



Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Katedra parazitologie

ZMĚNY GLOBÁLNÍ GENOVÉ EXPRESE V LIDSKÝCH
NEURÁLNÍCH BUŇKÁCH PO INFEKCI VIREM KLÍŠŤOVÉ
ENCEFALITIDY

Magisterská diplomová práce

Bc. Hana Šťastná

Vedoucí práce: RNDr. Daniel Růžek, Ph.D.

Školitel specialista: Prof. RNDr. Libor Grubhoffer CSc.

České Budějovice, květen 2009

Změny globální genové exprese v lidských neurálních buňkách po infekci virem klíšťové encefalitidy. [Changes in global gene expression in human neural cells following tick-borne encephalitis virus infection. Msc. Thesis, in Czech] 82 p.

Annotation:

Our study was focused on the effect of tick-borne encephalitis virus infection on global gene expression in two human neural cell lines (neuroblastoma and glioblastoma). Changes of gene expression were determined using microarray approach. We identified several genes with up-or down-regulated expression in neural cells following the infection. The changes in expression of some of them were similar in both cell lines, other exhibited different pattern.

Tato práce byla financována granty:

Grantová Agentura České republiky: 524/08/1509

Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy České republiky: MSM 6007665801, LC 06009

Prohlašuji, že předkládanou diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

9. května 2009
v Českých Budějovicích

.....
Bc. Hana Šťastná

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla velmi poděkovat mým školitelům Prof. RNDr. Liborovi Grubhofferovi, CSc. a RNDr. Danielu Růžkovi, Ph.D. za poskytování cenných rad a všestrannou podporu a zázemí. Mé poděkování míří také ke všem členům Laboratoře molekulární biologie vektorů a patogenů, děkuji Vám za úžasnou pracovní atmosféru a příjemné společné chvíle, nejen v laboratoři. Mým blízkým, zvláště pak rodičům a příteli, děkuji za podporu a pochopení jak ve chvílích nadšení, tak i zoufalství. Zvláštní dík, patří všem, kteří se tím vším, co následuje, zvládli prokousat a poradit.

Za spolupráci, bez které by tato práce nemohla vzniknout, bych chtěla vyjádřit svůj dík společnosti Central European Biosystems, obzvláště Mgr. Zbyňku Halbhuberovi, PhD. Dále pak zaměstnancům z Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně, zejména Ing. Janu Vernerovi, PhD. za užitečnou instruktáž práce se softwafem MeV.

Obsah:

1. ÚVOD.....	1
1.1. VIRUS KLÍŠŤOVÉ ENCEFALITIDY.....	1
1.1.1 čeleď <i>Flaviviridae</i>	1
1.1.2 Klíště obecné (<i>Ixodes ricinus</i>).....	1
1.1.3 Stavba virionu.....	2
1.1.4 Průběh onemocnění.....	4
1.1.5 Subtypy.....	6
1.1.6 Patogeneze.....	6
1.1.7 Replikační cyklus v hostitelské buňce	8
1.2 IMUNITNÍ ODPOVĚĎ ORGANISMU NA INFEKCI	11
1.2.1 Interferon.....	11
1.2.2 Prezentace antigenu.....	13
1.2.3 Apoptóza	15
2. CÍLE PRÁCE.....	17
3. MATERIÁL A METODY	18
3.1. BUNĚČNÉ LINIE	18
3.2. VIRUS	18
3.3. PLAKOVÁ TITRACE.....	18
3.4. DYNAMIKA REPLIKACE VIRU KLÍŠŤOVÉ ENCEFALITIDY <i>IN VITRO</i>	19
3.5. INFEKCE BUNĚČNÝCH KULTUR PRO MIKROČIPOVOU ANALÝZU.....	19
3.6. IZOLACE RNA	20
3.8. MIKROČIPOVÁ ANALÝZA	21
3.8.1. Lineární amplifikace RNA.....	21
3.8.2. Značení	22
3.8.3. Promytí a prehybridizace.....	22
3.8.4. Hybridizace	23
3.8.5. Skenování a normalizace.....	23
3.8.6. Vyhodnocení a statistické zpracování mikročipových dat	23
3.9. REAL-TIME RT-PCR.....	24
3.9.1. Reverzní transkripce (RT-PCR)	25
3.9.2. Real-time PCR	25
3.9.3. Primery	26
3.9.4. Real-time RT-PCR reakce	27

3.9.5. Kontrola vhodnosti <i>HPRT1</i> genu jakožto interní kontroly.....	28
3.9.6. Kvantifikace	28
3.9.7. Kalibrační křivky	29
3.11. STATISTICKÁ VYHODNOCENÍ.....	29
4. VÝSLEDKY	30
4.1. DYNAMIKA REPLIKACE VIRU KLÍŠŤOVÉ ENCEFALITIDY <i>IN VITRO</i>	30
4.2. SPOLEČNÁ ODPOVĚĎ GLIO A NEURO NA INFEKCI VKE	31
4.2.1. RNA modifikace	32
4.2.2. Povrchové molekuly.....	33
4.2.3. Proteosyntéza.....	33
4.2.4. Cytoskelet	34
4.2.5. Membránové struktury.....	35
4.2.6. Metabolismus.....	36
4.3. ROZDÍLNÁ ODPOVĚĎ GLIO A NEURO NA INFEKCI VKE	37
4.3.1. GENY SE SIGNIFIKANTNĚ VYŠŠÍ EXPRESÍ V NEURO	38
4.3.2. GENY SE SIGNIFIKANTNĚ VYŠŠÍ EXPRESÍ V GLIO	40
4.3.2.1. Morfogeneze	41
4.3.2.2. Imunitní odpověď	42
4.3.2.3. Antigen prezentující dráhy	43
4.3.2.4. Apoptóza	45
4.4. REAL-TIME PCR	47
4.4.1. Kontrola vhodnosti <i>HPRT1</i> genu jakožto interní kontroly.....	47
4.4.2. Kalibrační křivky	48
4.4.3. KVANTIFIKACE.....	50
5. DISKUSE	51
SPOLEČNÁ ODPOVĚĎ GLIO A NEURO NA INFEKCI VKE.....	52
ROZDÍLNÁ ODPOVĚĎ GLIO A NEURO NA INFEKCI VKE	54
REAL-TIME PCR.....	59
6. SHRUTÍ	61
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	62
8 LITERATURA.....	64

1. Úvod

Onemocnění klíšťovou encefalitidou (KE) bylo klinicky popsáno již roku 1931 v Rakousku (Schneider, 1931). Původce četných encefalitid sezónního rázu byl odhalen v letech 1937-39 expedicí pátrající po původu infekce centrálního systému v Sovětském svazu (Zilber, 1939). V Evropě byl virus poprvé izolován v roce 1949 v tehdejší Československu (Rampas *et al.*, 1949). V současnosti se onemocnění způsobené virem klíšťové encefalitidy (VKE) vyskytuje od Japonska, přes Čínu a Rusko, až po většinu zemí východní, střední a západní Evropy. Případy výskytu KE byly zaznamenány i v řadě jihoevropských států a ve Skandinávii. (Dumpis *et al.*, 1999). Celosvětově bývá každý rok zaznamenáno přes 10 000 onemocnění (Kunz *et al.*, 2003). Na Českou republiku připadá každoročně 400-700 diagnostikovaných případů onemocnění (EpiDat-databáze Státního zdravotního ústavu v Praze).

1.1. Virus klíšťové encefalitidy

1.1.1 čeleď Flaviviridae

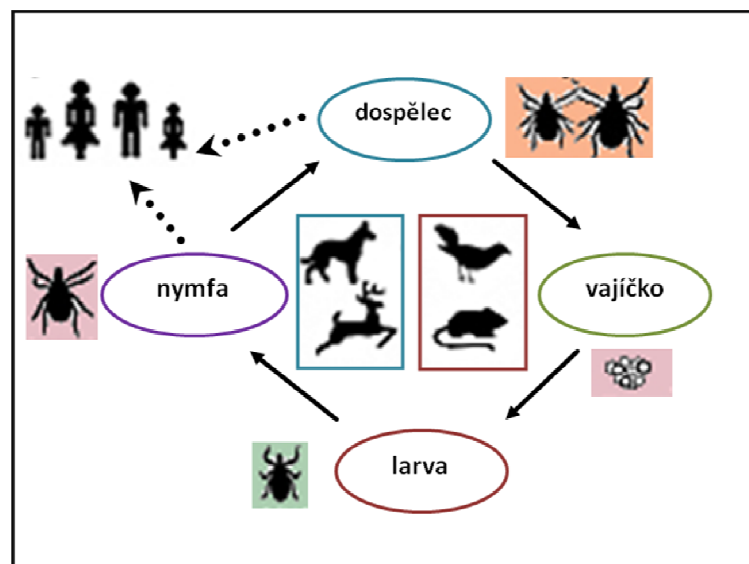
Virus klíšťové encefalitidy se řadí do rodu *Flavivirus* čeledi *Flaviviridae* (Thiel *et al.*, 2005). Tato čeleď zahrnuje více než sedmdesát zástupců (Lindenbach *et al.*, 2007). V rámci rodu *Flavivirus* rozlišujeme tři skupiny. První z nich je skupina komáry přenášených flavivirů, do které patří například virus žluté zimnice, viry dengue, virus Japonské encefalitidy a také virus západního Nilu. Do další skupiny bez známého přenašeče jsou řazeny kupříkladu viry Modoc a Rio Bravo. Poslední skupinou jsou klíšťaty přenášené flaviviry zahrnující např. virus Langat, virus vrtivky, virus Omské hemoragické horečky či virus Kyasanurského lesa. Mezi nimi patří virus klíšťové encefalitidy k těm nejzávažnějším (Gaunt *et al.* 2001).

1.1.2 Klíště obecné (*Ixodes ricinus*)

Přenašeči viru klíšťové encefalitidy jsou klíšťata čeledi *Ixodidae* (kmen *Arthropoda*, podkmen *Chelicerata*, třída *Arachnida*, řád *Acarina*, nadčeleď *Ixodoidea*). Klíště obecné (*Ixodes ricinus*) je hlavním vektorem VKE na našem území a slouží také jako jeden z jeho rezervoárů v přírodě (Kožuch *et al.*, 1990). Při přenosu viremickém, klíště saje na hostiteli, který právě prochází akutní infekcí, virus je tak nasáván společně s viremickou krví hostitele (Hardy *et al.*, 1983). Druhou alternativou je přenos pomocí tzv. „cofeedingu“, ke kterému dochází při současném sání infikovaného klíštěte v blízkosti klíštěte neinfikovaného.

V takovém případě dochází k přenosu viru bez probíhající virémie u hostitele (Jones *et al.*, 1987, Labuda *et al.*, 1993a,b). Přenos „cofeedingem“ je možný i na imunním hostiteli, který má proti VKE protilátky (Labuda *et al.*, 1997). Virus se také může přenášet mezi generacemi a to pomocí transovariálního přenosu, jehož účinnost je ovšem velmi nízká, přibližně 0,5%. V nakažených členovcích se virus pomnoží a přežívá v jejich těle i při metamorfóze (tzv. transstadiální přenos), klíště tedy zůstává infikované po celý zbytek života. Prevalence VKE v klíšťatech se pohybuje mezi 0,5-5% (Süss a Schrader, 2004).

Životní cyklus tohoto členovce sestává z několika vývojových stádií. Z vajíčka se líhne larva, která se svléká v nymfu a ta následně metamorfuje na dospělého. Pro přeměnu v další stádium je nezbytné nasátí, které trvá nepřetržitě po dobu několika dní (doba sání se liší u jednotlivých vývojových stádií). Klíště *Ixodes ricinus* představuje tedy o trojhostitelský druh, jehož životní cyklus se odehrává v rozmezí 2-6 let (Süss, 2003). Klíště obecné má široké rozmezí hostitelů zahrnující drobné hlodavce, ptáky, ale i ještěrky a velké savce a plazy. Člověk, možný hostitel všech tří vývojových stádií, není stálým článkem tohoto koloběhu, k jeho infekci dochází většinou náhodně při vstupu do ohniska cirkulace viru. Obrázek 1.1 ilustruje koloběh viru klíšťové encefalitidy v přírodě.

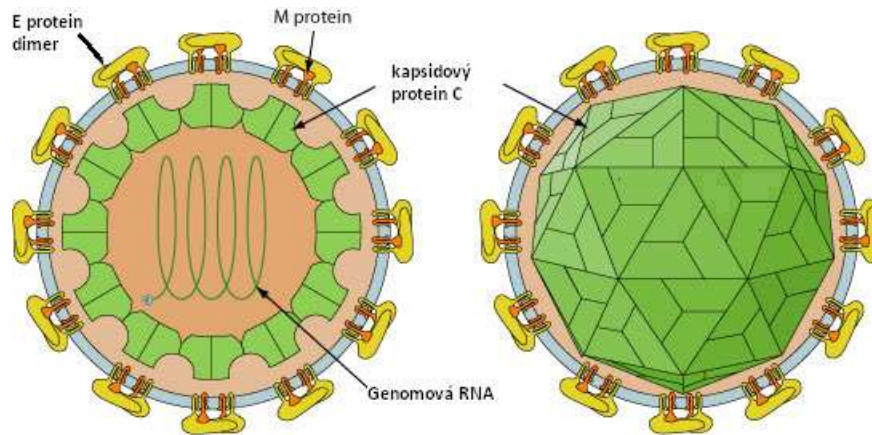


Obr 1.1 Cirkulace evropského subtypu VKE v přírodě. Upraveno dle Grešíkové a Kaluzové (1997).

1.1.3 Stavba virionu

Virion VKE je oválná částice obalená lipidickou membránou (Obr.1.2). Ve své membráně nese povrchový glykoprotein E (envelope) a protein M (membrane). Protein E je

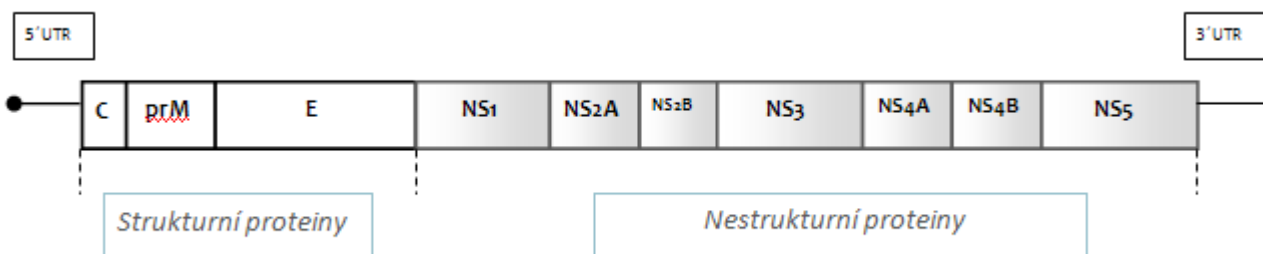
zásadní pro přichycení viru k buněčnému receptoru a pro vstup do cílové buňky. Je také hlavním antigenem, vůči kterému si organismus při infekci tvoří protilátky. Protein M, respektive jeho štěpení z prekursoru prM na M sehrává důležitou úlohu při virové maturaci. Pod lipidickou membránou se skrývá kapsida ikosaedrální symetrie tvořená malým bazickým kapsidovým proteinem C (capsid).



Obr. 1.2 Schéma viru klíšťové encefalidity. Převzato z ExPASy Proteomics Server, Viral Zone (www.expasy.ch/viralzone/all_by_species/24.html).

Genomem viru klíšťové encefalidity je jednovláknová RNA pozitivní polarity (~11kb), která v jediném otevřeném čtecím rámci kóduje rozsáhlý polyprotein. Ten je jak buněčnými, tak také virovými proteázami štěpen na tři strukturální proteiny, již zmíněné E, prM (prekursor proteinu M), C a sedm nestrukturních proteinů NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B a NS5 (Obr.1.3) (Gritsun *et al.*, 2003a). Nestrukturní proteiny se významnou měrou podílejí na virové replikaci v buňce. Jejich funkce jsou shrnuty v tabulce (Tab 1.1).

Obr. 1.3 Schéma struktury genomu čeledi Flaviviridae, upraveno dle Leyssen (2000).



Tab. 1.1 Nestrukturní proteiny VKE (Lindenbach *et al.*, 2007; Gritsun *et al.*, 2003a)

PROTEIN	FUNKCE
NS1	- intracelulární lokalizace v místě RNA replikace - integrován do buněčné membrány či sekretován ven z buňky (indukce protektivní imunity)
NS2A	- asociován s membránami - interaguje s komponentami replikace NS3 a NS5 - kandidát pro přesun od replikace k balení virové RNA
NS2B	- kofaktor v NS2B/NS3 serinové proteáze - asociován s membránami
NS3	- helikáza v komplexu s NS5 - serinová proteáza v komplexu s NS2B - RNA trifosfatázová aktivita
NS4A	- možná role při RNA replikaci - orientace polyproteinu
NS4B	- kolokalizace s NS3 v místech membranózních struktur, o kterých se předpokládá, že jsou místy RNA replikace - orientace polyproteinu
NS5	- RNA dependentní RNA polymeráza - methyl transferáza

Virová RNA je na obou koncích obklopena nekódujícími oblastmi, tzv. UTR (untranslated region), na 5'konci s methylguanositovou čepičkou nezbytnou pro iniciaci translace virové genetické informace. 3'UTR hraje zásadní roli ve virové replikaci (Markoff, 2003) a skládá se ze dvou rozdílných oblastí – variabilního a konzervovaného úseku (Gritsun, 2003a; Wallner, 1995). 3' úsek nekódující oblasti tvoří složitou sekundární strukturu, která má pravděpodobně důležitou úlohu při replikaci genomu, translaci a balení virové nukleové kyseliny do kapsidy (Gritsun, 2003a).

1.1.4 Průběh onemocnění

Onemocnění klíšťovou encefalitidou se klinicky projevuje po 7-14 dnech inkubační doby a má obvykle dvoufázový průběh. V první fázi se objevují nespecifické příznaky podobné chřipkovému onemocnění, které zahrnují horečku, bolesti hlavy, bolest svalů, únavu a malátnost. V druhé fázi, která nastává u 20-30% pacientů, se rozvinou neurologické příznaky s různou mírou závažnosti, které vyústí v meningeální, meningoencefalickou, poliomyelitickou či polyradikuloneuritickou formu onemocnění (Gritsun, 2003a).

Meningeální forma – silné bolesti hlavy a nevolnost, častá je též fotofobie, příznaky trvají 1-2 týdny s postupným zotavováním (Gritsun, 2003a)

Meningoencefalická forma – méně častá, ale závažnější forma onemocnění s poškozením CNS. Příznaky zahrnují kupříkladu slabost, ospalost, halucinace až bezvědomí, hemiparézy a hemiplegie, zpomalení srdeční frekvence (bradykardie), bradykinesie (zpomalené pohyby). U této formy nemoci přetrvávají často trvalé následky a zotavování je velmi pomalé.

Poliomyelitická forma – vyčerpanost, stahy svalů, pocit slabosti, necitlivost v jedné z končetin, která se později rozvine v paralýzu. Po třech až čtyřech dnech se přidává ztuhlost krku, ramen a horních končetin trvající několik týdnů až měsíců, po dvou až třech týdnech nastupuje atrofie svalů. Tato forma onemocnění je závažná s velmi pomalým zotavováním.

Polyradikuloneuritická forma – projevuje se bolestmi a poškozením periferních nervů. První fázi (3-7 dnů) doprovází horečky, nespavost, zvracení, bolest svalů. V další fázi nejprve horečka ustoupí, poté opět nastupuje. Dochází k poškození CNS spolu s meningeálními a lokálními neurologickými příznaky. Zotavení bývá většinou kompletní (Avšič-Županc *et al.*, 1995).

Chronická forma – tento průběh onemocnění bývá spojován s infekcí kmene spadajícími do sibiřského subtypu VKE. Symptomy rozvíjející se po nástupu onemocnění se postupně zhoršují během měsíců až let (Gritsun *et al.*, 2003b).

Po překonání vlastního klinicky manifestního onemocnění se 35 až 58 % pacientů potýká s trvalými následky onemocnění (Haglund a Günter, 1997). Prodělání onemocnění KE může vyústit v dlouhodobé dysfunkce v rámci CNS, zejména kognitivního rázu, a doba rekonvalescence může být velmi dlouhá (Čižnam *et al.*, 1999). V Rakousku byly u 10% až 20% pacientů se závažným průběhem KE zaznamenány následky neuro-psychiatrického rázu, jako prudké bolesti hlavy, závratě, potíže s udržením pozornosti, deprese, poruchy autonomního nervstva, postižení sluchu či náladovost (Mamoli *et al.*, 1990).

Kromě tradiční cesty nákazy prostřednictvím klíštěcího přenašeče jsou možné i další způsoby nákazy. Méně časté jsou případy perorální infekce po požití nepasterovaného mléka (kozího, ovčího, kravského) či mléčných výrobků. Bylo to například roku 1951 při epidemii v Rožňavě, která zasáhla 600 lidí, kdy propukla klíšťová encefalitida s poněkud mírnějším průběhem (Blaškovič, 1954, Grešíková a Kaluzová, 1997), Případy perorální nákazy se vyskytují avšak i v současnosti (Daneš, 2000). Před zahájením ochranného očkování se

příležitostně objevovaly nákazy VKE v laboratorním prostředí (Galia *et al.*, 1949), po vdechnutí kontaminovaného aerosolu či po zranění kontaminovanou injekční jehlou.

Incidence onemocnění KE u lidí má v průběhu roku dvě hlavní maxima, která úzce souvisí se sezónní dynamikou aktivity jednotlivých stádií klíšťat v přírodě (Korenberg, 2000). Tato maxima spadají na květen-červen a září-říjen (Blaškovič, 1967). Lidské infekce mají většinou bezpříznakový průběh (Luňáčková *et al.*, 2003).

1.1.5 Subtypy

Ecker *et al.* (1999) na základě srovnávacích analýz sekvencí 16 různých izolátů VKE navrhli rozdělení rodu do tří subtypů: na subtyp evropský, jehož hlavním přenašečem je klíště obecné (*Ixodes ricinus*), subtyp sibiřský a dálnovýchodní, které jsou přenášeny převážně klíštětem tajgovým (*I. persulcatus*) (Ecker *et al.*, 1999, Heinz *et al.*, 2000). Jednotlivé subtypy se kromě geografického rozšíření a hlavního vektora liší i průběhem onemocnění. Nejzávažnější je v případě infekcí způsobených kmeny náležícími do subtypu dálnovýchodního, kdy propukají těžké meningoencefalitidy či polyencefalitidy končící fatálně v 20-60% případů (Gritsun *et al.*, 2003a). U sibiřského subtypu probíhá akutní fáze mírněji, spíše jako neparalytická horečnatá forma, avšak se sklonem k chronicitě. Infekce způsobené zástupci sibiřského subtypu mají za následek smrt pacienta v 6-8% případů (Gritsun *et al.*, 2003a). Průběh infekce evropským subtypem je obvykle dvoufázový, mírný. Onemocnění končí smrtí pouze v 0,5-5% případů (Dumpis *et al.*, 1999; Grešíková a Kaluzová, 1997). Není ovšem zcela zřejmé, jestli rozdílná procenta úmrtnosti na kmeny VKE náležící do různých subtypů jsou způsobena rozdílnou virulencí subtypů VKE cirkulujících v těchto oblastech, či zda jsou důsledkem rozdílů v diagnostice, definici klinického případu či úrovni lékařské péče (Mandl, 2005).

1.1.6 Patogeneze

VKE vstupuje do hostitelského organismu v místě přísátí klíštěte společně se slinami vylučovanými do rány. Právě sliny klíštěti umožňují a usnadňují sání. Virus se nejprve replikuje v podkoží a ve spádových lymfatických uzlinách (Albrecht, 1968). Transport do spádových uzlin není prozatím jednoznačně objasněn, avšak zásadní úlohu v něm nejspíše hrají Langerhansovy buňky kůže (Labuda *et al.*, 1996). Z uzlin se virus dostává do krevního oběhu a spolu s krví do tkání a orgánů celého těla a působí tak systémovou infekci s následnou sekundární virémií (Mandl, 2005). V souvislosti s neuropatogenezí a obecnou charakteristikou biologických neurotropních virů se rozlišují dva termíny. Neuroinvazivita,

což je schopnost viru vstoupit do centrálního nervového systému (CNS) a souvisí se schopností viru pomnožit se v periferní tkáni a dosáhnout vysoké virémie. Naopak neurovirulence označuje schopnost viru množit se a způsobovat poškození přímo v CNS (Mandl, 2005; McMinn, 1997). U přirozených hostitelů v přírodě virus nepůsobí symptomatické onemocnění. U řady obratlovců ovšem VKE působí neuropatogenně, překonává hematoencefalickou bariéru a invaduje do CNS.

Vysoká hladina virémie je nezbytná pro virovou invazi mozku (Mandl, 2005). Přesný mechanismus vstupu do CNS a překonání hematoencefalické bariéry (BBB) není znám, existují však tři pravděpodobné cesty. Transport infikovanými leukocyty, které po zvýšení exprese adherentních molekul na endoteliálních buňkách prostupují do mozku transcytózou. Virus také může využívat přímý vstup po zvýšení permeability hematoencefalické bariéry či transcytózu přes endoteliální buňky. Další možností je retrográdní transport po axonech přes periferní nervový systém. Tato varianta byla popsána u příbuzných virů encefalitidy St. Louis, viru západního Nilu či u australské encefalitidy. Šlo o šíření z čichového nervu po periferní inokulaci a následný „vlnový“ transport z rostrální do kaudální části mozku (King *et al.*, 2007).

