

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Vliv overexprese proteinu OASL na průběh infekce virem
klíšťové encefalitidy**

Diplomová práce

Bc. Libor Hejduk

Školitel: RNDr. Ján Štěrba, PhD.

České Budějovice 2017

Hejduk L., 2017: Vliv overexprese proteinu OASL na průběh infekce virem klíšťové encefalitidy. [Effect of OASL protein overexpression on the development of infection by tick-borne encephalitis virus, MSc. thesis, in Czech] 63 p, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

This study was focused on determining the possible antiviral role of OASL protein in human neural cell line infected by the tick-borne encephalitis virus. OASL proteins are involved in the signaling cascade of innate immune system and their antiviral effect was described in case of some RNA viruses, for example hepatitis C virus, respiratory syncytial virus or Sendai virus. The expression vectors for OASLa, OASLb, and OASLd variants were purchased and general transfection optimization was performed. Optimized transfection conditions were subsequently used for the OASL intracellular localization analyses and the determination of transcriptional and translational kinetics. The virion production as well as the levels of TBEV genomic RNA were characterized in OASL-transfected cells. Virion production was not affected in the presence of any OASL variant, however, a temporary decrease of TBEV RNA was documented in OASLa-transfected cells at 24 hours post infection. On the contrary, the presence of TBEV in cells resulted in decreased protein levels of OASLa when compared to mock-infected cells. The virus-induced inhibition of OASLa production seems to occur on the translational level, since the OASL mRNA levels were not affected by the TBEV infection.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval 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, 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 13.12.2017

Bc. Libor Hejduk

Poděkování

Na prvním místě bych rád poděkoval Martinovi Selignerovi za neskutečnou obětavost a trpělivost při metodickém vedení mé práce. Veliký dík patří i Jankovi Štěrbovi za jeho odborné vedení, řadu podnětných a poučných připomínek, laskavý přístup a trpělivost. Dále bych poděkoval všem dalším kolegům z laboratoře za drobné rady. V neposlední řadě patří poděkování přátelům a hlavně mé rodině, která mě ve studiu podporovala.

Obsah

ÚVOD	1
KLIŠŤOVÁ ENCEFALITIDA	1
IMUNITNÍ SYSTÉM	5
INTERFERON A JEHO SIGNALIZACE	6
RODINA PROTEINŮ OAS	14
OASL.....	15
CÍLE PRÁCE:	17
MATERIÁL A METODY	18
PRIMERY	18
POUŽITÉ PLASMIDY	18
TRANSFORMACE BAKTERIÍ	19
PCR KONTROLA BAKTERIÁLNÍCH KOLONIÍ (COLONY PCR)	20
RESTRIKČNÍ ANALÝZA	20
IZOLACE PLASMIDŮ OASL.....	20
BUNĚČNÉ KULTURY A PRÁCE S BUŇKAMI	21
<i>Infekce</i>	21
<i>Transfekce</i>	22
IZOLACE PROTEINŮ	22
IZOLACE PROTEINŮ Z RNA BLUE	23
MĚŘENÍ KONCENTRACE PROTEINŮ	23
PROTILÁTKY	23
IMUNOBLOT	24
STRIPPING MEMBRÁN A ZNAČENÍ GAPDH	25
BARVENÍ PROTEINŮ	25
IMUNOFLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE	26
IZOLACE RNA.....	26
DNÁZOVÁ REAKCE.....	27
PŘÍPRAVA CDNA	27
QRT-PCR.....	28
NORTHERN BLOT.....	29
<i>Denaturační gel</i>	29
<i>Příprava sondy pro Northern blot</i>	30
<i>Prehybridizace a hybridizace membrán</i>	31
PLAKOVÁ TITRACE	32
VÝSLEDKY	33
AMPLIFIKACE EXPRESNÍCH VEKTORŮ A OVĚŘENÍ SEKVENCÍ OASL	33
OPTIMALIZACE TRANSFEKCE BUNĚK DAOY HTB-186	34
DETEKCE VARIANT OASL NA PROTEINOVÉ ÚROVNI.....	37
DETEKCE VARIANT OASL NA ÚROVNI MRNA.....	40
VLIV OASL NA PRŮBĚH INFEKCE.....	43
DISKUSE	48
ZÁVĚR:	52
SEZNAM LITERATURY	53

Úvod

Klíšťová encefalitida

Klíšťová encefalitida (KE) je závažné infekční onemocnění a jedna z nejzávažnějších neurologických infekcí v Evropě a na většině území kontinentální Asie. Jen u nás jsou ročně zaznamenány stovky případů, což nás řadí přední příčky v Evropě, v Rusku je to na 3000 hospitalizovaných pacientů a toto číslo neustále roste (Süss 2008). Ročně je na území obou kontinentů registrováno kolem deseti až patnácti tisíc případů infekce. Reálná čísla se mohou značně lišit z důvodu různé úrovně zdravotnické péče v jednotlivých zemích, především ohledně diagnostiky. Také není zaveden jednotný standard v popisu onemocnění (Dobler 2010). Původcem onemocnění je virus klíšťové encefalidity (VKE) patřící do rodu *Flavivirus*, čeleď *Flaviviridae*. Kromě přenosu klíšťaty, jako např. u VKE, jsou viry rodu *Flavivirus* přenášeny také komáry, nebo u nich není doposud známý vektor. Dalšími medicínsky a epidemiologicky významnými zástupci rodu *Flavivirus* jsou například virus západonilské horečky, virus horečky Dengue, viru žluté zimnice, virus Zika, virus japonské encefalidity a některé další viry způsobující encefalidity nebo hemorrahagické horečky. Vzájemná příbuznost zástupců rodu *Flavivirus* a výskytu možných zkřížených reakcí může představovat komplikaci v diagnostice infekcí způsobených těmito viry (Holzmann 2003).

První případy onemocnění spojených s klíšťaty byly zaznamenány již v 19. století ve Skandinávii, ale první medicínsky popsáný případ se objevil v roce 1931 v Rakousku. Časem byly potvrzeny případy z mnoha evropských i asijských zemí, včetně Japonska. V roce 1937 byl na ruském dálném východě poprvé izolován původce onemocnění (VKE) jak z myši, člověka, tak i z klíštěte a předpovězen základní princip cirkulace viru v potravním řetězci. Ten byl o dva roky později potvrzen. V Evropě byl poprvé virus izolován v roce 1948 v Československu (Kaiser 2008).

VKE je na území Eurasie zastoupen třemi hlavními subtypy. Dle geografického výskytu se označují jako evropský subtyp, sibiřský a dálnovýchodní subtyp (Mansfield et al. 2009). Sibiřský subtyp zasahuje kromě Sibíře i Baltské státy a Finsko. Dálnovýchodní subtyp je endemický ve východní Asii a v Japonsku (Jaenson et al. 1994). Přestože jsou si subtypy velice příbuzné, variabilita v rámci aminokyselin uvnitř subtypu je 2-3 % a mezi subtypy 5-6 %, tak onemocnění jimi vyvolaná se významně liší (Ecker et al. 1999).

Flaviviry včetně VKE jsou nukleoproteinové infekční částice tvaru dvacetistěnu o průměru kolem 50 nm a dle Baltimorovy klasifikace virů spadají do čtvrté skupiny, tedy do

virů s jednořetězcovou RNA pozitivní polarity (Baltimore 1971). Jejich RNA má délku přibližně 11 kb a kóduje jeden čtecí rámeček (ORF). ORF je na obou koncích ohraničen nekódujícími oblastmi, na 5' konci o délce cca 130 bazí a na 3' konci od několika desítek až po 600 bazí (dle konkrétního kmene viru). Tyto oblasti tvoří konzervované sekundární struktury. Přímým přepisem ORF do proteinu vzniká polyprotein o délce 3414 aminokyselin, který je v průběhu a po ukončení translace štěpen virovými a hostitelskými proteázami na jednotlivé virové proteiny. Virový genom kóduje tři strukturní proteiny a sedm nestrukturních. Strukturní jsou zastoupeny proteiny C (capsid), E (envelope) a prM (precursor-membrane). Do nestrukturních proteinů s nejrůznější funkcí se řadí NS1, NS2A a NS2B, NS3, NS4A a NS4B, NS5. C protein vytváří kolem RNA asi 30 nm velikou kapsidu, která je při pozorování elektronovým mikroskopem označována jako elektronově denzní. Kolem kapsidy je při opouštění buňky vytvořena fosfolipidická membrána pocházející z hostitelské buňky obsahující proteiny E a prM. Protein prM se vyskytuje v prekurzorové formě v nezralém virionu a ke štěpení a vzniku zralého proteinu M dochází ve fázi vypouštění virionů z buňky. E protein je hlavním povrchovým proteinem viru, umožňuje interakci viru s receptory na povrchu hostitelské buňky a vnik do buňky. Při invazi do buňky dochází díky restrukturalizaci proteinu E ve virové membráně ke splynutí membrán (Heinz and Allison 2003).

