

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

**Diferenciální exprese genů po infekci virem klíšťové
encefalitidy u lidských primárních nervových buněk**

Bakalářská práce

Petra Ošlejšková

Školitel: RNDr. Ján Štěrba, Ph.D.

Školitel specialista: Mgr. Hana Tykalová

České Budějovice 2020

Ošlejšková P., 2020: Diferenciální exprese genů po infekci virem klíšťové encefalitidy u lidských primárních nervových buněk. [Differential expression of genes in human primary neural cells after tick-borne encephalitis virus infection. Bachelor thesis, in Czech] – 45.p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotation

This study focuses on the differential expression of genes in the human primary neural cells after tick-borne encephalitis virus infection. Changes in gene expression were determined using qRT-PCR and compared by correlation analysis with results previously obtained by next generation sequencing. The difference in gene expression determined by qRT-PCR correlated with those obtained from the next generation sequencing.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou 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 bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů

České Budějovice, 9. 12. 2020

.....

Petra Ošlejšková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svým školitelům a hlavně Mgr. Haně Tykalové za velkou trpělivost a ochotu při vedení mé bakalářské práce, za celkové seznámení s problematikou a za poskytnutí cenných rad. Ráda bych také poděkovala všem členům Laboratoře aplikované biochemie za poskytnutou pomoc a úžasnou pracovní atmosféru. Velký dík patří mé rodině a příteli za pochopení a podporu i ve chvílích zoufalství.

1. ÚVOD.....	1
1.1 Virus klíšťové encefalitidy.....	1
1.1.1. Zařazení.....	1
1.1.2. Subtypy.....	1
1.1.3. Stavba virionu.....	2
1.1.4. Přenašeč viru klíšťové encefalitidy	3
1.1.5. Průběh onemocnění	4
1.1.6. Životní cyklus viru v buňce	5
1.2. Ovlivnění centrální nervové soustavy infekcí viru klíšťové encefalitidy.....	5
1.2.1. Patogeneze viru klíšťové encefalitidy do centrální nervové soustavy.....	6
1.2.2. Infekce virem klíšťové encefalitidy v neurálních buňkách.....	6
1.2.3. Imunopatologie viru klíšťové encefalitidy v centrální nervové soustavě.....	9
2. CÍL PRÁCE.....	11
3. METODIKA.....	12
3.1. Buněčné linie.....	12
3.2. Virus.....	12
3.3. Infekce.....	12
3.4. Geny	13
3.5. Optimalizace reakčních podmínek.....	15
3.5.1. Primery.....	15
3.5.2. Reverzní transkripce.....	17
3.5.3. Optimalizace koncentrace primerů a reakčních podmínek PCR.....	17
3.6. Analýza vzorků.....	19
3.6.1. DNázování.....	19
3.6.2. Kvantitativní RT-PCR.....	21
4. VÝSLEDKY.....	23
4.1. Stanovení reakčních podmínek	23
4.2. Kvantifikace exprese vybraných genů	24
4.3. Porovnání exprese cílových genů metodou qRT-PCR s výsledky z NGS.....	27
5. DISKUZE.....	30
5.1. Reakční podmínky.....	30
5.2. Míra exprese vybraných genů.....	31
5.3. Porovnání metod qRT-PCR a NGS.....	33
6. ZÁVĚR.....	34
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	35
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	36

1. ÚVOD

Klíšťová encefalitida (KE) je onemocnění způsobené virem klíšťové encefalitidy (VKE), který napadá centrální nervovou soustavu. Poprvé bylo popsáno v Rakousku v roce 1931 (Schneider, 1931) a do dnešního dne nebyla vyvinuta specifická léčba. Jedinou spolehlivou ochranou zůstává očkování, které by mělo být provedeno před propuknutím nemoci (Demicheli et al., 2009).

1.1. Virus klíšťové encefalitidy

1.1.1. Zařazení

Virus klíšťové encefalitidy (VKE) se řadí do rodu *Flavivirus* čeledi *Flaviviridae* (Simmonds et al., 2017). Tento rod obsahuje více jak 50 druhů virů, které jsou přenášeny členovci (Mukhopadhyay et al., 2005).

Podle přenašeče dělíme tento rod do 3 skupin. První skupinou jsou komáry přenášené flaviviry. Mezi jeho zástupci můžeme najít virus žluté zimnice, virus dengue nebo virus způsobující západonilskou horečku. Další skupina nemá známého přenašeče a řadí se sem například vir Rio Bravo. Virus klíšťové encefalitidy náleží do třetí skupiny, která je přenášena klíšťaty. Patří sem i virus Langat, virus Omské hemoragické horečky nebo virus Kyasanurského lesa (Gaunt et al., 2001).

1.1.2. Subtypy

Kmeny viru klíšťové encefalitidy byly na základě fylogenetické analýzy rozděleny do 3 subtypů (Ecker et al., 1999). Je to subtyp evropský, který je přenášen hlavně klíštětem obecným (*Ixodes ricinus*), subtyp sibiřský a dálnovýchodní, jehož přenašečem je klíště tajgové (*I. persulcatus*) (Heinz et al., 2000). Evropský subtyp je dominantní napříč Evropou a v evropské části Ruska, zatímco sibiřský a dálnovýchodní můžeme najít převážně v Asii. V některých oblastech, jako například v baltských republikách, na Sibiři nebo na Ukrajině, se můžou různé subtypy VKE vyskytovat současně (Růžek et al., 2019).

Nejzávažnější průběh má infekce dálnovýchodním subtypem VKE. U nakažených jedinců může dojít k rozvoji meningoencefalitidy až polyencefalitidy. Při těžkém průběhu dochází k poškození neuronů v různých částech mozku a míchy. Rekonvalescence trvá

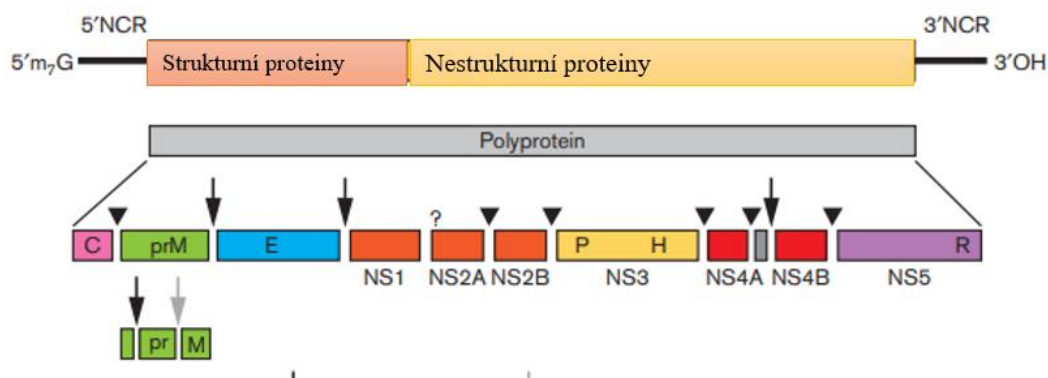
dlouhou dobu a je doprovázena výrazným pocitem únavy (Gritsun et al., 2003). Po prodělání této nemoci nemá žádné trvalé následky pouze 25 % pacientů. Mortalita jedinců nakažených virem tohoto subtypu je skoro 35 % (Votjakov et al., 2002, Dumpis et al., 1999).

Sibiřský subtyp se projevuje méně závažnými akutními příznaky, kdy se neobjevují paralytické formy encefalitidy. Dochází zde ovšem často rozvoji chronického onemocnění (Gritsun et al., 2003). Ke kompletnímu uzdravení dochází u 80 % nakažených a onemocnění je smrtelné jen ve 2 % případů (Votjakov et al., 2002).

Encefalitida vyvolaná evropským subtypem viru klíšťové encefalitidy probíhá většinou dvoufázově. Nejdříve se objevuje horečka typická pro první etapu onemocnění. Ve druhé fázi dochází k nervovým poruchám o různé intenzitě. Oproti dálnovýchodní formě průběh nebývá tak závažný. Většina pacientů po prodělání nemoci nemá trvalé následky a úmrtnost se pohybuje pod 2 % (Gritsun et al., 2003).

1.1.3. Stavba virionu

Virion viru klíšťové encefalitidy je oválná částice měřící přibližně 50 nm v průměru. Uvnitř se nachází genom viru, který je tvořen jedním vláknem RNA pozitivní polarity o délce 11 kb. Obsahuje jeden otevřený čtecí rámec (ORF). ORF je ohraničen nekódujícími oblastmi. Na 5' konci je tato oblast dlouhá přibližně 150 nukleotidů a na 3' konci 400–700 nukleotidů. 3' koncová oblast se rozděluje na variabilní a konzervovaný úsek. Konzervovaný úsek kóduje sekundárních struktury, které jsou nezbytné při replikaci genomu, pro jeho translaci a správné sbalení. ORF obsahuje asi 3400 aminokyselin, které kódují 3 strukturální proteiny: C, M, E a 7 nestrukturních: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 (viz Obrázek 1) (Pletnev, 2001, Gritsun et al., 2003). Genom viru je obalen kapsidou, která je tvořena proteinem C (capsid). Kapsidu obklopuje lipidová dvojvrstva obsahující dva glykoproteiny: E (envelope) a M (membrane). Protein E je nejvýznamnější membránový protein, který interaguje s receptory hostitelské buňky, a tak zprostředkovává fúzi viru s danou hostitelskou buňkou (Gritsun et al., 2003).



Obrázek 1: Schématické vyobrazení genomu viru klíšťové encefalitidy včetně 5' a 3' koncových nekódujících sekvencí. Převzato a upraveno od Simmonds et al., 2017.

1.1.4. Přenašeč viru klíšťové encefalitidy

Hlavním přenašečem klíšťové encefalitidy v našich podmínkách je klíště obecné. Přírozený výskyt těchto členovců je v lesích Evropy a Asie, kde je dostatečná vlhkost vzduchu a hustý podrost. Klíšťata čekají na procházející zvíře, popřípadě člověka, jehož přítomnost vycítí díky svým receptorům oxidu uhličitého (Bowman & Nuttal, 2008). Jakmile dojde ke kontaktu se zvířetem nebo člověkem, klíště se reflexivně přichytí a posléze přisaje ke svému hostiteli. Krev obratlovců je nezbytná pro klíštěcí životní cyklus. Ten zahrnuje 3 stádia: larvu, nymfu a dospělé a každá z těchto fází vývoje trvá nejméně rok (Süss, 2003). Klíště zůstává prisáté i několik dní a délka sání záleží na vývojovém stádiu. Pro dospělé samice je krev nezbytná pro produkci vajíček (Růžek et al., 2010).

Nejvýznamnější cestou nákazy klíštěte je tak zvaným „cofeeding“, kdy skupina jedinců saje zároveň na jednom hostiteli, u kterého nemusí propuknout virémie (Labuda et al. 1993b). K přenosu viru dochází i na imunním jedinci (Labuda et al. 1997). Klíšťata se mohou infikovat také sáním krve z nakaženého zvířete během virémie, popřípadě transovariálním přenosem – z dospělé samice na vajíčka a posléze nymfy. Tento způsob má malou účinnost, zhruba - 0,5 % (Labuda et al., 1993a, Danielová & Holubová, 1991). Nakažená klíšťata zůstávají infekční po celý život (Gritsun et al., 2003).

1.1.5. Průběh onemocnění

Hlavní způsob přenosu nákazy na člověka je kousnutí infikovaným klíštětem. Kromě přenosu viru z klíštěte je další popsanou možností nákazy konzumace nepasterizovaných mléčných výrobků. Virus dokáže přejít z krevního řečiště do mléčných žláz savců, a tak infikovat mléko, které produkují (Korenberg, 1976). Bylo též prokázáno, že lidský trávicí systém není schopný zničit virové částice (Pogodina et al., 1960).

Inkubační doba KE se pohybuje mezi 7 a 14 dny. Poté propuká první fáze nemoci. Její typické příznaky jsou únava, horečka, bolest hlavy a oblasti šíje, dolní části zad a končetin. Objeví se pocity nevolnosti a zvracení. (Gritsun et al. 2003). Toto období trvá přibližně 2 až 4 dny. Poté dochází k ústupu příznaků. U 20 až 30 % nakažených se objeví druhá fáze, která má několik forem: meningeální, meningoencefalitickou, poliomyelitickou, polyradikuloneuritickou a chronickou (Kaiser, 1999, Gritsun et al, 2003).

Nejběžnější je meningeální forma KE. Příznaky se podobají první fázi onemocnění, ale jsou intenzivnější. Navíc se může rozvinout fotofobie a bolest očí. Zvýšená teplota trvá 7-14 dní, kdy dochází k postupnému uzdravování (Gritsun et al. 2003).

Meningoencefalitida je méně častá a pojí se s ní poškození centrální nervové soustavy (CNS). Pacienti se cítí velmi slabě, ospale, mají halucinace a můžou upadat do bezvědomí. Objevuje se i krvácení do žaludku a ochrnutí části těla, které může být trvalé. Rekonvalescence trvá dlouhou dobu (Gritsun et al. 2003).

Stejně jako většina forem, i poliomyelitická forma je příznačná vyčerpaností s pocity slabosti. Dochází k necitlivosti v jedné z končetin, která se postupně rozvine v paralýzu. Po delší době nastává paralýza krku a ramen trvajících až několik měsíců. Po 2 až 3 týdnech atrofují svaly a postižený není schopný udržet vzpřímenou hlavu. Jedná se o velice závažnou formu onemocnění a zotavení je velmi pomalé (Gritsun et al. 2003).