V mozku jsou primárním cílem viru neurony, ke kterým vykazuje VKE selektivní tropismus (Gelpi *et al.*, 2005). Byla ovšem zaznamenána i infekce jiných buněčných typů, např. gliálních buněk (Mázló a Szántó, 1978). Imunohistochemickou analýzou lidských mozků *post mortem* byl antigen VKE nejčastěji lokalizován v předních rožích míšních, prodloužené míše, mostu a mozečku, žíhaném tělese (*corpus striatum*) včetně *dentate nucleus* (největší mozečkové jádro) a mozkové kůře (Gelpi *et al.*, 2005). S infekcí CNS jsou spojeny také histopatologické a zánětlivé změny. Jde zejména o perivaskulární buněčné infiltráty, nekrózy, úbytek neuronů neurophagií či tvorbu nodulů z gliálních buněk v místech degenerujících lézí (Solomon *et al.*, 2007). Poškození a smrt nervových buněk může být způsobena vlastní virovou replikací, ale také virem indukovanou zánětlivou reakcí anebo kombinací obojího (Chambers a Diamond, 2003). Výrazné zánětlivé infiltráty většinou sestávají z T lymfocytů, makrofágů/mikroglíí, naopak B lymfocyty bývají přítomny jen zřídka (Gelpi *et al.*, 2005). Cytotoxické T lymfocyty, které bývají v úzkém kontaktu s membránami nakažených neuronů (Gelpi *et al.*, 2005), hrají pravděpodobně důležitou úlohu v imunopatologii onemocnění (Růžek *et al.*, 2009a). Narozdíl od CD4+ T lymfocytů, které zmírňují průběh KE, CD8+ T lymfocyty naopak zřejmě přispívají k rychlejšímu průběhu, rozvoji encefalitidy a vyšší mortalitě (Růžek *et al.*, 2009a).

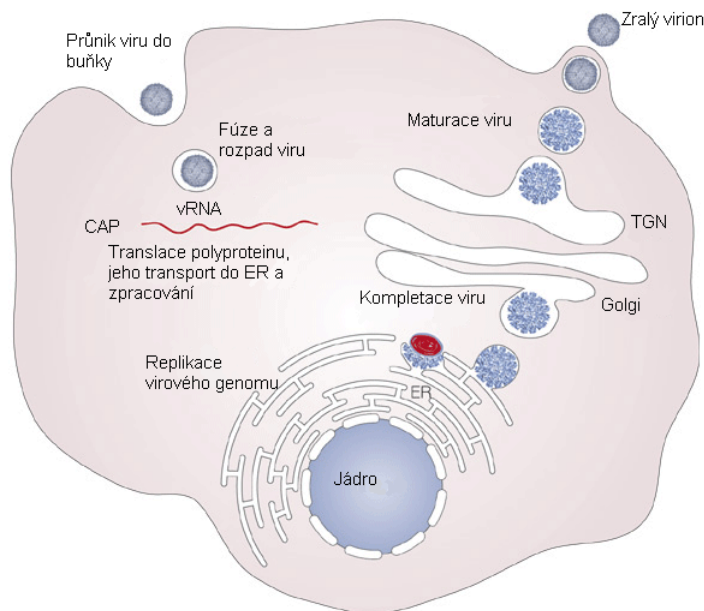
1.1.7 Replikační cyklus v hostitelské buňce

Po nalezení cílové buňky se virus váže pomocí proteinu E na příslušný virový receptor. Ten v případě viru klíšťové encefalitidy nebyl doposud jednoznačně identifikován. Široký buněčný tropismus flavivirů naznačuje, že tyto viry buď ke vstupu do buňky využívají řadu druhů různých receptorů anebo jediný „univerzální“ receptor, který je ovšem přítomen na širokém spektru buněk a to savčích i členovčích (King *et al.*, 2007). Doposud bylo u flavivirů identifikováno několik kandidátních proteinů jak na savčích, tak na klíštěcích buňkách, které ovšem nebyly dále charakterizovány (Kopecký, 1999; Martinez-Barragan a del Angel, 2001; Ramos-Castaneda *et al.*, 1997). U viru dengue slouží jako receptor povrchový ligand buněk DC-SIGN (CD209) (Tasseneetrithep *et al.*, 2003).

Zdá se, že důležitou úlohu při vazbě VKE na buňku hrají glukosaminoglykany. Pasážování VKE v buněčné kultuře (BHK-21) zvyšovalo afinitu virového E proteinu k heparan sulfátu na povrchu buněk a tento proces adaptace šel ruku v ruce s atenuací viru (Mandl *et al.*, 2001). Je ovšem dosti pravděpodobné, že proces vazby na hostitelskou buňku zahrnuje více než jeden typ hostitelské receptorové molekuly (Mandl, 2005).

Vstup do buňky probíhá procesem receptorem zprostředkované endocytózy (Chu a Ng, 2004). Nízké pH v endosomu spouští reorganizaci receptorového proteinu E z dimerů na trimery, která umožní splynutí virové membrány s membránou váčku a uvolnění nukleokapsidy do cytoplazmy. Po jejím rozpadu slouží virová RNA jako templát pro translaci virových proteinů. Vznikající polyprotein je translokován do lumen endoplazmatického retikula (ER) a je štěpen jak virovými, tak také buněčnými proteázami (Chambers *et al.*, 1990). Pro replikaci virového genomu musí nejprve vzniknout negativní vlákno RNA, které slouží jako templát pro syntézu kopií pozitivní polarity, které jsou následně proteinem C obalovány do nově vznikajících virových partikulí. Virová replikace se odehrává v membranózních strukturách přidružených k ER, do jehož lumen nukleokapsida pučí (Lindquist *et Vapalahti*, 2008). Pučením získává nukleokapsida svůj lipidový obal s již integrovanými proteiny E a prM. Takto vzniklé nezralé viriony obsahují protein prM a protein E uspořádané do heterodimerů. PrM funguje jako chaperon napomáhající správnému sbalení proteinu E. Viriony jsou transportovány sekretorickou dráhou ven z buňky. Virus maturuje díky štěpení prM buněčnou proteázou furinem v kyselých váčcích trans-Golgiho aparátu. Štěpení prM umožňuje reorganizaci proteinu E do formy homodimeru. Zralé, plně infekční, viriony jsou uvolněny z buňky fúzí transportních vezikulů s plazmatickou membránou

hostitelské buňky. Virová částice tak může infikovat další cílovou buňku (Mandl, 2005). Schéma replikace flavivirů je zobrazeno na obrázku (Obr. 1.4).



Obr. 1.4 Replikace Flavivirů. Převzato z A structural perspective of the flavivirus life cycle Mukhopadhyay *et al.*, 2005.

Obecně byly u flavivirů popsány dva způsoby maturace (Hase *et al.*, 1989). U *trans* typu maturace dochází k sestavování virionů v drsném endoplazmatickém retikulu a je spojeno s membranózními strukturami. K uvolnění virionů pak dochází sekretorickou cestou hostitelské buňky. Tento způsob je u flavivirů nejčastější a byl mimo jiné popsána u virů japonské encefalitidy, viru Kunjin a dengue-2 - novoguinejského kmene C (Hase *et al.*, 1987a, Ng, 1987, Sriurairatna *et al.*, 1973). V případě *cis* typu maturace dochází ke kompletování virionů v cytoplasmě. Cestou uvolňování z buňky je pak pučení přes plazmatickou membránu nebo membránu vakuol. Stejným způsobem probíhá maturace u viru dengue-2 a viru západního Nilu (Hase *et al.*, 1987b, Ng *et al.*, 2001).

U viru VKE byly popsány oba typy maturace a to v závislosti na hostitelských buňkách. Maturace typu *cis* byla pozorována při jeho množení v klíštěcích buňkách, zatímco v buňkách savčích probíhala maturace viru typem *trans* (Šenigl *et al.*, 2006).

V neurálních buňkách, které byly použity v této práci, byla provedena studie morfologických změn následkem virové infekce VKE. Do studie byly zahrnuty buněčné linie odvozené z lidských nádorů neuroblastomu, meduloblastomu a glioblastomu (NEURO, GLIO, MEDULO), dvě ze zmíněných linií byly použity též v této práci pro studium změn

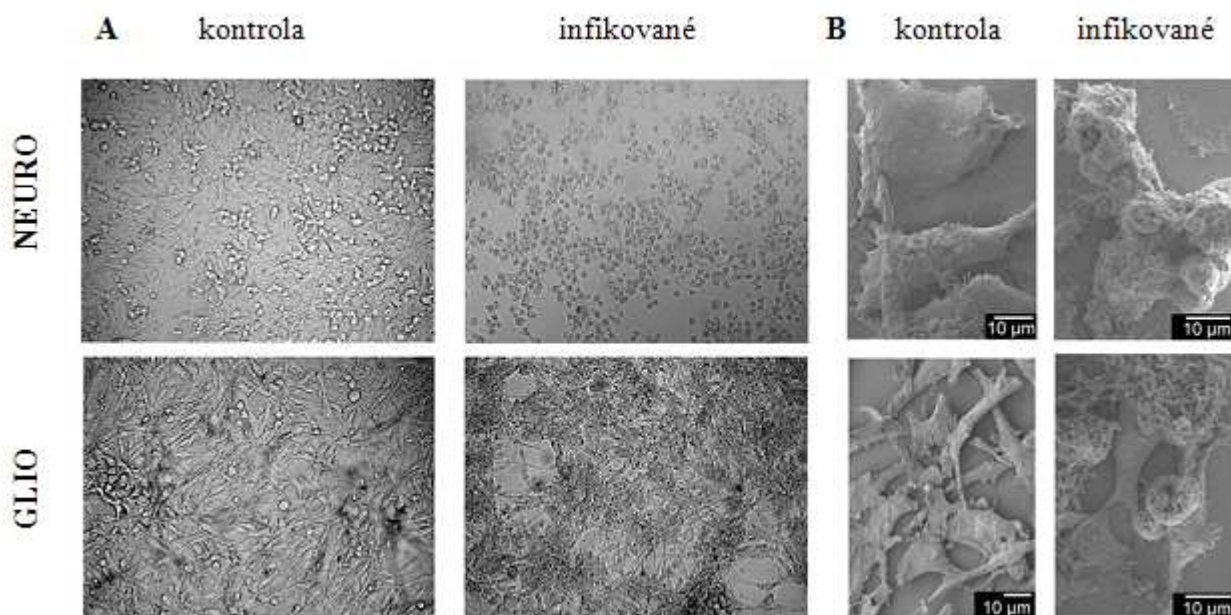
genové exprese po infekci VKE. Všechny tři linie byly vysoce citlivé k infekci VKE, kmenem Hypr. Produkce viru v těchto buňkách byla vysoká (10^7 až 10^9 PFU/ml), což představuje sto až desettisíckrát vyšší množství, než v buňkách extraneurálního původu (např. PS) Infekce ve studovaných buňkách se projevila již po 48 hodinách infekce výrazným cytopatickým efektem. U linie NEURO byl však tento efekt mnohem výraznější než u zbylých dvou linií. Buňky se zakulacovaly, shlukovaly a uvolňovaly od dna kultivační lahve (Růžek *et al.*, 2009b). Cytopatický efekt způsobený infekcí VKE je ilustrován na obrázku 1.5.

Pomocí transmisní elektronové mikroskopie byly sledovány ultrastrukturní změny, které virová replikace v buňkách vyvolala. U MEDULO a GLIO byla infekce spojena s morfologickými změnami, proliferací membranózních struktur, např. tvorba hladkých membranózních struktur uvnitř cisteren hrubého endoplazmatického retikula. Zvětšení Golgiho aparátu a nepravidelnosti ve struktuře a velikosti mitochondrií. Viriony bylo možno nelézt ve výrazně zvětšených cisternách ER (Růžek *et al.*, 2009b).

Odpověď u NEURO se lišila od dvou předešlých. Infekce tu probíhala nejvíce dramaticky. Nedochovalo k proliferaci membranózních struktur. Viriony se nalézaly jak v rozšířených cisternách endoplazmatického retikula, tak ale také volně v cytoplazmě, často asociované s mikrotubulárními strukturami. Hladké membranózní struktury uvnitř ER se vyskytovaly pouze vzácně (Růžek *et al.*, 2009b).

Ultrastrukturně byly u části buněk všech tří linií pozorovány známky apoptózy (kondenzace, marginace a fragmentace chromatinu) či nekrózy. Množství nekrotických buněk ovšem převažovalo (Růžek *et al.*, 2009b). Podobně pomocí TUNEL analýzy (terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP-biotin nick-end labelling), která naznačí buňky, kde došlo k apoptotickému štěpení DNA chromozomů byla zaznamenána apoptotická smrt v důsledku infekce u asi 20% infikovaných buněk.

Následkem virové infekce došlo společně se změnou tvaru buněk také ke změnám v uspořádání mikrotubulů. V buňkách došlo k výraznému narušení tubulinové sítě, která byla částečně degradována, v některých oblastech, zejména s velmi intenzivní virovou replikací, byla tubulinová síť utvářena velmi hustě (Růžek *et al.*, 2009b).



Obr. 1.5 Cytopatický efekt způsobený množením VKE v NEURO a GLIO buněčných liniích. **A** světelná mikroskopie, **B** skenovací elektronová mikroskopie. Převzato z Růžek *et al.*, 2009b.

1.2 Imunitní odpověď organismu na infekci

1.2.1 Interferon

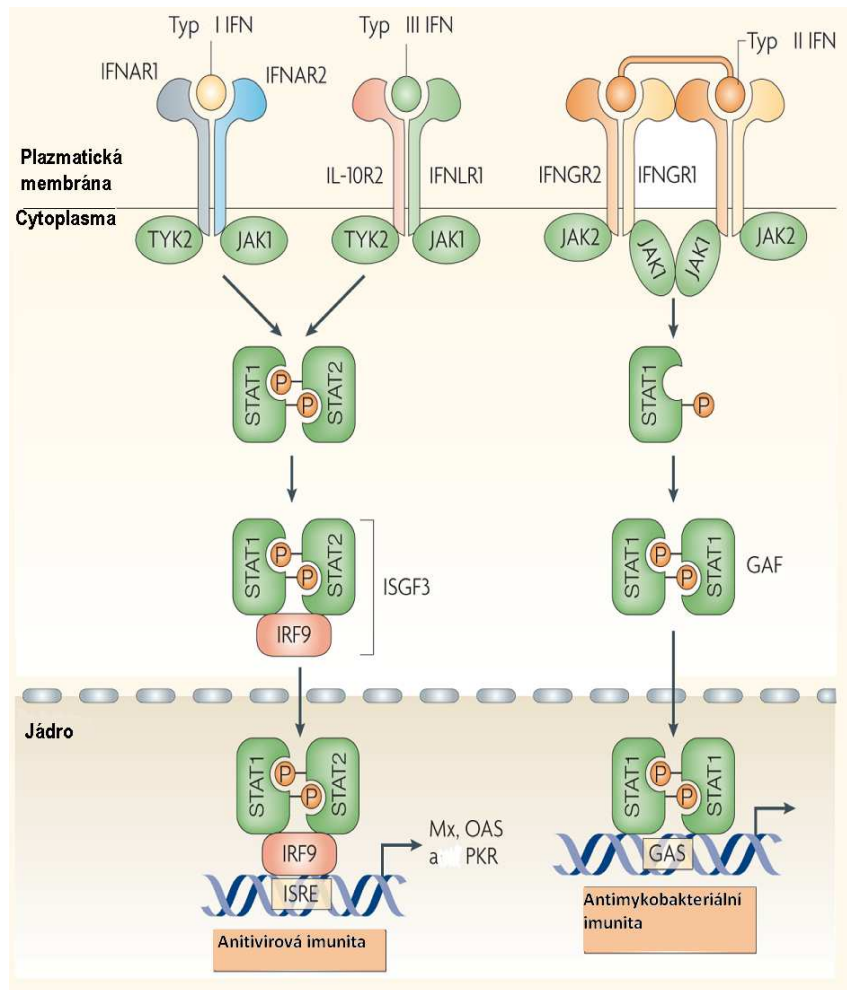
Nejčasnější imunitní odpověď hostitele na virovou infekci je nespecifická a zahrnuje, kromě jiných cytokinů, indukci produkce interferonů (Lobigs *et al.*, 2003). Jde o multifunkční sekretované proteiny, které na základě rozdílné antigenní struktury, buněk které je produkují a aktivit dělíme na interferony prvního typu (IFN I) a interferony typu druhého (IFN II). V buňkách navozují tzv. protivirový stav, kdy po navázání na typově specifické receptory spouštějí kaskádu signalizačních drah (Jak/STAT), které následně ústí v transkripci cílových genů. Oba typy IFN omezují či blokují virovou replikaci, zpomalují růst cílových buněk a činí je více náchylné k apoptóze. V neposlední řadě také svými imunomodulačními účinky stimulují specifickou imunitní odpověď (Goodbourn *et al.*, 2000). Škály genů, jež mohou být v reakci na interferonový stimul obou typů spuštěny se do značné míry překrývají (Stark *et al.*, 1998).

Interferony prvního typu zahrnují dva sérologicky odlišné typy proteinů, z nichž každý typ je kódován samostatnou skupinou genů IFN α a IFN β . Obě skupiny se váží na shodný receptor a ve výsledku vyvolávají transkripci stejné skupiny genů (Goodbourn *et al.*, 2000). Jejich efekt na buňky se projevuje v několika oblastech. Spouští Jak/STAT signalizaci, která

zahrnuje formování STAT1/ STAT2 heterodimeru a jeho translokaci do jádra. Zde se tento heterodimer asociuje s IRF9 (interferon stimulated regulatory factor 9) a vzniká trimer, který je znám pod názvem ISGF3. Tento faktor se váže na regulační sekvenci DNA, zvanou ISRE (cis-acting interferon response element), Aktivace vyústí v transkripci řady genů zodpovědných za navození antivirového stavu, označovaných jako ISG (interferon stimulated genes). Produkty těchto genů zahrnují jak další regulační faktory, tak proteiny s přímým protivirovým účinkem, jako jsou PKR (protein kináza R), MX1 protein či OAS (enzym 2'-5' oligoadenylát syntetáza). Dalšími účinky IFN jsou inhibice proliferace buněk, stimulace aktivity NK buněk a zvyšují expresi MHC I molekul, zatímco expresi MHC II inhibují. (Buc, 2001).

Na myším modelu byla studována vnímavost k flavivirovým infekcím. Jedním z hlavních faktorů hrajících úlohu v genetické náchylnosti či rezistenci vůči flavivirům se ukázala být právě 2'-5'oligoadenylát syntetáza (OAS), gen aktivovaný interferonovou odpovědí a zásadní účastník vrozené protivirové imunity (Mashimo *et al.*, 2002). Substrátem pro tento enzym je dvouvláknová RNA (dsRNA) na kterou připojí několik oligomerů ATP. Tato dsRNA je následně rozpoznávána RNázou L, která poté tyto RNA (ať již buněčného anebo cizorodého původu) degraduje (Randal a Godbourn, 2008). Nicméně úloha OAS genu v souvislosti s flavivirovou infekcí u lidí potřebuje další zkoumání, neboť mezi myšimi a lidskými genovými klastry existují odlišnosti (Chambers a Diamond, 2003).

K interferonům druhého typu patří interferon γ . Hlavními producenty, poté co rozpoznají infikovanou buňku, jsou T lymfocyty a NK buňky (angl. natural killer) (Lobigs *et al.*, 2003). Receptor se také skládá ze dvou řetězců, ale liší se od receptoru pro interferony typu I (Buc, 2001). Aktivuje odlišnou signální kaskádu, která zahrnuje formaci STAT homodimeru, který je též označován jako GAF (gamma- activated factor). Jeho navázání na genomickou regulační sekvenci GAS a stimuluje transkripci odlišných genů než v případě IFN I (Goodbourn *et al.*, 2000). IFN γ ovlivňuje především funkci makrofágů, NK buněk a T lymfocytů, zvyšuje expresi jak molekul MHC I, tak i MHC II a aktivuje endotelové buňky cév pro usnadnění adheze lymfocytů k cévní stěně (Buc, 2001).



Obr. 1.6 Signální dráhy spouštěné jednotlivými typy IFN. Upraveho dle Sadler a Williams, 2008.

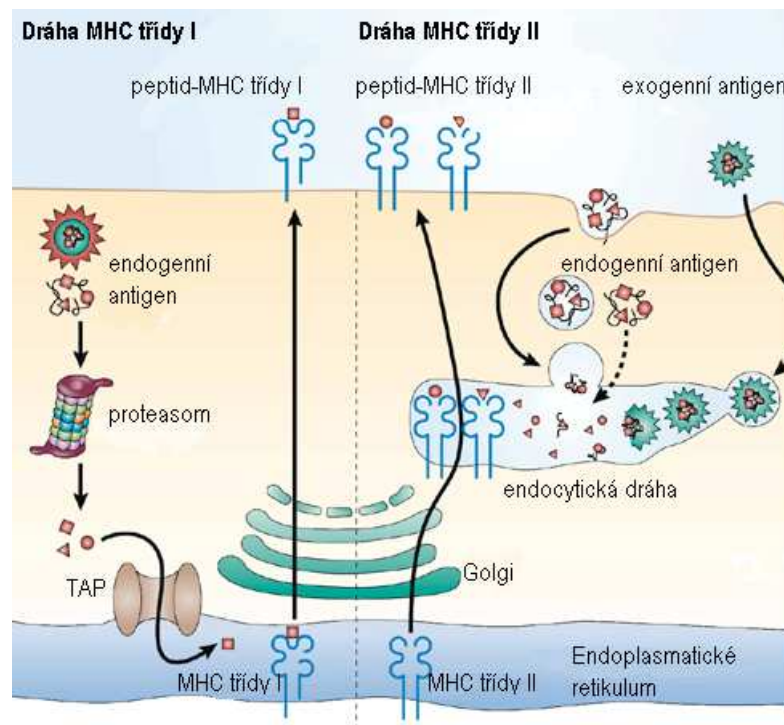
1.2.2 Prezentace antigenu

Molekuly MHC (major histocompatibility complex) jsou glykoproteiny prezentované na povrchu buněk, které na vazebném místě nesou krátké peptidové fragmenty proteinů produkovaných anebo pohlcených buňkou. Rozlišujeme dva hlavní typy MHC molekul MHC typ I (MHC I) jsou přítomny na povrchu všech buněk, typ II (MHC II) se vyskytuje pouze na specializovaných antigen prezentujících buňkách, jako jsou makrofágy, monocyty, dendritické buňky anebo buňky gliové (Hořejší *et* Bartůňková, 2001).

MHC I se skládají z transmembránového řetězce α a nekovalentě asociovaného β 2-mikroglobulinu. Vazebné místo pro prezentované peptidy je v rýze mezi dvěma doménami MHC I (Hořejší *et* Bartůňková, 2001) a tyto peptidy jsou endogenního původu, odvozené převážně z defektních produktů ribozomální translace (Schubert *et al.*, 2000). MHC I molekuly se formují v lumen, proto je nezbytné přemístit prezentované fragmenty z cytosolu

dovnitř ER. Klíčovým transportérem, který zastává tuto funkci je protein TAP (transporter associated with antigen processing) (Abele *et* Tampe, 1999). Zformované komplexy MHC I jsou ve vesikulech transportovány přes Golgiho aparát až na povrch buňky (Spiliotis *et al.*, 2000). MHC I prezentují své antigeny převážně specifickým CD8+ T lymfocytům, které monitorují povrchové MHC I molekuly a eliminují infikované buňky (Cresswell, 1994).

MHC II se skládají ze dvou asociovaných podjednotek (α a β), vazebné místo pro antigen je na rozhraní těchto dvou podjednotek. Na molekulách MHC II, vznikajících v endoplazmatickém retikulu, je vazebné místo blokováno invariantním řetězcem, který zabraňuje navázání buněčných peptidů či peptidů z endogenních drah. Tyto komplexy procházejí běžnou sekreční dráhou a váčky odštěpené z Golgiho aparátu fúzí s endozomem, který obsahuje degradované proteiny. Invariantní řetězec je rozštěpen a do uvolněného vazebného místa se mohou vázat peptidy pocházející z endocytovaných proteinů (Hořejší *et* Bartůňková, 2001). Tento komplex prezentuje antigeny převážně CD4+ T pomocným lymfocytům, které následně zprostředkovávají stimulační signály pro další imunitní reakce buněčné či protilátkové odpovědi. (Cresswell, 1994).



Obr 1.7 Prezentace antigenů komplexy MHC I a MHC II. Upraveno dle Villadangos a Schanorrer, 2007.

1.2.3 Apoptóza

Apoptóza je aktivní proces buněčné sebedestrukce doprovázené výraznými morfologickými a biochemickými změnami. Indukce apoptózy zahrnuje aktivaci intracelulárního signalizačního systému (Courageot *et al.*, 2003). Apoptotický proces může být rozdělen do tří fází. Fáze iniciační, kdy buňka dostane signál, který může aktivovat apoptotickou kaskádu; fázi „výkonnou“, což je okamžik, kdy se obdržený signál stává nevratným a fází degradace, ve které buňky vykazují biochemické a morfologické známky poslední fáze apoptózy (Hengartner, 2000).