VKE je schopno přenášet minimálně 11 druhů klíšťat, ale klinicky významné jsou jen dva zástupci. Vektorem evropského subtypu VKE je *Ixodes ricinus* (klíště obecné), zatímco zbylé dva subtypy přenáší *I. persulcatus* (klíště sibiřské) (Süss 2003). *I. ricinus* se vyskytuje na většině území Evropy, na poloostrově Malá Asie, území výskytu na jihovýchodě zasahuje na část Íránu a na Kavkaz. Výskyt *I. persulcatus* pokrývá prakticky celou jižní polovinu Ruska od Evropské části po východ, zasahuje do severovýchodní Číny, Japonska. V evropské části dosahuje severněji k Petrohradu a *I. persulcatus* byl zaznamenán i ve Finsku. V oblasti pobaltských republik, Finska a části Ruska dochází k výskytu obou druhů klíšťat, a tudíž i všech tří subtypů VKE. U endemických oblastí výskytu klíšťat byl pozorován trend jejich rozšiřování a s ním související nárůst počtu případů onemocnění KE. Hlavním rezervoárem viru jsou divoce žijící obratlovci, zejména drobní hlodavci (Süss 2007, Dobler et al 2012).

Na základě geografických podmínek a počasí v průběhu roku je prevalence VKE v klíšťatech v Evropě od 0,1 do 5 %, přičemž narůstá s vývojovým stádiem klíštěte. U dospělců *I. persulcatus* je prevalence VKE na Sibiři až 40 %. Kousnutí klíštětem zůstává hlavní cestou viru do lidského těla, minoritně u přibližně 1 % případů došlo k přenosu viru alimentární cestou konzumací nepasterizovaného mléka, především kozího, a produktů z něj vyrobených. Byly popsány i přenosy mateřským mlékem. (Süss 2011, Mansfield et al. 2009,).

Při hlavní cestě přenosu viru kousnutím klíštěte má inkubační doba střední hodnotu 8 dní, při alimentárním přenosu bývá 3 až 4 dny. Diagnostiku onemocnění stěžuje fakt, že třetina nemocných nepozorovala kousnutí klíštětem (Kaiser 1999, Günther et al. 1997). Po kousnutí dochází k lokálnímu pomnožení viru, v čemž hrají významnou roli dendritické buňky, které poté transportují/rozšiřují virus do blízkých lymfatických uzlin, kde se dále množí (primární viremie). Poté virus napadá retikulo-endoteliální systém, dále se množí (sekundární viremie) a následně dochází k prostupu viru do mozku (Mickiene et al. 2002). Mechanismus překonání hematoencefalitické bariéry není doposud znám (Palus et al. 2017). Hlavním cílem viru v centrální nervové soustavě (CNS) jsou neurony (Růžek et al. 2010). Zánět CNS je provázen infiltrací imunitními buňkami, aktivací mikroglíí a neuronální degenerací. Tkáňové léze zasahují mozkové obaly a šedou kůru mozkovou, ale především hluboké mozkové struktury jako mozkový kmen, bazální ganglia, thalamus, míchu a mozeček. Histologické nálezy jsou nespecifické s celkovou akumulací lymfocytů T, B a mikroglíí, nález doplňuje nekróza infikovaných neuronů a jejich likvidace fagocytujícími buňkami (Gelpi et al. 2006).

Na základě pozorovatelných příznaků se průběh onemocnění způsobeného evropským subtypem dělí na několik fází a u většiny pacientů probíhá onemocnění dvoufázově. První fáze je nazývána viremická a trvá 2 až 7 dní. Mezi charakteristické příznaky první fáze patří horečka, únava a celková slabost, bolesti hlavy a těla (Mickiene et al. 2002). Z laboratorních hodnot nalézáme leukopenii a trombocytopenii. V séru mohou být zvýšeny transaminázy (Kaiser 1999). Laboratorní nálezy v cerebrospinální tekutině jsou v normě. Po první fázi nastává asymptomatické období trvající průměrně jeden týden. Druhá fáze se příznaky nijak neliší od ostatních virových meningoencefalitid. Projevuje se většinou jako meningitida, v menší míře jako meningoencefalitida, případně spojená s myelitidou. Tělesná teplota bývá zvýšená po delší dobu než u první fáze. Cerebrospinální tekutina vykazuje lehkou pleocytózu. Z počátku jsou zvýšeny polymorfonukleární buňky, postupně zcela převládnu mononukleáry. U dvou třetin pacientů je mírně zvýšen albumin (Grygorczuk et al. 2002). U většiny pacientů dochází také ke změnám na EEG. Z hlediska neurologického jsou významná postižení míchy. Kvůli preferenci viru pro přední kořeny míšní dochází v oblasti krční míchy k paralýzám postihující svalstvo ramen, horních končetin a zdvihačů hlavy. V minoritních případech může nastat paréza jedné, dvou nebo všech končetin, popřípadě dýchacích svalů (Kaiser 1999). Při postižení hlavových nervů jsou často zjištěny poruchy motoriky lícnic, okoohybných a laryngeálních svalů, poruchy sluchu a vestibulárního ústrojí. Tato postižení bývají jednostranná (Pikelj et al. 1995).

U 58 % pacientů postižených evropským subtypem viru dochází k výskytu postencefalitického syndromu (Haglund and Günther 2003). Mezi nejčastější příznaky lze zařadit kognitivní a neuropsychiatrické potíže typu neklidnost, podrážděnost, poruchy koncentrace, apatie, poruchy paměti a spánku. Dále jsou pozorovány poruchy zraku, sluchu, bolesti hlavy, poruchy koordinace pohybů a parézy (Haglund et al. 1996, Misić Majerus et al. 2009).

Na průběh onemocnění má významný vliv subtyp VKE. Nejmírnější forma KE je způsobena evropským subtypem a její mortalita je maximálně 2 % (Dumpis et al. 1999, Kaiser 2008). Průběh je závislý na věku. Nejmírněji probíhá u dětí, často ve formě meningitidy, s postupujícím věkem je průběh těžší a u seniorů se projevuje častěji jako meningoencefalitida. Infekce dálnovýchodním subtypem mají celkově těžší průběh s mortalitou 20 až 40 %. Průběh je pak u dospělých i dětí podobný (Mansfield et al. 1999). U sibiřského subtypu činí mortalita 2-3 %, zato je tento subtyp spojen s chronickou progresivní formou KE. Ta se může projevovat jako tzv. epilepsia partialis continua (Poponnikova 2006, Mukhin et al 2012).

Pro stanovení diagnózy KE je třeba splnit tři hlavní kritéria. Prvním jsou klinické příznaky charakterizující možnou meningitidu, potažmo meningoencefalitidu. Druhým je cytologická analýza mozkomíšního moku a zvýšení leukocytů. Třetím kritériem je průkaz přítomnosti viru v organismu. Přímá detekce viru, detekce RNA pomocí RT-PCR, není v rutinní diagnostice využívána. Virová RNA se v organismu vyskytuje ve viremické fázi, ale v druhé meningoencefalitické fázi je výjimečně přítomen v mozkomíšním moku, v cirkulaci se nevyskytuje. Stěžejní je nepřímá detekce protilátek v séru metodou ELISA, která je dostatečně specifická a citlivá. Na počátku druhé fáze, kdy je většina pacientů hospitalizována, jsou v séru přítomny IgM a IgG protilátky. V některých případech jsou detekovatelné jen IgM protilátky, kdy k serokonverzi ve třídě IgG dochází při dalším odběru. Jde o znak čerstvé infekce virem, kdy ještě nedošlo k produkci IgG. V mozkomíšním moku jsou protilátky detekovatelné o několik dní později. Protilátky třídy IgM přetrvávají v organismu po dobu několika měsíců, IgG po celý zbytek života (Holzmann 2003).