Polyradikuloneuritická forma má dvě fáze. Kromě klasických příznaků se objevují symptomy poškození periferního nervového systému, které se ze začátku projevuje jako mravenčení v končetinách (Růžek et al., 2019).

Chronické onemocnění se geograficky pojí s územím Ruska. Symptomy se mohou projevit až po letech od kousnutí nakaženým klíštětem. Při rozvinutí této formy dochází k postupnému zhoršování stavu postiženého (Gritsun et al. 2003).

U pacientů nakažených klíšťovou encefalitidou se často objevují trvalé následky. Ve 40 až 50 % případů se rozvine „post-encefalitický“ syndrom. Pro něj je typická apatie, podrážděnost, problémy s pamětí, udržením pozornosti a spánkem. Může dojít k poruchám smyslového vnímání či trvalé ochrnutí části těla (Bogovič et al. 2018, Růžek et al. 2019). Průběh a závažnost onemocnění se u každého člověka liší. Záleží na množství a virulenci viru vpraveného do jedince při kousnutí. Důležitý je i celkový zdravotní stav infikovaného jedince (Růžek et al., 2009).

1.1.6. Životní cyklus viru v buňce

Prvním krokem je vstup viru do buňky pomocí glykoproteinu E, který se naváže na povrch hostitelské buňky. Doposud není znám specifický receptor, na který by se virus vázal, ale Mandl et al., 2001 dokázal, že virový protein E má vysokou afinitu k heparan sulfátu, což je glukosaminoglykan hojně přítomný na povrchu buněk obratlovců i klíšťat.

Virus se dostává do buňky mechanismem endocytózy zprostředkované receptorem (Chu & Ng, 2004). Nízké pH v endozomu vyvolává konformační změny proteinu E, který se z dimerní struktury přetransformuje na trimerní (Allison et al. 2005). Tak dochází k splynutí obalu viru se stěnou endozomu a uvolnění virové nukleokapsidy do cytoplasmy hostitelské buňky (Heinz & Allison, 2003). V cytoplasmě dochází k translaci virové RNA do polyproteinu (Mandl, 2005). Během tohoto procesu se polyprotein štěpí na 3 strukturální a 7 nestrukturálních proteinů, které se dále účastní replikace viru (Mazeaud et al., 2018).

Nezralé viriony obsahují protein prM a E v heterodimerickém uspořádání a prozatím jsou neinfekční (Elshuber et al., 2003). Maturace je dosaženo štěpením prM proteinu pomocí buněčné proteázy furinu v kyselých váčcích Golgiho aparátu (Stadler et al., 1997). Díky tomuto štěpení je E protein schopný se reorganizovat. Tyto již infekční viriony jsou sekretovány z buňky ven pomocí transportních váčků (Mandl, 2005).

1.2. Ovlivnění centrální nervové soustavy infekcí viru klíšťové encefalitidy

Neurony jsou základní stavební jednotkou nervové soustavy. Tvoří je tělo, ve kterém jsou uloženy jádro a další orgány. Z těla vystupují nervové výběžky – neurity, které se pomocí synapsí spojují s ostatními neurony a vytváří síť. Jako podpůrné buňky neuronům slouží neuroglie. Mezi gliové buňky jsou řazeny astrocyty, oligodendrocyty, mikroglie a periferní glie, do nichž patří např. Schwannovy buňky (Druga et al. 2011).

1.2.1. Patogeneze viru klíšťové encefalitidy v centrální nervové soustavě

Virus je přenesen do těla pomocí slin v prvních minutách po kousnutí klíštětem. Bylo zjištěno, že sliny zvyšují schopnost replikace viru a jeho šíření v těle hostitele (Labuda et al., 1996, Lieskovská et al., 2018). V místě sání se virus množí a infikuje buňky kůže – keratinocyty, Langerhansovy buňky, nezralé dendritické buňky, neutrofilní granulocyty a monocyty (Labuda et al., 1996). Nezralé dendritické buňky putují do lymfatických uzlin, kde dozrávají a aktivují T lymfocyty (Robertson et al., 2014).

Po replikaci v lymfatických orgánech se virus šíří eferentními lymfatickými drahami do dalších orgánů, například do sleziny, jater a kostní dřeně. Uvolnění virionů z těchto tkání má za následek několikadenní trvání virémie (Málková & Fraňková, 1959, Růžek et al., 2010, Zambito Marsala et al., 2014).

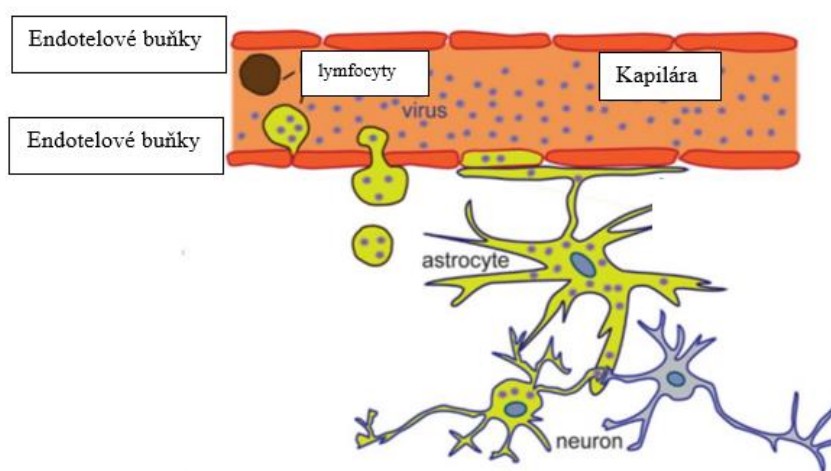
Aby se virus dostal do CNS, musí překonat hematoencefalickou bariéru (HB). HB se skládá ze souvislé vrstvy mozkových kapilár, které přiléhají na bazální membránu, která je z druhé strany obklopena astrocyty. Kapiláry nejsou fenestrovány a sousedící buňky jsou spojeny těsnými spoji (tight junctions). Toto uspořádání zabraňuje vniknutí červených krvinek, patogenů a toxických látek (Růžek et al. 2019). Přesný mechanismus vstupu viru do CNS není znám. Do této doby se uvažuje o 4 možných mechanismech vstupu viru přes HB: (i) infekce čichového nervu nebo šíření z infikovaných periferních nervů přes nervové spoje (ii) překonání HB pomocí „trojského koně“, kdy infikované imunokompetentní buňky migrují přímo do CNS, (iii) infekce endotelových buněk kapilár, (iv) zvýšenou propustností HB způsobené prozánětlivými cytokiny (Robertson et al., 2014, Růžek et al., 2011, Palus et al., 2014). Výzkumy naznačují, že poslední zmíněná cesta průniku viru se jeví jako nejpravděpodobnější, zatímco strategie trojského koně je zmiňována, ale není podložena experimentálně (Schnoor & Parkos, 2008).

1.2.2. Infekce virem klíšťové encefalitidy v neurálních buňkách

Astrocyty patří mezi nejpočetnější gliové buňky v lidském mozku (Nedergaard et al., 2003). Mají zásadní roli ve správném fungování CNS. Jejich funkce spočívá v udržení homeostáze, podpoření funkce neuronů, zachování HB a zprostředkování odvodu odpadních látek (Verkhatsky & Nedergaard, 2018, Abbott et al., 2006, Thrane et al., 2014, Prebil et al., 2011). Jako další funkci astrocytů

naznačuje Fares et al., 2020 ochranu neuronů před virem KE. Ve smíšených kulturách astrocytů a neuronů, které byly infikovány virem klíšťové encefalitidy, bylo výrazně méně infikovaných neuronů v porovnání s kulturou, která neobsahovala astrocyty (Fares et al., 2020).

Astrocyty obalují nervové synapse a přiléhají k endotelovým buňkám krevních kapilár (viz Obrázek 2) (Zorec et al., 2019). Díky těsným vazbám k buňkám endotelu pomáhají formovat HB. Proto změny vyvolané u astrocytů mění propustnost HB (Abbott et al., 2006, Růžek et al., 2011).



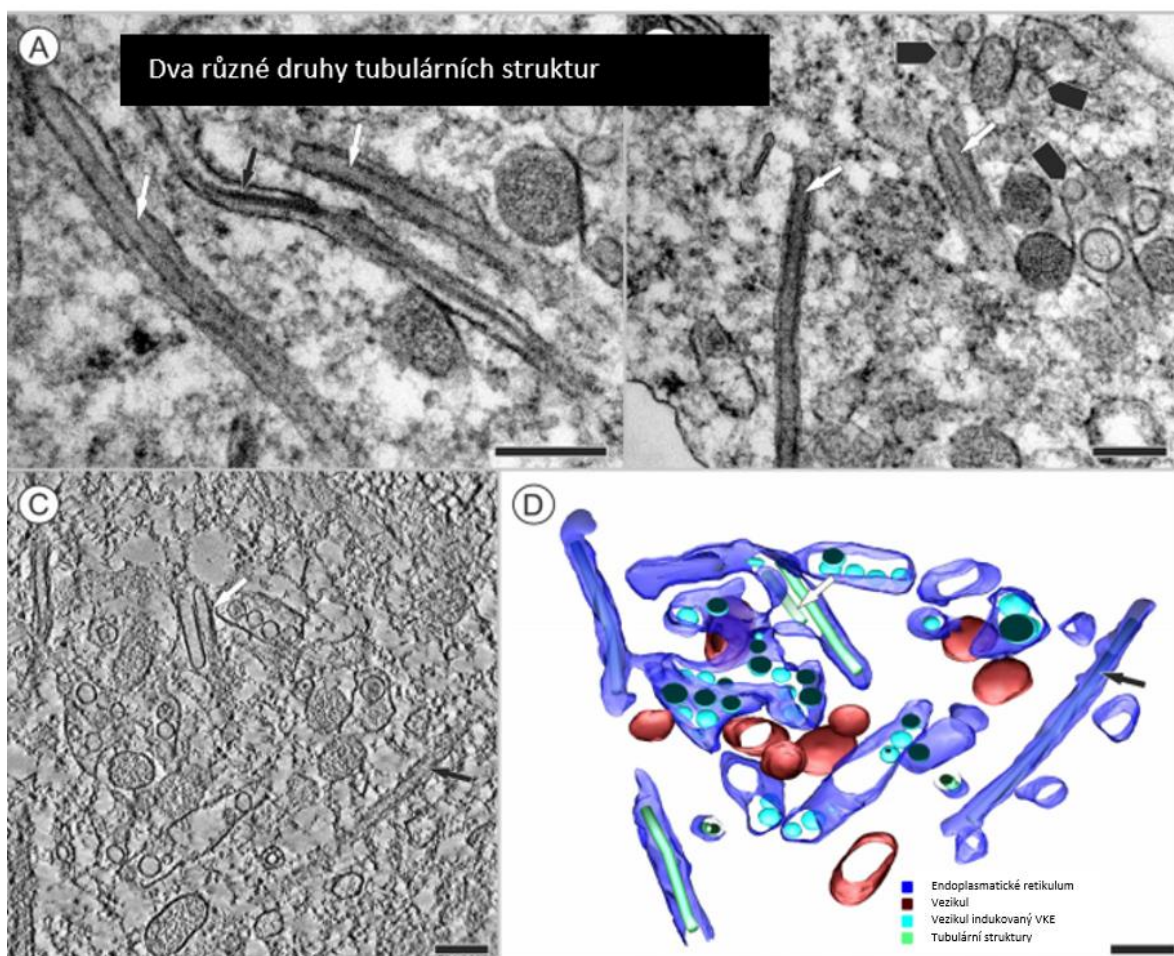
Obrázek 2: Astrocyty přiléhající k endotelovým buňkám zajišťující pevnost HB. Obrázek zároveň popisuje možný průnik viru z krve CNS. Endotelové buňky infikované virem z krevního řečiště díky těsnému kontaktu s astrocyty infikují i je. Astrocyty, které vytváří hustou síť i s ostatními buňkami mohou předávat infekci dále. Převzato od Protokar et al., 2019 a upraveno dle vlastních potřeb.

Schopnost VKE infikovat astrocyty byla poprvé prokázána u hlodavců a později i u lidí (Růžek et al., 2009, Palus et al., 2014). Pokusy Potokar et al., 2014 ukazují vysokou schopnost přežití krysích astrocytů, u kterých ani po 14 dnech od infekce nebyla zpozorována nekróza vyvolaná virem klíšťové encefalitidy. Tato schopnost se později potvrdila i u lidských monokultur astrocytů (Palus et al., 2014). Ve smíšených kulturách astrocytů a neuronů ovšem Fares et al., 2020 zpozoroval snížený počet astrocytů po 7 dnech od infekce v porovnání s kontrolní skupinou.