V iniciační fázi buňka obdrží stimul, který může být tvořen přímo, či nepřímo, zprostředkovaný receptorem. Těchto signálů může být celá škála, od spuštění IFN I signalizační dráhy v důsledku odpovědi na mikrobiální/virovou infekci nebo obdržení signálu přes tzv. „death receptory“ kterými jsou například receptory Fas a TNF (tumor necrosis factor). Apoptóza může být spuštěna také faktorem p53, který může započít indukovanou buněčnou smrt v důsledku nějaké vnitrobuněčné poruchy, jako je poškození DNA nebo nedostatek metabolitů. V případě závažného poškození funkce endoplazmatického retikula (ER stres) může vycházet signál pro započítí apoptózy odsud, následně bývá aktivován transkripční faktor NF- κ B. Na závěr ještě zmíním další častou možnost a ta je spojena s mitochondriemi, signálem pro indukci programované buněčné smrti může být porušení jejího elektrochemického gradientu (Courageot *et al.*, 2003).

V exekuční fázi hraje klíčovou roli mitochondrie. Četné apoptotické stimuly vyvolávají změny v propustnosti vnější mitochondriální membrány a kolaps transmembránového potenciálu. To vše vyústí v uvolnění mitochondriálních apoptózu-podporujících molekul do cytosolu, například cytochromu c (Desagher *et Marinou*, 2000). Kaspázy (cysteinové proteázy) jsou ústřední vykonavatelé apoptózy. Jsou produkovány ve formě neaktivních prokaspáz a různorodé specifické iniciační apoptotické signály indukují jejich štěpení na aktivní enzymy. Kaspázy tvoří propojenou signalizační dráhu, ve které mohou být rozděleny na kaspázy iniciační (kaspázy 2, 8 a 9) a efektorové (např. kaspázy 3, 6, 7)(Green *et Kroemer*, 1998).

V degradační fázi efektorové kaspázy štěpí klíčové vnitrobuněčné substráty, což vyústí v morfologické a biochemické změny spojenými s apoptózou. Mimo jiné dochází kondenzaci chromatinu a k aktivaci DNAázy, která degraduje chromozomální DNA (Degen *et al.*, 2000).

Různí zástupci rodu *Flavivirus* jsou schopni indukovat apoptózu. Děje se tak rozdílnými cestami působením jak strukturních (E protein viru Langat (Prihod'ko *et al.*, 2001), M protein viru dengue (Cateau *et al.*, 2003) tak nestrukturních (NS3 protein viru Langat (Prihod'ko *et al.*, 2002), NS3 protein viru západního Nilu (Ramanathan *et al.*, 2005)) virových proteinů. Viry Dengue-2 a Japonské encefalitidy jsou schopny zabránit časné apoptotické smrti spuštěním signální dráhy PI3K/Akt (Lee *et al.*, 2005). Proces apoptózy byl zaznamenán také v případě VKE (Isaeva *et al.*, 1998; Růžek *et al.*, 2009b), avšak o mechanismu jakým k ní dochází, není prozatím známo nic.

2. Cíle práce

- Stanovení replikačních křivek viru klíšťové encefalitidy ve vybraných lidských buněčných liniích neurálního původu.
- Sledování změny exprese vybraných genů souvisejících se základními fyziologickými a patofyziologickými procesy následkem infekce buňky virem KE.
- Interpretace získaných dat vzhledem k průběhu patogeneze klíšťové encefalitidy u hostitele.

3. Materiál a metody

3.1. Buněčné linie

Pro sledování změn genové exprese byly použity dvě buněčné linie odvozené z lidských buněk neurálního původu poskytnuté Prof.MUDr. Tomášem Eckschlagerem, CSc. (2. lékařská fakulta UK a Fakultní nemocnice v Motole, Praha).

Neuroblastomová buněčná linie **UKF-NB4** (NEURO) byla získána z metastází lidského neuroblastomu do kostní dřeně (Cinatl *et al.*, 1990). Neuroblastom je jeden z nejčastějších dětských extrakraniálních nádorů a vzniká z buněk sympatického nervového systému.

Glioblastomová buněčná linie (GLIO) byla odvozena z nádoru nezralých podpůrných buněk mozku. Glioblastom je považován za nejčastější a nejagresivnější typ primárního mozkového tumoru u dospělých.

Buňky neurálního původu byly kultivovány v médiu IMDM (PAA) s přídavkem 10% BOFES, 1% glutaminu a 1% směsi antibiotik a antimykotik (Sigma; penicilin, streptomycin, amphotericin B) při 37°C. Pasáže byly prováděny metodou suché trypsinizace.

K účelu plakové titrace byla použita buněčná linie **PS** odvozená z buněk prasečí ledviny (Inoue *et al.*, 1962, Kožuch *et Mayer*, 1975). Pro kultivaci při teplotě 37°C bylo použito médium L15 (Sigma) s přídavkem 3% PTS, 1% antibiotik a antimykotik (Sigma; penicilin, streptomycin, amphotericin B) a 1% glutaminu. Pasáže byly prováděny suchou trypsinizací.

3.2. Virus

K infekci lidských neurálních buněk byl použit prototypový kmen evropského subtypu VKE a to kmen Neudoerfl. Tento kmen byl izolován v roce 1971 v Rakousku z klíštěte *Ixodes ricinus* (Mandl *et al.*, 1988). Virus je uchováván ve formě 20% mozkové suspenze při -70°C, a jedná se o čtvrtou pasáž viru v mozku sajících myšek.

3.3. Plaková titrace

Titry VKE vyjádřené v tzv. plakotvorných jednotkách (PFU, plaque forming units) byly stanovovány metodou plakové titrace (de Madrid *et Porterfield*, 1969). Testované vzorky byly v kultivačním médiu ředěny desítkovou ředící řadou. Do každé z jamek 24 jamkového panelu bylo přidáno 300 μ l buněčné suspenze PS buněk v množství $1,2 \times 10^5$ buněk na jamku (koncentrace 4×10^5 buněk/ml). Buňky byly inkubovány při 37 °C v atmosféře 0,5 % CO₂. Po

4 hodinách, kdy již došlo k adhezi, byly buňky převrstveny 400 μ l přelivu (1,5% karboxymethylcelulóza a 2x koncentrované kultivační médium v poměru 1:1). Panely byly inkubovány po dobu 5 dní při 37 °C v prostředí 0,5% CO₂. K vizualizaci plaků, po promytí fyziologickým roztokem (9 g NaCl na 1l H₂O), byl použit roztok naftalenové černě (1 g naftalenové černě, 60 ml ledové kyseliny octové, 13,6 g octanu sodného, doplněno do 1 l H₂O). Tento roztok obarví pouze živé buňky, čímž se zviditelní virem lyzovaná ložiska, která se nám jeví jako plaky.

3.4. Dynamika replikace viru klíšťové encefalitidy *in vitro*

Dynamika množení viru klíšťové encefalitidy ve studovaných liniích NEURO a GLIO byla určena metodou plakové titrace. Buněčná suspenze o koncentraci 5×10^4 buněk/jamku byla kultivována v objemu 200 μ l v jamkách 96-ti jamkového panelu přes noc při 37°C v atmosféře 0,5% CO₂. Následující den byly buňky infikovány I.D. (infekční dávka) 1 MOI (multiplicity of infection, multiplicita infekce) suspenzí VKE, kmenem Neudoerfl. Po 2 hodinové inkubaci bylo veškeré médium odebráno, buňky byly jednou promyty v PBS a poté bylo do jamek přidáno 200 μ l čerstvého kultivačního média. Vzorky supernatantu, triplikace pro každý časový interval, byly odebírány v časném stádiu infekce v intervalech 2, 8, 15, 25 hodin a dále v časových intervalech 1, 2, 3, 5 a 7 dní. Do vlastního stanovení titru viru byly vzorky uloženy při -70°C. Množství viru v odebraném supernatantu bylo stanovováno plakovou titrací.

3.5. Infekce buněčných kultur pro mikročipovou analýzu

Infekce buněčných kultur pro mikročipové studie byly prováděny v kultivačních lahvích. Pro porovnání změn genové exprese byly použity vždy dvě kultury získané rozdělením jedné kultivační lahve. Buněčné kultury byly infikovány ve stádiu asi 90% konfluence, 2-3 dny po zpasážování. Z kultur bylo odebráno kultivační médium a bylo nahrazeno buď roztokem virové mozkové suspenze kmene Neudoerfl (I.D. 1 MOI) v kultivačním médiu anebo médiem samotným. Adsorbce viru probíhala v malém objemu (3ml) po dobu 1-2 hodin při teplotě 37°C. Poté bylo infekční médium nahrazeno čerstvým kultivačním médiem. Totální buněčná RNA (totRNA) byla izolována 3-4 dny po infekci, v závislosti na rozvoji cytopatického efektu.

3.6. Izolace RNA

totRNA z neurálních buněk byla izolována v okamžiku pokročilého cytopatického efektu. Pro izolaci totRNA byly použity současně buňky přisedlé na dně kultivační nádoby i buňky volně plovoucí v médiu. Adherované buňky byly uvolněny pomocí suché trypsinizace a resuspendovány v malém množství čerstvého média, které bylo následně smícháno s původním kultivačním médiem. Malé množství média bylo odebráno pro stanovení titru viru v kulturách a pro vyloučení přítomnosti viru v kontrolních kultivačních lahvích. Buněčná suspenze byla centrifugována (300g, 5 min, 4°C) a supernatant byl opatrně odebrán. Z takto získaného peletu byla izolována totRNA za použití RNeasy Mini Kitu (Qiagen) v souladu s pokyny výrobce s následujícími modifikacemi postupu. Buněčný lyzát byl homogenizován opakovaným (6x) nabíráním a vypouštěním přes 20G jehlu (průměr 0,9 mm). Pro dokonalé odstranění veškerého ethanolu obsaženého v pufru RPE, byla kolonka dodatečně vysušena centrifugací při 8000g po dobu 1 minuty. Kvůli zajištění maximálního výtěžku byla totRNA z membrány kolonky eluována dvakrát, nejprve 30-40 µl RNase-free vody, podruhé za použití prvního eluátu.

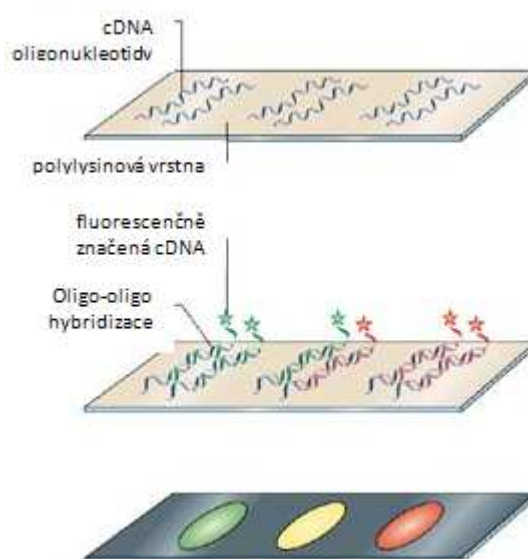
3.7. Kontrola kvality RNA

Koncentrace vyizolované totRNA byla stanovena na spektrofotometru Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific). Integrita RNA byla ověřována na přístroji Bioanalyzer 2100 (Agilent). Míra integrity RNA (RNA integrity number, RIN) se pohybovala nad hodnotou 9,0, čímž byly splněny kvalitativní parametry pro mikrčipovou analýzu (minimální požadovaná hodnota pro použití pro mikročipovou analýzu je 8,0).

3.8. Mikročipová analýza

Mikročipová analýza je robustní analytická metoda, která umožňuje současnou analýzu exprese velkého množství genů (Schena *et al.*, 1995). Na konkrétní místa (spoty) na nosném podkladu jsou navázány DNA oligonukleotidy komplementární ke specifickým cílovým sekvencím DNA či RNA, jejichž množství ve vzorku má být kvantifikováno. Současné technologie umožňují nanesení těchto sond na podklad (sklíčko) ve vysokém počtu a hustotě. Princip metody je zobrazen na následujícím obrázku (Obr 3.8.1). Paralelní genová analýza pomocí mikročipů poskytuje rychlou a efektivní metodu pro zkoumání lidských genů ve velkém měřítku (Schena *et al.*, 1996). Tato technologie má širokou škálu uplatnění. V našem případě byla využita pro porovnání exprese mRNA mezi dvěma skupinami, tj. buňkami infikovanými virem klíšťové encefalitidy a buňkami kontrolními a to u dvou linií lidských neurálních buněk.

Pro sledování změn genové exprese byly použity mikročipy Human OneArray 4.2 firmy PhalanxBiotech,. Tyto čipy obsahují 30968 specifických genomových sond a 1082 experimentálních kontrolních sond. Pro každou skupinu (GLIO a NEURO) bylo zhotoveno 8 opakování mikročipové analýzy.

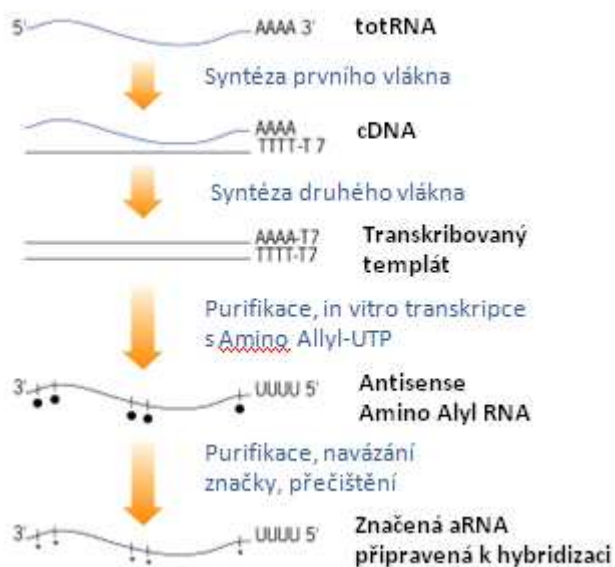


Obr. 3.8.1 Princip cDNA mikročipové analýzy. Obrázek převzat a modifikován z Bunka a Stockley, 2006.

3.8.1. Lineární amplifikace RNA

Vzorky RNA (1 μ g totRNA) byly amplifikovány pomocí Amino Allyl MessageAmp II aRNA Amplification Kitu (Ambion). Jedná se o modifikovanou *in vitro* transkripci za použití oligo(dT) primeru nesoucího T7 promotor a reverzní transkriptázy ArrayScriptTM. Nejprve je k RNA syntetizováno druhé vlákno komplementární DNA (cDNA) s T7 oligo(dT) primerem.

Poté je transkripcí vytvořena antisense RNA (aRNA) s použitím nukleotidů modifikovaných aminoalyl přítomných v reakční směsi (aminoalyl-UTP).



Obr.3.8.2 Průběh amplifikace a značení vzorku. Převzato z www.ambion.com, Amino Allyl MessageAmp™ Procedure.

3.8.2. Značení

Pro nepřímé značení byly na modifikované nukleotidy navázány NHS (N-hydroxy-sukcino) estery fluorescenčních značek. Pro každou reakci bylo použito 25 µg aRNA. U vzorku kontrolního (aRNA z buněk neinfikovaných virem) byla použita barvička Cy3 (cyanin 3) (excitace ~550 nm, emise ~570 nm, zelená), u vzorků aRNA z VKE infikovaných buněk byl jako fluorescenční značka použit Cy5 infikovaného vzorku (excitace ~650 nm, emituje červeně ~670nm).

Potřebné množství aRNA bylo vysušeno ve vakuu a resuspendováno v 0,1M uhličitanovém pufru (pH 9,0). Po přidání Cy3 či Cy5 (rozpuštěné v DMSO) byly směsi inkubovány 30 minut při pokojové teplotě. Posléze byla reakce zastavena přidáním 4 M hydroxylaminu a přečištěna od nenavázaných barviček.

3.8.3. Promytí a prehybridizace

Skříčka pro hybridizaci vzorku byla předehřata ve vodní lázni na 60°C po dobu 10 minut. Poté byla propláchnuta ve 25 ml 100% etanolu, nejprve 15 sekund v klidu a poté 20 s třepána. Následně byla skříčka opláchnuta ddH₂O od zbylého ethanolu. Ve 25 ml předehřátého prehybridizačního pufru (25 ml; 5X SSPE*, 0,1% SDS (sodium dodecyl sulfát), 1% BSA(hovězí sérový albumin)), byla skříčka inkubována 2 hodiny při 42°C.

[* 20X koncentrovaný SSPE: 3M NaCl, 200mM sodium fosfát a 20mM EDTA, pH 7.4]

3.8.4. Hybridizace

Vzorky Cy3/Cy5 značené aRNA z obou porovnávaných skupin (kontrolní a infikovaná) v poměru 1:1 byly smíchány s hybridizačním pufrém HybIt 2 (Telechem) (směs aRNA: pufr , 1:4). Na sklíčko bylo nanášeno cca 40 µl směsi, která celkem obsahovala 3 µg aRNA z infikované kultury a 3 µg aRNA kontrolní. Pro vlastní hybridizaci byla použita hybridizační stanice MAUI (BioMicro). Vzorky byly hybridizovány při teplotě 42°C po dobu 16,5 hodiny.

Po hybridizaci byla sklíčka postupně promyta pufrů A, B, C (WBA, WBB, WBC; Telechem) se stoupající stringencí a dokonale osušena centrifugací.

3.8.5. Skenování a normalizace

Mikročipová sklíčka byla snímána skenerem InnoScan[®] 700 (Innopsys) s rozlišením 5 µm v obou detekčních kanálech, odečítajících vlnovou délku emitovanou Cy3 i Cy5 barvou. Získaný obraz byl analyzován pomocí softwaru Mapix[®] (Microarray Image Analysis Software, Innopsys). Následně bylo optimalizováno zarovnání mřížky a tak byly získány hodnoty fluorescence pro individuální body. Jednotlivé próby byly pomocí softwaru na sklíčku lokalizovány a identifikovány.

K získaným hodnotám byla přiřazena anotace a provedena „Lowess“ normalizace a „Per-chip“ normalizace na median, vše za využití softwaru GeneSpring GX 9 od firmy Agilent.

3.8.6. Vyhodnocení a statistické zpracování mikročipových dat

Ke statistickému vyhodnocení získaných expresních dat byl použit nástroj volně dostupné sady nástrojů TM4, a to program Multiple Experiment Viewer, verze MeV 4.3.02.

Ze získaných dat byly nejprve odfiltrovány nulové hodnoty pomocí 100% Percentage Cut-Off Filter. Následně bylo množství analyzovaných dat zredukováno pomocí nástroje Variance Cut-Off Filter. Z analýz bylo odstraněno 50% genů s největší směrodatnou odchylkou exprese.

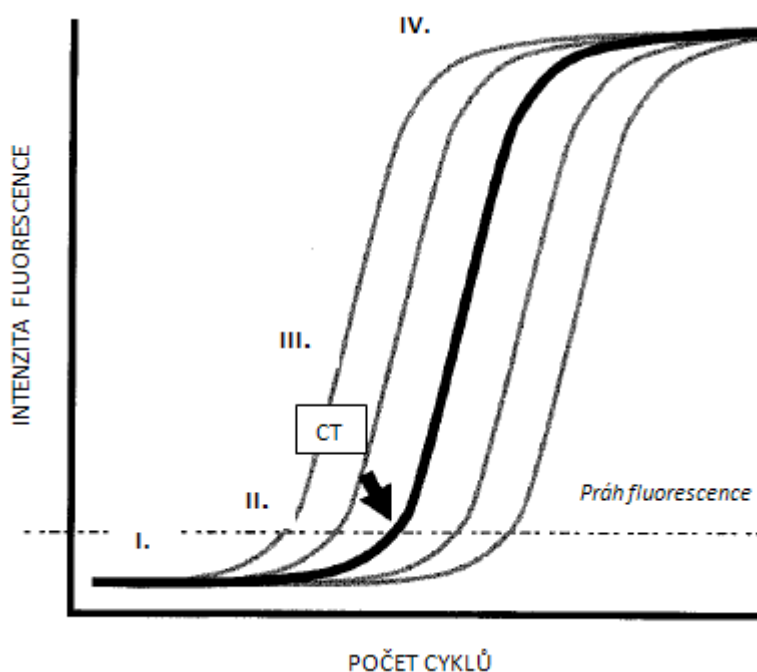
Pro zhodnocení statistické významnosti byla použita SAM analýza (Significance Analysis of Microarray) (Tusher *et al.*, 2001), která přiřazuje skóre každému genu na základě změny genové exprese v relativním poměru k směrodatné odchylce opakovaných měření. SAM používá permutace naměřených hodnot u jednotlivých genů k odhadu procenta genů, které by mohly být náhodně identifikovány jako signifikantní (tzv. false discovery rate, FDR), jde tedy o mnohonásobné testování. Hranice pro signifikantně změněnou expresi byla

nastavena tak, aby FDR nepřesáhl nulu. Byl použit jednoskupinový design (SAM one class), kdy byly hodnoty expresí testovány proti nule. Dále byly také porovnávány skupiny GLIO a NEURO mezi sebou, tedy dvouskupinový design (SAM two class unpaired).

Bioinformatická databáze DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/gene2gene.jsp>; Gene Functional Classification tool, DAVID Bioinformatics Resources 2008, NIAID/NIH), byla použita pro ucelené vyhodnocení genů, jejich funkční anotace a skupinové příslušenství. (Huang *et al.*, 2009; Dennis *et al.*, 2003)

3.9. Real-time RT-PCR

Real-time PCR je odvozena od polymerázové řetězové reakce. V reakci dochází zároveň s amplifikací i ke kvantifikaci cílové DNA a odpadá tedy nutnost analýzy vzorku po reakci. Pro detekci amplifikace se, kromě jiných přístupů (fluorescenčně značené primery či próby), využívají interkalační barviva, jako je např. SYBR Green I. Toto barvivo emituje fluorescenci úměrně množství templátu v reakci. Kvantifikace je pak umožněna díky faktu, že existuje přímá úměra mezi počátečním množstvím cílového templátu v reakci a cyklem, ve kterém začne exponenciálně narůstat fluorescence. Hodnota CT (treshold cycle) je bod, počet cyklů, kdy fluorescence v reakci dosáhne zvolené prahové hodnoty fluorescence. Průběh typické amplifikace real-time PCR, která má čtyři fáze, je zaznamenán na obrázku (Obr. 3.9.1).



Obr. 3.9.1 Průběh amplifikace real-time PCR. Jednotlivé fáze amplifikace I. skrytá, II. exponenciální, III. lineární, IV. fáze plató; CT – treshold cycle. Obrázek převzat a upraven podle Mackay *et al.*, 2002.

Amplifikaci specifického produktu si je možno ověřit na křivce tání (melting curve), která zaznamenává postupný pokles fluorescence v reakční směsi v závislosti na pozvolně se zvyšující teplotě. V místě kdy je dosažen bod tání (T_m) příslušného produktu je zaznamenán výrazný pokles fluorescence. V grafu závislosti změny fluorescence na změně teploty se projeví charakteristickým vrcholem křivky.

3.9.1. Reverzní transkripce (RT-PCR)

Za účelem kvantifikace mRNA pomocí semikvantitativní real-time RT-PCR byly vzorky totRNA, shodné s těmi, které byly použity pro mikročipovou analýzu, přepsány pomocí reverzní transkripce (RT). Pro RT byl použit First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas). Za účelem optimalizace metod a kontroly vhodnosti HPRT1 jako interní kontroly (tzv. housekeepingového genu) byl při RT použit 1 μ g totRNA. Pro potřebu kalibračních křivek byly použity 4 μ g totRNA jako vstupního materiálu RT. Pro kvantifikace exprese jednotlivých studovaných genů byly pro reverzní transkripci použity 2 μ g totRNA z každého vzorku. Reakce byla provedena ve dvojitěm objemu, tzn. objem všech reakčních komponent byl zdvojen a finální objem reakční směsi činil 40 μ l. Zároveň s reverzní transkripcí byla pokaždé připravena i kontrolní reakce, která obsahovala RNA a veškeré reagensie, ovšem bez reverzní transkriptázy.

RT byla prováděna v souladu s pokyny výrobce. Jako templátu bylo užito 1-4 μ g totRNA (viz výše) a primerem byly Oligo(dT)18 (10 μ M). Reakce probíhala ve třech krocích a finální koncentrace komponent reakce byly následující: 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 20 U inhibitoru RNáz RiboLock™, 1 mM směs nukleotidů. V posledním kroku bylo přidáno 200 U reverzní transkriptázy M-MuLV3.9.2. Real-time PCR

3.9.2. Real-time PCR

Pro ověření dat získaných mikročipovou analýzou bylo vybráno několik genů (viz Tab.3.9.2) pro kvantifikace mRNA pomocí specifické semikvantitativní real-time RT-PCR. Analýzy byly provedeny v termálním cykleru Rotor Gene 3000 (Corbett Research) a výsledky analýz byly zpracovány pomocí softwaru Rotor Gene 5.0 (Corbett Research).

Tab 3.9.2 Vybrané geny pro validaci změn genové exprese.