Imunitní systém

Lidský imunitní systém je jedním ze základních regulačních systémů organismu, mezi něž patří ještě nervový a humorální systém, kterým podléhá. Jeho hlavní funkcí je udržovat integritu organismu, rozpoznávat exogenní i endogenní patogeny a potencionálně nebezpečná agens, před kterými brání organismus. Základními komponentami imunitního systému jsou lymfatické orgány, buňky imunitního systému a molekulární mediátory imunitního systému – cytokiny. Lymfatické orgány představují anatomicky definovaná místa, kde dochází ke střetu buněk imunitního systému a antigenů. Je možno je dělit na primární a sekundární. Primární jsou zastoupeny kostní dření a brzlíkem, ve kterých se tvoří, potažmo dozrávají leukocyty. Mezi sekundární lymfatické orgány lze zařadit lymfatické uzliny, slezinu a slizniční lymfatické tkáně a noduly. Buňky imunitního systému jsou obecně zodpovědné za průběh imunitní odpovědi a dají se zjednodušeně rozdělit dle funkce na fagocytující buňky, cytotoxické buňky, buňky produkující protilátky a antigen prezentující buňky. Cytokiny jsou peptidy produkované imunitními buňkami obecně jako reakce na antigen v organismu a také pro regulaci imunitní odpovědi. Dle funkce je můžeme charakterizovat jako cytokiny regulující vrozenou imunitu, cytokiny získané imunitní odpovědi a cytokiny stimulující hemopoézu.

Imunitní systém je založen na dvou hlavních funkčních větvích – nespecifické, vrozené, imunitě a na imunitně specifické, získané. Nespecifická imunita je vývojově mnohem starší a vyskytuje se v různé míře u všech mnohobuněčných organismů. Specifická imunitní odpověď je získaná až na základě setkání buněk imunitního systému s antigenem a vyznačuje se imunologickou pamětí. Díky tomu je počáteční reakce imunitního systému pomalejší, ale při dalším styku s antigenem je reakce rychlejší a cílená. Do složek specifické imunity řadíme buněčnou složku a složku humorální. Buněčnou složku tvoří B lymfocyty, T lymfocyty a plasmatické buňky. Buňky specifické imunity vznikají v červené kostní dření z progenitorových buněk lymfoidní řady. B lymfocyty dozrávají a získávají svou specifitu v kostní dření. Po aktivaci se část B lymfocytů mění na plasmatické buňky, které produkují specifické protilátky a část na paměťové B lymfocyty. T lymfocyty dozrávají v brzlíku, kde získávají specifitu proti cizím antigenům, zatímco lymfocyty rozpoznávající vlastní antigeny jsou ničeny.

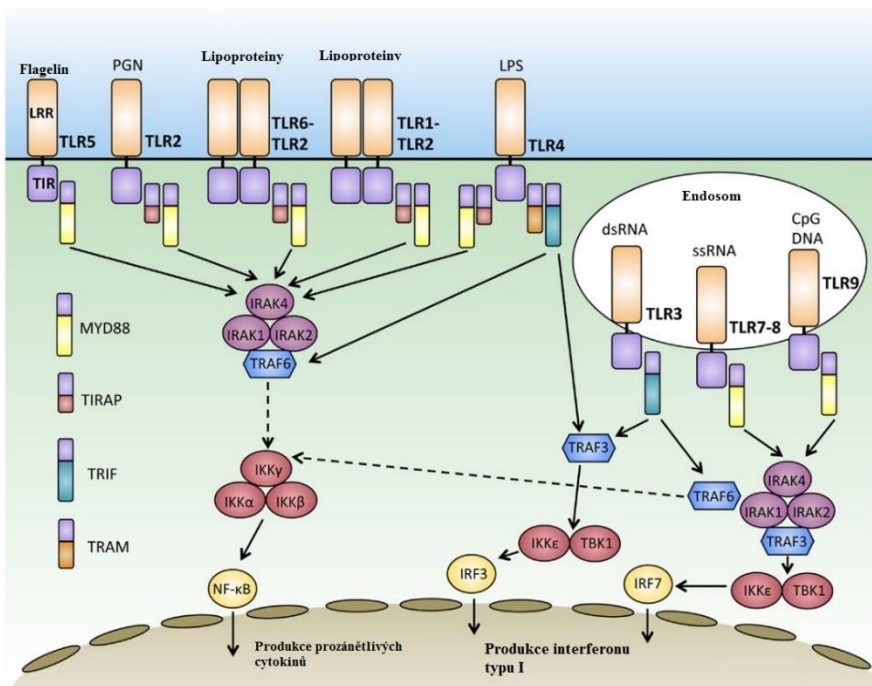
Nespecifická imunita není na rozdíl od specifické závislá na antigenu, díky čemuž je sice necílená, ale zato rychlejší a je tak prvotním obranným štítem před infekcí. Nemá také

imunologickou paměť. Obsahuje složku buněčnou, humorální, ale řadí se sem i bariérové funkce organismu. Bariérové funkce jsou anatomické a fyziologické. Za anatomickou bariéru lze považovat povrch kůže, sliznice a veškeré anatomické překážky bránící šíření infekce. Fyziologické bariéry jsou teplota, pH prostředí, tenze kyslíku, sliny, slzy a různé slizniční sekrety obsahující např. lysozym a jiné obranné proteiny. Funkčně lze do bariérových funkcí zařadit zánět. Jde o fyziologickou reakci organismu na poškození tkáně způsobené infekcí, fyzikálními, chemickými vlivy nebo endogenně ischemií tkáně. Dochází k zvýšení perfuze poškozené tkáně, místnímu otoku a zvýšení teploty, zvýšení permeability cév a kapilár, migraci fagocytujících buněk a zvýšení hladiny proteinů akutní fáze. Cílem zánětu je ohraničit ložisko poškození, eliminovat šíření patogenu, stimulovat imunitní odpověď, navodit zpět homeostázu a opravit poškození. Může být ale i poškozující (chronické zánětlivé procesy). Do buněčné složky nespecifické imunity patří fagocyty, mastocyty (žírné buňky a heparinocyty), bazofily, NK buňky a trombocyty. Do humorální složky patří komplement a proteiny akutní fáze, koagulační a fibrinolytický systém a interferony (Krejsek a Kopecký 2004).

Interferon a jeho signalizace

Interferony jsou skupina cytokinů, které se účastní odpovědi jak specifické, tak nespecifické imunity. Původně byly objeveny jako působky proteinové povahy tvořené virem infikovanými buňkami s parakrinním účinkem na sousední neinfikované buňky. V současnosti je známo mnohem více oblastí účinku jako například nádorová imunita, buněčná diferenciaci nebo autoimunitní choroby. Interferony jsou rozděleny do třech tříd. První třída interferonů je obsáhlá a zahrnuje mnoho různých zástupců. Druhá třída je zastoupena jediným zástupcem, interferonem γ . Třetí třída je zastoupena subtypy interferonu λ , konkrétně IFN λ 1, IFN λ 2 a IFN λ 3. Interferony třídy I a třídy III jsou exprimovány ve většině savčích buněk v reakci na různé patologické podněty jako např. virovou či buněčnou DNA a RNA, části bakterií, virové proteiny a nesčetné cizorodé antigeny. Interferon γ jako jediný zástupce II. třídy je produkován pouze leukocyty, zejména pak po aktivaci působky produkovánými antigenem stimulovaných lymfocytů. Třída I obsahuje řadu subtypů interferonu α , interferony β , ϵ , κ a ω (de Weerd a Nguyen 2012). Hlavními a nejčastěji zkoumanými jsou ale především interferon α a β . Za normálního fyziologického stavu buňky je exprese interferonů skupiny I nedetekovatelná nebo na velice nízké úrovni.

Funkce vrozené imunity je zásadně závislá na evolučně konzervovaných receptorech, které rozpoznávají mikrobiální patogeny, jako jsou bakterie, houby či plísňe, ale také viry nebo parazité. Tyto receptory odlišují vlastní a cizí molekuly na základě specifických vzorů asociovaných s patogeny (Paludan and Bowie 2013, Goubau et al. 2013). Cílem této signalizace je indukovat produkci antimikrobiálních molekul, cytokinů a chemokinů zánětu, potažmo interferonů. Na rozdíl od aktivace lymfocytů specifické imunity, tato reakce trvá jen několik hodin a hraje tak významnou roli prvotní bariéry. Prvně popsány a zároveň nejvíce zkoumanými receptory je skupina Toll-like receptorů (TLR) (Obrázek 1). TLR dostaly název podle svého analogu Toll objeveného u *D. melanogaster* (Lemaitre et al. 1996). Obecně u savců jsou rozděleny do šesti hlavních tříd na základě podobnosti sekvence. Třída TLR1 zahrnuje TLR1, TLR2, TLR6, TLR10 a TLR14. Další třídy jsou TLR3, TLR4, TLR5 zahrnující jenom tyto jednotlivé receptory, TLR7 (do které spadají TLR7, TLR8, TLR9) a třída TLR11 (TLR11, TLR12, TLR13) (Roach et al. 2005). U člověka se vyskytují zástupci TLR1 až TLR10. Strukturně se jedná o transmembránový protein s N-koncem nalézajícím se na vnější straně membrány, transmembránovou doménou a C-koncem na cytoplasmatické straně membrány. Na N-konci se nachází na leucin bohatá doména detekující patogeny, naopak na C-konci Toll/interleukin-1 receptorová doména (TIR) zodpovědná za přenos signálu (Bowie and O'Neill 2000, Akira and Tadeka 2004). Zástupci třídy TLR1 jsou přítomni na povrchu cytoplasmatické membrány a fungují jako heterodimer TLR2 s dalším zástupcem třídy. Rozpoznávají membránové lipoproteiny a peptidoglykany. TLR4 a TLR5, které jsou také ukotveny v cytoplasmatické membráně, detekují bakteriální komponenty – lipopolysacharid a flagelin. Část TLR je intracelulární, konkrétně zástupci tříd TLR3 a TLR7 (také TLR11, u člověka ale jen jako pseudogen) (Kawai a Akira 2011).