U infikovaných astrocytů dochází k fyziologickým i morfologickým modifikacím. VKE způsobuje změnu v polymerizaci aktinu a myozinu a tím negativně ovlivňuje cytoskeleton buňky. V průběhu infekce se mění endoplasmatické retikulum (ER). Vytváří se váčky na drsném ER, které obsahují virové částice. Byla zpozorována i přítomnost tubulovitých útvarů. Zřetelný je nárůst zralých virionů v Golgiho aparátu. Změny jsou patrné na mitochondriích, kde se objevují prstencové struktury v matrix. (Palus et al., 2014). VKE spouští také u astrocytů produkci GFAP (glial fibrillary acidic protein). Tento protein slouží jako marker pro detekci reaktivní astrocytózy. Během tohoto procesu dochází k velkému nárůstu počtu astrocytů za účelem ochrany proti patogenům (Pěkný & Pěkná, 2016). Navíc v průběhu infekce produkují velké množství cytokinů a chemokinů (Palus et al., 2014).

Po vstupu VKE do CNS jsou však neurony primární cíl (Bílý et al., 2015). RNA viru KE je schopná se pohybovat po neuronu do dendritů, kde je schopná translace i replikace (Kao et al., 2010, Hirano et al., 2017). Díky dlouhým axonům jsou virové částice schopné se dostat i na velkou vzdálenost (Maximova & Pletnev, 2018).

Stejně jako u astrocytů, i u neuronů infekce VKE způsobuje změny ER. Byly pozorovány dva druhy struktur připomínající tubuly, které se od sebe strukturně lišily (viz Obrázek 3). Obsahovala virový protein E, který tvoří hlavní součást obalu viru. Druhý typ se nacházel v dalších cisternách a byl výrazně menší (Bílý et al., 2015).



Obrázek 3: Vyobrazení dvou druhů tubulárních struktur v infikovaných neuronech vytvořených po infekci virem klíšťové encefalitidy. Převzato a upraveno od Bílý et al., 2015.

Po vstupu viru do buňky, spouštějí neurony i astrocyty set reakcí vedoucí k vypínání a zapínání vybraných genů za účelem obrany. Tato odpověď se u astrocytů a neuronů liší. Fares et al. 2020 dokázal, že u astrocytů reakce trvá déle a je intenzivnější. To vysvětluje jejich zvýšenou viabilitu po infekci virem KE (Palus et al., 2014).

1.2.3. Imunopatologie viru klíšťové encefalitidy v centrální nervové soustavě

VKE po vniknutí do CNS přednostně cílí na neurony v předním rohu míchy, prodloužené míše, Varolově mostě, mozečku a striatu (Gelpi et al, 2005). V mozcích pacientů, kteří zemřeli na klíšťovou encefalitidu byly nalezeny zánětlivé léze a ložiska poškozených nebo degradovaných neuronů, která ovšem neodpovídala topograficky s místy, kde byl detekován virový antigen (Gelpi et al., 2005, Gelpi et al., 2006).

Po napadení CNS dochází ke spuštění mnohých antivirových mechanismů např. produkci interferonu, aktivaci komplementu nebo migraci makrofágů a leukocytů do CNS

(Gupta et al., 2010, Palus et al., 2013, Růžek et al., 2009). Hlavními producenty cytokinů, chemokinů a růstových faktorů v mozku jsou považovány astrocyty a mikroglie (Ramesh et al., 2013). Ty po své aktivaci produkují např. TNF- α , IL-1 β , IL-6 nebo CXCL10, které byly nalezeny v séru nebo v cerebrospinální tekutině pacientů s klíšťovou encefalitidou (Kondusik et al., 2001, Zajowska et al., 2011). Kromě protektivních účinků mohou mít mechanismy obrany proti viru i imunopatologický efekt, který může vést k poškození tkání mozku (Gelpi et al., 2006, Růžek et al., 2009). Ghoshal et al., 2007 dokázal, že u Japonské encefalitidy TNF- α a IL-1 β produkované mikroglie působily poškození neuronů. Dále bylo zjištěno, že TNF- α a IL-6 zvyšují propustnost hematoencefalické bariéry, což přispívá k imunopatologii (Atrasheuskaya et al., 2003, Palus et al., 2015).

Se zvýšenou produkcí cytokinů a chemokinů dochází k aktivaci T-buněčné odpovědi, u které se ukázalo, že během infekce zastává duální roli – protektivní a imunopatologickou (Růžek et al., 2009). Růžek et al., 2009 ve svých pokusech dokázal, že myši s deficiencí pro CD8+ T-lymfocyty měli po infekci virem klíšťové encefalitidy delší dobu dožití. CD 8+ lymfocyty také aktivují NK buňky, které mohou poškozovat tkáň mozku (Biron et al., 1999). NK buňky se podílí na usmrcení infikovaných buněk přímo nebo nepřímo pomocí cytokinů, které produkují (Biron et al., 1999, Guidotti & Chisari, 2006). Navíc byly detekovány v cerebrospinální tekutině u pacientů nakažených virem klíšťové encefalitidy, což naznačuje jejich migraci přes hematoencefalickou bariéru (Tomazic & Ihan, 1997).

2. CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo:

- zpracovat literární rešerši k zadanému tématu
- optimalizovat podmínky amplifikace cílových genů pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR)
- kvantifikace exprese vybraných genů ve vzorcích astrocytů a neuronů infikovaných virem klíšťové encefalitidy
- vyhodnocení získaných výsledků a porovnání s výsledky získanými pomocí next generation sequencing (NGS)

3. METODIKA

3.1. Buněčné linie

Vzorky RNA pro stanovení změn genové exprese v lidských astrocytech a neuronech byly připraveny RNDr. Martinem Selingerem, PhD. Totožné vzorky připravené pro metodu NGS byly použity i pro analýzu pomocí kvantitativní reverzně transkripční řetězové polymerázové reakce (qRT-PCR). Z důvodu ucelenosti práce je zde zmíněn stručný popis diferenciaci, procesu infekce a izolace RNA. K provedení tohoto experimentu byly využity kultury lidských neurálních kmenových buněk (hNSC11) od firmy ALSTEM. Z této linie je možné pomocí diferenciacních medií získat primární lidské astrocyty a neurony, jejichž odpověď na infekci byla studována. V souladu s pokyny od výrobce bylo pro diferenciaci astrocytů využito médium obsahující D-MEM (Science Cell™) s 1 % fetálního bovinního séra a 1 % GlutaMAX-I Component. Diferenciaci trvala 3 týdny. K získání linie primárních lidských neuronů bylo použito diferenciacní medium, které se skládalo z Neurobasal Medium (Thermo Fisher Scientific) s 2 % B-27 Serum-Free Component a 1 % GlutaMax-I Component. Diferenciaci trvala 2 týdny.

3.2. Virus

K infekci primárních lidských nervových buněk byly použity dva kmeny evropského subtypu viru klíšťové encefalitidy – Hypr a Neudoerfl (4. pasáž v mozcích sajících myší u obou virů). Více virulentní Hypr byl izolován z krve desetiletého chlapce nakaženého klíšťovou encefalitou (Pospíšil et al., 1954). Kmen Neudoerfl byl poprvé získán z klíšťe *Ixodes ricinus* v Rakousku v roce 1971 (Mandl et al., 1988).

3.3. Infekce

Po diferenciaci byly buněčné linie primárních lidských astrocytů a neuronů infikovány dvěma kmeny viru klíšťové encefalitidy – Hypr a Neudoerfl. Buňky byly kultivovány v 6-ti jamkovém panelu (TPP) pokrytých bazální membránou Geltrex (Thermo Fisher Scientific; A1413301). Počet buněk primárních lidských astrocytů nasazených v jamce byl 500 000. Počet nasazených primárních lidských neuronů byl 400 000. Do každé z jamek u obou druhů buněk byla přidána virová suspenze v takovém množství, aby multiplicita infekce odpovídala číslu 5. U kontrolních vzorků byla ke vzorkům astrocytů a neuronů zvlášť přidána negativní myší mozková suspenze. Vzorky byly připravovány v triplikátu.

Odběr vzorků proběhl po 24 a 72 hodinách od infekce. RNA byla izolována pomocí RNA Blue (Top-Bio s.r.o.). Vzniklé pelety u vzorků byly rozpuštěny v 40 μ l respektive 30 μ l (neurony 72 hodin po infekci – h.p.i.) DEPC H₂O. RNA byla poté dvacetkrát naředěna a použita k měření koncentrace pomocí bioanalyzáru (Agilent 2100 Bioanalyzer) s použitím Agilent RNA 6000 Nano kit (Agilent Technologies; #5067–1511). Hodnoty koncentrací jsou uvedené v Tabulce VI.

3.4. Geny

Z výsledných dat získaných metodou NGS bylo vybráno 11 kandidátních genů, které měly v důsledku infekce signifikantně odlišně exprimované geny. Po následné optimalizaci reakčních podmínek byly k ověřování exprese vybrány 4 geny: HSPA6, OASL, RNVU1 a RSAD2. Charakteristiky zvolených genů jsou shrnuty v Tabulce I. Míra změny exprese v důsledku infekce byla hodnocena relativně, porovnáním s referenčním (housekeeping) genem HPRT1 (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1), který je odpovědný za syntézu purinu (Balendiran et al., 1999). Zároveň bylo stanoveno i relativní množství virové RNA v infikovaných vzorcích. K amplifikaci byla vybrána část genu kódujícího protein E viru klíšťové encefalitidy. Amplifikační primery mají pracovní označení EO1. Podrobná charakteristika primerů zahrnutých v této práci je uvedena v Tabulce II.

Tabulka I: Charakteristika funkcí vybraných genů.

Symbol	Název genu	Funkce
HSPA6	Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 6	Buněčný chaperon zajišťující správné složení proteinů a jejich transport. Aktivuje proteolýzu špatně složených proteinů. Účastní se formování i rozpadu proteinových komplexů. Hraje významnou roli při obraně buňky proti stresu. (Radons, 2016)
OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	Má antivirovou aktivitu – váže se na RIG -I receptor (Zhu et al., 2014). Tento komplex se poté váže na dvouvláknovou RNA v cytosolu buňky. (Marques et al., 2018). Navázáním na RIG-I receptor dojde ke zrychlení reakce na cizorodou RNA (Zhu et al., 2014). Spouští signalizační kaskádu vedoucí k produkci interferonů I. typu (Choi et al., 2015, Kell & Gale, 2015).
RNVU1	RNA, Variant U1 Small Nuclear 2	Účastní se sestřihu pre-RNA jako součást spliceozomu (U1) (Zhou et al., 2002). U1 část spliceozomu definuje místo mezi intronem a exonem, kde dochází k prvnímu sestřihu (O'Reilly et al., 2013) Chrání vznikající transkripty před předčasnou polyadenylací nebo degradací (Kaida et al., 2010) Chrání buňku při stresových situacích.
RSAD2	Radical S-Adenosyl Methionine Domain Containing 2/ Viperin	Má antivirovou aktivitu a jeho syntéza je vyvolaná virovou infekcí (Chin & Cresswell, 2001). Má schopnost inhibovat velké množství DNA i RNA virů jako např. virus západonilské horečky (Szretter et al., 2011). Brání šíření flavivirů degradací jejich NS3 proteinu (Helbig et al., 2013). Reguluje přesun proteinů do ER, čímž omezuje šíření viru, který využívá následnou exocytózu (Hinson & Cresswell, 2009). Hraje roli v produkci IFN (Qiu et al., 2009).

3.5. Optimalizace reakčních podmínek

Pro zajištění vhodných reakčních podmínek kvantifikační reverzně transkripční polymerázové řetězové reakce (qRT-PCR) byla nejprve provedena optimalizace reakčních podmínek a koncentrace primerů v PCR. Následně byla provedena separace produktů na agarózovém gelu.

3.5.1. Primery

Primery 11 kandidátních genů byly ručně navrženy Mgr. Hanou Tykalovou a RNDr. Martinem Selingerem Ph.D. nebo byly převzaty z veřejně dostupných databází a literatury. Tabulka II charakterizuje primery pouze 4 genů vybraných na základě výsledků optimalizačních reakcí, referenčního genu a genu sloužícího pro stanovení relativního množství virové RNA.

Tabulka II: Seznam a charakteristika použitých primerů. MS – RNDr. Martin Selinger Ph.D., nt – počet nukleotidů primeru, T_m – teplota tání produktu.

Název genu	F/R	Sekvence	nt	T _m [°C]	Velikost produktu	Zdroj	Koncentrace primerů v reakci [nM]	Referenční sekvence	Pozice
HPRT1	F	5' TGACACTGGCAAACAATGCA 3'	21	45,3	92	Vandesompele et al., 2002	300	NM_000194.3	558-651
	R	5' GGTCCCTTTTCACCAGCAAGCT 3'	21	49,2			300		
HSPA6	F	5' GATGTGTTCGGTTCTCTCCATTG 3'	22	59	115	Primer bank 42822885c3	300	NM_002155.5	741-855
	R	5' CTTCCATGAAGTGGTTCACGA 3'	21	58,2			150		
OASL	F	5' CTTCCATGAAGTGGTTCACGA 3'	23	59,2	105	MS	150	NM_003733.3	278-363
	R	5' CACAGCGTCTAGCACCTCTT 3'	20	59,8			300		
RNVU1	F	5' ATACTTACTTGGCGGGGGAGATAC 3'	24	61,5	138	MS	150	NR_104076.1	1-138
	R	5' ACTATCACAAGTTATGCAGTCGAGTTCC 3'	28	63			150		
RSAD2	F	5' CAAGACCGGGGAGAATACCTG 3'	21	51,2	143	Primer Bank: 19923667a3	300	NM_080657	388-530
	R	5' CAAGACCGGGGAGAATACCTG 3'	23	50,2			300		
EO1	F	5' GCAGCCAGATGCCCAACAATGG 3'	22	64,9	166	MS	150	NP_775503.1	1183-1348
	R	5' TCTTTTTTGCCTCACAAGCCGCCT3'	24	65,8			150		

3.5.2. Reverzní transkripce

Pro optimalizaci reakčních podmínek qRT-PCR bylo třeba připravit vhodný templát v podobě DNA. Toho bylo dosaženo pomocí reverzní transkripce (RT), která přepisuje RNA na cDNA (komplementární DNA). Pro optimalizaci byl z každé buněčné linie zvolen jeden vzorek, ze kterého byl připraven cDNA templát.