SYMBOL	NÁZEV GENU
BIRC7	Baculoviral IAP repeat-containing 7 (livin)
CEACAM8	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8
HPRT1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
IFI6	Interferon, alpha-inducible protein 6
IL23R	interleukin 23 receptor
MX1	Myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78
OAS1	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa
OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like
TAP1	Transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)
BIRC4BP (XAF1)	XIAP associated factor-1

3.9.3. Primery

Použité primery, jejichž sekvence a charakteristiky jsou shrnuty v Tab. 3.9.3, byly buď převzaty z literatury či byly navrženy ručně a za pomoci programu Vector NTI Suite, verze 5, kde byla ověřována tvorba homo- a hetero-dimerů. Kontrola specifičnosti primerů byla provedena v databázích Nucleotide BLAST a primer BLAST (server National Center for Biotechnology Information). Při navrhování byl brán zřetel, aby výsledný amplifikovaný produkt zasahoval alespoň do 2 různých exonů mRNA, čímž byla zajištěna amplifikace cDNA a ne možné zbytkové DNA. Primery byly navrhovány univerzálně, tak aby rozpoznávaly všechny známé transkripční varianty genu, které byly rozpoznány sondami na mikročipech.

Kvantifikace byla normalizována expresí genu interní kontroly HPRT (hypoxantin phosphoribosyltransferáza), který se v buňkách účastní syntézy purinů. Tento gen byl vybrán na základě pozitivních hodnocení, co do stability genové exprese a také vhodnosti pro použití v neurálních buňkách a mozku (Thellin et al., 1999; Vandesompele et al., 2002).

Tab 3.9.3 Použito primery

NÁZEV GENU	F/R	SEKVENCE	nt	Tm	PRODUK T	CITACE
BIRC7	F	5' ACCTAAAGACAGTGCCAAGTG 3'	22	49,7	346	
BIRC7	R	5' GCCTGTGTGGAAGAAGCCG 3'	19	50,3		
CEACAM8	F	5' GAGGTTCTTCTACTTGCCACA 3'	22	47,9	125	
CEACAM8	R	5' TGGGGTAATCTGTTGATTG 3'	20	53		

HPRT1	F	5' TGACACTGGCAAACAATGCA 3'	21	45,3	92	Vandesompele <i>et al.</i> , 2002
HPRT1	R	5' GGTCTTTTCCACCAGCAAGCT 3'	21	49,2		Vandesompele <i>et al.</i> , 2002
IFI6	F	5' GTAAGAAAAAGTGCTCGGAG 3'	20	44,6	260	
IFI6	R	5' ATTACCTATGACGACGCTGC 3'	20	46,7		
IL23R	F	5' TCAGTAGAGGAGGAAACCACC 3'	21	49,2	119	
IL23R	R	5' GGCAACTCCTCATTACGATC 3'	21	49,2		
ISG15	F	5' AGCGAACTCATCTTTGCCAG 3'	20	46,7	92	
ISG15	R	5' AGCATCTTCACCGTCAGGTC 3'	20	48,7		
MX1	F	5' CGACACGAGTTCACAAATG 3'	20	46,7	297	
MX1	R	5' AATTTGGACTTGGCGGTC 3'	20	44,6		
NCK2	F	5' GGGCGAGTTCACATTATTCC 3'	20	46,7	284	
NCK2	R	5' GGTGGTTCAGTATTGCTATCAG 3'	23	50,2		
OAS1	F	5' GTGTCCAAGGTGGTAAAGGG 3'	20	48,7	75	
OAS1	R	5' AACCAGGTCAGCGTCAGAT 3'	19	46		
OASL	F	5' AGCTGGAACGTGAAGAGGG 3'	19	48,1	314	
OASL	R	5' GCATAGGCGTAGCTCCAC 3'	19	50,3		
TAP1	F	5' TATGACACAGAGGTAGACGAGGC 3'	22	51,9	215	
TAP1	R	5' AGGTGCTGGGTGATGAGAAG 3'	20	48,7		
XAF1	F	5' CTAATCAACATCAGGAGAAATG 3'	23	44,8	131	
XAF1	R	5' GGAATGCCAGTGTTAAAAGTG 3'	21	45,3		

3.9.4. Real-time RT-PCR reakce

K reakcím real-time RT-PCR byla použita 2X koncentrovaná reakční směs qPCR 2x SYBR Master Mix (Top-Bio).

Složení real-time RT-PCR reakční směsi (celkový objem 25 μ l):

- templátová cDNA 1 μ l/reakci (výchozí koncentrace RNA pro RT jsou uvedeny v bodu 3.9.1)
- forward a reverse primer (viz. Tab.3.9.3)
(koncentrace optimalizovány v rozmezí 400, 300 a 200 nM v závislosti na konkrétním genu; pro amplifikaci kontrolního genu HPRT1 byla použita koncentrace 300nM)
- PCR H₂O
- finální koncentrace ostatních složek reakce: 10 mM Tris-HCl (pH 8,8), 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100, 1,5mM MgCl₂, 200 μ M směs dNTP, 0,625 U Taq DNA polymerázy, 19 nM monoklonální anti-Taq DNA Pol protilátky, SYBR Green I, stabilizátory a aditiva).

Optimalizované reakční podmínky pro gen HPRT1 jsou shrnuty v následující tabulce (Tab.3.9.4). Referenční gen byl ovšem účinně amplifikován při širokém rozmezí reakčních podmínek. Teploty nasedání primerů a délka trvání jednotlivých kroků reakce, za kterých byl gen HPRT1 amplifikován díky tomu mohly být individuálně upraveny tak, aby podmínky reakce vyhovovaly amplifikaci konkrétních studovaných genů. V případě samostatných reakcí (např. kontrola vhodnosti HPRT1) byly použity optimalizované podmínky pro HPRT1. Hladina fluorescence byla odečítána při teplotě vyšší, než je teplota elongace, optimální konkrétní geny, tak aby nebyla snímána fluorescence dimerů primerů a zároveň při teplotě nižší než T_m specifického produktu.

Tab.3.9.4 Optimalizované reakční podmínky pro real-time RT-PCR amplifikaci HPRT1.

	Denaturace	95°C	4 min
Cyklování (40x)	Denaturace	95°C	15 sec
	Nasedání primerů	58°C	7 sec
	Elongace	72°C	7 sec
	Odečet fluorescence	80°C	15 sec
	Křivka tání	60-99°C	45 sec první krok, 5 sec každý další

3.9.5. Kontrola vhodnosti HPRT1 genu jakožto interní kontroly

Vzorky pro analýzu vhodnosti genu HPRT1 jako interní kontroly pro real-time PCR analýzu byly získány dle 3.5 a 3.6. Množství mRNA kódující HPRT1 bylo stanoveno v triplicacích vzorků z každé skupiny (NEURO infikované/kontrolní, NEURO infikované/kontrolní) bylo stanoveno pomocí real-time RT-PCR. Přičemž složení reakční směsi bylo totožné jako v bodě 3.10.2., použit byl 1 μ l templátové cDNA. Reakční podmínky viz. Tab. Tab.3.9.3.

3.9.6. Kvantifikace

Jako metoda kvantifikace byl vybrán relativní kvantifikační model s korekcí účinnosti (reaction efficiency) real-time PCR reakce (Pfaffl, 2001). Při použití tohoto přístupu je zapotřebí stanovit průměrnou reakční účinnost každého z kvantifikovaných genů, která se odvozuje ze sklonu kalibrační křivky (CT/log koncentrace).

3.9.7. Kalibrační křivky

Pro účel kalibrační křivky byla připravena ředící řada pěti standardů cDNA o koncentracích 150, 100, 50, 25 a 12,5 ng/μl. Do každé reakce byl použit 1 μl templátové cDNA. Nejkoncentrovanější standard (150 ng/μl) byl používán pouze u transkriptů s velmi nízkou expresí.

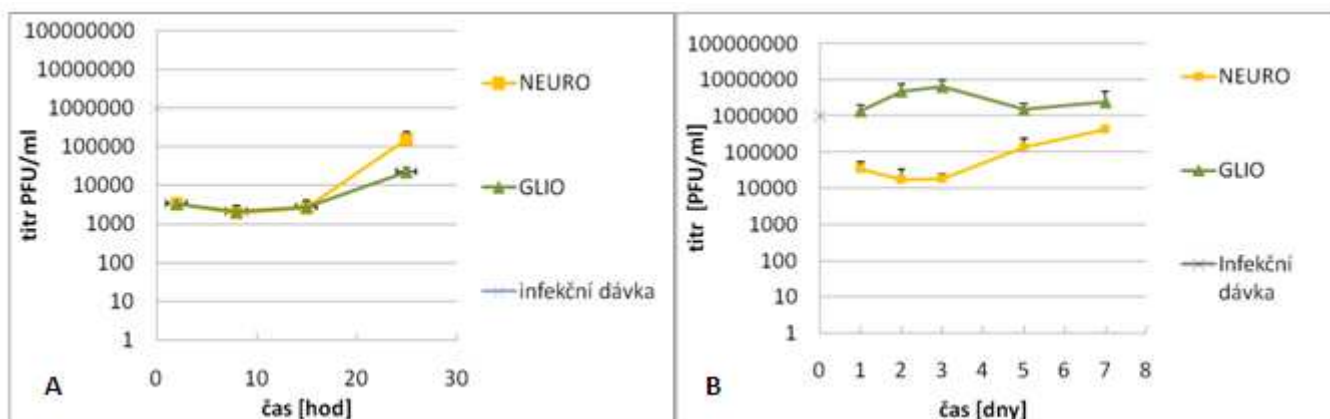
3.11. Statistická vyhodnocení

Statistická významnost výsledků byla vyhodnocována programem Statistica, verze 7., pomocí nezávislé analýzy podle skupin (Studentův T-test). Výsledky jejichž hladina významnosti **p** je menší než 5% byly považovány za signifikantní. Matematické výpočty průměrů a směrodatných odchylek byly provedeny v programu Microsoft® Office Excel® 2007.

4. Výsledky

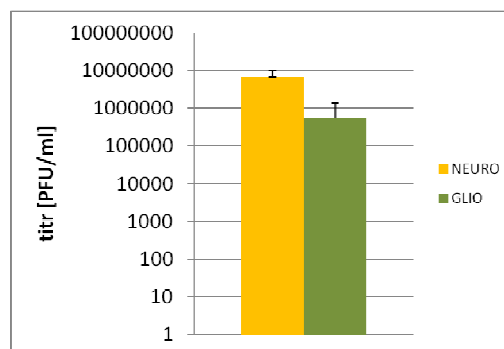
4.1. Dynamika replikace viru klíšťové encefalitidy *in vitro*

Buňky neurálního původu jsou citlivé k infekci virem klíšťové encefalitidy. Dynamika množení VKE *in vitro* byla sledována pomocí plakové titrace jak v časných (2, 8, 15, 25 hodin) tak také pokročilých (1, 2, 3, 5 a 7 dní) fázích infekce. K nárůstu titru VKE, kmen Neuroerfl, v kultivačním médiu docházelo v intervalu mezi 8 a 15 hodinami p.i., kdy se již uvolňovaly nově vzniklé viriony z buněk. (Obr 4.1.1 A). VKE se v neurálních buňkách replikuje efektivně, množství detekovaného viru v supernatantu kultur dosahuje titrů až 10^7 PFU/ml (Obr. 4.1.1 B). Vrchol produkce viru nastává u GLIO 2-3 dny po infekci (p.i.) (10^7 PFU/ml), v případě NEURO byl výrazný nárůst titru zaznamenán první den (10^5 PFU/ml) a od třetího dne množství VKE v supernatantu postupně narůstalo až k 10^6 PFU/ml sedmý den infekce.



Obr. 4.1.1 Dynamika replikace VKE kmene Neuroerfl v GLIO a NEURO buňkách. **A** časná intervaly infekce, **B** pozdější intervaly infekce; I.D. 1MOI.

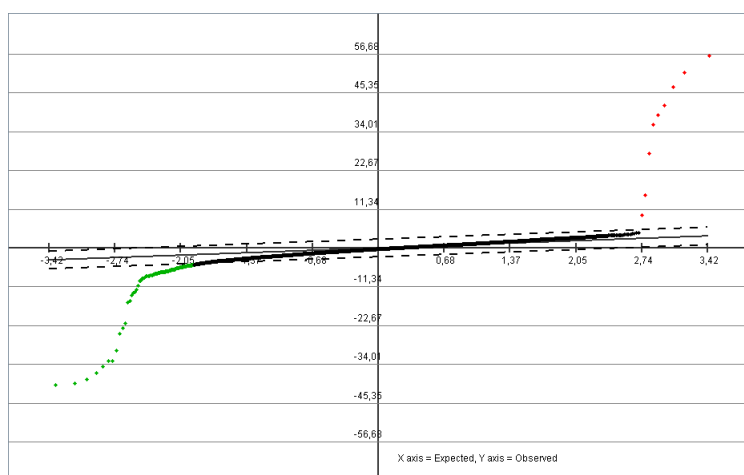
V rámci infekce buněčných kultur pro mikročipovou analýzu bylo stanovováno množství VKE v infikovaných vzorcích. V okamžiku izolace totRNA se zjištěný titer v kultivačním médiu dosahoval hodnot přibližně 10^6 PFU/ml v případě GLIO a 10^7 PFU/ml u NEURO buněk (Obr 4.1.2).



Obr. 4.1.2 Titry VKE, kmen Neuroerfl v médiu buněčných kultur v okamžik izolace totRNA pro mikročipovou analýzu. I.D. 1 MOI.

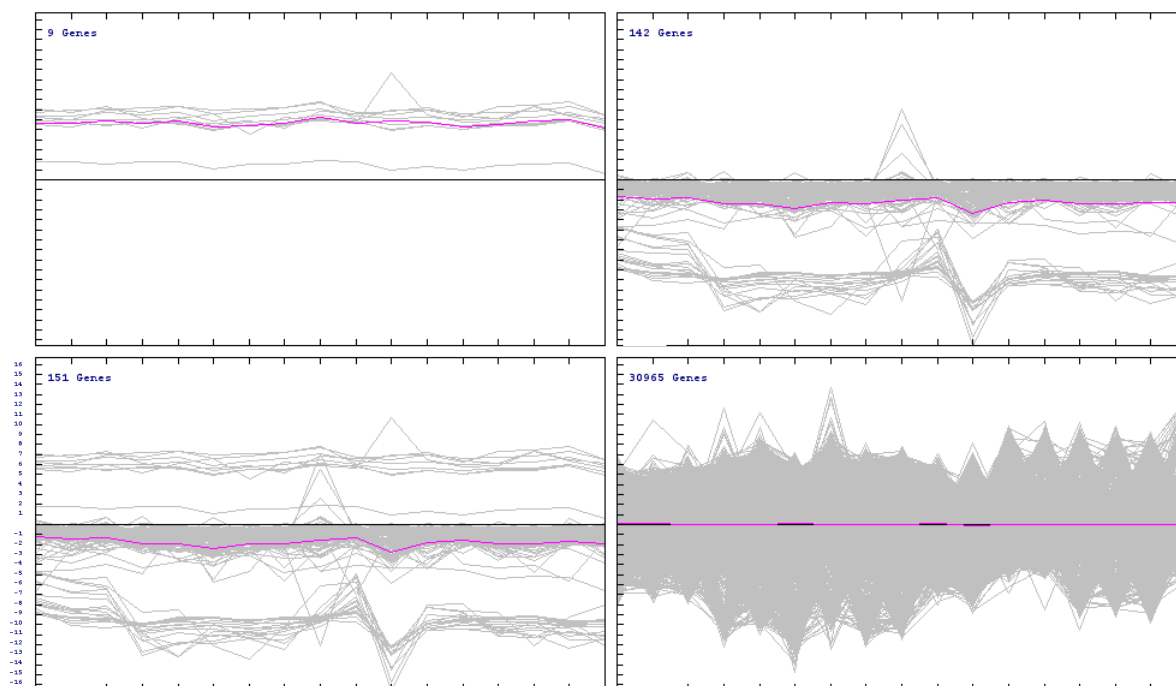
4.2. Společná odpověď GLIO a NEURO na infekci VKE

Změny globální genové exprese navozené množením viru klíšťové encefalidity byly v GLIO a NEURO buňkách sledovány prostřednictvím mikročipové analýzy. Následkem infekce VKE byla celá řada genů shodně regulována v obou studovaných buněčných liniích. Jediný gen byl up-regulován jak v NEURO, tak GLIO buňkách, funkce tohoto genu v buňce prozatím nebyla objasněna. Naopak ke snížení exprese docházelo shodně u 123 genů. (Pozn. z celkových počtů byly vyloučeny geny kontrolní). Představu o tom, jakého charakteru byly



změny genové exprese v jednotlivých skupinách si můžeme udělat ze souhrnných expresních grafů Obr. 4.2.1 a Obr. 4.2.2. Vybraným down-regulovaným genům budou věnovány následující řádky a změny jejich míry exprese jsou shrnuty v následujících tabulkách. Pozn. „Prům. GLIO a NEURO“ v tabulkách označuje společný průměr v obou skupinách.

Obr. 4.2.1 SAM (significance analysis of microarray) graf jednoskupinového designu (společná odpověď GLIO a NEURO) zobrazující poměr hodnot pozorovaných (observed) změn exprese proti očekávaným poměrům (expected). Osa x – očekávané hodnoty, osa y – pozorované hodnoty. Upregulované geny zobrazeny červenými body, downregulované zelenými.



Obr. 4.2.2 Souhrnné grafy globální exprese. Skupiny genů s průkazně/neprůkazně změněnou genovou expresí, shodně v obou buněčných liniích. **A** geny s průkazně zvýšenou expresí, **B** geny s průkazně sníženou expresí, **C** geny průkazně pozitivně či negativně regulovány, **D** geny s neprůkazně změněnou genovou expresí. Na ose x jsou jednotlivé vzorky (GLIO1-8, NEURO 1-8), na ose y je vynesena změna genové exprese. Růžová křivka znázorňuje průměrnou změnu genové exprese ve skupině.

4.2.1. RNA modifikace

Významný zásah do chodu infikované buňky představuje snížení exprese genu **PAPOLA**, genu pro polyA polymerázu, která v buňce obstarává polyadenylaci konců mRNA. Další její funkcí je endoribonukleázové štěpení některých specifických míst s polyadenylací. Omezení polyadenylační funkce může mít za následek výrazné snížení životnosti mRNA molekul v buňce. (Thuresson *et al.*, 1994).

Tab. 4.2.1 Gen ovlivňující modifikaci RNA se změněnou expresí následkem infekce VKE.

Symbol	Unigene	Název genu	Prům. GLIO a NEURO	±S.D.
PAPOLA	Hs.253726	Poly(A) polymerase alpha	-1,13	±0,47

4.2.2. Povrchové molekuly

CEACAM8 (CDC66b), jejíž exprese je shodně down-regulována v obou buněčných liniích, patří do imunoglobulinové rodiny proteinů. Exprese tohoto povrchového membránového proteinu je omezena na granulocyty a jeho zvýšená přítomnost na jejich povrchu svědčí o jejich aktivaci (Yoon *et al.*, 2007).

Tab 4.2.2 Gen kódující povrchovou molekulu shocně regulován následkem infekce VKE.

Symbol	Unigene	Název genu	Prům. GLIO a NEURO	±S.D.
CEACAM8	Hs.41	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8	-1,27	±0,68

4.2.3. Proteosyntéza

Následkem infekce došlo ke snížení transkripce několika faktorů translačního iniciačního komplexu. Tento soubor molekul nasedá na 5' konec mRNA a zahajuje translaci mRNA do molekuly bílkoviny. Iniclace proteosyntézy zahrnuje použití iniciátorové tRNA pro methionin, rozpoznání iniciačního kodonu AUG, vytvoření preiniciačního komplexu s připojením malé ribozomální podjednotky (40S) a podpoření začátku translace iniciačními faktory (Sonenberg *et al.*, 2001). Infekce virem klíšťové encefalidity měla za následek sníženou transkripci genů pro některé z nich.

Translační iniciační faktor 4B (**eIF4B**) obsahuje dvě RNA vázající domény. Jednu, která nespecificky interaguje s mRNA, zatímco druhá váže část 18S RNA, jedinou rRNA malé ribozomální podjednotky. Spojuje tak obě části, mRNA a ribosom, dohromady. Translační iniciační faktor 4B napomáhá po fosforylaci formování pre-iniciačního komplexu (Preiss *et Hentze*, 2003).

Množství transkriptů tří podjednotek translačního iniciačního faktoru 3 (**eIF3**), konkrétně **S5** a **S6** (subunit 5 a 6) a **EIF3EIP** (podjednotka **L**) bylo také sníženo. eIF3 je největším iniciačním faktorem, který propojuje jednotlivé složky celého iniciačního komplexu a má celkem 13 podjednotek. Kontroluje nasedání malé podjednotky ribosomu na vlákno mRNA a tak podporuje formování pre-iniciačního komplexu (Preiss a Hentze, 2003).

Infekcí je ovlivněno nejen množství translačních iniciačních faktorů, snížena byla také produkce RNA kódujících vlastní ribozomální proteiny. Signifikantně byla snížena exprese proteinu **L24 (RPL24)**, což je jeden z osmdesáti proteinů tvořících ribozomy a je součástí velké ribozomální podjednotky. Byla-li nastavena méně přísná statistická kritéria, stejný jev

byl zaznamenán i u dalších dvou ribozomálních proteinů, a to ribozomálních podjednotek L22 a L3 (RPL22, RPL3).

Dalším zástupcem z down-regulovaných genů ovlivňujících průběh proteosyntézy je gen **PRMT3**, jenž kóduje methyltransferázu modifikující ribozomální proteiny. Tato methyltransferáza ovlivňuje buněčnou hladinu a funkci ribozomálních podjednotek, čímž a tudíž i reguluje proteosyntézu (Swiercz *et al.* 2004).

Souhrn změn genových expresí pro proteiny ovlivňující proteosyntézu je v následující tabulce (Tab 4.2.3)

Tab.4.2.3 Geny s úlohou v proteosyntéze, jejichž exprese je po infekci VKE snížena.

Symbol	Unigene	Název genu	Prům. GLIO a NEURO	±S.D.
EIF3S5	Hs.516023	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 5 epsilon, 47kDa	-0,63	±0,40
EIF3S6	Hs.405590	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6 48kDa	-0,60	±0,26
EIF3S6IP	Hs.446852	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6 interacting protein	-0,62	±0,30
EIF4B	Hs.292063	Eukaryotic translation initiation factor 4B	-0,64	±0,32
PRMT3	Hs.152337	Protein arginine methyltransferase 3	-2,42	±1,27
RPL24	Hs.477028	Ribosomal protein L24	-1,26	±0,79

4.2.4. Cytoskelet

Další skupinou genů, které byly po infekci VKE exprimovány v nižší míře byly geny podílející se na funkci či organizaci cytoskeletu.

Nejvýrazněli byl ovlivněn gen **MYO9A** (myosin IXA), který kóduje nekonvenční myosin podílející se na vnitrobuněčném pohybu. Funkcí tohoto proteinu je negativní regulace aktivity proteinu Rho, který kontroluje organizaci aktinového cytoskeletu, čímž se MYO9A podílí na regulaci morfologie neuronů (Bähler, 2008).

Dalším členem této skupiny je tubulin $\alpha 8$ (**TUBA8**), člen tubulinové rodiny proteinů. Hlavní složkou mikrotubulů jsou heterodimery α a β tubulinu. Buňky mohou exprimovat vícero izotypů α a β tubulinu, což má za následek rozdílné formy tubulinového proteinu.

Konkrétní isotypy přímo ovlivňují strukturu mikrotubulů a funkci v buňce (McKean *et al.*, 2001).

Gen **CNN1** kóduje calponin1, protein asociovaný s filamenty. Ve svalových buňkách moduluje kontrakce hladkých svalů. Je schopen vázat aktin, kalmodulin, troponin a tropomyosin a jeho neutrální isoforma hraje fyziologickou roli v organizaci cytoskeletu (Masuda *et al.*, 1996).

Tab. 4.2.4 Expresní změny složek cytoskeletu následkem VKE infekce.

Symbol	Unigene	Název genu	Prům. GLIO a NEURO	±S.D.
MYO9A	Hs.546268	Myosin IXA	-1,73	±0,75
CNN1	Hs.465929	Calponin 1, basic, smooth muscle	-1,25	±0,72
TUBA8	Hs.137400	Tubulin, alpha 8	-1,10	±0,53

4.2.5. Membránové struktury

V obou buněčných liniích byla shodně negativně regulována skupina genů souvisejících s transportem a tříděním proteinů a membránovými strukturami v rámci buňky. Krátce zmíním čtyři zástupce.

Nejprve gen **VSP13B** kódující protein, jenž zastává funkci ve vesikuly zprostředkovaném transportu a třídění proteinů v rámci buňky. Tentýž protein pravděpodobně hraje i úlohu při vývoji centrální nervové soustavy (Kolehmainen *et al.*, 2003).

Protein caveolin 2 je kódován genem **CAV2**. Jedná se o hlavní komponentu vnitřních struktur v buňce, tzv. caveolae, což jsou malé invaginace plasmatické membrány. Tyto buněčné struktury, účastníci se endocytózy a vnitrobuněčného transportu, jsou také místem lokalizace řady signálních molekul (Cohen *et al.*, 2004), Caveolin 2 sehrávají důležitou úlohu v přenosu signálu, kupříkladu adrenergního receptoru či epidermálního růstového faktoru, byla také popsána interakce s alfa podjednotkou signalizačních G proteinů, jejichž aktivitu a reguluje. Mimo to je zapojen také do lipidického metabolismu, kontroly buněčného růstu i apoptózy. Ačkoliv caveolin2 není schopen formovat caveolae sám, bez caveolinu 1, má značný vliv na jejich tvorbu a funkci (Krasteva *et al.*, 2006)

CRTAP (cartilage associated protein) je součástí buněčného komplexu, podílejícího se na modifikaci kolagenu, jeho transportu do extracelulární matrix a formaci extracelulárních

fibril. Spekuluje se i o jeho možném zapojení do retrográdního transporu uvnitř Golgiho aparátu (Morello *et al.*, 2006).