Obrázek 1: Schéma účinku TLR včetně hlavních ligandů (převzato z Wang et al., 2014).

Tyto intracelulární receptory jsou nejprve syntetizovány v endoplasmatickém retikulu jako prekurzory, odkud jsou transportovány do endosomů, lysosomů a aktivovány proteázou (Hayashi and Iwasaki 2013, Roach et al. 2005). Tyto endocelulární receptory jsou specializované na detekci nukleových kyselin (NK). TLR3 detekuje dvouřetězcovou RNA, TLR7 a TLR8 jednořetězcovou RNA a TLR9 nemetylované CpG (cytidin-fosfát-guanosin) oblasti DNA (Alexopoulou et al. 2001, Kawai a Akira 2011). Díky detekci nukleových kyselin těmito zástupci TLR je buňka schopna detekovat virovou infekci. Kromě těchto endocelulárních TLR virovou infekci mohou detekovat i povrchové TLR2 a TLR4. Rozeznávají strukturální i nestrukturální proteiny virů (Ge et al. 2013, Kurt-Jones et al. 2000). Po navázání se spustí kaskáda vedoucí k aktivaci transkripce genů pro protivirové cytokiny. Regulační mechanismy těchto kaskád jednotlivých TLR se částečně překrývají a mají společné mediátory. Hlavními transkripčními faktory jsou IRF (interferon regulatory factor), především IRF3 a IRF7, a NF-κB (nuclear factor-kappa B). IRF3 a NF-κB jsou konstitutivně exprimovány a jsou připraveny na signál, zatímco exprese IRF7 je velice nízká a zvýšení její míry je stimulováno infekcí nebo jinými podněty (Mogensen and Paludan 2001). Co se týče NF-κB, ten je v cytoplasmě přítomen v neaktivním stavu inhibovaný skupinou inhibitorů IκB. Na základě stimulace např. viry či TNF-α dochází k aktivaci IκB kinázy (IKK), následně fosforylaci IκB a jeho polyubikvitinaci a degradaci v proteazomu. Tímto se NF-κB uvolňuje do jádra, kde se váže na promotory a iniciuje transkripci INF-β, ale především ostatních

prozánětlivých cytokinů, což je jeho hlavní úloha (Li and Stark 2002, Kawai and Akira 2007). IRF7 nasedá na promotor a indukuje expresi především INF- α a INF- λ 2 a λ 3, zatímco IRF3 indukuje expresi převážně INF- β a INF- λ 1 (Osterlund et al. 2007). Specifická odpověď jednotlivých TLR a ovlivnění promotorů je zaručena jednak na subcelulární úrovni místně, kde se daný TLR nachází a jednak v součinnosti s TIR doménovým adaptorovým proteinem. Aktivace TLR na endosomech může vyvolat odpověď v expresi jak prozánětlivých cytokinů, tak interferonů, zatímco aktivace povrchových TLR aktivuje expresi pouze prozánětlivých cytokinů, nikoli však interferonů (Oganesyan et al 2006).

Další cestou, která se podílí na detekci virové infekce je skupina RIG-I-like receptorů (RLR). Cílem těchto receptorů je detekce virové RNA a aktivace exprese interferonů (Yoneyama et al. 2004). Do skupiny RLR se řadí RIG-I receptory, proteiny MDA5 a LGP2. Z hlediska struktury mají všechny RLR společnou DExD/H-box RNA helikázovou doménu a C-terminální doménu (CTD). V přítomnosti ostatních domén se ale liší. RIG-I a MDA5 mají na svém N-konci dvě jednotky CARD domén (caspase recruitment domain), kterou LGP2 postrádá. Adaptorovým proteinem pro RIG-I a MDA5 je na mitochondriální membráně ukotvený MAVS/IPS-1. Za interakci s tímto adaptorovým proteinem je zodpovědná CARD doména.

RIG-I se běžně vyskytuje v neaktivní formě a procesu aktivace se účastní protein TRIM3, který připojuje na RIG-I krátký ubikvitinový řetězec (Gack et al. 2007). RIG-I receptor je aktivován při infekci různými RNA viry (Sendai virus, virus hepatitidy C atd.) (Yoneyama a Fujita 2010, Takeuchi a Akira 2010). Strukturou pro aktivaci je virová RNA s trifosfátovou skupinou na 5' konci a krátkou vlásenkou. Také bylo prokázáno, že i virová RNA s trifosfátovou skupinou a navázanými proteiny kapsidy je schopna aktivovat RIG-I receptor (Weber et al. 2013). CTD doména na RIG-I interaguje s α a β fosfátem na 5' konci RNA, za přítomnosti ATP dojde ke konformační změně a zabalení komplexu RIG-I s RNA následované vyrušením přirozené autoreprese domén CARD a jejich navázání na MAVS/IPS-1 (Kowalinski et al. 2011).

Druhý zástupce RLR rodiny MDA5 rozpoznává dlouhé dvouřetězcové RNA. (Runge et al. 2014). Mechanismus interakce MDA5 není dopodrobna znám, ale na rozdíl od RIG-I CTD nepodléhá autorepresi (Saito et al. 2007). CTD u MDA5 spoluvytváří komplex obklopující RNA podobný tomuto komplexu u RIG-I, ale neobsahuje smyčku zodpovědnou za rozpoznání trifosfátového 5' konce. Tyto drobné odlišnosti i přes jinak velmi podobnou

strukturu a podobný systém navázání na MAVS/IPS-1 vysvětlují odlišnost v rozpoznávaném substrátu (Wu et al. 2013).

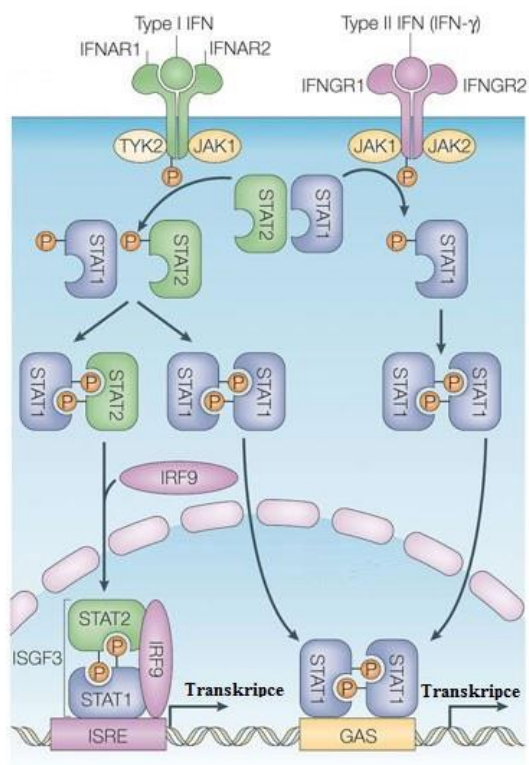
Posledním zástupcem RLR je receptor LGP2. LGP2 se od ostatních liší tím, že postrádá na svém N-konci CARD doménu, ale v porovnání s ostatními má vyšší afinitu ke dvouřetězcové RNA (Yoneyama et al. 2005). Původně byl označován jako negativní regulátor RIG-I a MDA5 systému, ale později se prokázalo, že má vliv na zvýšení produkce interferonu u některých virů (Venkataraman et al. 2007, Satoh et al. 2010). Později byl prokázán vliv na signalizaci pomocí MDA5 systému. Zatím se o LGP2 mnoho informací neví, bude proto jistě cílem dalšího zkoumání (Bruns et al. 2014).