K reverzní transkripci byl využit ProtoScript® II First Strand cDNA Synthesis Kit (New England Biolabs), který byl používán dle pokynů od výrobce. Reakční směs se skládala z 1 µg RNA z A24N a A72N. Jako primer byly využité 6 µM náhodné hexanukleotidy a do celkového objemu 8 µl byla směs doplněna Nuclease-free H₂O. Následně byla RNA denaturována při teplotě 65 °C po dobu 5 minut. Poté byly zkumavky krátce stočeny a do obou mixů byl přidán ProtoScript II Reaction Mix (2X) a ProtoScript II EnzymeMix(10X). Reverzní transkripce byla provedena v termálním cycleru (Biometra Tone, Analytik Jena) podle programu shrnutého v Tabulce III. Takto připravená cDNA byla skladována při -20 °C.

Tabulka III: Program použitý pro reverzní transkripci.

Popis kroku	Teplota [°C]	Čas [min]
Inkubace	25	5
Reverzní transkripce	42	60
Deaktivace enzymatické aktivity	80	5

3.5.3. Optimalizace koncentrace primerů a reakčních podmínek PCR

Optimalizace spočívala v nalezení ideální koncentrace primerů tak, aby docházelo k amplifikaci pouze specifického produktu v co nejvyšším možném množství. V tomto kroku byl použit Plain Combi PP Master Mix od firmy Top-Bio s.r.o (#C208-C210). Podrobné složení Master Mixu je uvedeno v Tabulce IV. Jako templát byla využita cDNA (viz 3.5.2. Reverzní transkripce). U každé sady primerů bylo provedeno 9 reakcí s koncentracemi primerů v různých kombinacích uvedených v nM koncentraci – 300F/300R, 300F/150R, 300F/50R, 150F/300R, 150F/150R, 150F/50R, 50F/300R, 50F/150R, 50F/50R. Do finálního objemu 25 µl byla reakční směs doplněna PCR H₂O. Ke každé z 9 reakcí byla přiřazena negativní kontrola, která neobsahovala žádnou templátovou DNA. Stejný rozsah koncentrací byl použit i pro negativní kontrolu.

Tato kontrola sloužila k případné detekci kontaminací a nežádoucích dimerních struktur. Amplifikační reakce probíhala v termálním cycleru (Biometra Tone, Analytik Jena) a její přesný popis je uveden v Tabulce V.

Tabulka IV: Detailní popis složení Master Mixu v reakci.

Reagencie	Finální koncentrace
Tris-HCl	75 nM
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 nM
Tween 20	0,01 %
MgCl ₂	2,5 nM
dATP	200 μM
dCTP	200 μM
dGTP	200 μM
dTTP	200 μM
Taq DNA polymeráza	1,25 U
Stabilizátory, aditiva	

Tabulka V: Program amplifikační reakce.

Popis	Teplota	Doba	Počet cyklů
Úvodní denaturace	94 °C	60 s	1
Denaturace	94 °C	15 s	
Nasednutí primerů	60 °C	15 s	40
Extenze	72 °C	15 s	
Chlazení	16 °C		

Produkty těchto PCR reakcí byly rozděleny pomocí elektroforézy v 1,5 % agarozovém gelu (Agarose Standart, Carl Roth; #3810.4). Celá separace probíhala v TAE pufri (Tribase s 6 % EDTA a 18 % kyselinou octovou) při napětí 110 V (PowerPac HV High-Voltage Power Supply, Bio Rad). Jako barvivo byl využit 6 % GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) spolu s nanášecím pufrem DNA Gel Loading Dye (6X) (Thermo Fisher Scientific), které bylo přidáno ke vzorkům. Z výsledné směsi bylo na gel naneseno 15 μl.

Pro vizualizaci vzorků bylo použito UV záření (G: Box, Syngene). Po zviditelnění vzorků byla vyhodnocena jako nejlepší ta koncentrace primerů, kde byl dobře viditelný očekávaný produkt a zároveň nebyly přítomny nespecifity (pro velikosti produktů viz Tabulka II).

3.6. Analýza vzorků

3.6.1. DNázování

Za účelem odstranění genomické DNA, která může být součástí vyizolované RNA byly vzorky předem ošetřeny DNázou od firmy Thermo Fisher Scientific. Tento enzym zajišťuje, že vzorky RNA nebudou po ošetření obsahovat zbytky genomové DNA, která by mohla negativně ovlivnit kvantifikaci mRNA u vzorků i tím, že by během PCR vznikaly navíc odlišné produkty.

Reakční směs o celkovém objemu 10 μ l obsahovala 1 μ l 10X dsDNase Buffer (Thermo Fisher Scientific, #EN0771), 1 U dsDNase (Thermo Fisher Scientific, #EN0771, nuclease-free H₂O a templátovou RNA. Množství přidané templátové RNA bylo vypočítáno na základě koncentrací RNA naměřené na bioanalyzáru s ohledem na koncentrace RNA nutné pro proběhnutí reverzně transkripční PCR (viz. Tabulka VI).

Tabulka VI: Vzorky primárních lidských astrocytů (A), neuronů (N) a negativních myších mozkových suspenzí (mock) s údaji o jejich koncentraci (c), poměru absorbancí (A260/A280, A260/A230) a čísla integrity RNA (RIN). Červeně zvýrazněná políčka jsou vzorky, kde bylo menší množství vyizolované mRNA.

A	Číslo vzorku	Virový kmen	c [ng/ul] bioanalyzer	A260/A280	A260/A230	RIN RNA 4 µg	N	Číslo vzorku	Virový kmen	c [ng/ul] bioanalyzer	A260/A280	A260/A230	RIN mRNA 4 µg
24 hodin po infekci	1	Neudoerfl	2490	1,987	2,315	1,61	24 hodin po infekci	19	Neudoerfl	1290	1,908	1,512	3,10
	2	Neudoerfl	2040	1,996	2,288	1,96		20	Neudoerfl	1170	1,937	2,234	3,42
	3	Neudoerfl	3110	1,929	2,344	1,29		21	Neudoerfl	1270	1,857	2,343	3,15
	4	Hypr	2420	1,991	2,293	1,65		22	Hypr	1620	1,956	2,336	2,47
	5	Hypr	1780	1,941	2,237	2,25		23	Hypr	1070	1,927	2,349	3,74
	6	Hypr	2140	1,968	2,270	1,87		24	Hypr	1380	1,932	2,374	2,90
	7	mock	1250	1,974	2,212	3,20		25	mock	2010	1,972	2,178	1,99
	8	mock	2630	1,947	2,326	1,52		26	mock	1720	1,952	2,339	2,33
	9	mock	1940	1,980	2,277	2,06		27	mock	1260	1,964	2,146	3,17
72 hodin po infekci	10	Neudoerfl	2230	1,934	2,333	1,79	72 hodin po infekci	28	Neudoerfl	890	1,865	2,337	2,25
	11	Neudoerfl	2540	1,983	2,388	1,57		29	Neudoerfl	930	1,875	2,378	2,15
	12	Neudoerfl	2140	1,958	2,341	1,87		30	Neudoerfl	820	1,920	2,313	2,44
	13	Hypr	2690	1,979	2,292	1,49		31	Hypr	360	1,851	2,446	5,56
	14	Hypr	2910	1,983	2,362	1,37		32	Hypr	440	1,841	2,396	4,55
	15	Hypr	2520	1,981	2,359	1,59		33	Hypr	350	1,915	2,093	5,71
	16	mock	3530	1,978	2,317	1,13		34	mock	1380	1,976	2,316	1,45
	17	mock	2550	1,971	2,300	1,57		35	mock	1020	1,968	2,359	1,96
	18	mock	3860	1,968	2,369	1,04		36	mock	1260	1,944	2,337	1,59

Ošetření DNázou probíhalo v termocycleru (Biometra Tone, Analytik Jena). Reakce probíhala 20 minut při teplotě 37 °C. Teplota byla poté zvýšena na 55 °C po dobu 5 minut. Během tohoto kroku probíhala inaktivace DNázy. Následně byly vzorky naředěny na koncentraci potřebnou pro analýzu qRT-PCR. Takto byly po 4 µl rozplněny do panelů v rozvržení jeden panel pro jednu analýzu a skladovány v -70 °C. Tento způsob skladování zabránil opakovanému rozmrazování RNA, které by ji degradovalo.

3.6.2. Kvantitativní RT-PCR

qRT-PCR byla využita pro stanovení relativní míry exprese vybraných genů ve vzorcích. Pro tuto metodu byl použit termální cycler LightCycler® 480 (Roche Life Science). KAPA SYBR® FAST Universal One-Step qRT-PCR Kit (Kapa Biosystems, Inc.) použitý v tomto experimentu obsahuje SYBR Green I. Toto barvivo se váže nespecificky na dvouvláknovou DNA. SYBR Green I by se mohl potenciálně vázat na dimerní struktury vytvořené primery, a proto byla nutná předešlá optimalizace. Tento kit také obsahuje enzym reverzní transkriptázu, takže PCR i reverzní transkripce se děje postupně v jedné reakci.

Geny byly po jednom analyzovány v destičce s 96 jamkami (4titude; #4ti-0955, Brooks Life Sciences). Analýza každého vzorku byla prováděna v technickém triplikátu. Ke každému triplikátu byla přiřazená RT kontrola, která obsahovala templát, ale neobsahovala reverzní transkriptázu. Tato kontrola sloužila k případné detekci kontaminace genomovou DNA. Každá destička obsahovala ještě 3 negativní kontroly bez templátu.

Reakční směs o celkovém objemu 15 µl obsahovala 120 ng RNA ze vzorků astrocytů nebo neuronů. U některých vzorků nebylo dostatečné množství RNA (viz Tabulka VI), proto reakční směs obsahovala jen:

- 114 ng RNA ze vzorku 30
- 31,2 ng RNA ze vzorku 31
- 62 ng RNA ze vzorku 32
- 85 ng RNA ze vzorku 33

Směs dále tvořil 2X KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix, který je složen z KAPA SYBR FAST DNA Polymerázy, reakčního pufru, KAPA RT Mix (50X) – M-MuLV Reverse Transcriptase, dNTP, barviva SYBR Green I a MgCl₂ (2,5 mM). Množství primerů a PCR H₂O se lišilo v závislosti na zvolené koncentraci primerů (viz Tabulka II). Po rozplnění

reakčních směsí byla destička zakryta fólií a krátce centrifugována. Celá reakce probíhala v cycleru dle programu uvedeného v Tabulce VII. Výjimka z tohoto protokolu byla učiněna u dvou genů – RNVU1 a HSPA6. U genu RNVU1 musela být koncentrace RNA u astrocytů i neuronů 100x snížena, protože jinak bylo množství detekované RNA příliš vysoké, což způsobilo brzký nárůst fluorescence, který neumožňoval spolehlivou analýzu. U genu HSPA6 byl amplifikační protokol upraven na tříkrokový. Po fázi extenze byl přidán krok, ve kterém se teplota zvýšila na 80 °C po dobu 10 sekund, a kdy byla odečítána fluorescence. Důvodem úpravy protokolu byl vznik nespecifických produktů, které zkreslovaly výsledek reakce.

Tabulka VII: Popis podmínek RT-qPCR reakce. *Odečet fluorescence u genu HSPA6 probíhal po samostatném kroku při teplotě 80 °C po dobu 10 sekund.