SNAG1 (sorting nexin associated Golgi protein) je důležitým účastníkem hned v několika krocích vnitrobuněčné dopravy. Jeho konkrétní funkce však nebyla doposud objasněna (Entrez Gene ID: 112574).

Tab. 4.2.5 Ovlivnění proteinů účastnících se vnitrobuněčné dopravy infekcí VKE.

Symbol	Unigene	Název genu	Prům. GLIO a NEURO	±S.D.
CAV2	Hs.212332	Caveolin 2	-1,53	±0,58
CRTAP	Hs.517888	Cartilage associated protein	-0,39	±0,11
VPS13B	Hs.191540	Vacuolar protein sorting 13 homolog B (yeast)	-1,41	±0,66
SNAG1	Hs.432755	Sorting nexin associated golgi protein 1	-0,86	±0,50

4.2.6. Metabolismus

Množení VKE v buněčných liniích lidských neurálních buněk mělo za následek omezenou expresi některých genů buněčného metabolismu.

Lipoxygenázový gen (**ALOXE3**) hraje úlohu v oxidaci nenasycených mastných kyselin a metabolismu eikosnoidů, což jsou významní zprostředkovatelé v zánětu a imunologických procesech (Brash, 1999; Entrez Gene ID: 59344).

Gen **XYLB** kóduje xylulokinázu B, která patří do rodiny enzymů, katalyzujících přenos fosfátové skupiny na hydroxylovou skupinu akceptorových monosacharidů, v tomto případě konkrétně xylulózy. Tyto proteiny hrají zásadní úlohu v buněčném metabolismu (Tamari *et al.*, 1998).

Gen **ABCB7** kóduje jednu ze dvou částí mitochondriálního transportéru zapojeného do transportu hemu z mitochondrie do cytosolu. Hraje stěžejní roli v maturaci cytosolických proteinů obsahujících železito-sírné klastry (Fe-S). Proteiny, jež je obsahují, se v buňce účastní četných metabolických drah (Cavadini *et al.*, 2007).

Tab.4.2.6 Proteiny metabolismu down-regulované v GLIO i NEURO buňkách po infekci VKE.

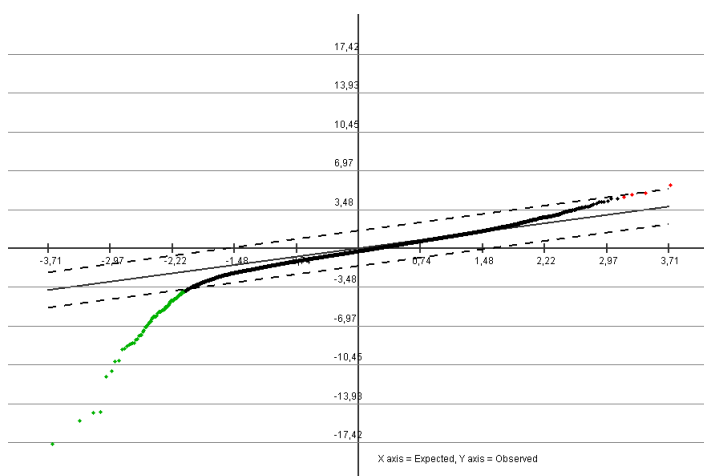
Symbol	Unigene	Název genu	Prům. GLIO a NEURO	±S.D.
ALOXE3	Hs.232770	Arachidonate lipoxigenase 3	-0,67	±0,37
XYLB	Hs.356820	Xylulokinase homolog (<i>H. influenzae</i>)	-1,65	±0,73
ABCB7	Hs.370480	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 7	-0,49	±0,19

4.3. Rozdílná odpověď GLIO a NEURO na infekci VKE

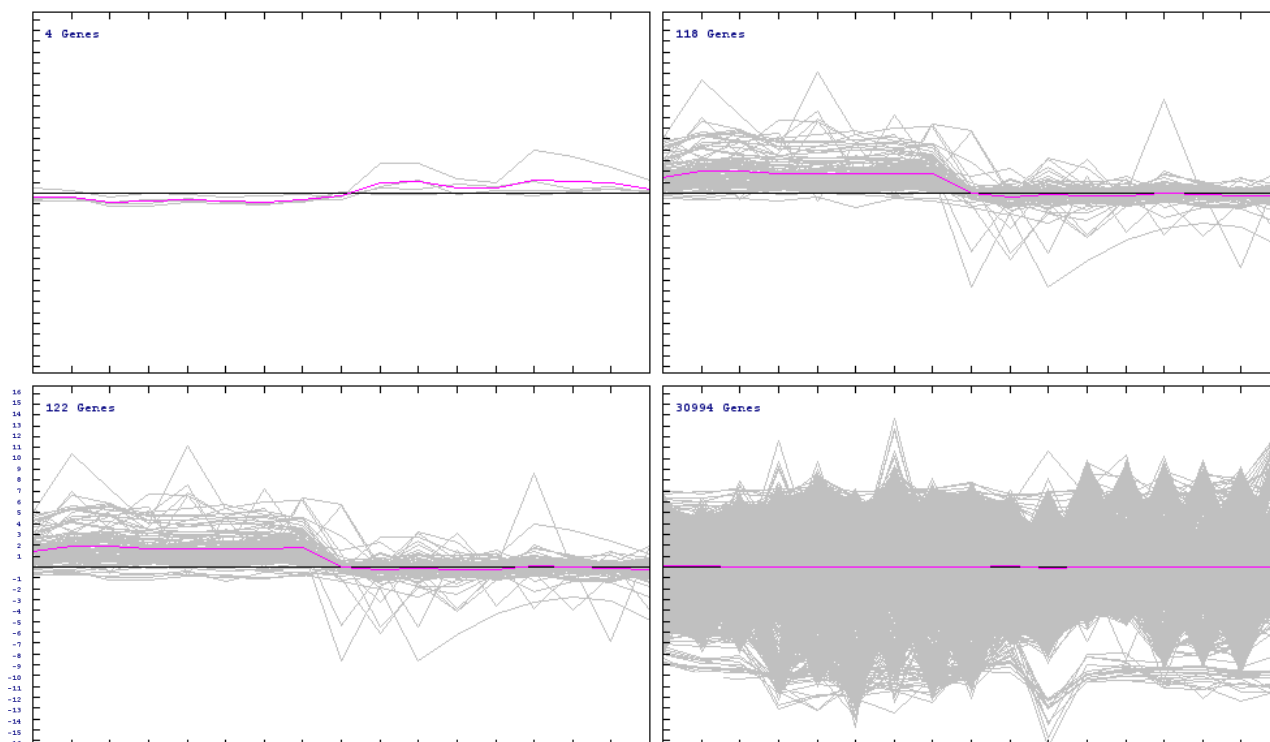
Po porovnání změn genové exprese navozených infekcí virem klíšťové encefalitidy byl v řadě případů zaznamenán rozdílný charakter v odpovědi u glioblastomové buněčné linie v porovnání s linií neublastomovou. Odlišný typ regulace, genová exprese signifikantně vyšší v linii NEURO oproti GLIO, byla zaznamenána u čtyř genů. Naopak v případě 118 genů byla

exprese signifikantně zvýšena u linie GLIO v porovnání s expresí v NEURO.

Informaci o charakteru změn genové exprese v jednotlivých skupinách podávají následující souhrnné grafy globální exprese (Obr. 4.3.1 a Obr. 4.3.2). Vybrané geny s rozdílnou odpovědí budou shrnuty v následující pasáži.



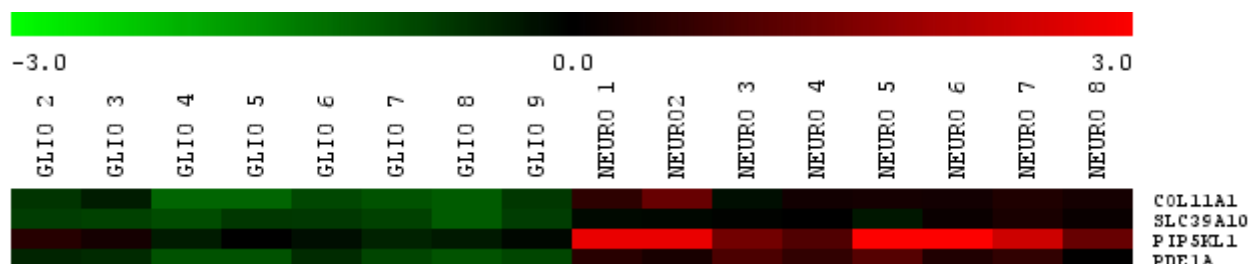
Obr. 4.3.1 SAM graf dvouskupinového designu SAM analýzy porovnávající rozdíly v odpovědi mezi liniemi GLIO a NEURO. Graf zobrazuje poměr hodnot pozorovaných (observed) změn exprese proti očekávaným poměrům (expected). Osa x – očekávané hodnoty, osa y – pozorované hodnoty. Upregulované geny zobrazeny červenými body, downregulované zelenými.



Obr. 4.3.2 Souhrnné grafy globální exprese. Skupiny genů rozdílně regulovaných jak v GLIO tak NEURO. **A** geny s průkazně zvýšenou expresí ve skupině NEURO, **B** geny s průkazně zvýšenou expresí ve skupině GLIO, **C** geny s průkazně zvýšenou expresí v obou liniích, **D** geny s neprůkazně změněnou genovou expresí. Na ose x jsou jednotlivé vzorky (GLIO1-8, NEURO 1-8), na ose y je vynesena změna genové exprese. Růžová křivka znázorňuje průměrnou expresi ve skupině.

4.3.1. Geny se signifikantně vyšší expresí v NEURO

SAM dvouskupinové porovnání vyhodnotilo skupinu čtyř genů jako zvýšeně exprimovanou v buněčné linii NEURO v porovnání s GLIO (skupina NEURO UP). Genový expresní profil je zobrazen na následujícím obrázku (Obr.4.3.3).

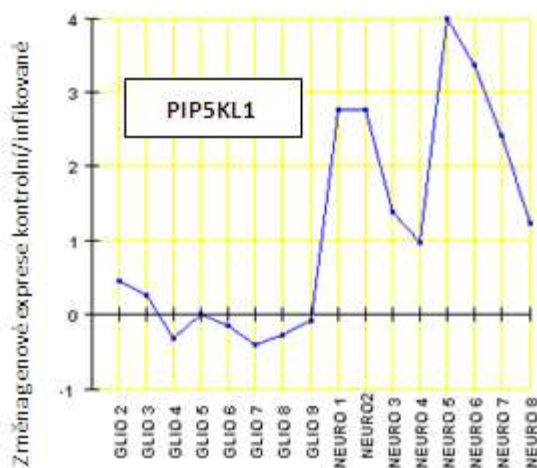


Obr. 4.3.1.1 Genový expresní profil. Geny se signifikantně vyšší genovou expresí v NEURO v porovnání s GLIO. Barevná stupnice odráží míru změny genové exprese. Červená označuje upregulované hodnoty, zelená downregulované.

Z těchto čtyř genů měl nejvýrazněji změněn profil genové exprese pouze gen **PIP5KL1**. Protein kódovaný tímto genem, běžně vysoce exprimován v mozku, se podílí na syntéze fosfatidyl inositolů (PI) a slouží pravděpodobně jako pojící prvek v intracytoplazmatických vezikulech, v kterých probíhá syntéza fosfatidylinositol 3,4,5-trisfosfátu. Ten se, společně s dalšími PI, podílí na tvorbě a přeskupování aktinového cytoskeletu (Chang *et al.*, 2004).

Tab. 4.3.1 Proteiny se signifikantně vyšší expresí v NEURO po infekci VKE.

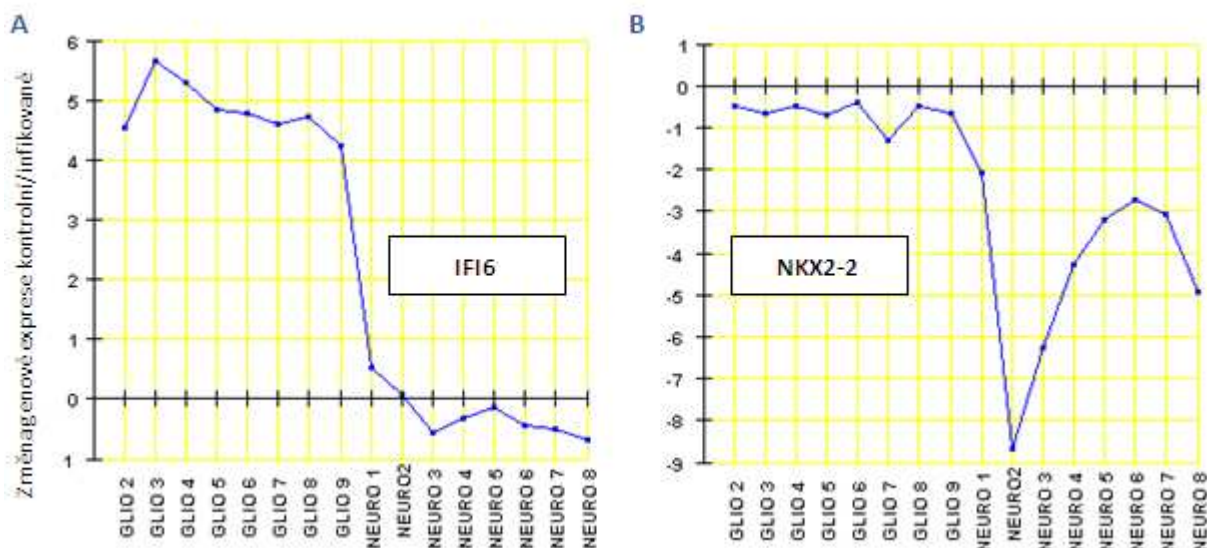
Symbol	Unigene	Název genu	Prům GLIO	±S.D.	Prům NEURO	±S.D.
PIP5KL1	Hs.445486	Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase-like 1	-0,07	±0,28	2,36	±1,01
COL11A1	Hs.523446	Collagen, type XI, alpha 1	-0,86	±0,29	0,38	±0,37
SLC39A10	Hs.413434	Solute carrier family 39 (zinc transporter), member 10	-0,79	0,13	0,01	0,17
PDE1A	Hs.191046	Phosphodiesterase 1A, calmodulin-dependent	-0,75	±0,22	0,55	±0,30



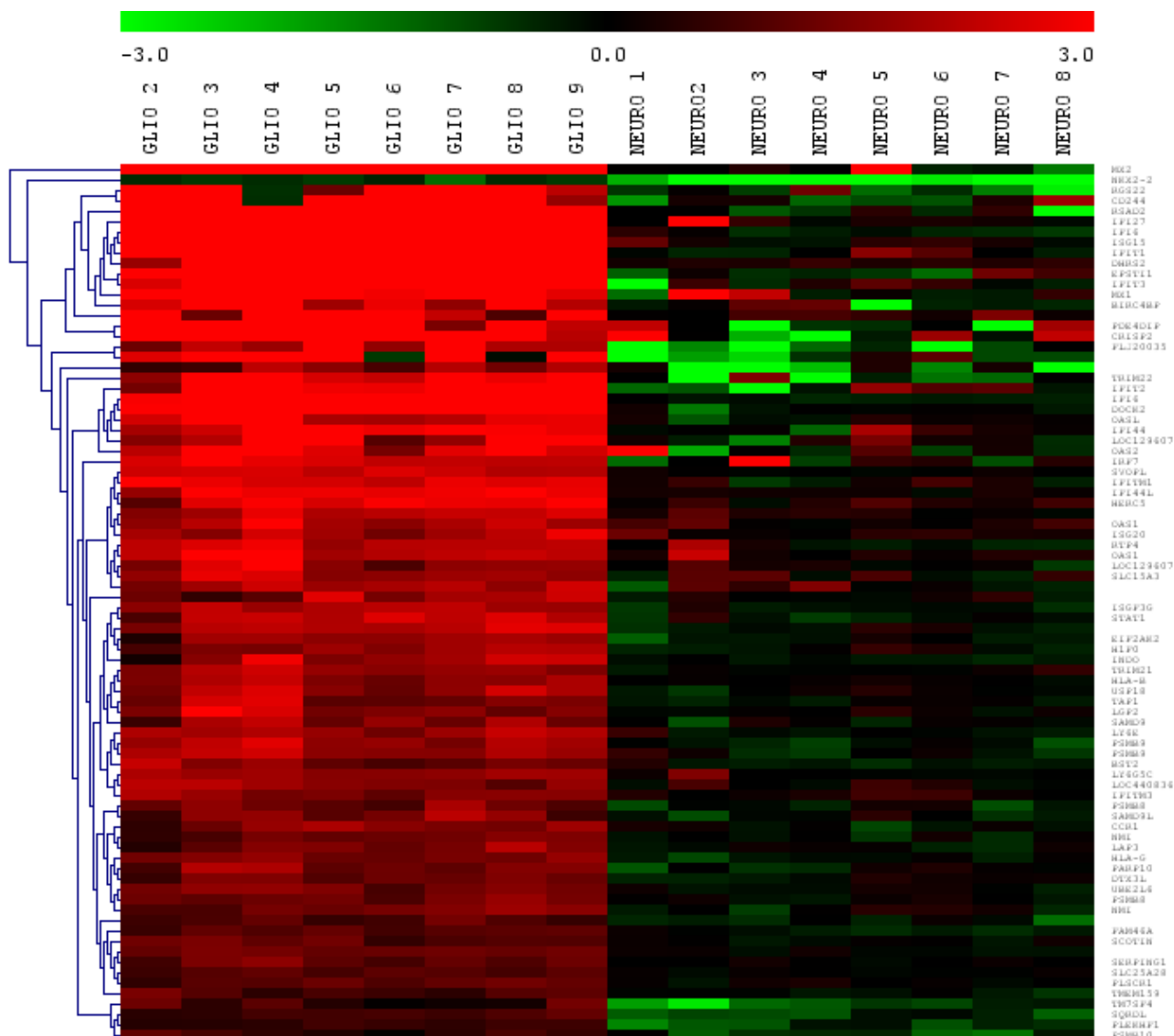
Obr.4.3.1.2 Graf znázorňující genový expresní profil. Hodnoty změn genových expresí u jednotlivých vzorků mikročipových analýz.

4.3.2. Geny se signifikantně vyšší expresí v GLIO

Naprostá většina (118 ze 122) genů, jejichž exprese se odlišovala mezi dvěma neurálními buněčnými liniemi, vykazovala signifikantně vyšší expresi v buněčné linii GLIO. V rámci této skupiny lze dále rozlišit dvě hlavní situace, proč byla exprese u GLIO signifikantně vyšší. V prvním případě byla po infekci VKE down-regulována exprese u NEURO, zatímco u GLIO zůstala exprese na té samé úrovni – nazvěme tento typ ovlivnění „NEURO DOWN“. Příkladem pro tento typ je pak gen NKX2-2. V druhém případě docházelo ke zvýšení exprese genů u GLIO zatímco exprese v NEURO nebyla změněna – tento typ budu dále nazývat „GLIO UP“. Do této skupiny genů patří například IFI6.



Obr. 4.3.2.1 Hlavní trendy ovlivnění genové exprese ve skupině se signifikantně vyšší genovou expresí v GLIO. A „GLIO UP“ typ ovlivnění (gen IFI6), B „NEURO DOWN“ typ ovlivnění (gen NKX2-2).



Obr. 4.3.2.2 Genový expresní profil. Geny se signifikantně vyšší genovou expresí v GLIO v porovnání s NEURO. Barevná stupnice odráží míru změny genové exprese. Červená označuje upregulované hodnoty, zelená downregulované.

4.3.2.1. Morfogeneze

Gen **NKX2-2** je funkčně zapojen do morfogeneze centrální nervové soustavy (CNS). Jedná se o jaderný transkripční faktor, který se podílí na endokrinní diferenciaci CNS, tvorbě hranic neuromer (přechodných segmentů ve vývoji CNS a nasměrování axonů (díky gradientu signalizace Shh (sonic hedgehog) (Briscoe *et al.*, 1999). Graf genové exprese je zobrazen na Obr. 4.3.2.1. a hodnoty jsou uvedeny v tabulce (Tab 4.3.2.1).

Tab.4.3.2.1 Změna exprese genů účastnícího se na morfogenezi.

Symbol	Unigene	Název genu	Prům GLIO	±S.D.	Prům NEURO	±S.D.
NKX2-2	Hs.516922	NK2 transcription factor related, locus 2 (Drosophila)	-0,65	±0,26	-4,41	±2,04

4.3.2.2. Imunitní odpověď

Narozdíl od NEURO, infekce v GLIO vede k rozsáhlé aktivaci antivirové imunitní odpovědi. Svědčí o tom zvýšená exprese celé řady genů, které se na imunitní reakci podílí.

Byl zaznamenán průkazný nárůst mRNA hladin transkripčních faktorů, jako jsou **STAT1** a **IRF9** a **IRF7**, zapojených do signalizačních kaskád jak interferonové odpovědi typu I, tak i typu II. To vede k transkripční aktivaci a expresi **interferon/em** stimulovaných genů (Randal a Goodbourn , 2008).

O indukovaném antivirovém stavu svědčí zvýšená exprese takových genů, jako je **Mx1**, **OAS1**, **OASL**, **EIF2AK2**, **RSAD2**, které kódují účinné protivirové proteiny se širokou škálou účinnosti vůči a ne vždy zcela prozkoumaným mechanismem účinku. OAS1 (oligoadenylát syntetáza 1) syntetizuje oligomery ATP, čímž značí virovou RNA pro degradaci RNázou L. Gen EIF2AK2 kóduje protein kinázu R (PKR), jenž je aktivována dsRNA, její funkcí je omezení virové replikace či směřování buňky k apoptotické smrti. Exprese genu RSAD2 vede k syntéze proteinu viperinu, který rozrušuje tvorbu lipidických raftů, jenž jsou důležité při pučení některých virů přes plazmatickou membránu (Randal a Goodbourn , 2008)

V GLIO byla také detekována zvýšená hladina mRNA chemokinu **CCL5** (protein **RANTES**) a jeho receptoru **CCR1**. Obě tyto molekuly sehrávají úlohu v chemoatrakci cirkulujících imunitních buněk (jako jsou T lymfocyty, eosinofily a bazofily) do místa zánětu a tím také v patogenezi zánětu a autoimunitních onemocnění. (Glass *et al.*, 2005).

Tab. 4.3.2.2 Geny související s imunitní odpovědí transkripčně aktivované v GLIO.

Symbol	Unigene	Název genu	Prům GLIO ±S.D.	Prům NEURO ±S.D.
CCL5 (RANTES)	Hs.514821	Chemokine (C-C motif) ligand 5	1,92 ±0,83	0,24 ±0,37
CCR1	Hs.301921	Chemokine (C-C motif) receptor 1	1,49 ±0,43	-0,10 ±0,33
IRF7	Hs.166120	Interferon regulatory factor 7	2,52 ±0,33	0,20 ±1,27
MX1	Hs.517307	Myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78	3,86 ±1,41	0,50 ±1,43
OAS1	Hs.524760	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	2,44 ±0,45	0,53 ±0,72
OASL	Hs.118633	2',5'-oligoadenylate synthetase-like	2,92 ±1,03	-0,03 ±0,41
RSAD2 (VIPERIN)	Hs.17518	Radical S-adenosyl methionine domain containing 2	4,96 ±0,54	-0,62 ±1,35
STAT1	Hs.642990	Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	2,16 ±0,52	-0,19 ±0,38
EIF2AK2 (PKR)	Hs.131431	Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2	1,65 ±0,50	-0,26 ±0,37

4.3.2.3. Antigen prezentující dráhy

Infekce VKE vede u glioblastomové buněčné linie k zvýšené expresi proteinů podílejících se na prezentaci antigenu.

Šlo jednak o zástupce MHC II antigen prezentující dráhy, která zpracovává a prezentuje na povrchu buněk exogenně získané antigeny a prezentuje je na svém povrchu CD4+ T pomocným lymfocytům. V GLIO buňkách byl následkem infekce VKE upregulován gen **HLADRB1**, který kóduje beta řetězec MHC II molekuly. Doposud byly popsány stovky alel

kódujících MHCII, avšak alelická varianta genu DRB1 je přítomna v každém jedinci (Jensen *et al.*, 1999).

Dalším reprezentantem je gen kódující molekulu **CD74**. V buňce funguje jako invariabilní řetězec, který váže a stabilizuje MHC II heterodimery ihned poté, co jsou nasyntetizovány, blokuje antigen vázající žlábk před navázáním nesprávných molekul a směřuje transport MHC II dimerů do endoplazmatického retikula, kde následuje navázání prezentovaného peptidu (Cresswell, 1994).

Pod vlivem infekce byla zvýšena exprese také u molekul, účastnících se zpracování antigenu a jeho prezentaci s MHC I molekulami. Bylo tomu tak u buněk GLIO, nikoliv však v případě NEURO. Jedná se o geny kódující MHC I řetězec (**HLA-G** a **HLA-B**) a beta 2-mikroglobulin (**B2M**), povrchové molekuly nesoucí prezentovaný peptid. Zvýšeny byly také hladiny mRNA kódujících podjednotky proteasomu (**PSMB8**, **PSMB9**, **PSMB10**), které se podílí na proteolytickém štěpení endogenních proteinů a jejich zpracování na MHC I prezentované peptidy. Exprese všech těchto podjednotek je indukovaná interferonem γ . Tyto nově indukované podjednotky nahrazují některé podjednotky 20S proteasomu, čímž dávají vzniknout imunoproteasomu s efektivnějším zpracováním proteinů (Baumeister *et al.*, 1998; Nandi *et al.*, 1997, Früh *et* Yang, 1999).