Mitochondriální adaptorový protein MAVS/IPS-1 obsahuje jednu jednotku CARD domény, centrální doménu bohatou na prolin a transmembránovou doménu. CARD doména zde umožňuje navázání CARD proteinů RIG-I nebo MDA5. Také zapříčiňuje polymerizaci MAVS/IPS-1 na mitochondriích. Za mitochondriální lokalizaci je zodpovědná specifická transmembránová doména. Centrální oblast obsahuje vazebné místo proteinu TRAF (Tumor necrosis factor receptor-associated factor) a tři vazebná místa pro proteiny TBM (TRAF binding motif) (Takamatsu et al. 2013). Kromě mitochondrií byl MAVS/IPS-1 nalezen i na peroxisomech a membránových strukturách asociovaných s mitochondriemi (Dixit et al. 2010, Horner et al. 2011).

RNA aktivované RIG-I nebo MDA5 se navazují na mitochondriální MAVS/IPS-1, zde se jednotlivé proteiny na sebe napojují, vytváří oligomerní agregáty, CARD domény těchto agregátů se spojují a následně aktivují signální proteiny jako např. skupina I κ B kináz (Patel et al. 2013, Peisley et al. 2013). IKK aktivují opět NF- κ B, IRF-3 a IRF-7 a následně dochází k transkripci prozánětlivých cytokinů a interferonů. Agregáty s RNA se vytvářejí na základě mechanismu, na jehož začátku se aktivovaný receptor pohybuje po molekule RNA, u RIG-I po dvouvláknové části. U RIG-I se vytváří tetramerický komplex připomínající navlečené korálky na šňůrce (Wu et al. 2014, Xu et al. 2014). Tetramerické CARD domény odstupující z RIG-I komplexu se navazují na MAVS/IPS-1. Agregáty samotného MAVS/IPS-1 jsou potřebné pro další signalizaci, přičemž na komplexu jsou navázány molekuly proteinů TRAF. Jelikož MDA5 nevykazuje preferenci v afinitě pro 5'konec RNA, dochází k iniciaci tvorby agregátu náhodně. MDA5 v *in vitro* modelech vytváří vláknitou strukturu o více jednotkách, přičemž vytváření dlouhých vláken je nezbytné pro funkční detekci dlouhých molekul RNA (Peisley et al. 2011).

S detekcí virové infekce pomocí RLR je spojena i stresová odpověď ve formě granulárních stresových agregátů. Signalizaci vedoucí k tvorbě těchto stresových agregátů zprostředkovává RNA dependentní protein kináza (PKR). Tyto agregáty obsahují jednak RLR receptory, jednak některé molekuly s antivirovými účinky, mezi něž patří např. OAS (oligoadenylate synthase) či PKR a také obsahují virový ribonukleoproteinový komplex. Zabránění tvorby těchto agregátů některými viry narušuje iniciaci exprese genů pro interferony (Onomoto et al. 2012). Tyto granulární agregáty hrají klíčovou roli v detekci virové infekce pomocí RLR, ale jejich tvorba není hlavním spouštěcím faktorem imunitní odpovědi. Jejich úloha bude doplňující, usnadňující odpověď na detekci viru pomocí RLR (Langerels et al. 2013).

Interferony třídy I jsou klíčové pro expresi mnoha genů označovaných jako INF-stimulované geny (ISG). ISG kódují proteiny ovlivňující patogenními procesy a infekci několika mechanismy. Jedná se především o inhibici transkripce a translace, změnu v metabolismu lipidů nebo degradaci nukleových kyselin. Tyto procesy výrazně ovlivňují i vlastní procesy buňky a navozují obranný stav. Hlavní cestou aktivace těchto genů je signální dráha JAK-STAT (Janus kinase – signal transducer activator of transcription) (Stark and Darnell 2012). Co se týče genů pro hlavní zástupce třídy I, IFN- α je kódován 14 geny, zatímco IFN- β kóduje jediný gen. Většina buněk produkuje hlavně IFN- β , kromě hematopoetických a plasmocytoidních dendritických, které produkují převážně IFN- α (Iwasaki 2012, Goubau et al. 2013). Hlavním receptorem pro IFN- α i β je transmembránový receptor s označením IFN- α receptor (IFNAR) (Obrázek 2). IFNAR je heterodimerický receptor složený z podjednotek IFNAR1 a IFNAR2. K IFNAR je připojena Janus kináza 1 (JAK1) a tyrosin kináza 2 (TYK2). Tyto kinázy fosforylací aktivují latentní cytoplasmatické transkripční faktory nazvané STAT (signal transducer activator of transcription), konkrétně STAT1 a STAT2. Dochází k vytvoření STAT dimeru, kde se tento dimer váže na IFN-regulační faktor 9 (IRF9), společně vytvoří komplex nazývaný ISGF3 (IFN-stimulated gene factor), který poté putuje do jádra. ISGF3 se váže na úseky DNA kódující ISG a přímo aktivuje transkripci. Tyto úseky jsou nazývány ISRE (IFN-stimulated response elements) (Schoggins et al. 2011, Stark and Darnell 2012).



Obrázek 2: Základní schéma interferonové signalizace (převzato z Decker et al., 2005).

Odpověď na IFN signalizaci musí být velice přísně regulována. Regulační signály pocházejí jak z vnějšího prostředí, tak z vnitřního stavu organismu a jejich vliv se mění i v průběhu imunitní odpovědi. Hlavní komponenty signální dráhy JAK-STAT jsou v buňce běžně exprimovány a jsou připraveny zahájit odpověď na signál. Obzvláště imunitní buňky jsou schopny intenzivně zareagovat i na relativně nízké hladiny IFN. Také bylo zjištěno, že běžná mikrobiální flóra ovlivňuje bazální expresi IFN- β a tím přispívá k správné hladině odpovědi na IFN typu I (Abt et al. 2012, Kawashima et al. 2013). STAT1 a IRF9 patří mezi ISG a tudíž je jejich exprese pozitivně ovlivňována hladinou IFN (Gough et al. 2012). Bazální expresi zajišťuje zejména IFN- β . Dalšími induktory jsou IFN- γ a další cytokiny, včetně IL-6. Jsou ale také cílem ostatních mechanismů ovlivnění intenzity odpovědi. Zesílení odpovědi signální dráhy je kromě zvýšené exprese STAT1 a IRF9 způsobeno také fosforylační aktivitou tyrozinových kináz SYK (spleen tyrosin kinase) a PYK2 (protein tyrosin kinase2) a také fosforylací serinů. Zvýšení hladiny STAT1 zintenzivňuje vazbu na IFNAR, zatímco vyšší hladina IRF9 pozitivně ovlivňuje vazbu ISGF3 na cílové geny. Už pikomolární koncentrace IFN zvyšuje hladiny STAT1, což umožňuje zejména makrofágům rychlou reakci v brzké fázi

imunitní odpovědi, kdy jsou hladiny ještě nízké. Během aktivace makrofágů je TNF (tumor necrosis factor) také induktorem pro zvýšení hladiny IFN- β , potažmo pak STAT1 a následně zesílení exprese ISG (Hu et al. 2002, Yarilina et al. 2008). Exprese ISG zůstává zvýšená delší dobu po aktivaci IFNAR i v době, kdy už není přítomen podněcující signál (Cheon et al. 2013). Serinové kinázy PKC (protein kinase C) a zástupci MAPK (mitogen-activated protein kinase) mohou fosforylací C-konce proteinu STAT1 také zvýšit jeho aktivitu.