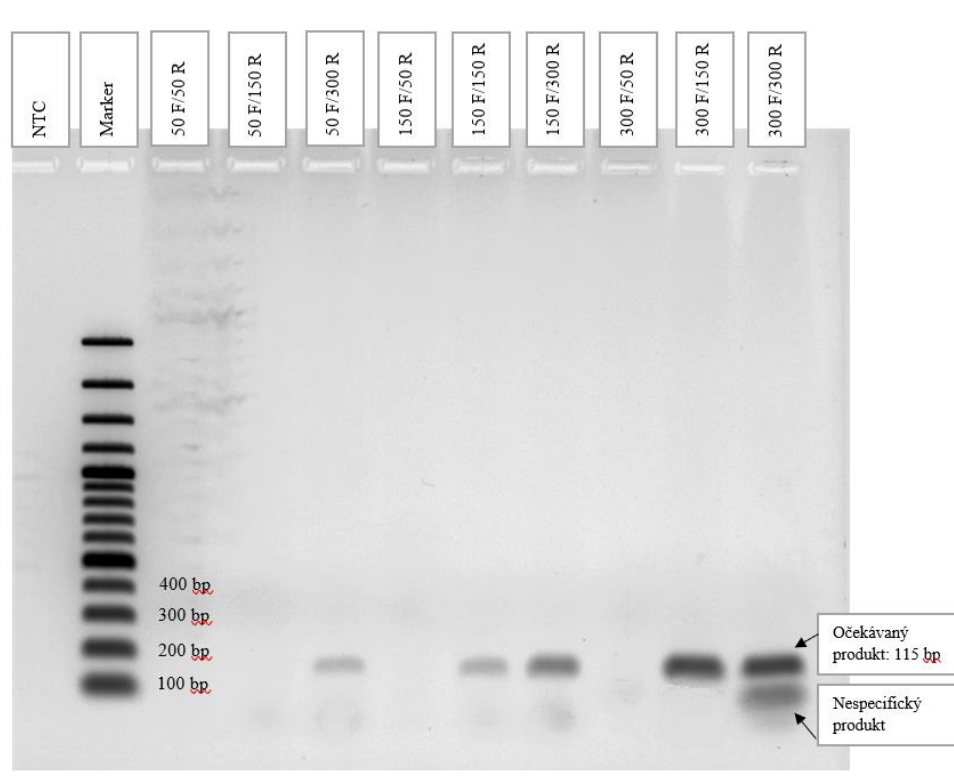
Popis	Teplota	Čas	Počet cyklů
Reverzní transkripce	42 °C	10 min	1
Inaktivace enzymu	95 °C	5 min	1
Denaturace	95 °C	5 s	40
Nasednutí primerů, extenze, odečet fluorescence*	60 °C	25 s	
Melting analýza	v rozsahu 90 °C		

Výsledky byly analyzovány pomocí LightCycler® 480 Software. Číslo cyklu, ve kterém nárůst fluorescence překročil práh pozadí, bylo brán jako hodnota Ct. Následně byla vypočítána $\Delta\Delta Ct$ analýza (Schmittgen & Livak, 2008) pomocí Microsoft® Office 365 Excel®. Pro porovnání shody dat získaných dvěma rozdílnými metodami pro určení genové exprese byla využita korelační analýza v programu RStudio.Version (4.0.2) – Rstudio Team (2020).

4. VÝSLEDKY

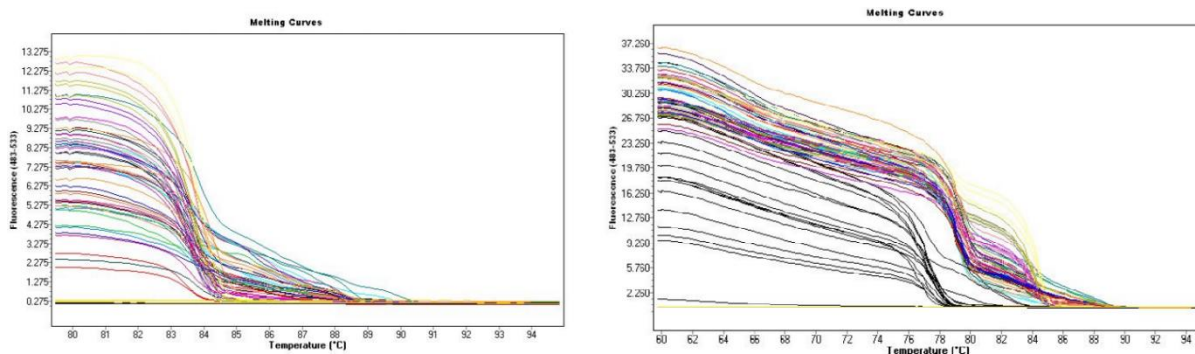
4.1. Stanovení optimálních reakčních podmínek

Pro amplifikaci úseků vybraných genů byla využita metoda PCR s templátem, jehož charakteristika je uvedena v kapitole 3.5.2. Reverzní transkripce, po které následovala elektroforetická separace produktů v 1,5 % agarozovém gelu. Výsledek těchto reakcí dal vzniknout ucelenému přehledu tvorby specifických i nespecifických produktů v závislosti na měnící se koncentraci primerů u každého z genů. Jiné aspekty reakce se optimalizovat v tomto případě nedaly. Na základě výsledku elektroforetické separace byla vybrána nejoptimálnější kombinace koncentrací u „forward“ a u „reverse“ primeru, která vytvářela nejvyšší množství specifického produktu (viz Tabulka II). Příklad výsledku je ukázán na Obrázku 3 a 4. Na základě výsledků reakcí, které byly provedeny u všech původních třinácti genů, byly vybrány čtyři – HSPA6, OASL, RNVU1 a RSAD2, u kterých se po optimalizaci koncentrace primerů amplifikoval pouze specifický produkt.



Obrázek 3: Snímek elektroforetické separace zachycující výsledné produkty PCR reakce u genu HSPA6. Na gel bylo nanášeno 15 μ l reakční směsi. Hodnoty uvedené v popisku udávají koncentraci primerů v dané reakci a vyznačují jamku s negativní kontrolou (NTC).

Při interpretaci výsledků byla zohledněna křivka tání, která by odhalila případné nežádoucí produkty, které by negativně ovlivnily odečet fluorescence. Příklad je uveden na Obrázku 4.



Obrázek 4: Porovnání křivek tání po amplifikaci genu HSPA6 pomocí qRT-PCR u neuronů. Obrázek vpravo ukazuje tvorbu nespecifických produktů, které negativně ovlivnily stanovení míry exprese v případě dvoukrokového protokolu amplifikace. Na základě tohoto výsledku byl upraven protokol a po kroku elongace byla fluorescence odečítána při teplotě 80 °C. Stejný protokol byl poté aplikován pro analýzu exprese genu HSPA6 u vzorku z druhé buněčné linie.

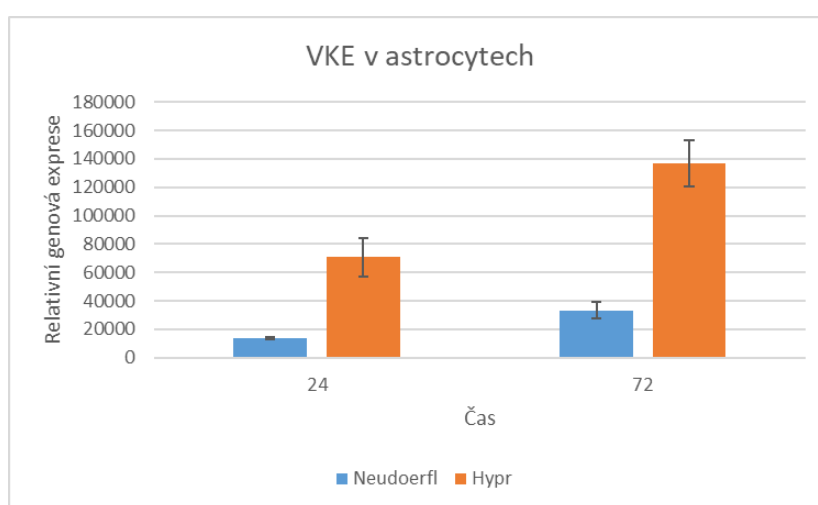
4.2. Kvantifikace exprese vybraných genů

Porovnání míry exprese genů bylo provedeno pomocí qRT-PCR. Pro stanovení relativní kvantifikace jednotlivých genů u vzorků astrocytů a neuronů po infekci virem klíšťové encefalitidy byla použita $\Delta\Delta C_t$ analýza. Jako referenční gen pro tuto analýzu byl použit HPRT1.

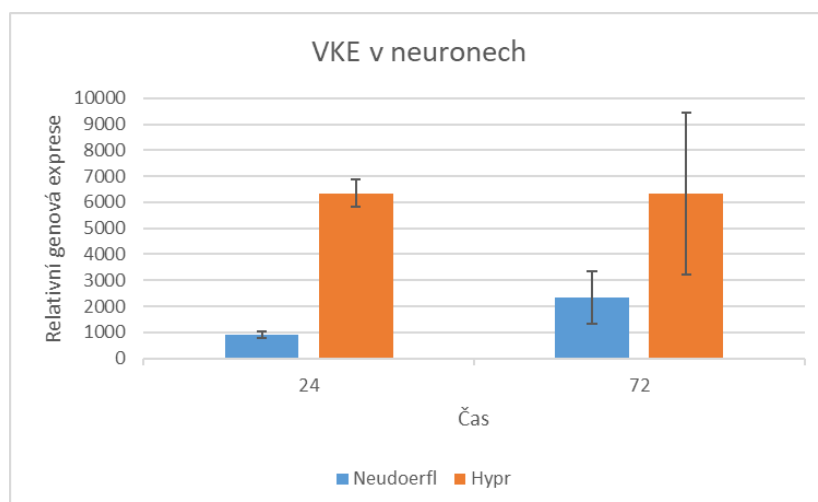
Zvlášť byl analyzován gen kódující protein E viru klíšťové encefalitidy. Stanovení relativního množství virové RNA bylo úspěšné a poskytlo tak přehled o množství viru v době, kdy byla zjišťována exprese ostatních genů. Výrazně větší množství virové RNA bylo zaznamenáno u vzorků primárních lidských astrocytů, kdy s přibývajícím časem se toto množství ještě zvyšovalo. Z výsledných dat je možné zpozorovat velký rozdíl v produkci virové RNA mezi buňkami v závislosti na odlišném kmenu viru, kterým byly infikovány. U buněk infikovaných kmenem Hypr bylo zaznamenáno výrazně větší množství virové RNA. Výsledky analýzy jsou pro zřehlednění uvedeny v Tabulce VIII a na Obrázku 5 a 6.

Tabulka VIII: Kvantifikace virové RNA v astrocytech a neuronech po infekci virem kmene Neudoerfl (N) nebo Hypr (H) v časových intervalech (24/72 h.p.i.).

Vzorek	Astrocyty		Neurony	
	relativní genová exprese EO1	SD	relativní genová exprese EO1	SD
24 N	13558,81	563,78	899,22	119,02
24 H	70750,74	13554,99	6344,11	526,51
72 N	33363,21	5549,67	2340,15	1020,08
72 H	136766,44	16135,19	6332,79	3099,75

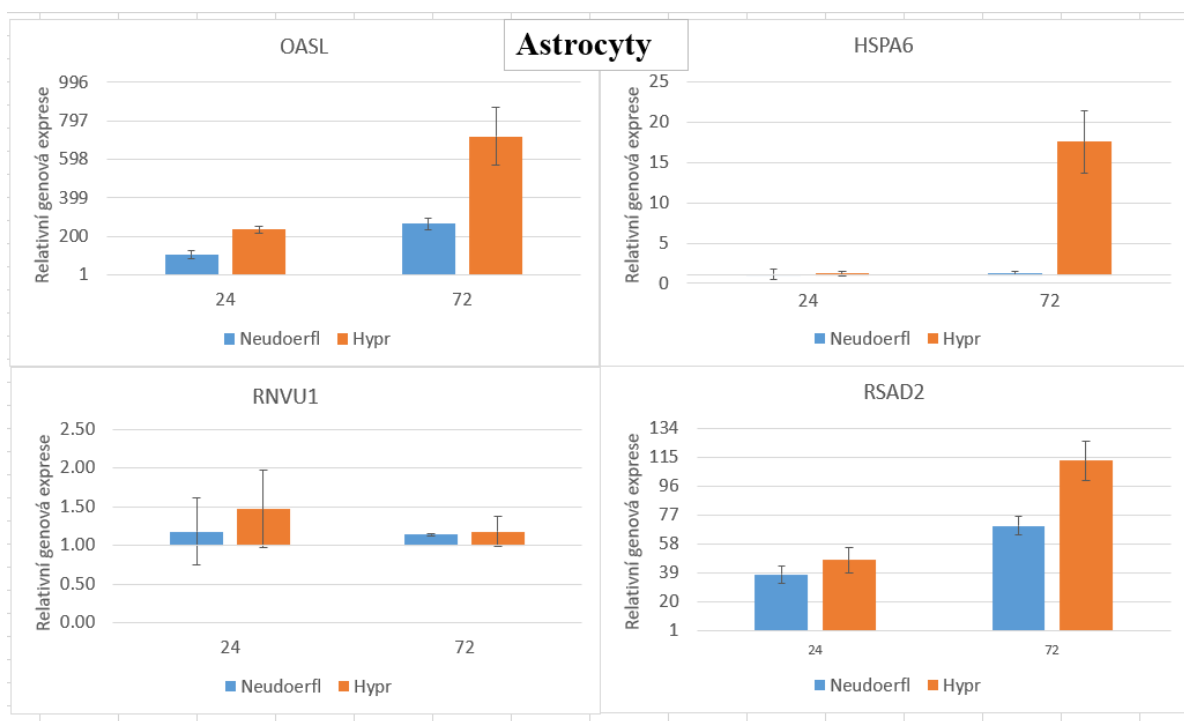


Obrázek 5: Relativní genová exprese proteinu E viru KE v kultuře primárních lidských astrocytů s uvedenou směrodatnou odchylkou.