Signifikantně byla zvýšena exprese transportéru spojeného se zpracováním antigenů (**TAP1**). Tento protein hraje úlohu v transportu prezentovaných peptidů z cytoplazmy do lumen endoplazmatického retikula, funguje v součinnosti s proteasomem a MHC I molekulami a jakožto podpůrný protein napomáhá správnému sbalení komplexu MHC I (Abele *et* Tampe, 1999).

Přehled odlišně regulovaných genů podílejících se na prezentaci antigenu je uveden následující tabulce (Tab 4.3.2.3).

Tab 4.3.2.3 Geny antigen prezentujících drah upregulované v GLIO.buňkách

Symbol	Unigene	Název genu	Prům GLIO	±S.D.	Prům NEURO	±S.D.
HLA-DRB1	Hs.534322	Major histocompatibility complex, class II, DR beta 1	0,77	±0,23	-0,03	±0,23
HLA-G	Hs.512152	HLA-G histocompatibility antigen, class I, G	1,46	±0,20	-0,23	±0,27
HLA-B	Hs.77961	Major histocompatibility complex, class I, B	1,74	±0,35	0,05	±0,10
CD74	Hs.436568	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain	1,33	±0,50	0,23	±0,20
B2M	Hs.534255	Beta-2-microglobulin	0,96	±0,25	-0,12	±0,32
TAP1	Hs.352018	Transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	1,60	±0,60	-0,14	±0,20
PSMB8	Hs.180062	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 8 (large multifunctional peptidase 7)	1,32	±0,25	-0,01	±0,20
PSMB9	Hs.132682	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 9 (large multifunctional peptidase 2)	1,95	±0,37	-0,32	±0,34
PSMB10	Hs.9661	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 10	0,62	±0,32	-0,66	±0,45

4.3.2.4. Apoptóza

V GLIO buněčné linii GLIO byla zvýšena exprese několika genů popsanych v souvislosti s apoptózou.

Protein **XAF1** kódovaný genem **BIRC4BP** váže protein XIAP, což je inhibitor apoptózy a supresor kaspázové aktivity (Liston *et al.*, 2001). Blokováním inhibiční funkce

XIAP podporuje XAF1 přechod buňky k apoptotické smrti, jedná se tedy o proapoptotický protein. Proapoptotická funkce XAF1 je spjata s aktivací mitochondriální apoptotické dráhy a podporuje uvolnění cytochromu c do cytoplazmy čímž znásobuje signál, který buňka dostala přes tzv. „death“ receptory (Xia *et al.*, 2006).

Protein kódovaný genem **SCOTIN** je lokalizován v membráně jádra a endoplazmatického retikula. Scotin je schopen indukovat apoptózu na kaspázách závislým mechanismem a je spjat s p53 závislou apoptotickou dráhou (Bourdon *et al.*, 2002).

Gen **IFI6** je jedním z celé řady genů, jejichž exprese je indukována interferonovou signalizací. Tento protein ovšem sehrává zásadní úlohu v regulaci apoptózy. Je lokalizován v mitochondriích a má důležitou protiapoptotickou úlohu tím, že inhibuje funkci kaspázy 3. Mechanismem je inhibice depolarizace mitochondriální membrány a tím zabránění uvolnění cytochromu c do cytoplazmy (Tahara *et al.*, 2005).

Tab. 4.3.3.4 Geny související s apoptotickou buněčnou smrtí zvýšeně exprimované v GLIO buňkách.

Symbol	Unigene	Název genu	Prům GLIO	±S.D.	Prům NEURO	±S.D.
BIRC4BP (XAF1)	Hs.441975	XIAP associated factor-1	3,06	±1,56	-0,36	±1,46
IFI6	Hs.466383	Interferon, alpha-inducible protein 6	4,83	±0,42	-0,25	±0,37
SCOTIN	Hs.523847	Scotin	1,09	±0,27	-0,02	±0,17



Obr.4.3.3.4 Porovnání genových expresí genů souvisejících s apoptózou.

4.4. Real-time PCR

Na základě dat získaných mikročipovou analýzou bylo vybráno několik genů, u kterých byly hodnoty jejich genové exprese ověřovány pomocí real-time PCR.

Z genů souvisejících s imunologickou odpovědí buňky byly vybrány geny MX1, OAS1, OASL. Jako představitelé genů hrajících roli v regulaci apoptotické smrti buňky byly vybrány geny XAF1, IFI6, BIRC7. Gen TAP1 byl vybrán jako reprezentant antigen prezentující buněčné mašinerie. Geny CEACAM8 a IL23R byly vybrány jako zástupci buněčných povrchových molekul.

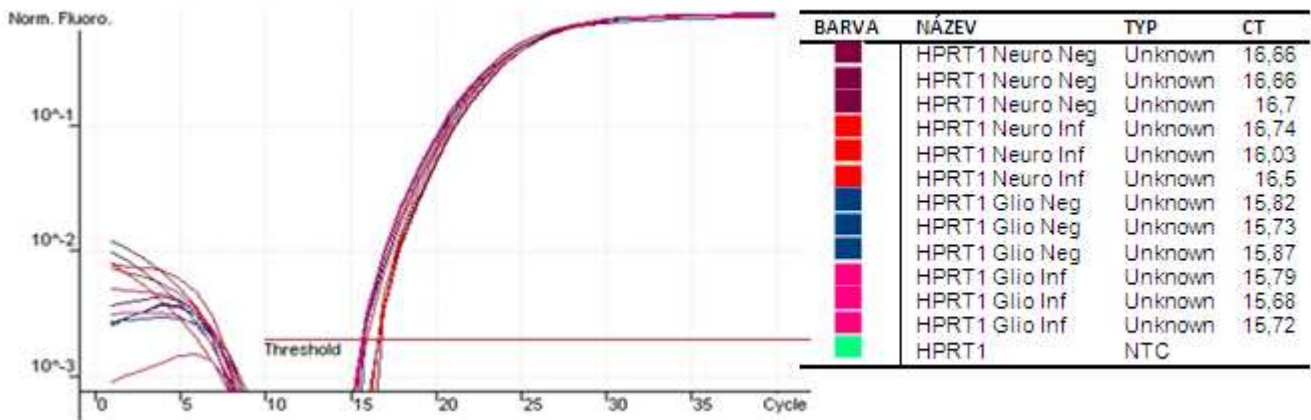
Pozn. Geny BIRC7, IL23R byly vybrány v době, kdy ještě nebyly kompletní výsledky mikročipových analýz. Nakonec byly virem indukované změny jejich exprese natolik heterogenní, že nebyly SAM analýzou vyhodnoceny jako signifikantní.

4.4.1. Kontrola vhodnosti HPRT1 genu jakožto interní kontroly

Pro ověření vhodnosti výběru HPRT1 jako referenční kontroly byla porovnána exprese tohoto genu v GLIO a NEURO po infekci VKE ve srovnání s kontrolou. Průměrné hladiny mRNA genu HPRT1 se u buněčných linií GLIO a NEURO signifikantně nelišily mezi skupinami kontrolními a infikovanými. Dosažená hladina významnosti (p) u Studentova T-testu byla v rozmezí 0,2-0,3 (viz Tab. 4.4.1.1). Z čehož vyplývá, že gen HPRT1 je vhodný jakožto interní kontrola pro relativní kvantifikace expresí srovnávaných genů. Profil real-time PCR reakce je zobrazen na následujícím obrázku (Obr. 4.4.1.1)

Tab. 4.4.1.1 Dosažené hodnoty CT.

		průměr C.T.	±S.D.	p
NEURO	NK	16,68	±0,023	0,298
	INF	16,43	±0,361	
GLIO	NK	15,81	±0,071	0,214
	INF	15,73	±0,055	

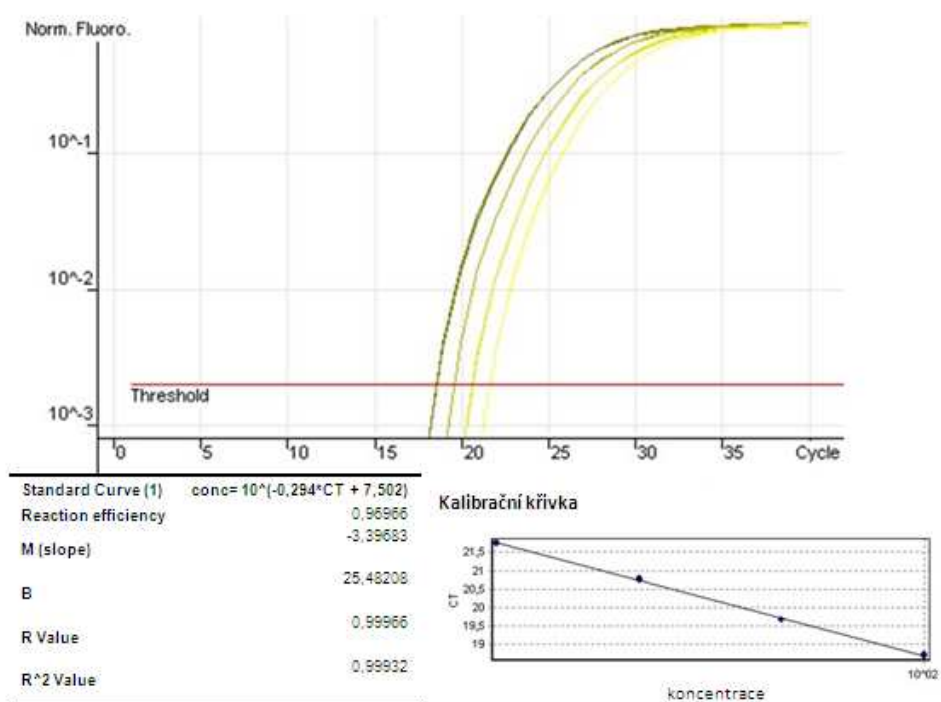


Obr. 4.4.1.1 Profil real-time PCR reakce pro ověření HPRT1 jakožto referenčního genu.

4.4.2. Kalibrační křivky

Pro specifickou semikvantitativní real-time RT-PCR analýzu byla zvolena metoda kvantifikace dle Pfaffla (2001). Tento přístup zahrnuje stanovení účinnosti jednotlivých real-time PCR reakcí, který se odvozuje z kalibrační křivky. Pro účel kalibrační křivky byla připravena ředící řada cDNA standardů o koncentracích 150, 100, 50, 25 a 12,5 ng/μl. Příklad kalibrační křivky genu HPRT1 je na následujícím obrázku (Obr.4.4.2.1).

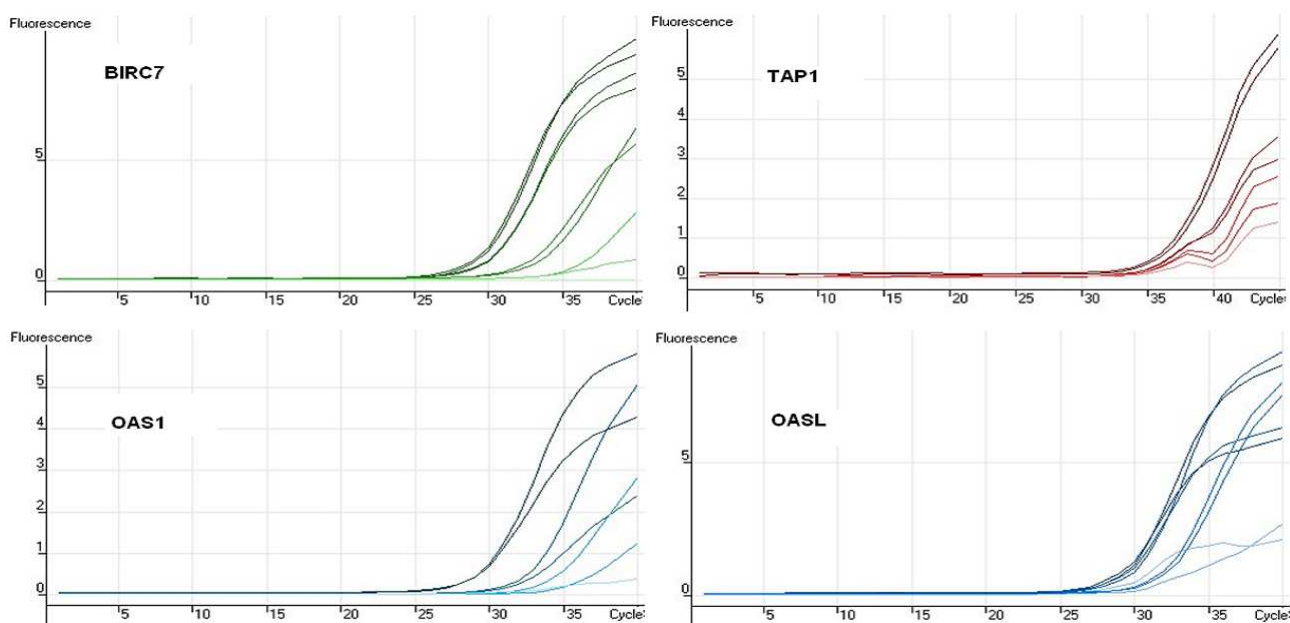
BARVA	NÁZEV	TYP	CT	ZADANÁ KONCENTRACE	ZJIŠTĚNÁ KONCENTRACE	% Var.
	HPRT1	Standard	18,68	100	100,64	0,60%
	HPRT1	Standard	18,72	100	97,6	2,40%
	HPRT1	Standard	19,67	50	51,43	2,90%
	HPRT1	Standard	19,68	50	51,02	2,00%
	HPRT1	Standard	20,78	25	24,17	3,30%
	HPRT1	Standard	20,75	25	24,76	0,90%
	HPRT1	Standard	21,76	12,5	12,48	0,10%
	HPRT1	Standard	21,74	12,5	12,68	1,40%
	HPRT1	NTC				
	HPRT1	NTC				



Obr.4.4.2.1 Profil real-time PCR reakce genu HPRT1, kalibrační křivka.

4.4.3. Kvantifikace

Navržené primery pro studované geny byly nejprve ověřeny běžnou PCR. Tyto reakce poskytovaly produkt o správné velikosti a nebyly zaznamenány nespecifické produkty. Přesto se prozatím nepodařilo optimalizovat podmínky real-time PCR do té míry, aby mohly být příslušné geny kvantifikovány. Na tomto úkolu se však nadále intenzivně pracuje. Důvody neúspěchu v této části práce jsou blíže rozebrány v diskuzi. Ilustrace nezdařilých kalibračních křivek jsou zobrazeny na obrázku (Obr. 4.4.2.2)



Obr. 4.4.2.2 Profily nevyhovujících kalibračních křivek.

5. Diskuse

Ovlivnění globální genové exprese v důsledku infekce virem klíšťové encefalitidy bylo studováno s použitím dvou buněčných linií odvozených z lidských neurálních buněk. Zvoleny byly neuroblastomová buněčná linie (NEURO), která je odvozena z buněk sympatického nervového systému, a glioblastomová buněčná linie (GLIO), která pochází z podpůrných buněk mozku. GLIO patří k antigen prezentujícím buňkám a zprostředkovávají některé imunologické procesy.

Množení viru klíšťové encefalitidy v buňkách centrální nervové soustavy, sehrává zásadní úlohu v patogenezi onemocnění klíšťovou encefalitidou. Pochopení mechanismů nemoci je klíčové pro vývoj a volbu správné terapie. Přesto však interakci VKE a lidských nervových buněk nebylo doposud věnováno příliš pozornosti. Proto jsme se rozhodli jako model této interakce použít buněčné linie odvozené z lidských neurálních buněk (GLIO a NEURO) s vírou, že bližší porozumění interakci VKE s těmito buňkami na molekulární úrovni nám napoví více o dějích, které se při této infekci odehrávají. Jako nástroj nám k tomu sloužila technologie DNA čipů.

Virus klíšťové encefalitidy se ve zvolených buněčných liniích GLIO a NEURO replikuje velmi efektivně. Oproti VKE kmene Hypr (Růžek *et al.*, 2009b) nedosahuje titr námi použitého kmene Neudoerfl tak vysokých hodnot, avšak virová produkce je srovnatelná s produkcí v běžně používaných extraneurálních buněčných liniích. Rozdíl v intenzitě množení mezi oběma kmeny je dán vyšší virulencí kmene Hypr. Tyto buněčné linie tedy představují vhodný model pro studium průběhu infekce v lidských neurálních buňkách. Obdobně Koh *et Ng* (2005) použili lidské gliové buňky pro sledování změn genové exprese indukované infekcí virem západního Nilu.

Následkem infekce VKE byla v obou použitých liniích shodně změněna genová exprese u 124 genů. U jednoho se jednalo o průkazně zvýšenou expresi, zbylých 123 genů mělo v důsledku infekce genovou expresi shodně sniženu. Tento výrazný nepoměr mezi oběma skupinami může souviset s faktem, že virová replikace v buňce spíše vypíná přirozené pochody a metabolické procesy tak, aby zbylo dostatek energie a stavebních komponent pro vlastní množení viru. Podobný trend byl zaznamenán například v lidských endoteliálních buňkách infikovaných virem dengue-2, kdy byla v důsledku replikace snížena exprese u 90 genů, zatímco zvýšena byla u 21 genů (Liew *et Chow*, 2005).

Společná odpověď GLIO a NEURO na infekci VKE

Virová replikace může významnou měrou narušovat přirozené fungování transkripce a translace v buňce. Svědčí o tom shodné omezení transkripce genů účastnících se na modifikaci mRNA a iniciaci translace v obou buněčných liniích. Snížená exprese genu PAPOLA, kódujícího polyA polymerázu, může představovat výrazný zásah do chodu buňky. Polyadenylace mRNA hraje důležitou úlohu při obratu RNA v buňce, neboť stabilizuje transkripty, chrání je proti degradaci a prodlužuje jejich životnost. Polyadenylace také podporuje export mRNA z jádra do cytoplasmy a translaci (Dreyfus *et* Regnier, 2002). Snížení exprese genu PAPOLA tak ovlivňuje množství a životnost buněčné mRNA v širokém měřítku.

Virovou infekcí byla snížena exprese řady proteinů účastnících se na iniciaci translace proteinů. Šlo o podjednotky translačního iniciačního komplexu eIF4B a eIF3 (3 podjednotky), dále také vlastní ribozomální proteiny (RPL24, 22 a 3), ale i methyltransferázu PRMT3, která reguluje funkci ribozomálních podjednotek. To může významně ovlivnit procesivitu proteosyntézy v buňce. Otázka ovšem je, do jaké míry ovlivní celou mašinérii snížení exprese pouze několika podjednotek translačního iniciačního komplexu a tří z 82 proteinů ribozomálních podjednotek. Snížená regulace těchto mRNA může mít vliv nejenom na proteosyntézu buněčných, ale také virových proteinů. Na iniciaci translace virové RNA se podílejí buněčné translační iniciační faktory. Kupříkladu právě down-regulovaný eIF4B, rozpoznává virovou 5' methylguanosinovou čepičku, podílí se na formaci preiniciačního komplexu a počátku translace (Merrick, 2004). Je otázkou, zda jsou sledované změny výsledkem replikační strategie viru, anebo záchranné strategie infikované buňky.

Poněkud těžko interpretovatelným jevem je snížená exprese buněčné povrchové molekuly CEACAM8. Jde o protein z imunoglobulinové rodiny, který by měl být exprimován pouze na granulocytárních buňkách, obzvláště eosinofilech a svědčí o jejich aktivaci (Yoon *et al.*, 2007). Proto by se tento protein neměl vyskytovat na povrchu neurálních buněk. Jsem toho názoru, že ovlivnění exprese tohoto genu, je artefaktem v důsledku použití buněk odvozených z nádorů, neboť abnormální exprese CEACAM molekul byla popsána v souvislosti s nádorovými buňkami (Lasa *et al.*, 2008).

V nižší míře byly dále exprimovány geny, kódující proteiny s úlohou při procesu organizace cytoskeletu. Gen MYO9A negativně reguluje formování aktinového cytoskeletu

inhibicí proteinu Rho. Funkce Rho souvisí s indukcí polymerizace aktinu, místní adheze a tvorby „stress fibers“ (Narumiya *et al.*, 1997). Down-regulace MYO9A může tudíž hrát roli v povzbuzení přestavby aktinového cytoskeletu. Aktinová vlákna a mikrotubuly jsou klíčové komponenty při penetraci a endocytóze viru západního Nilu do buněk. Zatímco aktinové filamenty jsou podstatné pro průniku viru do buňky, mikrotubuly jsou zapojeny v přepravě pohlcených virionů z časných endosomů do lysosomů (Chu *et Ng*, 2004). Průkazně nižší hladina byla pozorována i pro mRNA tubulinu $\alpha 8$ (TUBA8), což naznačuje, že kromě aktinového cytoskeletu, je infekcí VKE ovlivněna i síť miktotubulů. Tento údaj je v souladu s dříve pozorovanými strukturními změnami tubulinového cytoskeletu v totožných buňkách neurálního původu (Růžek *et al.*, 2009b). V důsledku infekce virem klíšťové encefalidity docházelo v GLIO a NEURO k narušení a částečné degradaci sítě miktotubulů. Toto narušení korelovalo s cytopatickým efektem, morfologickými změnami buněk a jejich zakulacováním. V místech s vysokým výskytem virového proteinu E byla tubulinová síť utvářena hustěji, což naznačuje možnou úlohu v procesu replikace a maturace VKE (Růžek *et al.*, 2009b). Potřeba polymerizace mikrotubulů a aktinu pro replikaci viru hepatitidy C byla zaznamenána již dříve (Bost *et al.*, 2003). Právě gen TUBA8 by se mohl v této souvislosti významně uplatňovat. Důležitým faktorem spjatým s regulací organizace cytoskeletu by mohl být také gen CNN1 (Masuda *et al.*, 1996).

Několik faktorů souvisejících s buněčným transportem, tříděním a strukturami membrán bylo shodně down-regulováno v obou studovaných buněčných liniích. Jde kupříkladu o gen VSP13, jenž hraje důležitou úlohu ve vesikuly zprostředkovaném transportu a třídění proteinů v rámci buňky (Kolehmainen *et al.*, 2003), anebo o protein CRTAP, jenž je účastníkem retrográdních transportů uvnitř Golgiho aparátu. Infekce VKE velmi výrazně ovlivňuje organizaci a nejspíše i funkci buněčných membránových kompartmentů. Proto je možné, že množení viru nějakým způsobem interferuje s běžnou funkcí těchto genů. Gen CAV 2 je stěžejní komponentou drobných invaginací plazmatické membrány („caveolae“), které zastávají široké spektrum funkcí. Těžko lze vyvozovat konkrétní důsledky, ale snížená exprese CAV2 dozajisté ovlivní funkčnost těchto struktur, čímž může být omezena signalizace, metabolismus lipidů, buněčná růst i apoptóza (Krasteva *et al.* 2006). „Caveolae“ se podílí na alternativním způsobu endocytózy. Jedná se o paralelu ke clathrinem zprostředkované endocytóze, kterou flaviviry vstupují do buněk (Chu *et Ng*, 2004). Endocytóza zprostředkovaná caveolinem je využívána kupříkladu opičím virem SV40 (Pelkmans *et Helenius*, 2002) a není vyloučeno, že tento typ endocytózy by v případě VKE mohla hrát nějakou úlohu při infekci buněk.

Rozdílná odpověď GLIO a NEURO na infekci VKE

V řadě případů se odpověď buněčných linií GLIO a NEURO na infekci VKE lišila. Průkazně vyšší exprese v NEURO linii byla zaznamenána u čtyř genů; opačný trend, tedy průkazně vyšší exprese v linii GLIO byla zaznamenána v případě 118 genů. Tento výrazný nepoměr by mohl mít dvě hlavní příčiny. První z nich je mnohem výraznější celková heterogenita získaných dat genové exprese v případě NEURO linie. Zdá se, že odpověď NEURO buněk byla méně uniformní než tomu bylo u GLIO, což v důsledku vedlo k tomu, že řadu genů nemohla být při statistickém vyhodnocení považována za geny s průkazně změněnou expresí. Další důvod vyplývá přímo z typu studovaných buněk. GLIO patří mezi antigen prezentující buňky a tak v důsledku infekce u nich došlo k aktivaci řady drah souvisejících s imunitní odpovědí, které ovšem v NEURO spuštěny být nemohly.

Ze skupiny „NEURO UP“, tedy genů s průkazně vyšší expresí v neuroblastomové buněčné linii, byla nejmarkantnější změna genové exprese zaznamenána u genu PIP5KL1. Jím kódovaný protein se podílí se na syntéze fosfatidylinositol trifosfátu a s tím související reorganizaci aktinového cytoskeletu. Jedná se tak o další gen s možným vlivem na disorganizaci buňčného cytoskeletu v důsledku infekce VKE (Chang *et al.*, 2004).

U GLIO byly v důsledku infekce pozitivně regulovány tři geny související s apoptózou. Apoptóza byla ve studii Růžka a kolegů (2009b) zaznamenána u asi 20% infikovaných buněk v intervalu 48 hodin po infekci VKE a to jak u GLIO tak i u NEURO buněčné linie. I v jiných studiích byla apoptóza v souvislosti s VKE popsána jak v buněčných liniích i v mozcích laboratorně infikovaných myší a byla považována za mechanismus cytopatického efektu (Isaeva *et al.*, 1998).