Tak jako je aktivita JAK-STAT signalizace různými mechanismy zvyšována, tak je i tlumena. Snížení exprese IFNAR, potažmo jeho internalizace je indukována několika signálními drahami. Tyto dráhy mohou být aktivovány např. prozánětlivými cytokiny, Toll-like receptory nebo oxidativním a metabolickým stresem. P38 kináza fosforyluje IFNAR, tím usnadní Kasein kináze 2 fosforylací IFNAR na cytoplasmatické straně, jeho následnou internalizaci, ubiquitinaci a degradaci (Fuchs 2013). Dalším regulačním mechanismem je zpětnovazebná smyčka tvorby supresorových proteinů signální dráhy. IFN typu I spouští syntézu supresorových proteinů SOCS1, SOCS3 (suppressor of cytokine signalling) a USP18 (ubiquitin carboxy-terminal hydrolase 18). SOCS proteiny fungují jako kompetitory se STAT proteinem a snižují aktivitu JAK, zatímco USP18 nahrazují JAK při její vazbě na IFNAR. Exprese supresorových proteinů je ovlivněna i jinými cytokiny a jejich drahami (Yoshimura et al 2007). V souvislosti s aktivací T pomocných lymfocytů je funkce JAK-STAT dráhy inhibována miRNA, kdy cílem je snížit negativní dopad IFN na proliferaci T lymfocytů (Gracias et al. 2013). K vysvětlení modulace signální dráhy přispívá i rozdíl v expresi proteinů STAT, které aktivují různé geny a mají odlišné funkce v organismu. Rozdílné funkce signalizace ovlivňují hladiny a poměry mezi hladinami jednotlivých STAT proteinů. Kromě popsané dráhy aktivace proteinů STAT1 a STAT2, IFNAR aktivuje ve většině buněk i vznik homodimerů STAT1 a heterodimerů STAT1/STAT3 z aktivovaných proteinů. V některých buňkách může aktivovat i STAT4, STAT5 a STAT6 (van Boxel-Dezaire et al. 2006). Paralelní větví, která naopak utlumuje signální kaskádu a přispívá k vyvážené regulaci dráhy, je signalizace přes STAT3. Rovnováha mezi STAT1 homodimerem a tvorbou ISGF3 komplexu je regulována aktivitou IKK ϵ , která tlumí tvorbu STAT1 homodimeru ve prospěch ISGF3 komplexu (Tenover et al. 2007). Přestože se u popisu regulace signální dráhy nabízí popis pouze na úrovni receptoru a signálních proteinů, tak k regulacím dochází i na další úrovni, a to na úrovni IFN-indukované transkripce cílových genů. Protein STAT není fosforylován pouze v cytoplasmě v místě jeho účinku, ale dochází k modifikacím i na úrovni jádra v lokusu cílového genu, například STAT1 je modifikován CDK8 po jeho navázání na DNA (Bancerek et al. 2013). STAT proteiny často spolupracují s jinými transkripčními faktory, převážně IRF

proteiny. Sekvence rozpoznávané IRF se mohou překrývat s ISRE. Proteiny STAT, ISGF3 a IRF mohou spolupracovat a vázat se v místech promotorů nejrůznějších ISG (Tamura et al. 2008). Například STAT1 a IRF nasedají na různé promotory po stimulaci IFN- γ nebo lipopolysacharidem. STAT se můžou spojovat s IRF a vytvářet komplexy odlišující se od ISGF3 a mají vzhledem k interakcím širší pole působnosti, než jen exprese ISG (Qiao et al 2013).

Rodina proteinů OAS

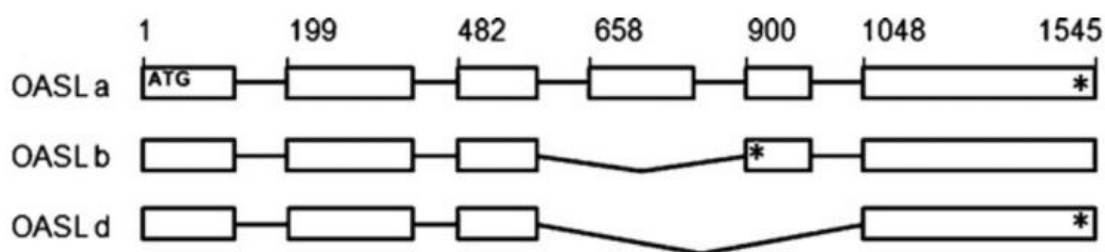
K ISG patří stovky genů, které jsou přepisovány po stimulaci IFN a mnohdy hrají důležitou roli v průběhu protivirové imunitní odpovědi. Mezi důležité ISG proteiny patří rodina OAS (2'-5' oligoadenylát syntháza), obsahující proteiny OAS1, OAS2, OAS3 a později objevený OASL (OAS-like, viz Kap. OASL). Tyto proteiny regulují prvotní fázi odpovědi buňky na virovou infekci. Jak už název napovídá, proteiny OAS syntetizují krátké adenosinové oligonukleotidy a byly popsány jako proteiny detekující virovou RNA podílející se na prvotní signalizaci virové infekce a degradaci virové RNA za spoluúčasti RNázy L (Kristiansen et al. 2010). Díky aktivitě RNázy L dochází k funkčnímu propojení OAS systému s detekcí virové RNA pomocí receptorů RIG-I a MDA5. Přestože funkcí OAS je protivirová obrana v součinnosti s RNázou L, tyto proteiny mají i další funkce nesouvisející přímo s dráhou RNázy L.

Homologní proteiny OAS1, OAS2 a OAS3 se liší v počtu podjednotek, který odpovídá číselnému označení proteinu. Geny pro lidské OAS proteiny leží na dlouhém raménku dvanáctého chromozomu. OAS1 a OAS2 mají každý dvě splicingové isoformy, zatímco OAS3 jen jednu 100 kDa velkou (Hovnanian et al. 1998). OAS1 má kromě 40 a 46 kDa splicingových ještě další tři formy, za které jsou ale zodpovědné polymorfismy SNP (Single nucleotide polymorphism) (Bonnie-Nielsen et al. 2005). SNP v genech pro OAS mohou být zodpovědné i za některá onemocnění (Yakub et al. 2005, Su et al. 2008). Exon-intronová struktura genů *oas* je konzervovaná u lidí a myší, liší se počet isoform (Eskildsen et al. 2003). Pro signalizaci OAS-RNáza L je klíčová schopnost OAS syntetizovat krátký oligoadenylát o třech nebo čtyřech jednotkách (Ghosh et al. 1997). Původně se zdálo, že OAS3 není schopno této syntézy, ale později byla prokázána schopnost antivirové aktivity OAS3 proti infekci virem horečky Dengue (Lin et al. 2009) anebo virem hepatitidy C v součinnosti s OAS1 (Kwon et al. 2013). OAS3 vytváří dimer adenylátu, který se na RNázu L váže s nízkou

afinitou, ale na druhou stranu zase vykazuje vyšší vazebnou schopnost pro detekci dvouřetězcové RNA, než jakou mají OAS1 a OAS2. OAS1 a OAS2 vytváří tri až tetramerické oligoadenyláty. Během infekce se v rané fázi indukuje tvorba nejprve OAS1, hladina ostatních dvou stoupá o něco později. SNP v *oas* genech mohou zapříčinit nižší protivirovou aktivitu a tomu odpovídající rychlejší množení viru v organismu (Rebouillat a Hovnanian 1999).

OASL

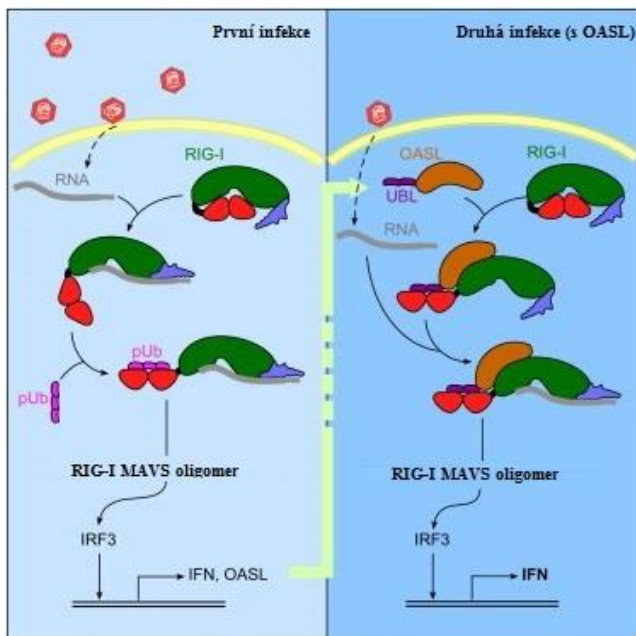
OASL patří do stejné skupiny jako OAS, ale od OAS se v několika aspektech odlišuje. Především gen pro OASL kóduje tři isoformy – OASLa, OASLb a OASLd (Obrázek 3).



Obrázek 3: Organizace genomu variant OASL (převzato z Guo et al. 2012).