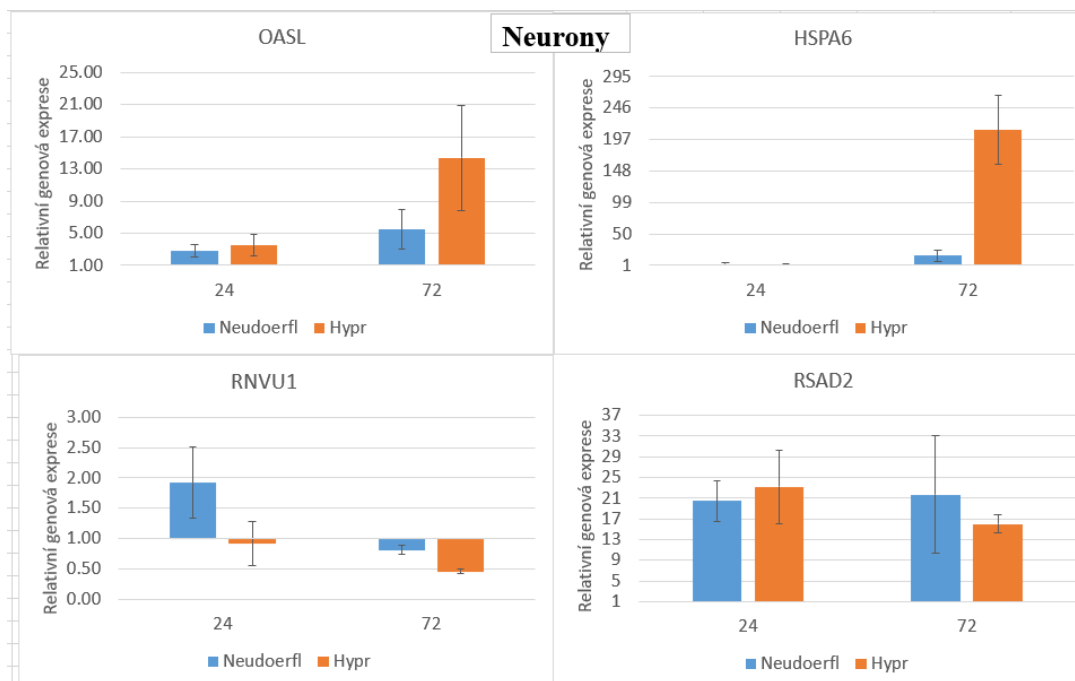


Obrázek 6: Relativní genová exprese proteinu E viru KE v kultuře primárních lidských neuronů s uvedenou směrodatnou odchylkou.

Dále byla stanovena relativní exprese genů: HSPA6, OASL, RNVU1 a RSAD2. Kvantifikace těchto genů se u obou typů buněk podařila. Výsledky této analýzy jsou graficky znázorněné na Obrázku 7 a 8. Zvýšená exprese byla zaznamenána u genů HSAP6, OASL a RSAD2. Všeobecně lze zpozorovat u up-regulovaných genů nárůst exprese po 72 hodinách od infekce. Výjimku tvoří RSAD2, u kterého se množství RNA ve vzorcích neuronů nezvyšovalo dle očekávání. U genu RNVU1 se produkce mRNA snižovala. K největšímu poklesu došlo u neuronů infikovaných Hyprem 24 a 72 hodin po infekci. Během této doby došlo ke snížení exprese. Z výsledků je také patrný rozdíl v syntéze RNA u buněk infikovaných subtypem Hypr a Neudoerfl. Je zjevné, že Hypr u buněk výrazně více zvyšuje expresi genů HSAP6, OASL a RSAD2.



Obrázek 7: Relativní exprese genů HSPA6, OASL, RNVU1 a RSAD2 u primárních lidských astrocytů infikovaných virem klíšťové encefalitidy (Neudoerfl, Hypr) v časech 24 a 72 hodin po infekci



Obrázek 8: Relativní exprese genů HSAP6, OASL, RNVU1 a RSAD2 u primárních lidských neuronů, které byly infikovány virem klíšťové encefalidity (Neudoerfl, Hypr) v časech 24 a 72 hodin po infekci.

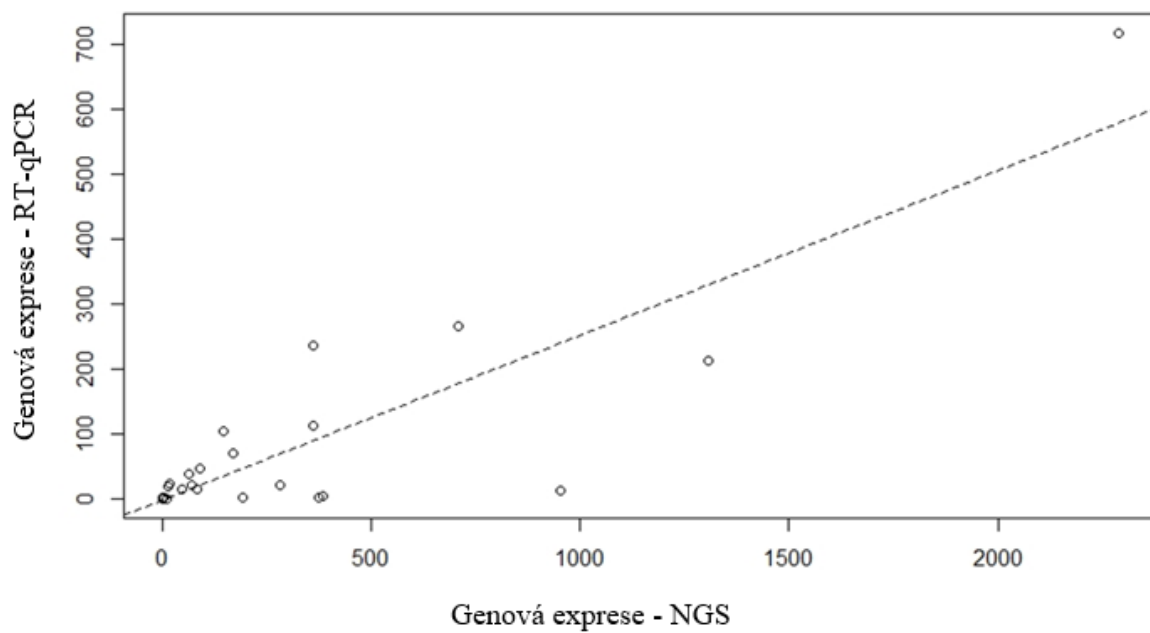
4.3. Porovnání exprese cílových genů metodou qRT-PCR s výsledky z NGS

Hlavním cílem této práce bylo porovnání výsledků získaných metodou qRT-PCR s výsledky získanými metodou NGS. Výstupy obou těchto metod byly zaznamenány do tabulky porovnávající relativní míru exprese jednotlivých genů u astrocytů a neuronů po infekci virem klíšťové encefalidity (viz Tabulka IX).

Tabulka IX: Porovnání změn genové exprese spolu se směrodatnou odchylkou (SD) astrocytech (A) a neuronech (N) infikovaných dvěma subtypy VKE (Neudoerfl - N, Hypr – H) ve dvou časových intervalech po infekci (24 a 72 h.p.i.) ze 3 biologických opakování.

		A24H	A24N	A72H	A72N	N24H	N24N	N72H	N72N
HSPA6	NGS	1,00	1,00	282,38	10,04	4,25	3,66	1308,23	46,39
	qPCR ± S.D.	1,23±0,24	1,18±0,67	17,55±3,86	1,23±0,23	1,96±1,41	3,07±1,71	212,02 ± 53,35	16,40±9,04
OASL	NGS	359,91	144,58	2290,58	708,74	374,86	193,10	951,20	383,42
	qPCR ± S.D.	236,17±17,09	104,83±20,44	716,79±149,11	266,08±30,91	3,51±1,37	2,80±0,79	14,38±6,57	5,45±2,47
RNVU1	NGS	0,0088	0,0069	0,0008	0,0019	1,0000	1,0000	0,0014	0,0050
	qPCR ± S.D.	1,47±0,50	1,18±0,44	1,18±0,19	1,14±0,02	0,92±0,36	1,92±0,59	0,46±0,03	0,81±0,07
RSAD2	NGS	88,26	64,46	361,87	170,00	18,23	14,64	82,54	68,14
	qPCR ± S.D.	47,32±8,54	37,84±5,55	112,56±13,03	69,84±6,08	23,18±7,09	20,45±4,00	16,02±1,77	21,71±11,31

Pro statistické ověření, zda si výsledky z obou metod odpovídají, byla provedena Spearmanova korelační analýza. Korelační koeficient hodnot relativních expresí zjištěných metodou qRT-PCR s expresemi stanovenými NGS je 0.82, což validuje výsledky získané z NGS. Pro názornost byl zkonstruován graf (viz Obrázek 9). Neparametrická obdoba korelační analýzy byla zvolena na základě charakteru analyzovaných dat. Pro zjištění normality dat byl proveden Shapiro-Wilkův test, který určil nenormální rozdělení. Dodatečně byly zkonstruovány histogramy, které potvrdily výsledky Shapiro-Wilkových testů.



Obrázek 9: Korelace výsledných relativních expresí genů HSPA6, OASL, RNVU1 a RSAD2 získaných metodou qRT-PCR a NGS.

5. DISKUZE

5.1. Reakční podmínky

Jedním z cílů této práce bylo stanovení optimálních reakčních podmínek pro průběh qRT-PCR, tak aby pro daný gen vznikl jeden námi očekávaný produkt. Pro dosažení specifického průběhu reakce byla optimalizována koncentrace primerů jednotlivých genů. Další možností, jak zlepšit průběh PCR reakce je úprava koncentrace $MgCl_2$, kterou obsahuje Master Mix. $MgCl_2$ je potřebně k udržení enzymatické aktivity Taq polymerázy tím, že stabilizuje komplex DNA-polymeráza (Čikoš et al., 2001). V tomto experimentu byl ale využíván KAPA SYBR® FAST Universal One-Step qRT-PCR Kit, který obsahuje již připravený roztok Master Mixu o dané koncentraci $MgCl_2$. Ze stejného důvodu nebyly do reakce přidány další reagenty, které by mohli příznivě ovlivnit amplifikaci produktu. Mezi ně se řadí např. glycerol nebo DMSO, které brání vzniku sekundárních struktur (Čikoš et al., 2001).

I po optimalizaci reakčních podmínek byly nutné dodatečné úpravy v protokolu pro qRT-PCR u genů HSPA6 a RNVU1. U genu RNVU1 bylo nutné 100x snížit vstupní množství RNA. V původní reakci hodnoty fluorescence narůstaly příliš brzo, takže nebylo možné porovnávat změny genové exprese v jednotlivých vzorcích. Po provedené úpravě bylo možné analyzovat měnící se expresi toho genu. HSPA6 během qRT-PCR ve vzorcích neuronů vytvářel nespecifické produkty, které mohly potenciálně zkreslovat výsledek reakce. Na základě následné elektroforetické separace a analýzy teploty tání bylo zjištěno, že nespecifické produkty denaturují při nižších teplotách než specifické produkty (viz Obrázek 4). Proto byl poté do amplifikačního protokolu přidán krok, ve kterém se po extenzi odečítala fluorescence při 80 °C (viz Tabulka VII). Díky této optimalizaci nebyly po úpravě reakčního protokolu detekovány nespecifické produkty a výsledky mohly být vyhodnoceny.

5.2. Míra exprese vybraných genů

Ve vzorcích primárních lidských astrocytů a neuronů byla stanovena míra exprese genu kódujícího protein E viru klíšťové encefalitidy (viz Tabulka VIII). Nárůst množství virové RNA a související míra replikace viru v buňkách byla signifikantně zvýšená u vzorků infikovaných kmenem Hypr. Tento kmen je více virulentní než mírnější Neudoerfl (Mandl et al., 1997), což se projevuje zvýšenou expesí virové RNA. Také lze pozorovat rozdíl v produkci RNA mezi astrocyty a neurony. Ačkoliv jsou neurony považovány

za hlavní cíl viru (Hirano et al., 2014), infekce astrocytů byla také prokázána (Palus et al., 2014). Zvýšená produkce virové RNA v primárních lidských astrocytech naznačuje, že by tyto buňky mohly sloužit jako potenciální rezervoár infekce v mozku (Zorec et al., 2019). Relativní množství virové RNA u primárních lidských astrocytů bylo výrazně vyšší v porovnání s infikovanými buňkami z lidské meduloblastomové linie (Selinger et al., 2019). Tento rozdíl v produkci virové RNA byl očekávatelný, protože kultury primárních lidských buněk mají fyziologicky blíže k fungování buněk v mozku, a proto mohou poskytnout lepší přesnější výsledky k popisu neuropatogeneze (Fares et al., 2020). Meduloblastomová linie pocházející z nádoru mozečku má výrazně pozměněné vlastnosti (Jacobsen et al., 1985, Petruželka & Konopásek, 2003).

Ke stanovení míry genové exprese byly vybrány čtyři geny: HSPA6, OASL, RNVU1 a RSAD2. Na Obrázku 7 a 8 jsou viditelné odlišné odpovědi v buňkách, dle kmenu viru, kterým byly infikovány. U up-regulovaných genů byla exprese více zvýšená u buněk infikovaných kmenem Hypr, což může být dáno tím, že tento kmen je více virulentní než Neudoerfl. Výjimku tvořil gen RSAD2, u kterého se u neuronů po 72 hodinách od infekce exprese snížila (viz Obrázek 8). Tento jev odpovídá výsledkům práce Selinger et al., 2019, který u meduloblastomových buněk infikovaných kmenem Hypr zaznamenal sníženou hladinu mRNA tohoto genu. Sníženou expresí toho genu potvrdil i Fares et al., 2020 u primárních lidských neuronů, které byly infikovány kmenem Hypr. Nižší míra zvýšení exprese RSAD2 v neuronech po 72 h.p.i. může být důsledkem virem způsobeným potlačením produkce genů, jejichž exprese je závislá na produkci interferonů (Selinger et al., 2019).