Za spuštění apoptózy v GLIO linii by mohly být, alespoň částečně, zodpovědné dva geny, a to XAF1 (gen BIRC4BP) a SCOTIN.

Prvně jmenovaný váže inhibitor apoptózy XIAP (gen BIRC4BP), čímž mu znemožňuje blokování aktivace kaspáz, což vyústí ve spuštění kaspázové kaskády a apoptózy (Liston *et al.*, 2001). Další mechanismus, kterým XAF1 podporuje apoptotickou smrt souvisí s buněčným cytokinem TNF α (tumor necrosis factor α). U buněk deficientních na XIAP dochází díky XAF1 k aktivaci mitochondriální apoptotické dráhy a to uvolněním cytochromu

c do cytoplasmy, čímž je zesílen signál pro apoptózu obdrženy od „death“ receptoru stimulovaného TNF α . (Xia *et al.*, 2006).

SCOTIN představuje proapoptotický gen částečně spjatý s p53 závislou apoptotickou dráhou. Exprese SCOTINU bývá spuštěna v důsledku výrazného narušení endoplazmatického retikula (Bourdon *et al.*, 2002), ke kterému u VKE dochází jak v souvislosti s replikací, tak s kompletováním nové populace virionů. Tento gen byl popsán jako up-regulovaný v mozcích myši v důsledku infekce virem západního Nilu (Venter *et al.*, 2005), což naznačuje, že tento gen by mohl hrát úlohu ve zprostředkování apoptózy u širší škály flavivirů.

Převážná většina NEURO a GLIO buněk ovšem apoptotické smrti nepodléhala (Růžek *et al.*, 2009b), z čehož je možné vyvozovat, že je v buňkách přítomen nějaký faktor schopný působit proti mechanismu apoptotické smrti. Alespoň částečně se na protiapoptotickém působení mohl podílet gen IFI6, up-regulovaný v GLIO buněčné linii. Produkt tohoto genu inhibuje funkci kaspázy 3 tím, že blokuje depolarizaci mitochondriální membrány a uvolnění cytochromu c do cytosolu. Nejspíše má rozhodující úlohu ve zprostředkování buněčného přežití tím, že blokuje mitochondriemi zprostředkovanou apoptózu (Tahara *et al.*, 2005). Dalším zajímavým faktem je, že tento gen byl v infikovaných GLIO buňkách up-regulován velmi výrazně (až pětinasobně vyšší exprese než v buňkách kontrolních). To představuje i mnohem výraznější expresní změnu než u genů BIRC4BP a SCOTIN, takže není těžké si představit, že i v buňkách, kde byla exprese BIRC4BP a SCOTIN zvýšena, mohla být výrazně převážena antiapoptotickou funkcí IFI6.

Apoptotická buněčná smrt byla popsána i v případě linie NEURO, ale v rámci sledovaných, s apoptózou souvisejících genů, nebyly změny v expresi pozorovány.

Buněčná interferonová odpověď typu I zahrnuje skupinu virem indukovaných faktorů, které kontrolují infekci v případě množství lidských i zvířecích virů. Jde o univerzálně exprimované molekuly, které v rozličných typech buněk aktivují několik paralelních antivirových drah, jejichž produkty interferují s virovou replikací (Urošević, 2003).

V provedených experimentech byla na úrovni genové exprese v glioblastomové buněčné linii zaznamenána masivní up-regulace genů zapojených v odpovědi na stimulaci interferonem. Byla pozorována zvýšená regulace IFN signalizačních molekul (a zároveň transkripčních faktorů) jako jsou STAT1, IRF9 nebo IRF7 a také molekul, jejichž přítomnost svědčí o indukovaném antivirovém stavu. Jde například o proteiny Mx1, OAS1, OASL, PKR (protein kináza R) či Viperin. Všechny tyto molekuly jsou rozličnými mechanismy schopny limitovat množení viru v buňce (Randal *et al.*, 2008). Oligoadenylát syntetáza (OAS)

a protein kinázy R (PKR) se prokazatelně uplatňují při kontrole infekce kupříkladu virem západního Nilu (Kajaste-Rudnitski, *et al.*, 2006; Samuel *et al.*, 2006).

Na druhou stranu ovšem k výrazné aktivaci interferonové odpovědi nedocházelo v případě NEURO buněk. Tato přirozená protivirová obrana buňky by tedy v případě NEURO linie mohla být blokována. Jak bylo popsáno na příkladu několika buněčných linií, VKE může působit antagonisticky na interferonovou signalizační dráhu. Virový protein NS5 v součinnosti s buněčným proteinem hScrib je schopen blokovat fosforylaci (a tudíž i aktivaci) transkripčního faktoru STAT1, zásadního účastníka signalizační dráhy IFN I i IFN II (Werme *et al.*, 2008). Protein NS5 blízkého příbuzného viru Langat dokáže blokovat fosforylaci STAT1, STAT2 TYK2 a JAK1 signalizačních molekul a NS5 zároveň přímo interaguje s interferonovým receptorem (IFNAR1, IFNAR2) (Best *et al.*, 2005). Otázkou zůstává, zda případné blokování fosforylace STAT1 faktoru (či případně dalších) virem KE v NEURO buňkách postačuje samo o sobě k tak výraznému utlumení IFN odpovědi anebo za to může být zodpovědný další, doposud nepopsaný mechanismus.

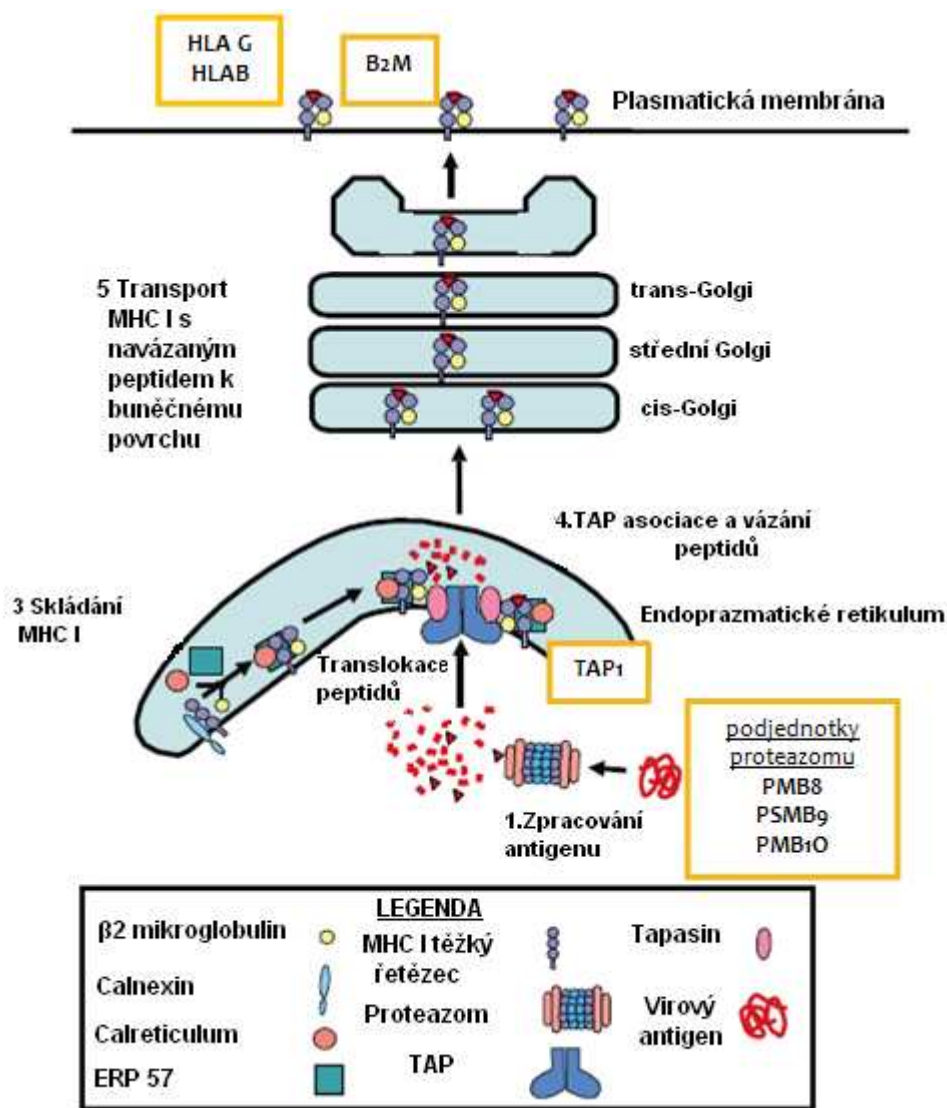
Protein viperin (kódovaný genem RSAD2) byl popsán jako protein se širokým antivirovým účinkem, který je indukován interferony typu I i II, virovou infekcí anebo se strukturami asociovanými s patogeny. Poprvé byla tato molekula popsána v souvislosti s cytomegalovirovou infekcí (Zhou *et al.*, 1997), avšak od té doby se ukázalo, že se jedná o protein s účinky proti širokému spektru virů (např. Helbig *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007). Přesná funkce a mechanismus antivirového působení zůstává prozatím neobjasněna. V případě infekce virem Japonské encefalitidy dochází k indukci exprese viperinu IFN-nezávislým mechanismem. Překvapivě je v buňkách infikovaných tímto virem viperin na proteinové úrovni rychle degradován v proteasomech (Chan *et al.*, 2008). Viperin, jakožto molekula up-regulovaná VKE je v této práci popsán poprvé u klíšťaty přenášených flavivirů. Bylo by velmi zajímavé ověřit, zda i v tomto případě dochází k expresi na proteinové úrovni. Jak již bylo zmíněno výše, viperin může být aktivován dvěma mechanismy, na interferonové odpovědi závislým a nezávislým. Fakt, že u GLIO buněk byla silně indukována IFN signalizace a současně up-regulován viperin naznačuje, že u VKE na rozdíl od JEV se uplatňuje spíše první ze zmíněných mechanismů aktivace.

V GLIO buňkách byla rovněž detekována zvýšená exprese chemokinu RANTES (CCL5) a jeho receptoru CCR5. Úlohou těchto molekul je přitahovat cirkulující imunitní buňky jako jsou lymfocyty, eosinofily, bazofily, makrofágy a NK buňky do místa zánětu. Zvýšená exprese těchto molekul by mohla být klíčem k imunopatologii onemocnění KE. Na

myším modelu bylo pozorováno, že CD8⁺ cytotoxické T lymfocyty jsou zodpovědné za rychlejší a fatální průběh KE (Růžek *et al.*, 2009a). Souvislost infiltrace cytotoxickými T lymfocyty a exprese CCR5 byla prokázána v případě viru západního Nilu. Na druhou stranu je však CCR5 důležitým faktorem pro zdolání virové encefalitidy. Myši deficientní v CCR5 sice vykazovaly nižší míru infiltrace imunitními buňkami do CNS, avšak podléhaly infekci dříve, v důsledku intenzivnější virové replikace (Glass *et al.*, 2005).

Zajímavým faktem na modulaci hostitelských imunitních drah virem VKE je zvýšená regulace MHC I molekul. U široké škály virů (např. herpesviry, adenoviry, retroviry) byl popsán jev opačný, kdy se snížením prezentace svých peptidů MHC I molekulami snaží tyto viry předejít rozpoznání specifickými cytotoxickými T lymfocyty, které po vazbě na komplex eliminují infikované buňky (shrnuto v Hewitt, 2003). Zvýšená prezentace MHC I molekul na povrchu buněk infikovaných flaviviry je tedy svým způsobem paradoxní jev, který byl doposud zaznamenán výhradně u zástupců rodu Flavivirus, jako jsou kupříkladu virus žluté zimnice, virus dengue, virus západního Nilu, virus japonské encefalitidy anebo virus Kunjin (shrnuto v Lobigs *et al.*, 2003).

Doposud ovšem nebylo ověřeno, zda ke stejnému jevu dochází také u flavivirů přenášených klíšťaty (Lobigs *et al.*, 2003). V předkládané práci se podařilo prokázat spojitost zvýšené exprese MHC I molekul s infekcí virem klíšťové encefalitidy a je to tedy poprvé u klíšťaty přenášeného flaviviru. Nešlo však pouze o molekuly kódující MHC I řetězec (HLA-B, HLA-G), ale také o zástupce celé metabolické dráhy která se na prezentaci antigenů podílí, počínaje zpracováním antigenu (interferon indukibilní podjednotky proteasomu PSMB8, PSMB9, PSMB10), přes molekulu podílející se na translokaci peptidových fragmentů z cytoplazmy do lumen endoplazmatického retikula (TAP1), až po beta 2-mikroglobulin volně asociovaný s MHC I. Jednotlivé kroky, směřující k prezentaci antigenů MHC I komplexy, u kterých je ovlivněna jejich exprese jsou shrnuty na obrázku (Obr 5.1).



Obr. 5.1 Ovlivnění MHC I antigen prezentující dráhy replikací VKE. Ve žlutých rámečcích jsou vypsány geny up-regulované v GLIO buněčné linii. Obrázek převzat z Hewitt, 2003.

MHC I molekuly se formují v lumen ER a navázání peptidového fragmentu (antigenu) je nedílnou součástí celého procesu. Proto je nezbytné komponenty MHC I molekul přemístit z cytosolu do lumen ER. Klíčovým transportérem, jakýmsi „hrdlem lahve“, zastávajícím tuto funkci je protein TAP (transporter associated with antigen processing) (Abele *et* Tampe, 1999). Kromě translokace peptidů je jakožto podpůrný protein nepostradatelným účastníkem sbalování vznikajících MHC I. Doposud byly podávány rozporuplné informace o tom, jestli zvýšená MHC I exprese přímo souvisí se zvýšenou expresí TAP (Momburg *et al.*, 2001; Kesson *et* King, 2001). Předkládané výsledky naznačují, že zvýšená exprese MHC I je úzce spjata se zvýšenou expresí proteinu TAP1.

Je tedy možné, že si flaviviry vyvinuly mechanismus jak se přes zvýšenou expresi MHC I vyhnout NK buňkami zprostředkované odpovědi (Liu *et al.*, 1989). Starší studie našla souvislost mezi mírou cytolytické aktivity NK buněk vůči infikovaným buňkám a upregulací MHC antigenů na cílových buňkách (Müllbacher *et al.*, 1989). V důsledku toho ovšem mohou být VKE infikované buňky náchylnější k rozpoznání cytotoxickými T lymfocyty. Vysvětlení ale může být prozaičtější, zvýšená exprese MHC I molekul může být pouze vedlejším produktem úzkého propojení virové replikace a formování nových virionů v těsném kontaktu s ER a pro rozvoj infekce v hostiteli nemusí mít žádný význam (Lobigs *et al.*, 2003).

Zvýšení exprese komplexů MHC I ovšem u VKE není jevem univerzálním, neboť k němu nedochází u všech typů buněk, hladina MHC I u NEURO nebyla infekcí VKE ovlivněna.

Real-time PCR

Mikročipová analýza nám dává možnost zkoumat buněčné procesy ve velkém měřítku, stává se tak vodítkem ke konkrétním dějům v buňce, které jsou v důsledku experimentu ovlivněny, v našem případě buněčné procesy ovlivněné v důsledku infekce virem klíšťové encefalidity. Avšak jako většina molekulárně-biologických metod má i své nedostatky. Proto je třeba potvrdit výsledky také jinou nezávislou metodou, v našem případě to měla být real-time RT-PCR kvantifikace. Bohužel optimalizace podmínek real-time RT-PCR se doposud nezdařila do té míry, aby změny exprese konkrétních mRNA mohly být potvrzeny.

Jako problematické se ukázalo být použití fluorescenční barvy SYBR Green I, která se nespécificky váže do dvouřetězců jakýchkoliv DNA, tedy i dimerů primerů. Problém s dimery se podařilo z větší míry odstranit zvýšením teploty, při které je odečítána fluorescence. Místo odečtu na konci elongace při 72°C, jak je to běžné při real-time PCR experimentech, bylo zvoleno odečítání fluorescence při teplotě vyšší, upravené dle T_m teploty odtávání jednotlivých produktů pro každý konkrétní gen (většinou v rozmezí 77-80°C). Teplota při které byla odečítána fluorescence byla nastavena tak, aby dimery primerů již byly zvýšenou teplotou odděleny, ale aby T_m specifického produktu byla vyšší než tato teplota.

Použití interkalačních barviv má svá nesporná pozitiva, ale také omezení. V porovnání s používáním sond, které jsou specifické pro každý templát, je nespornou výhodou SYBR Green I finanční nenákladnost a možnost použití pro jakákoliv templát a kombinaci primerů. Hlavní nevýhodou je nespécifičnost, tedy fakt, že v reakci je kromě kýžených produktů detekován i jakýkoliv nespécifický produkt, včetně dimerů primerů (Giulietti *et al.*, 2001). Toto riziko lze ovšem výrazně snížit pečlivou optimalizací reakce – teploty nasedání primerů,

teploty odečtu fluorescence, koncentrace primerů, koncentrace hořčnatých iontů a v neposlední řadě i přidavkem tzv. enhancerů PCR reakce.

Dalším problémem se ukázala být velmi nízká exprese některých vybraných genů v běžných neovlivněných buňkách. Ačkoliv je HPRT1 považován za referenční gen s nízkou expresí, v neovlivněných buňkách byla exprese ostatních 4-200x nižší. V důsledku toho byla koncentrace cílových mRNA molekul v jednotlivých standardech na hranici či pod hranicí detekční metody. S tím byla následně spojena i nízká účinnost real-time RT-PCR reakce. Možným řešením by bylo pro tvorbu kalibrační křivky použít cDNA ze vzorků infikovaných VKE.

Na závěr bych chtěla konstatovat, že problémy, které se vyskytly ve spojení s kvantifikací mRNA, je v některých případech možno překonat ještě důkladnější optimalizací parametrů real-time PCR reakce, j jiných případech použitím cDNA templátu z infikovaných buněk pro kalibraci. V ostatních případech by bylo možno dosáhnout cíle použitím specifické hybridizační sondy navržené pro konkrétní produkt.

6. Shrnutí

- Infekce VKE výraznou měrou ovlivňuje proteosyntézu v infikovaných buňkách; děje se tak na úrovni modifikace mRNA a iniciace translace proteinů v obou studovaných buněčných liniích.
- Infekce VKE výraznou měrou zasahuje do utváření a organizace buněčného cytoskeletu a membránových struktur.
- V GLIO buněčné linii dochází v důsledku infekce k masivní indukci imunitní reakce související s interferonovou odpovědí, tento efekt ovšem chyběl u NEURO buněčné linie.
- Poprvé byla v souvislosti s klíšťaty přenášenými flaviviry popsána indukce Viperinu, proteinu s antivirovým účinkem.
- Řada účastníků MHC I antigen prezentující dráhy byla v důsledku infekce VKE zvýšeně exprimována; šlo o první pozorování u klíšťaty přenášených flavivirů.
- K apoptóze v GLIO buňkách dochází pravděpodobně v souvislosti s „death“ receptory. Apoptózy může být spouštěna buď mitochondriální anebo p53 závislou apoptotickou dráhu. V souvislosti s infekcí VKE byl identifikován antiapoptotický gen IFI6, inhibující mitochondriální dráhu.

7. Seznam použitých zkratk

aRNA	antisense ribonukleová kyselina
ATP	adenosin trifosfát
BOFES	fetální telecí sérum
bp	páry bází
BSA	hovězí sérový albumin
cDNA	komplementární DNA
CT	z angl. treshold cycle
ddH ₂ O	redestilovaná voda
DEPC H ₂ O	voda ošetřená diethylpyrocarbonátem
DMSO	dimethyl sulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	2'-deoxyribonukleosid-5'-trifostáty
dsDNA	dvouvláknová DNA (double strand)
dsRNA	dvouvláknová RNA (double strand)
DTT	dithiotreitol
FDR	z angl. false discovery rate
GLIO	glioblastomová buněčná linie
I.D.	infekční dávka
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's medium, kultivační médium
KE	klíšťová encefalitida
L15	Leibowitzovo kultivační médium

MHC	z angl. major histocompatibility complex
MOI	multiplicita infekce
mRNA	mediátorová RNA
NEURO	neuroblastomová buněčná linie
nt	nukleotid(y)
p	dosažená hladina významnosti
p.i.	doba po infekci (<i>post-infection</i>)
PBS	phosphate buffered saline – fosfáty pufrovaný fyziologický roztok
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
Prům.	průměr
PTS	prekolostrální telecí sérum
RIN	z angl. RNA integrity number
RNA	ribonukleová kyselina
rRNA	ribosomální RNA
RT- PCR	reverzně transkriptázová (zpětná) PCR
RT	reverzní transkripce
SAM	z angl. significance analysis of microarray
SDS	sodium dodecyl sulfát
ssDNA	jednovláknová DNA (single strand)
totRNA	totální RNA buňky
TNF α	tumor necrosis factor α , cytokin
Tm	z angl. melting temperature, teplota tání
VKE	virus klíšťové encefalitidy

8 Literatura

- Abele R., Tampe R., 1999.** Function of the transport complex TAP in cellular immune recognition. *Biochimica et Biophysica Acta* 1461: 405-419.
- Albrecht P., 1968.** Pathogenesis of neurotropic arbovirus infections. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 43:44-91.
- Avsic-Zupanc T., Poljak M., Maticic M. Radsel-Medvescek A., LeDuc J.W., Stiasny K., Kunz C., Heinz F.X., 1995.** Laboratory acquired tick-borne meningoencephalitis: characterisation of virus strains. *Clinical and Diagnostic Virology* 4: 51-9.
- Bähler M., 2008.** Class IX myosins. Negative regulators of the small GTP-binding protein Rho. In: Coluccio L.M. (editor) *Myosins: A superfamily of molecular motors*, Springer, 391-401.
- Baumeister W., Walz J., Zühl F., Seemüller E., 1998.** The Proteasome: Paradigm Review of a Self-Compartmentalizing Protease. *Cell* 92: 367–380.
- Best S. M., Morris K. L., Shannon J. G., Robertson S. J., Mitzel D. N., Park G. S., Boer E., Wolfenbarger J. B., Bloom M. E., 2005.** Inhibition of interferonstimulated JAK-STAT signaling by a tick-borne flavivirus and identification of NS5 as an interferon antagonist. *Journal of Virology* 79: 12828-12839.
- Blaškovič D., 1954.** The epidemic of encephalitis in the Rožňava natural focus of infection. Slovak Academy of Science, Bratislava, p 265.
- Blaškovič D., 1967.** The public health importance of tick-borne encephalitis in Europe. *Bulletin of the World Health Organization* 36 Suppl. 1: 5-13.
- Bost A.G., Venable D., Liu L., Heinz B.A., 2003.** Cytoskeletal requirements for hepatitis C virus (HCV) RNA synthesis in the HCV replicon cell culture system. *Journal of Virology* 77: 4401-4408.
- Bourdon J. C., Renzing J., Robertson P. L., Fernandes K. N., Lane D. P., 2002.** Scotin, a novel p53-inducible proapoptotic protein located in the ER and the nuclear membrane. *Journal of Cell Biology* 158: 235-246.

- Brash A.R., 1999.** Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *Journal of Biological Chemistry* 274: 23679-23682.
- Briscoe J., Sussel L., Serup P., Hartigan-O'Connor D., Jessell T.M., Rubenstein J.L., Ericson J., 1999.** Homeobox gene Nkx2.2 and specification of neuronal identity by graded Sonic hedgehog signalling. *Nature* 398: 622-627.
- Buc M., 2001.** *Imunológia. Veda. Bratislava*
- Bunka D.H.J., Stockley P.G., 2006.** Aptamers come of age - at last. *Nature Reviews of Microbiology* 4: 588-596.
- Catteau A., Kalinina O., Wagner M., Deubel V., Courageot M., Desprès P., 2003.** Dengue virus M protein contains a proapoptotic sequence referred as ApoptoM. *Journal of General Virology* 84: 2781-2793.
- Cavadini P., Biasiotto G., Poli M., Levi S., Verardi R., Zanella I., Derosas M., Ingrassia R., Corrado M., Arosio P., 2007.** RNA silencing of the mitochondrial ABCB7 transporter in HeLa cells causes an iron-deficient phenotype with mitochondrial iron overload. *Blood* 109: 3552-3559.
- Chambers T.J., Diamond M.S., 2003.** Pathogenesis of flavivirus encephalitis. *Advances in Virus Research* 60: 273-342.
- Chambers T.J., Hahn C.S., Galler R., Rice C.M., 1990.** Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annual Reviews of Microbiology* 44: 649-88.
- Chan Y.-L., Chang T.-H., Liao Ch.-L., Lin Y.-L., 2008.** The cellular antiviral protein viperin is attenuated by proteasome-mediated protein degradation in Japanese encephalitis virus-infected cells. *Journal of Virology* 82: 10455-10464.
- Chang J.D., Field S.J., Rameh L.E., Carpenter C.L., Cantley L.C., 2004.** Identification and characterization of a phosphoinositide phosphate kinase homolog. *Journal of Biological Chemistry* 279: 11672-11679.
- Chu J.J., Ng M.L., 2004.** Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway. *Journal of Virology* 78: 10543-10555.