Funkčně se OASL odlišuje v mutaci N-terminální domény, která u OAS zajišťuje nukleotidyl-transferázovou aktivitu. Antivirový účinek OASL tedy nespočívá v syntéze oligoadenylátu. Na C-konci se nachází ubiquitin-like (UBL) doména charakteristická pouze pro OASL (Kristiansen et al. 2011). Z pohledu genetického, gen *oasl* je umístěn také na dlouhém raménku dvanáctého chromozomu, ovšem v oblasti dále od centromery. Isoformy OASL jsou transkribovány z jednoho genu, ale liší se alternativním sestřihem a přítomností stop kodonů. RNA pro OASLa je vytvořena z šesti exonů, u OASLb chybí čtvrtý exon, čímž došlo k posunu čtecího rámce a vytvoření stop kodonu na počátku pátého exonu. U OASLb tudíž nedochází k vytvoření proteinu s ubiquitinovou C-terminální doménou. RNA pro OASLd po sestřihu postrádá exon čtvrtý a pátý. Všechny tři varianty OASL mají společnou 219 aminokyselin dlouhou N-terminální doménu. C-terminální doména je dlouhá 165 aminokyselin. Celková molekulární hmotnost variant je pro OASLa 59 kDa, OASLb 30 kDa a pro OASLd 45 kDa (Guo et al. 2012). Expresí proteinu OASL v buňkách po stimulaci IFN typu I zajišťuje protivirový účinek na základě zintenzivnění a zrychlení detekce virové RNA pomocí signalizace RIG-I receptorů. Při vniknutí cizorodé RNA do senzitivované buňky dojde

k aktivaci RIG-I receptoru. OASL se váže k RIG-I svojí UBL doménou (Obrázek 4), čímž napodobuje navázání polyubikvitinového řetězce za pomoci ligázy TRIM25 a tím zrychluje celou odpověď. Poté se komplex RIG-I a OASL proteinů naváže na cizorodou RNA a signalizace probíhá klasickým, již popsáním způsobem na MAVS/IPS-1 (Zhu et al. 2014).



Obrázek 4: Mechanismus účinku OASL. (převzato z Zhu et al. 2014)

Cíle práce:

- 1) Namnožení, izolace a ověření sekvence komerčně dodaných expresních plasmidů kódující varianty proteinu OASL.
- 2) Optimalizace transfekčních podmínek a stanovení kinetiky exprese variant proteinu OASL v lidské meduloblastomové buněčné linii.
- 3) Stanovení vlivu exprese variant proteinu OASL na průběh infekce meduloblastomových buněk virem klíšťové encefalitidy.

Materiál a metody

Primery

Pro práci s nukleovými kyselinami byly využívány primery uvedené v Tabulce 1 (Generi Biotech).

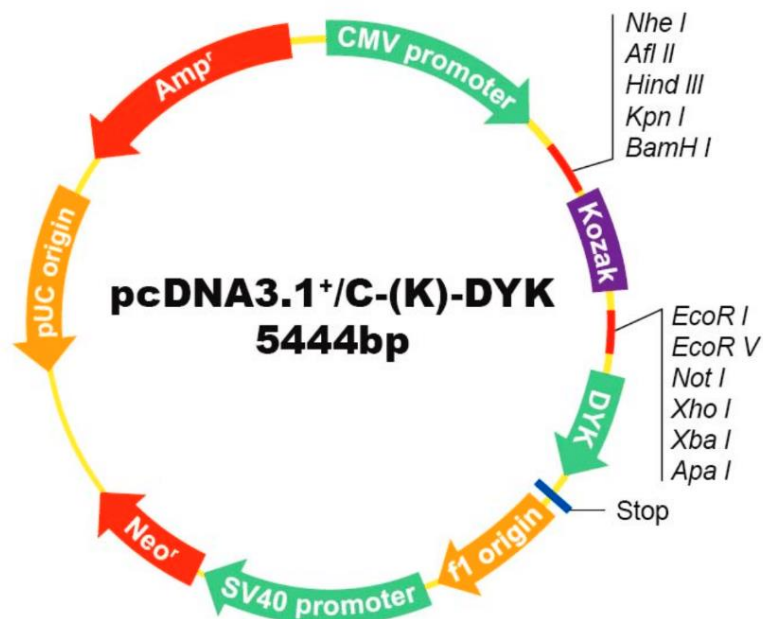
Tabulka 1: Názvy a sekvence použitých primerů.

Primer	Sekvence primeru (5'-3')
OASL probe F	CGTGGAGGAGTTTCTGAGGCAGG
OASL probe R	GGTGGCTGGGAGTTGGGAAGA
OASL qPCR F	CTGATGCAGGAACTGTATAGCAC
OASL qPCR R	CACAGCGTCTAGCACCTCTT
E01 F	GCAGCCAGATGCCCAACAATGG
E01 R	TCTTTTTTGCCTCACAAGCCGCCT
HPRT F	TGACACTGGCAAACAATGCA
HPRT R	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT
T7 F	TAATACGACTCACTATAGG
BGH-123 R	GACAATGCGATGCAATTTTCCTC

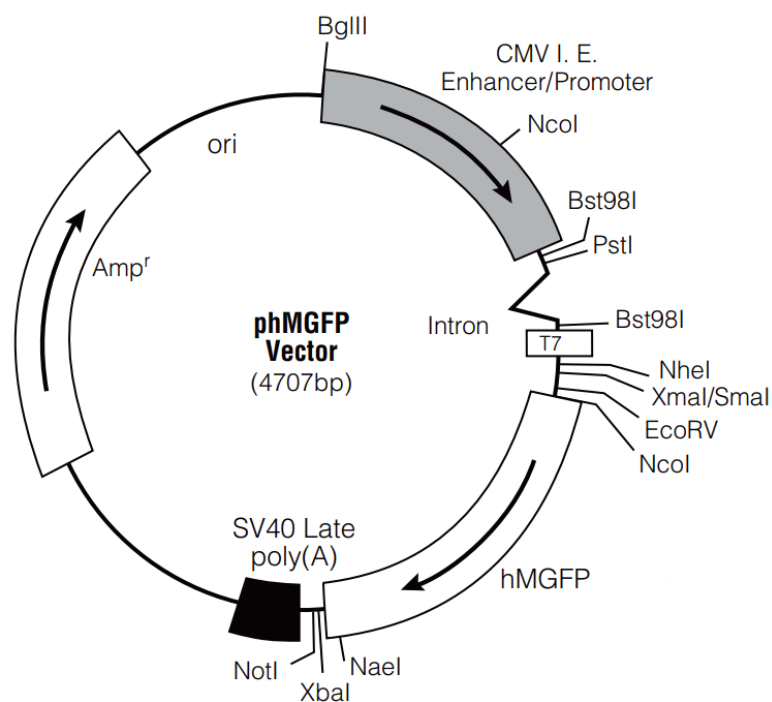
Pomocí dvojice primerů OASL probe F a OASL probe R byl amplifikován úsek DNA dlouhý 393 bazí lokalizovaný na exonu 1 a 2; pomocí primerů OASL qPCR F a OASL qPCR R byl pomocí real-time PCR amplifikován fragment DNA dlouhý 166 bp lokalizován na exonu 1. Primery E01 F a E01 R sloužily k detekci úseku virové RNA kódujícího obalový protein E, primery pro gen HPRT (hypoxanthin-guanin fosforibosyltransferáza) byly použity v rámci real-time PCR analýz pro detekci tohoto housekeeping genu (Vandesompele et al. 2002).

Použité plasmidy

Expresní OASL plasmidy byly objednány od firmy GenScript. Jedná se o expresní vektory pcDNA3.1⁺/C-(K)-DYK (Obrázek 5) s včleněnými ORF pro jednotlivé varianty OASL. pcDNA3.1⁺/C-(K)-DYK obsahuje FLAG-tag (často rovněž nazýván DYK-tag), který byl následně využíván pro imunodetekci overexprimovaných proteinů. Jako negativní kontrola byl při transfekci používán prázdný vektor bez kódující sekvence s promotorem CMV (Teng et al. 2013). Pro optimalizace transfekce byl používán plasmid pHMGFP (Promega) kódující GFP (green fluorescent protein) (Obrázek 6).



Obrázek 5: Mapa expresního vektoru pcDNA3.1+/C-(K)-DYK (GenScript).



Obrázek 6: Mapa vektoru pHMGFP (Promega) kódujícího protein GFP.

Transformace bakterií

Pro amplifikaci plasmidů všech variant OASL bylo využito kompetentních buněk *E. coli* (NovaBlue Singles™ Competent Cells; Novagen). K 50 μl bakterií bylo přidáno 100 ng plasmidu a směs byla inkubována na ledu 30 minut. Poté byly zkumavky s buněčnou suspenzí

zahřáty na 42 °C na dobu 30 sekund a následně chlazeny na ledu 5 minut. Poté bylo přidáno 600 µl SOC média a buňky byly inkubovány 90 minut při 37 °C za stálého třepání. Nakonec byla buněčná suspenze nanášena na LB agarové plotny v objemech 50 a 150 µl. Důvodem dvou různých objemů bylo zajistit optimální počet narostlých kolonií na plotně. Plotny byly inkubovány 20 hodin při 37°C. Poté byly vybrané kolonie překřížkovány na nové LB plotny a inkubovány ve stejných podmínkách. Jako selektivní antibiotikum byl do LB agarových ploten přidán ampicilin; výsledná koncentrace činila 100 µg.ml⁻¹.