RSAD2 neboli viperin (virus-inhibitory protein, endoplasmic reticulum-associated, interferon-inducible) je gen, který byl ve vzorcích astrocytů i neuronů up-regulovaný. Jeho exprese je u savčích buněk vyvolána vazbou cizorodé RNA na Toll-like nebo RIG-I receptory (Wang et al., 2015). Jeho hlavní funkcí je ochrana buňky před virovou infekcí. Jednou z jeho schopností je syntéza ribonukleotidu ddCTP, který zastavuje replikaci některých virů (Gizzi et al., 2018). U VKE se viperin váže na nestrukturní protein NS3 a způsobuje jeho degradaci (Helbig et al., 2013). NS3 má funkci helikázy, a tak jeho rozpad omezuje maturaci viru (Gritsun et al., 2003). Dalším způsobem, kterým RSAD2 přispívá k obraně proti flavivirům je regulace přesunu proteinů do ER odkud jsou následně exportovány z buňky ven (Mukhopadhyay et al., 2005). Tuto cestu využívá VKE ke svému šíření. Zvýšená exprese toho genu se dala očekávat nejen z důvodu jeho funkce, ale i na

základě jeho aktivace pomocí interferonu prvního typu (IFN-I), což je cytokin produkovaný jako jeden z prvních při virové nákaze (Der et al., 1998).

Jedním z genů, u kterého byla exprese po infekci viru klíšťové encefalitidy zvýšena, byl HSPA6. Tento gen kóduje buněčný chaperon, který zajišťuje správné složení a transport proteinů v buňce. Účastní se taktéž na formování a rozpadu proteinových komplexů (Radons, 2016). Zvýšení jeho exprese může být důsledkem množení viru. K svému množení využívá virus proteosyntetického aparátu buňky, jehož součástí jsou po translaci i buněčné chaperony (Bukau & Horeich, 1998).

Další z up-regulovaných genů byl OASL. Důvod zvýšení jeho exprese je pravděpodobně dán jeho funkcí v buňce. Tento protein má schopnost bojovat s virovou infekcí. Je aktivován IFN-I, který má kromě protizánětlivých účinků vliv také na zvýšení transkripce OASL. OASL zvyšuje aktivitu RIG-I receptoru, který rozpoznává dvouvláknovou RNA v cytosolu buňky (Yoneyama et al., 2004, Zhu et al., 2014). Po navázání RNA dojde k signalizační kaskádě vedoucí k produkci IFN-I, a tak i zvýšení exprese samotného genu (Kell & Gale, 2015). Zvýšená exprese se dala předpokládat i na základě výsledků Selinger et al., 2017, který na meduloblastomových buňkách prokázal zvýšenou expresi OASL po infekci virem klíšťové encefalitidy.

Expresi RNVU1 se ve vzorcích primárních lidských astrocytů a neuronů v časech mezi 24 a 74 h.p.i. snižovala. RNVU1 je součást spliceozomu a účastní se sestříhu pre-RNA a taktéž chrání vznikající transkripty před předčasnou polyadenylací nebo degradací. Pokles v expresi genu byl očekáván na základě výsledků Selinger et al., 2019, který prokázal výrazné snížení produkce nově syntetizovaných proteinů jak u A549, Vero a PS buněk, tak i u buněk neurálního původu během infekce virem klíšťové encefalitidy. Míra redukce se výrazně lišila. Největší snížení translace napříč všemi buněčnými liniemi bylo pozorováno po infekci kmenem Hypr, který je více virulentní a neuroinvazivní (Mandl et al., 1997). Stejný trend byl pozorován u vzorků primárních lidských astrocytů a neuronů. K největšímu poklesu v expresi došlo u neuronů infikovaných Hyprem 24 a 72 hodin po infekci. Výsledek kvantifikace pomocí RT-qPCR odpovídá teorii, že buňka, která rozpozná napadení RNA virem, se snaží snížit svoji proteosyntézu, které se účastní i RNVU1 jako součást spliceozomu (Harding et al., 2003, Zhou et al., 2002). Data Selinger et al., 2019 naznačují, že ani snížená syntéza proteinů nezastaví replikaci viru klíšťové encefalitidy. Tuto teorie lze podpořit i výsledkem analýzy na primárních lidských astrocytech a neuronech,

u kterých bylo naměřeno relativně vysoké množství virové RNA současně se sníženou expresí genu RNVU1.

5.3. Porovnání metod qRT-PCR a NGS

qRT-PCR obsahuje tři kroky: reverzní transkripci, PCR amplifikaci a detekci a kvantifikaci produktu v reálném čase (Gibson et al., 1996). Tato metoda se stala jednou z nejčastěji používaných při stanovování exprese jednotlivých genů. Její problém spočívá v závislosti na větším množství a kvalitě templátu (Bustin & Nolan, 2004). qRT-PCR dokáže v jednom setu reakcí zacílit pouze na omezený počet genů díky nutnosti použití specifického primeru. Výhodou je však její vysoká citlivost (Bustin, 2000).

NGS dokáže najednou poskytnout informace o velkém množství genů z relativně malého množství vstupní RNA, ale se sníženou citlivostí (Hrdličková et al., 2017). Avšak tyto metody mají problémy se sekvenací homopolymerů, což může vést k problémům při studiu poly(A) konců, které hrají důležitou roli v metabolismu transkriptů (Hrdličková et al., 2017). Jako nejlepší možnost analýzy genové exprese se jeví spojení těchto metod, ve kterém NGS identifikuje geny, které budou podrobeny přesnější analýze pomocí qRT-PCR (Costa et al., 2013). Možnost využití této kombinace potvrzuje i analýza genové exprese u primárních lidských astrocytů a neuronů, ve které byla dokázána korelace mezi výsledky z NGS a qRT-PCR.

6. ZÁVĚR

- Podařilo se optimalizovat reakční podmínky pro qRT-PCR tak, aby reakce probíhala specificky za vzniku jednoho očekávaného produktu u všech genů kromě HSPA6. U tohoto genu byl dodatečně upraven protokol takovým způsobem, aby byl detekován pouze specifický produkt.
- Expze virové RNA se lišila v závislosti na virulenci kmene viru klíšťové encefalitidy a typu buněk, naznačující možnou úlohu astrocytů jako rezervoár infekce v mozku.
- Byla stanovena změna expze genů HSPA6, OASL, RNVU1 a RSAD2 v primárních lidských astrocytech a neuronech po infekci virem klíšťové encefalitidy.
- Výsledky diferenciální expze genů získaných pomocí NGS korelují s výsledky získanými z qRT-PCR. Potvrzují tak vhodnost kombinace těchto dvou metod při analýze genové expze.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CNS	centrální nervová soustava
EO1	část genu kódující protein E viru klíšťové encefalidity
ER	endoplasmatické retikulum
GFAP	glial fibrillary acidic protein
HB	hematoencefalická bariéra
h.p.i.	hodin po infekci
HPRT1	Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1
HSPA6	Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 6
IFN-I	interferon I. typu
IL-1	interleukin 1
IL-6	interleukin 6
KE	klíšťová encefalitida
NGS	next generation sequencing
OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like
ORF	otevřený čtecí rámec
PCR	polymerázová řetězová reakce
RNVU1	RNA, Variant U1 Small Nuclear 2
RSAD2	Radical S-Adenosyl Methionine Domain Containing 2/Viperin
qRT-PCR	kvantitativní reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce
TNF- α	tumor nekrotizující faktor α
VKE	virus klíšťové encefalidity

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Abbott N., Rönnbäck L., Hansson E. (2006): Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience* 7: 41–53.

Allison S.L., Schalich J., Stiasny K., Mandl C. W., Kunz C., Heinz F. X. (1995): Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH. *Journal of Virology* 69: 695-700.

Balendrian G.K., Molina J.A., Xu Y., Torres-Martinez J., Stevens R., Focia P.J., Eakin A.E., Sacchettini J.C., Craig S.P. 3rd (1999): Ternary complex structure of human HGPRTase, PRPP, Mg²⁺, and the inhibitor HPP reveals the involvement of the flexible loop in substrate binding. *Protein Science* 5: 1023-1031.

Bílý T., Palus M., Eyer L., Elsterová J., Vancová M., Růžek D. (2015): Electron tomography analysis of tick-borne encephalitis virus infection in human neurons. *Scientific Reports* 5:10745.

Biron C.A., Nguyen K.B., Pien G.C., Cousens L.P., Salazar-Mather T.P. (1999): Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annual Review of Immunology* 17: 189–220.

Bogovič P., Stupica D., Rojko T., Lotrič-Furlan S., Avšič-Županc T., Kastrin A., Lusa L., Strle F. (2018): The long-term outcome of tick-borne encephalitis in Central Europe. *Ticks and Tick-borne Diseases* 9: 369–378.

Bowman A., Nuttal P. (2008): Ticks: biology, disease and control. *Cambridge University Press*. ISBN: 9780521867610.

Bukau B., Horwich A.L. (1998): The Hsp70 and Hsp 60 chaperone machines. *Cell* 92: 351-366.

Bustin S.A. (2000): Absolute quantification of mRNA using real-time reversetranscription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25: 169–193.

Bustin S.A., Nolan T. (2004): Pitfalls of quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Journal of Biomolecular Techniques* 15: 155–166.

- Costa C., Gimeréz-Capitán A., Karachaliou N., Rosell R. (2013): Comprehensive molecular screening: from the RT-PCR to the RNA-seq. *Translational Lung Cancer Research* 2: 87-91.
- Čikoš Š., Koppel J., Kantíková M. (2001): Polymerázová reťazová reakcia a jej použitie v biologickom výskume a diagnostike. Košice: SAV Košice, s. 203, ISBN 80-968-618-0-8
- Dai X., Shang G., Lu S., Yang J., Xu J. (2018): A new subtype of eastern tick-borne encephalitis virus discovered in Qinghai-Tibet Plateau, China. *Emerging Microbes & Infections* 7: 74.
- Demicheli V., Debalini M. G., Rivetti A. (2009): Vaccines for preventing tick-borne encephalitis. *The Cochrane database of systematic reviews* 1: CD000977.
- Der S.D, Zhou A., Williams B.R., Silverman R.H. (1998): Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 95: 15623-15628.
- Druga R., Grim M., Dubový P. (2011): Anatomie centrálního nervového systému. *Praha: Galén*. ISBN 978-80-7262-706-6.
- Dumpis U., Crook D., Oksi J. (1999): Tick-borne encephalitis. *Clinical Infectious Diseases* 28: 882-890.
- Elshuber S., Allison S.L., Heinz F.X., Mandl C.W. (2003): Cleavage of protein prM is necessary for infection of BHK-21 cells by tick borne encephalitis virus. *Journal of General Virology* 84: 183-191.
- Fares M., Cochet-Bernoin M., Gonzalez G., Montero-Menei C.N., Blanchet O., Benchoua A., Boissart C., Lecollinet S., Richardson J., Haddad N., Couplier M. (2020): Pathological modeling of TBEV infection reveals differential innate immune responses in human neurons and astrocytes that correlate with their susceptibility to infection. *Journal of Neuroinflammation* 17:79.
- Flamand M., Megret F., Mathieu M., Lepault J., Rey F.A., Deubel V. (1999): Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. *Journal of Virology* 73: 6104-6110.

- Gaunt M.W., Sall A.A., de Lamballerie X., Falconar A.K.I., Dzhibanian 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.
- 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.
- 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 & Experimental Neurology* 64: 506-512.
- Gelpi E., Preusser M., Laggner U., Garzuly F., Holzmann H., Heinz F.X., Budka H. (2006): Inflammatory response in human tick-borne encephalitis: analysis of postmortem brain tissue. *Journal of Neurovirology* 12: 322-327.
- Gibson U.E., Heid C.A., Williams P.M. (1996): A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research* 6: 995-1001.
- Gizzi A. S., Grove T. L., Arnold J. J., Jose J., Jangra R. K., Garforth S. J., Du Q., Cahill S. M., Dulyaninova N. G., Love J. D., Chandran K., Bresnick A. R., Cameron C. E., Almo, S. C. (2018): A naturally occurring antiviral ribonucleotide encoded by the human genome. *Nature* 558: 610–614.
- Gritsun T.S., Lashkevich V.A., Gould E.A. (2003). Tick-borne encephalitis. *Antiviral Research* 57: 129-146.
- Guidotti L.G., Chisari F.V. (2006): Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annual Review of Pathology* 1:23–61.
- Gupta N., Santhosh S., Babu J.P., Parida, M., Rao P.L. (2010): Chemokine profiling of Japanese encephalitis virus-infected mouse neuroblastoma cells by microarray and real-time RT-PCR: implication in neuropathogenesis. *Virus research* 147, 107-112.
- Harding H. P., Zhang Y., Zeng H., Novoa I, Lu P. D., Calfon M., Sadri N., Yun C., Popko B., Paules R., Stojdl D. F., Bell J. C., Hettmann T., Leiden J. M., Ron D. (2003): An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Molecular Cell* 11, 619–633.

Heinz F.X., Allison S.L. (2003): Flavivirus structure and membrane fusion. *Advances in Virus Research* 59: 63-97.

Helbig K. J., Carr J. M., Calvert J. K., Wati S., Clarke J. N., Eyre N. S., Narayana S. K., Fiches G. N., McCartney E. M., Beard M. R. (2013): Viperin is induced following dengue virus type-2 (DENV-2) infection and has anti-viral actions requiring the C-terminal end of viperin. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7: e2178.