- Cinatl, J. Jr., Gussetis E.S., Cinatl J., Ebener U., Mainke M., Schwabe D., Doerr H.W., Kornhuber B., Gerein, V., 1990.** Differentiation arrest in neuroblastoma cell culture. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 116 Suppl.: 9-14.
- Čizman M., Rakar R., Zakotnik B., Pokorn M., Arnez M., 1999.** Severe forms of tick-borne encephalitis in children. *Wiener klinische Wochenschrift* 111: 484-487.
- Cohen A.W., Hnasko R., Schubert W., Lisanti M.P., 2004.** Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiological Reviews* 84: 1341-1379.
- Courageot M.P., Catteau A., Desprès P., 2003.** Mechanisms of dengue virus-induced cell death. *Advances in Virus Research* 60: 157-186.
- Cresswell P., 1994.** Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annual Reviews of Immunology* 12: 259-293.
- Daneš L., 2000.** Nákaza člověka virem klíšťové encefalidity. *Medicína* 3: 16.
- de Madrid A.T.D., Porterfield J.S., 1969.** A simple micro-culture method for the study of group B arboviruses. *Bulletin of the World Health Organization* 40: 113 - 121.
- Degen W.G.J., Pruijn G.J., Raats J.M.H., van Venrooij W.J., 2000.** Caspase-dependent cleavage of nucleic acids. *Cell Death and Differentiation* 7: 616-627.
- Dennis G., Sherman B.T., Hosack D.A., Yang J., Gao W., Lane H.C., Lempicki R.A., 2003.** DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biology* 4: P3.
- Desagher S., Marinou J.C., 2000.** Apoptosis as the central control point of apoptosis. *Trends in Cell Biology* 10: 369-377.
- Dreyfus M., Regnier P., 2002.** The poly(A) tail of mRNAs: bodyguard in eukaryotes, scavenger in bacteria. *Cell* 111: 611–613.
- Dumpis U., Crook D., Oksi J., 1999.** Tick-borne encephalitis. *Clinical Infectious Diseases* 28: 882-890.

- Ecker M., Allison S. L., Meixner T., Heinz F. X., 1999.** Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *Journal of General Virology* 80: 179-185.
- Früh K., Yang Y., 1999.** Antigen presentation by MHC class I and its regulation by interferon gamma. *Current Opinions in Immunology* 11: 76-81.
- Galia F., Rampas J., Hollender L., 1949.** Laboratorní infekce encefalickým virem. *Časopis lékařů českých* 9: 224-228.
- Gaunt M.W., Sall A.A., de Lamballerie X., Falconar A.K.I., Dzhivanian T.I., Gould E.A., 2001.** Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. *Journal of General Virology* 82: 1867-1876.
- Gelpi E., Preusser M., Garzuly F., Holzmann H., Heinz F.X., Budka H., 2005.** Visualization of Central European tick-borne encephalitis infection in fatal human cases. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 64: 506-512.
- Giulietti A., Overbergh L., Valckx D., Decallonne B., Bouillon R., Mathieu C., 2001.** An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 25: 386-401.
- Glass W.G., Lim J.K., Cholera R., Pletnev A.G., Gao J.L., Murphy P.M., 2005.** Chemokine receptor CCR5 promotes leukocyte trafficking to the brain and survival in West Nile virus infection. *Journal of Experimental Medicine* 202: 1087–1098.
- Goodbourn S., Didcock L., Randall R.E., 2000.** Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *Journal of General Virology* 81: 2341-2364.
- Green D., Kroemer G., 1998.** The central executioners of apoptosis: Caspases or mitochondria. *Trends in Cell Biology* 8: 267-271.
- Grešíková M., Kaluzová M., 1997.** Biology of tick-borne encephalitis virus. *Acta Virologica* 41: 115-124.
- Gritsun T.S., Frolova T.V., Zhankov A.I., Armesto M., Turner S.L., Frolova M.P., Pogodina V.V., Lashkevich V.A., Gould E.A., 2003b.** Characterization of a Siberian

Virus isolated from a patient with progressive chronic tick-borne encephalitis. *Journal of Virology* 77: 25-36.

Gritsun T.S., Lashkevich V.A., Gould E.A., 2003a. Tick-borne encephalitis. *Antiviral Research* 57: 129-146.

Haglund M., Günther G., 1997. Do tick-borne encephalitis patients develop a post-encephalitic syndrome – a review of the literature. *Ellipse* 13: 7-12.

Harky, J.L., Houk, E.J., Kramer, L.D., Reeves, W.C., 1983. Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. *Annual Review of Entomology* 28: 229-262.

Hase T., Summers P.L., Eckels K.H., Baze W.B., 1987a. Maturation process of Japanese encephalitis virus in cultured mosquito cells *in vitro* and mouse brain cells *in vivo*. *Archives of Virology* 96: 135-151.

Hase T., Summers P.L., Eckels K.H., Punak J.R., 1987b. An electron and immunoelectron microscopic study of dengue-2 virus infection of cultured mosquito cells: maturation event. *Archives of Virology* 92: 273-291.

Heinz F.X., Collett M.S., Purcell R.H., Gould E.A., Howard C.R., Houghton M., Moormann R.J.M., Rice D.M., Theil H.J., 2000. Family *Flaviviridae*. In: van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Carstens E., Estes M.K., Lemon S., Maniloff J., Mayo M.A., McGeogch D., Pringle C.R., Wickner R.B. (Eds.), *Virus taxonomy*. In: *Proceedings of the 7th International Committee for the Taxonomy of viruses*. Academic Press, San Diego, California, 859-878.

Helbig K.J., Lau D.T., Semendric L., Harley H.A.J., Beard M.R., 2005. Analysis of ISG expression in chronic hepatitis C identifies viperin as a potential antiviral effector. *Hepatology* 42: 702-710.

Hengartner M.O., 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-776.

Hewitt E.W., 2003. The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion. *Immunology*. 110: 163-169.

Hořejší V., Bartůňková J., 2001. *Základy imunologie*. Triton: 260.

- Huang D.W., Sherman B.T., Lempicki R.A., 2009.** Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols* 4: 44-57.
- Inoue Y.K., Ogura R., 1962.** Studies on Japanese B encephalitis virus. III. Propagation and assay of Japanese B encephalitis virus in a stable line of porcine kidney cells. *Virology* 16: 205-207.
- Isaeva M.P., Leonova G.N., Kozhemiako V.B., Borisevich V.G., Maistrovskaia O.S., Rasskazov V.A., 1998.** Apoptosis as a mechanism for the cytopathic action of tick-borne encephalitis virus. (v Ruštině) *Voprosy virusologii* 43:182-186.
- Jensen P.E., Weber D.A., Thayer W.P., Chen X., Dao C.T., 1999.** HLA-DM and the MHC class II antigen presentation pathway. *Immunologic Research* 20: 195-205.
- Jones L.D., Davies C.R., Steele G.M., Nuttall P.A., 1987.** A novel mode of arbovirus transmission involving a nonviraemic host. *Science* 237: 775-777.
- Kajaste-Rudnitski A., Mashimo T., Frenkiel M.P., Guénet J.L., Lucas M., Desprès P., 2006.** The 2',5'-oligoadenylate synthetase 1b is a potent inhibitor of West Nile virus replication inside infected cells. *Journal of Biological Chemistry* 281: 4624-4637.
- Kesson A.M., King N.J., 2001.** Transcriptional regulation of major histocompatibility complex class I by flavivirus West Nile is dependent on NF-kappaB activation. *Journal of Infectious Diseases* 184: 947-954.
- King N.J.C., Getts D.R., Getts M.T., Rana S., Shrestha B., Kesson A.M., 2007.** Immunopathology of flavivirus infection. *Immunology and Cell Biology* 85: 33-42.
- Koh W-L., Ng M., 2005.** Molecular mechanisms of West Nile virus pathogenesis in brain cells. *Emerging Infectious Diseases* 11: 629-632.
- Kolehmainen J., Black G.C., Saarinen A., Chandler K., Clayton-Smith J., Traskelin A.L., Träskelin A., Perveen R., Kivitie-Kallio S., Norio R., Wartburg M., Fryns J., de la Chapelle A., Lehesjoski A., 2003.** Cohen syndrome is caused by mutations in a novel gene, COH1, encoding a transmembrane protein with a presumed role in vesicle-mediated sorting and intracellular protein transport. *American Journal of Human Genetics* 72: 1359-69.

- Kopecký J., Grubhoffer L., Kovár V., Jindrák L., Vokurková D., 1999.** A putative host cell receptor for tick-borne encephalitis virus identified by anti-idiotypic antibodies and virus affino blotting *Intervirology* 42: 9-16.
- Korenberg E.I., 2000.** Seasonal population dynamics of *Ixodes* ticks and tick-borne encephalitis virus. *Experimental and Applied Acarology* 24: 665-681.
- Kožuch O., Labuda M., Lysý J., Weismann P., Krippel E., 1990.** Longitudinal study of natural foci of central European encephalitis virus in west Slovakia. *Acta Virologica* 34: 537-544.
- Kožuch O., Mayer V., 1975.** Pig kidney epithelial (PS) cells: a perfect tool for the study of flaviviruses and some other arboviruses. *Acta Virologica* 19: 498.
- Krasteva G., Pfeil U., Drab M., Kummer W., König P., 2006.** Caveolin-1 and -2 in airway epithelium: expression and *in situ* association as detected by FRET-CLSM. *Respiratory Research* 7:108.
- Kunz C., Heinz F.X., 2003.** Tick-borne encephalitis. *Vaccine* 21 Suppl. 1: S1-S2.
- Labuda M., Austyn J.M., Zuffova E., Kožuch O., Fuchsberger N., Lysý J., Nuttall P.A., 1996.** Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission. *Virology* 219: 357-366.
- Labuda M., Jones L.D., Williams T., Danielova D., Nuttall P.A., 1993a.** Efficient transmission of tick-borne encephalitis virus between co-feeding ticks. *Journal of Medical Entomology* 30: 295-299.
- Labuda M., Kožuch O., Zuffova E., Eleckova E., Hails R.S., Nuttall P.A., 1997.** Tick-borne encephalitis virus transmission between ticks co-feeding on specific immune natural rodent hosts. *Virology* 235: 138-143.
- Labuda M., Nuttall P.A., Kožuch O., Elecková E., Williams T., Zuffova E., Sabo A., 1993b.** Non-viraemic transmission of tick-borne encephalitis virus: a mechanism for arbovirus survival in nature. *Experientia* 49: 802-805.

- Lasa A., Serrano E., Carricondo M., Carnicer M.J., Brunet S., Badell I., Sierra J., Aventín A., Nomdedéu J.F., 2008.** High expression of CEACAM6 and CEACAM8 mRNA in acute lymphoblastic leukemias. *Annals of Hematology* 87: 205-11.
- Lee C.J., Liao C.L., Lin Y.L., 2005.** Flavivirus activates phosphatidylinositol 3-kinase signaling to block Caspase-dependent apoptotic cell death at the early stage of virus infection. *Journal of Virology* 79: 8388-8399.
- Leysen P., De Clercq E., Neyts J., 2000.** Perspectives for the treatment of infections with *Flaviviridae*. *Clinical Microbiology Reviews* 13: 67-82.
- Liew K.J., Chow V.T., 2006.** Microarray and real-time RT-PCR analyses of a novel set of differentially expressed human genes in ECV304 endothelial-like cells infected with dengue virus type 2. *Journal of Virological Methods*;131: 47-57.
- Lindenbach B.D., Thiel H.J., Rice C.M., 2007.** *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication Fields Virology*, 5th Edition. In: Knipe D.M.,Howley P.M., Eds. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. 52
- Lindquist L., Vapalahti O., 2008.** Tick-borne encephalitis. *Lancet*.371: 1861-1871.
- Liston P., Fong W.G., Kelly N.L., Toji S., Miyazaki T., Conte D., Tamai K., Craig C.G., McBurney M.W., Korneluk R.G., 2001.** Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity. *Nature Cell Biology* 3, 128-133.
- Liu Y., King N., Kesson A., Blanden R.V., Müllbacher A., 1989.** Flavivirus infection up-regulates the expression of class I and class II major histocompatibility antigens on and enhances T cell recognition of astrocytes *in vitro*. *Journal of Neuroimmunology* 21: 157-168.
- Lobigs M., Müllbacher A., Regner M., 2003.** MHC class I up-regulation by flaviviruses: Immune interaction with unknown advantage to host or pathogen. *Immunology and Cell Biology* 81: 217-223.
- Luňáčková J., Chmelík V., Šípová I., Žampachová E., Bečvářová J., 2003.** Epidemiologic monitoring of tick-borne encephalitis in Rimov in Southern Bohemia. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie* 52: 51-58.

- Mackay I.M., Arden K.E., Nitsche A., 2002.** Real-time PCR in virology. *Nucleic acids Research* 30: 1292-1305.
- Mamoli B., Pelzl G., 1990.** Residualschaden nach FSME. *Österreichische Ärztezeitung* 45: 45–51.
- Mandl C.W., 2005.** Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that affect neuropathogenesis. *Virus Research* 111: 161-174.
- Mandl C.W., Heinz F.X., Kunz C., 1988.** Sequence of the structural proteins of tick-borne encephalitis virus (Western subtype) and comparative analysis with other flaviviruses. *Virology* 166: 197-205.
- Mandl C.W., Kroschewski H., Allison S.L., Kofler R., Holzmann H., Meixner T., Heinz F.X., 2001.** Adaptation of tick-borne encephalitis virus to BHK-21 cells results in the formation of multiple heparan sulfate binding sites in the envelope protein and attenuation *in vivo*. *Journal of Virology* 75: 5627-5637.
- Markoff L., 2003.** 5'- and 3'-noncoding regions in flavivirus RNA. *Advances in Virus Research* 59: 177-228.
- Martinez-Barragán J.J., del Angel R.M., 2001.** Identification of a putative coreceptor on Vero cells that participates in dengue 4 virus infection. *Journal of Virology* 75: 7818-7827.
- Mashimo T., Lucas M., Simon-Chazottes D., Frenkiel M., Montagutelli X., Ceccaldi P., Deubel V., Guenet J., Despres P., 2002.** A nonsense mutation in the gene encoding 2'-5'-oligoadenylate synthetase/L1 isoform is associated with West Nile virus susceptibility in laboratory mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 99: 11311-11316.
- Masuda H., Tanaka K., Takagi M., Ohgami K., Sakamaki T., Shibata N., Takahashi K., 1996.** Molecular cloning and characterization of human non-smooth muscle calponin. *Journal of Biochemistry* 120(2): 415-424.
- Mázló M., Szántó J., 1978.** Morphological demonstration of the virus of tick-borne encephalitis in the human brain. *Acta Neuropathologica* 43: 251-253.

- McKean P.G., Vaughan S., Gull K., 2001.** The extended tubulin superfamily. *Journal of Cell Science* 114: 2723-2733.
- McMinn P.C., 1997.** The molecular basis of virulence of the encephalitogenic flaviviruses. *Journal of General Virology* 78 : 2711-22.
- Merrick W.C., 2004.** Cap-dependent and cap-independent translation in eukaryotic systems. *Gene* 332:1–11.
- Momburg F., Müllbacher A., Lobigs M., 2001.** Modulation of transporter associated with antigen processing (TAP) – mediated peptide import into the endoplasmic reticulum by flavivirus infection. *Journal of Virology* 75: 5663–5671.
- Morello R., Bertin T.K., Chen Y., Hicks J., Tonachini L., Monticone M., Castagnola P., Rauch F., Glorieux F.H., Vranka J., Bächinger H.P., Pace J.M., Schwarze U., Byers P.H., Weis M., Fernandes R.J., Eyre D.R., Yao Z., Boyce B.F., Lee B., 2006.** CRTAP is required for prolyl 3-hydroxylation and mutations cause recessive osteogenesis imperfecta. *Cell* 127: 291–304.
- Mukhopadhyay S., Kuhn R.J., Rossmann M.G., 2005.** A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature Reviews Microbiology* 3: 13-22.
- Müllbacher A., King N.J.C., 1989.** Target cell lysis by natural killer cells is influenced by beta 2-microglobulin expression. *Scandinavian Journal of Immunology* 30: 21-29.
- Nandi D., Woodward E., Ginsburg D.B., Monaco J.J., 1997.** Intermediates in the formation of mouse 20S proteasomes: implications for the assembly of precursor β subunits. *The EMBO Journal* 16: 5363–5375.
- Narumiya S., Ishizaki T., Watanabe N., 1997.** Rho effectors and reorganization of actin cytoskeleton. *FEBS Letters* 410: 68-72.
- Ng M.L., 1987.** Ultrastructural studies of Kunjin virus-infected *Aedes albopictus* cells. *Journal of General Virology* 68: 103-120.
- Ng M.L., Tan S.H., Chu J.J.H., 2001.** Transport and budding at two distinct sites of visible nucleocapsids of West Nile (Sarafend) virus. *Journal of medical virology* 65: 758-764.

- Pelkmans L., Helenius A., 2002.** Endocytosis via caveolae. *Traffic* 3: 311-320.
- Pfaffl M., 2001.** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29: 2002-2007.
- Preiss T., Hentze M.W., 2003.** Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation. *Bioessays* 25: 1201-1211.
- Prikhod'ko G.G., Prikhod'ko E.A., Cohen J.I., Pletnev A.G., 2001.** Infection with Langkat Flavivirus or expression of the envelope protein induces apoptotic cell death. *Virology* 286: 328-335.
- Prikhod'ko G.G., Prikhod'ko E.A., Pletnev A.G., Cohen J.I., 2002.** Langkat Flavivirus protease NS3 binds caspase-8 and induces apoptosis. *Journal of Virology* 76: 5701-5710.
- Ramanathan M.P., Chambers J.A., Pankhong P., Chattergoon M., Attatippaholkun W., Dang K., Shah N., Weiner D.B., 2005.** Host cell killing by the West Nile virus NS2B-NS3 proteolytic complex: NS3 alone is sufficient to recruit caspase-8-based apoptotic pathway. *Virology* 345: 56-72.
- Ramos-Castaneda J., Imbert J.L., Barrón B.L., Ramos C., 1997.** A 65-kDa trypsin-sensible membrane cell protein as a possible receptor for dengue virus in cultured neuroblastoma cells. *Journal of Neurovirology* 3: 435-440.
- Rampas J., Galia F., 1949.** Laboratorní infekce encefalickým virem. *Časopis lékařů českých* 88: 1179.
- Randall R.E., Goodbourn S., 2008.** Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *Journal of General Virology* 89: 1-47.
- Růžek D., Salát J., Palus M., Gritsun T.S., Gould E.A., Dyková I., Skallová A., Jelínek J., Kopecný J., Grubhoffer L., 2009a.** CD8⁺ T-cells mediate immunopathology in tick-borne encephalitis. *Virology* 384: 1-6.
- Růžek D., Vancová M., Tesařová M., Ahantarig A., Kopecný J., Grubhoffer L., 2009b.** Morphological changes in human neural cells following tick-borne encephalitis virus infection. *Journal of General Virology*. v tisku.

- Samuel M.A., Whitby K., Keller B.C., Marri A., Barchet W., Williams B.R., Silverman R.H., Gale M. Jr, Diamond M.S., 2006.** PKR and RNase L contribute to protection against lethal West Nile Virus infection by controlling early viral spread in the periphery and replication in neurons. *Journal of Virology* 80: 7009-7019.
- Sanders M.L., Scott A.L., Glass G.E., Schwartz B.S., 1996.** Salivary gland changes and host antibody responses associated with feeding of male lone star ticks (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology* 33: 628-634.
- Schena M., Shalon D., Davis R.W., Brown P.O., 1995.** Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270: 467-470.
- Schena M., Shalon D., Heller R., Chai A., Brown P.O., Davis R.W., 1996.** Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 93: 10614-10619.
- Schneider H., 1931.** Über epidemische akute Meningitis serosa. *Wiener klinische Wochenschrift* 44: 350-352.
- Schubert U., Antón L.C., Gibbs J., Norbury C.C., Yewdell J.W., Bennink J.R., 2000.** Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature*.404: 770-774.
- Šenigl F., Grubhoffer L., Kopecký J., 2006.** Differences in maturation of tick-borne encephalitis virus in mammalian and tick cell line. *Intervirology* 49: 239-248.
- Solomon T., Ooi M.H., Mallewa M., 2007.** Viral infections of lower motor neurons. In: Eisen A. A., Shaw P. J., Editors, 2007. *Motor Neuron Disorders and Related Diseases, Handbook of Clinical Neurology, Vol. 82 (3rd series)*. Elsevier B.V. Stránky.
- Sonenberg N., Hershey J.W.B., Mathews M.B. (editors), 2001.** Translational control of gene expression. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Spiliotis E.T., Manley H., Osorio M., Zúñiga M.C., Edidin M., 2000.** Selective export of MHC class I molecules from the ER after their dissociation from TAP. *Immunity* 13:841-851.

- Sriurairatna S., Bhamarapravati N., Phalavadhtana O., 1973.** Dengue virus infection of mice: morphology and morphogenesis of dengue type-2 virus in suckling mouse neurons. *Infection and Immunity* 8: 1017-1028.
- Stark G.R., Kerr I.M., Williams B.R.G., Silverman R.H., Schreiber R.D., 1998.** How cells respond to interferons. *Annual Review of Biochemistry* 67: 227-264.
- Süss J., 2003.** Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. *Vaccine* 21 Suppl. 1: S19-S35.
- Süss J., Schrader C., 2004.** Durch Zecken übertragene humanpathogene und bisher als apathogen geltende Mikroorganismen in Europa. *Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz* 47: 392-404.
- Swiercz R., Cheng D., Kim D., Bedford M.T., 2007.** Ribosomal protein rpS2 is hypomethylated in PRMT3-deficient mice. *Journal of Biological Chemistry* 282: 16917-16923.
- Tahara E., Tahara H., Kanno M., Naka K., Takeda Y., Matsuzaki T., Yamazaki R., Ishihara H., Yasui W., Barrett J.C., Ide T., Tahara E., 2005.** G1P3, an interferon inducible gene 6-16, is expressed in gastric cancers and inhibits mitochondrial-mediated apoptosis in gastric cancer cell line TMK-1 cell. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 54: 729-740.
- Tamari M., Daigo Y., Ishikawa S., Nakamura Y., 1998.** Genomic structure of a novel human gene (XYLB) on chromosome 3p22-->p21.3 encoding a xylulokinase-like protein. *Cytogenetics and Cell Genetics* 82: 101-104.
- Tasseneetrithep B., Burgess T.H., Granelli-Piperno A., Trumfheller C., Finke J., Sun W., Eller M.A., Pattanapanyasat K., sarasombath S., Birx D.L., Steinman R.M., Schlesinger S., Marovich M.A., 2003.** DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine* 197: 823-829.
- Thellin O., Zorzi W., Lakaye B., De Borman B., Coumans B., Hennen G., Grisar T., Igout A., Heinen E., 1999.** Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology* 75: 291-295.

- Thiel H.J., Collett M.S., Gould E.A., Heinz F.X., Houghton M., Meyers G., Purcell R.H., Rice C., 2005.** Family *Flaviviridae*. In: Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A., Editors. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature*, Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, 981–998.
- Thuresson A.C., Aström J., Aström A., Grönvik K.O., Virtanen A., 1994.** Multiple forms of poly(A) polymerases in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 91: 979-83.
- Tusher V.G., Tibshirani R., Chu G., 2001.** Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 98: 5116-5121.
- Urosevic N., 2003.** Is flavivirus resistance interferon type I-independent? *Immunology and Cell Biology* 81: 224–229.
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F., 2002.** Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3: RESEARCH0034
- Venter M., Myers T.G., Wilson M.A., Kindt T.J., Paweska J.T., Burt F.J., Leman P.A., Swanepoel R., 2005.** Gene expression in mice infected with West Nile virus strains of different neurovirulence. *Virology* 342: 119-140.
- Villadangos J.A., Schnorrer P., 2007.** Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nature Reviews Immunology* 7: 543-555.
- Wang X., Hinson E.R., Cresswell P., 2007.** The interferon-inducible protein viperin inhibits influenza virus release by perturbing lipid rafts. *Cell Host & Microbe* 2: 96-105.
- Werme K., Wigerius M., Johansson M., 2008.** Tick-borne encephalitis virus NS5 associates with membrane protein scribble and impairs interferon-stimulated JAK-STAT signalling.
- Xia Y., Novak R., Lewis J., Duckett C.S., Phillips A.C., 2006.** Xaf1 can cooperate with TNF α in the induction of apoptosis, independently of interaction with XIAP. *Molecular and Cellular Biochemistry* 286: 67–76.

Yoon J., Terada A., Kita H., 2007. CD66b regulates adhesion and activation of human eosinophils. *Journal of Immunology* 179: 8454-8462.

Zhu H., Cong J.P., Shenk T., 1997. Use of differential display analysis to assess the effect of human cytomegalovirus infection on the accumulation of cellular RNAs: induction of interferon-responsive RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 94: 13985-13990.

Zilber L.A., 1939. Spring-summer tick-borne encephalitis. (v Ruštině) *Arkhiv Biologicheskich Nauk* 56: 255-61.

ELEKTRONICKÉ INFORMAČNÍ ZDROJE

ExpASY Proteomics Server, Viral Zone , Portal to viral UniProtKB/Swiss-Prot entries
www.expasy.ch/viralzone/all_by_species/24.html

EpiDat - databáze Státního zdravotního ústavu v Praze:
<http://www.szu.cz/cem/epidat/>

server National Center for Biotechnology Information
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Bioinformatická databáze DAVID (DAVID Bioinformatics Resources 2008, National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), NIH)
<http://david.abcc.ncifcrf.gov/gene2gene.jsp>