Henz F.X., Collet 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., Cartens E., Estes M.K., Lemon S., Maniloff J., Mayo M.A., McGeogch D., Pringle C.R., Wickner R.B. (2000): Family Flaviviridae, virus taxonomy. Proceedings of the 7th International Committee for the Taxonomy of viruses. *Academic Press*: 859-878.

Hinson E. R., Cresswell P. (2009): The N-terminal amphipathic α -helix of viperin mediates localization to the cytosolic face of the endoplasmic reticulum and inhibits protein secretion. *Journal of Biological Chemistry* 284: 4705–4712.

Hirano M., Muto M., Sakai M., Kondo H., Kobayashi S., Kariwa H., Yoshii K. (2017): Dendritic transport of tick-borne flavivirus RNA by neuronal granules affects development of neurological disease. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 114: 9960-9965.

Hirano M., Yoshii K., Sakai M., Hasebe R., Ichii O., Kariwa H. (2014): Tick-borne flaviviruses alter membrane structure and replicate in dendrites of primary mouse neuronal culture. *Journal of General Virology* 95: 849-861.

Hrdličková R., Toloue M. Tian B. (2017): RNA-seq methods for transcriptome analysis. *Wiley interdisciplinary reviews RNA* 8: 10.1002/wrna.1364.

Chin K.C., Cresswell P. (2001): Viperin (cig5), an IFN-inducible antiviral protein directly induced by human cytomegalovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 15125–15130.

Choi U.Y., Kang J.S., Hwang Y.S., Kim Y.J. (2015): Oligoadenylate synthase-like (OASL) proteins: dual functions and associations with diseases. *Experimental & Molecular Medicine* 47: e144.

- 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.
- Jacobsen P.F., Jenkyn D.J., Papadimitriou J.M. (1985): Establishment of a human medulloblastoma cell line and its heterotransplantation into nude mouse. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 44: 472-485.
- Kaiser R. (1999): The clinical and epidemiological profile of tick-borne encephalitis in southern Germany 1994-98: a prospective study of 656 patients. *Brain* 122: 2067-2078.
- Kao D-I., Aldridge G.M., Weiler I.J., Greenough W.T. (2010): Altered mRNA transport, docking, and protein translation in neurons lacking fragile X mental retardation protein. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 107: 15601–15606.
- Kell A.M., Gale M. (2015): RIG-I in RNA virus recognition. *Virology* 479-480: 110–121.
- Kondrusik M., Pancewicz S., Zajkowska J., Hermanowska-Szpakowicz T. (2001): Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1-beta in serum of patients with tick-borne encephalitis. *Polski merkuriusz lekarski: organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego* 11: 26-28.
- Korenberg E.I. (1976): Some contemporary aspects of natural focality and epidemiology of tick-borne encephalitis. *Folia Parasitologica* 23: 357-366.
- Labuda M., Jones L., Williams T., Nuttall P. (1993a): Enhancement of tick-borne encephalitis virus transmission by tick salivary gland extracts. *Medical and Veterinary Entomology* 7:193-196.
- Labuda M., Jones L.D., Williams T., Danielova V., Nuttall P.A. (1993b): Efficient transmission of tick-borne encephalitis virus between co-feeding ticks. *Journal of Medical Entomology* 30: 295-299.
- Lieskovská J., Páleníková J., Langhansová H., Chmelař J., Kopecký J. (2018): Saliva of *Ixodes ricinus* enhances TBE virus replication in dendritic cells by modulation of pro-survival Akt pathway. *Virology* 514: 98-105.
- Málková D., Fraňková V. (1959): The lymphatic system in the development of experimental tick-borne encephalitis in mice. *Acta Virologica* 3: 210-214.

- Mandl C.W. (2005): Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that affect neuropathogenesis. *Virus Research* 111: 161-174.
- Mandl C.W., Ecker M., Holzmann H., Kunz C., Heinz F.X. (1997): Infectious cDNA clones of tick-borne encephalitis virus European subtype prototypic strain Neudoerfl and high virulence strain Hypr. *Journal of General Virology* 78: 1049–1057.
- 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.
- Marques J., Anwar J., Eskildsen-Larsen S., Rebouillat D., Paludan S.R., Sen G., Williams B.R., Hartmann R.J. (2008): The p59 oligoadenylate synthetase-like protein possesses antiviral activity that requires the C-terminal ubiquitin-like domain. *Journal of General Virology* 89: 2767-2772.
- Maximova A.M., Pletnev A.G. (2018): Flaviviruses and the central nervous system: revisiting neuropathological concepts. *Annual Review of Virology* 5: 255-272.
- Mazeaud C., Freppel W., Chatel-Chaix L. (2018): The multiple fates of the flavivirus RNA genome during pathogenesis. *Frontiers in Genetics* 9: 595.
- Mukhopadhyay S., Kuhn R. J., Rossmann M. G. (2005): A structural perspective of the *Flavivirus* life cycle, *Nature Reviews Microbiology* 3: 13-22.
- Needergaard M., Ransom B., Goldman S.A. (2003): New roles for astrocytes, redefining the functional architecture of the brain. *Trends in Neurosciences* 26: 523-530.
- O'Reilly D., Dienstbier M., Cowley S.A., Vazquez P., Drozd M., Taylor S., James W.S., Murphy S. (2013): Differentially expressed variant U1 snRNAs regulate gene expression in human cells. *Genome Research* 23: 281-291.
- Palus M., Bílý T., Elsterová J., Langhansová H., Salát J., Vancová M., Růžek D. (2014): Infection and injury of human astrocytes by tick-borne encephalitis virus. *Journal of General Virology* 95: 2411-2426.

- Palus M., Vojtišková J., Salát J., Kopecký J., Grubhoffer L., Lipoldová M., Demant P., Růžek D. (2013): Mice with different susceptibility to tick-borne encephalitis virus infection show selective neutralizing antibody response and inflammatory reaction in the central nervous system. *Journal of neuroinflammation* 10: 77.
- Palus M., Žampachová E., Elsterová J., Růžek D. (2014): Serum matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 levels in patients with tick-borne encephalitis. *Journal of Infection* 68: 165-169.
- Pěkný M., Pěkná M. (2016): Reactive gliosis in pathogenesis of CNS diseases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1862: 483-491.
- Petruželka L., Konopásek B. (2003): *Klinická onkologie*, 1. Praha: Karolinum. 274. ISBN-13: 80-246-0395-0.
- Pletnev A. G. (2001): Infectious cDNA clone of attenuated Langat tick-borne flavivirus (strain E5) and 3' deletion mutant constructed from exhibit decreased neuroinvasiveness in immunodeficient mice. *Virology* 285: 288-300.
- Pogodina V. (1960): Experimental study of the pathogenesis of tick-borne encephalitis on alimentary infection. II. Study of pathways of excretion of virus from white mice. *Problems of Viriology* 5: 304-310.
- Pospíšil L., Jandásek L., Pešek J. (1954): Isolation of new strains of tick-borne encephalitis virus, Brno region, summer 1953. *Lékařské listy* 9: 3-5.
- Potokar M., Jorgačevski J., Zorec R. (2019): Astrocytes in Flavivirus Infections. *International Journal of Molecular Science* 20 (3): 691.
- Prebil M., Jensen J., Zorec R., Kreft M. (2011): Astrocytes and energy metabolism. *Archives of Physiology and Biochemistry* 117: 64-69.
- Qiu L.Q., Cresswell P., Chin K. C. (2009): Viperin is required for optimal Th2 responses and T-cell receptor-mediated activation of NF-kappaB and AP-1. *Blood* 113: 3520-3529.
- Radons J. (2016): The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? *Cell stress & chaperones* 21: 379-404.

- Ramesh G., MacLean A.G., Philipp M.T. (2013): Cytokines and chemokines at the crossroads of neuroinflammation, neurodegeneration, and neuropathic pain. *Mediators of Inflammation* 2013: 480739.
- Robertson F.C., Berzofsky J.A., Terabe M. (2014): NKT cell network in the regulation of tumor immunity. *Frontiers in Immunology* 5: 543.
- Růžek D., Avšič-Županc T., Boreda J., Chrdle A., Eyera L., Karganov G., Kholodilov I., Knap N., Kozlovskaya L., Matveev A., Miller A.D., Osolodkin D.I., Överby A.K., Tikunova N., Tkachev S., Zajkowska J. (2019): Tick-borne encephalitis in Europe and Russia: Review of pathogenesis, clinical features, therapy, and vaccines. *Antiviral Research* 164: 23-51.
- Růžek D., Dobler G., Mantke O. D (2010): Tick-borne encephalitis: Pathogenesis and clinical implication. *Travel Medicine and Infectious Disease* 8: 223-232.
- Růžek D., Salát J., Palus M., Gritsun T.S., Gould E.A., Dyková I., Skallová A., Jelínek J., Kopecký J., Grubhoffer L. (2009): CD8⁺ T-cells mediate immunopathology in tick-borne encephalitis. *Virology* 384:1–6.
- Růžek D., Salát J., Singh S.K., Kopecký J. (2011): Breakdown of the blood-brain barrier during tick-borne encephalitis in mice is not dependent on CD8⁺ T-cells. *PLoS ONE* 6: e20472.
- Růžek D., Vancová M., Tesarová M., Ahantarig A., Kopecký J., Grubhoffer L. (2009): Morphological changes in human neural cell following tick-borne encephalitis virus infection. *Journal of General Virology* 90: 1649-1658.
- Selinger M., Tykalová H., Štěrbá J., Věchtová P., Vavrušková Z., Lieskovská J., Kohl A., Schnettler E., Grubhoffer L. (2019): Tick-borne encephalitis virus inhibits rRNA synthesis and host protein production in human cells of neural origin. *PLoS Neglected Tropical Diseases*: 13: e007745.
- Selinger M., Wilkie G.S., Tong L., Gu Q., Schnettler E., Grubhoffer L., Kohl A. (2017): Analysis of tick-borne encephalitis virus – induced host responses in human cell of neuronal origin and interferon-mediated protection. *Journal of General Virology* 98: 2043-2060.
- Schmittgen T.D., Livak K.J. (2008): Analyzing real-timePCR data by the comparative C(T) method. *Nature Protocols* 3: 1101-1118.

- Schneider H. (1931): Uber epidemische akute Meningitis serosa. *Wiener klinische Wochenschrift* 44: 350-352.
- Schnoor M., Parkos Ch.A. (2008): Disassembly of endothelial and epithelial junctions during leukocyte transmigration. *Frontiers in Bioscience* 13: 6638-6652.
- Simmonds P., Becher P., Bukh J., Gould E. A., Meyers G., Monath T., Muerhoff S., Pletnev A., Rico-Hesse R., Smith D. B. Stapleton J. T., ICTV Report Consortium (2017): ICTV virus taxonomy profile: *Flaviviridae*. *Journal of General Virology* 98: 2-3.
- Süss J. (2003): Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. *Vaccine* 21: S1/19-S1/35.
- Szretter K. J., Brien J. D., Thackray L. B., Virgin H. W., Cresswell P., Diamond M. S. (2011): The interferon-inducible gene viperin restricts West Nile virus pathogenesis. *Journal of virology*, 85: 11557–11566.
- Thrane A.S., Rangroo Thrane V., Nedergaard M. (2014): Drowning stars: Reassessing the role of astrocytes in brain edema. *Trends in Neurosciences* 37: 620–628.
- Tomazic J., Ihan A. (1997): Flow cytometric analysis of lymphocytes in cerebrospinal fluid in patients with tick-borne encephalitis. *Acta Neurologica Scandinavia* 95: 29–33.
- Verkhatsky, A., Nedergaard M. (2018): Physiology of astroglia. *Physiological Reviews* 98, 239–389.
- Votiakov V.I., Zlobin V.I., Mishayeva N.P. (2002): Tick-borne encephalitis of Eurasia. *Ecology, molecular epidemiology, nosology evolution*. Novosibirsk: Nauka.
- Wang J., Huang, H. (2015): Viperin is induced following toll-like receptor 3 (TLR3) ligation and has a virus-responsive function in human trophoblast cells. *Placenta* 36: 667–673.
- Yoneyama M., Kikuchi M., Natsukawa T., Shinobu N., Imaizumi T., Miyagishi M., Taira K., Akira S., Fujita T. (2004): The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nature Immunology* 5: 730–737.
- Zajkowska J., Moniuszko-Malinowska A., Pancewicz S.A., Muszynska-Mazur A., Kondrusik M., Grygorczuk S., Swierzbinska-Pijanowska R., Dunaj J., Czupryna P. (2011): Evaluation of CXCL10, CXCL11, CXCL12 and CXCL13 chemokines in serum and

cerebrospinal fluid in patients with tick borne encephalitis (TBE) *Advances in medical sciences* 56: 311–317.

Zambito Marsala S., Pistacchi M., Gioulis M., Mel R., Marchini C., Francavilla E. (2014): Neurological complications of tick borne encephalitis: the experience of 89 patients studied and literature review. *Neurological Sciences* 35: 15-21.

Zhou Z., Licklider L.J., Gygi S.P., Reed R. (2002): Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. *Nature* 419: 182-185.

Zorec R. Avšič-Županc T., Verkhatsky A. (2019): Astrogliopathology in the infectious insults of the brain. *Neuroscience Letters* 689: 56–62.