PCR kontrola bakteriálních kolonií (colony PCR)

Pro PCR na kontrolu přítomnosti plasmidů v bakteriálních koloniích byl používán FastStart PCR Master Mix (Roche). Na jednu reakci bylo použito 12,5 µl Master mixu, primery ve finální koncentraci 0,3 mM, celkový objem reakce byl na 25 µl doplněn milliQ H₂O. Do jednotlivých reakcí byla odebrána malá část kolonií a buňky byly v reakční směsi rozsuspendovány. K detekci byly použity primery OASL probe F a OASL probe R. Podmínky PCR reakce jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 2: Podmínky PCR pro kontrolu kolonií.

95 °C	4 minuty	35 cyklů
95 °C	30 s	
56 °C	30 s	
72 °C	30 s	
72 °C	7 minut	

Restrikční analýza

Plasmidy byly štěpeny ve dvou různých reakčních směsích. Pro každou restrikční reakci bylo použito 1 µg plasmidové DNA a reakční objem byl 20 µl. První reakční směs obsahovala kombinaci enzymů *Xho*I (2µl) a *Nde*I (1µl) v pufru O (vše Fermentas/Thermo Fisher Scientific), druhá reakční směs obsahovala 1 µl *Kpn*I v CutSmart pufru (New England Biolabs). Reakce probíhaly při 37 °C po dobu 2 hodin bez následné tepelné inaktivace enzymu.

Izolace plasmidů OASL

Pro izolaci plasmidů byly používány kity High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) a High Speed Plasmid Maxi Kit (Qiagen). Bakterie pro izolaci prvním kitem byly kultivovány ve 3 ml tekutého LB média (ampicilin 100 µg.ml⁻¹), zatímco pro druhý kit byla připravena

startovací kultura 5ml buněk, ta byla posléze naředěna do 200 ml LB média (ampicilin 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Množství bakterií v suspenzi pro izolaci pomocí High Speed Plasmid Maxi kitu bylo kontrolováno spektrofotometricky měřením absorbance (též optická denzita OD_{600} , viz Tabulka 3). Izolace probíhaly přesně dle protokolu daného kitu. Izolace probíhala u obou kitů na principu lýzy buněk, vazby DNA na křemičitou fritu. DNA byla promývána promývacími roztoky, a eluována do PCR-grade H_2O .

Tabulka 3: Konečná absorbance kultury před izolací plasmidů.

Varianta	Konečné OD_{600}
OASLa	0,4
OASLb	0,6
OASLd	0,8

Buněčné kultury a práce s buňkami

Veškerou manipulaci s buňkami bylo nutné provádět ve sterilním prostředí laminárního boxu. Pro pokusy byly používány buňky DAOY HTB-186 (ATCC). Pro plakovou titraci byly použity buňky PS (pig kidney epithelial line, PARU BC AVČR). K veškerým kultivačním pokusům byly využity 24-jamkové panely. Kultivační podmínky pro DAOY buňky byly teplota 37 °C s atmosférou obsahující 5 % CO_2 a pro buňky PS 37 °C v atmosféře s obsahem 0,5 % CO_2 . Kultivačním médiem pro DAOY buňky bylo D-MEM (Biowest) s 10 % BOFES (bovinní fetální sérum, Sigma-Aldrich), 1 % antibiotické směsi (Amphotericin B 0,25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, Penicilin G 100 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$, Streptomycin 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; Biowest) a 1 % glutaminu (Biowest). Médium pro buňky PS bylo L-15 (Biowest) s 3 % PTS (prekolostrální telecí sérum, Biowest), 1 % antibiotické směsi a 1 % glutaminu. Pro trypsinizaci byl používán 0,25% trypsin/EDTA v HBSS (Biowest). Buňky byly kultivovány v kultivačních lahvích (25 nebo 75 cm^2) a po nasazení na panely inkubovány 18 hodin kvůli dostatečné adhezi na dno jamek panelu.

Infekce

Veškeré práce s infekcí bylo nutné provádět v laminárním boxu za podmínek splňujících standard BSL2 a po řádném školení o bezpečnosti práce. Pro infekci byl používán virus KE kmen Neudörfl (Prof. F. X. Heinz, Medical University of Vienna) namnožený v mozcích sajících laboratorních myši. Používány byly 20% mozkové suspenze v médiu

v množství odpovídajícímu 5 MOI (multiplicity of infection). Po odebrání média byla k buňkám přidána suspenze viru s kultivačním médiem v objemu 200 μ l a buňky byly ponechány 2 hodiny v kultivačních podmínkách. Po adhezi viru na buňky bylo médium s virem odebráno, buňky promyty 0,8 ml PBS a přidáno čerstvé médium v objemu 0,5 ml. Jako negativní kontrola byla používána mozková suspenze zdravých myší; příprava probíhala stejným postupem jako příprava vzorků viru.

Transfekce

Buňky na transfekci byly nasazeny 18 hodin předem v kýžené koncentraci v objemu 0,5 ml na 24 jamkový panel a pro použití na imunofluorescenci v objemu 100 μ l. Transfekce byly prováděny reagensy PolyJetTM In Vitro DNA Transfection Reagent (SignaGen Laboratories) a Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific). Počet buněk použitých v jedné jamce panelu, množství DNA, množství transfekční reagentie, stejně jako použitá transfekční reagentie byly předmětem optimalizace a jsou popsány ve výsledcích. Pro optimalizaci transfekčních podmínek byl využit plasmid pMGFP.

Postup transfekce pomocí PolyJet

Transfekce probíhala dle protokolu výrobce na buňkách kultivovaných v 0,5 ml kompletního D-MEM média. Na jednu reakci bylo připraveno 25 μ l média s přidaným plasmidem v jedné zklumavce a 25 μ l téhož média s přidaným PolyJet. Směs s PolyJet byla přidána do DNA směsi a inkubována 10 minut. Poté byla celá směs aplikována k buňkám a buňky uloženy do inkubátoru.

Postup transfekce pomocí Lipofectamin 2000

Před samotnou transfekcí byly buňky promyty PBS a bylo k nim přidáno médium bez antibiotik. Na jednu reakci bylo připraveno 50 μ l směsi DNA a Opti-MEM média a 50 μ l směsi Lipofectamin 2000 a Opti-MEM. Směs obsahující Lipofectamin 2000 byla inkubována 5 minut a poté promíchána s DNA směsí. Následovala inkubace 20 minut a poté byla transfekční reakce přidána k buňkám. Po 5 hodinách byly buňky promyty PBS a bylo přidáno čerstvé kompletní D-MEM médium.

Izolace proteinů

Pro přípravu buněčných lyzátů byl používán lyzační roztok obsahující 1 % SDS v PBS s přidanými inhibitory proteáz (Halt Protease Inhibitor Single Use Cocktail, Thermo Fisher Scientific). Buňky byly promyty PBS, následně k nim bylo přidáno 100 μ l lyzačního roztoku a buňky byly inkubovány 5 minut. Z důvodu precipitace SDS v chladném roztoku bylo se

vzorky pracováno při pokojové teplotě. Buněčné lyzáty byly sonikovány tyčovým sonikátorem po dobu 30 sekund.

Izolace proteinů z RNA Blue

Pro izolaci proteinů ze vzorků určených také pro izolaci RNA bylo použito fenolové extrakční činidlo RNA Blue (Top-Bio). K organické fázi po izolaci RNA bylo přidáno 0,3 ml 96% ethanolu a vzorek byl centrifugován 5 minut při 2500 ot.min⁻¹ a 4 °C. Na dně zkumavky se vytvořila peletka DNA, supernatant obsahující proteiny byl přenesen do čisté zkumavky. Proteiny byly precipitovány přidáním isopropylalkoholu v objemu 1,5 ml na 1 ml RNA Blue po dobu 10 minut. Poté byl vzorek centrifugován 10 minut při 12000 ot.min⁻¹ a 4 °C. Po odstranění supernatantu byla peletka celkem třikrát promyta 0,3M roztokem guanidin hydrochloridu v 96% ethanolu po dobu 20 minut a centrifugována 5 minut při 7500 ot.min⁻¹ a 4 °C. Po poslední centrifugaci byla peletka promyta 2 ml 96% ethanolu a sušena při 30 °C vakuovou odparkou do úplného vysušení. Peletka byla rozpuštěna v 1% SDS třepáním a zahřátím na 50 °C.

Měření koncentrace proteinů

K měření koncentrace proteinů ve vzorku byl použit PierceTM BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Vzorek pro reakci byl 10x zředěný. Reakce probíhala v 96-jamkovém panelu. Na jednu reakci bylo použito 25 µl naředěného vzorku a 200 µl reakční směsi, která vznikla smícháním reagensů A a B v poměru 50:1, dle protokolu výrobce. Jako standardy byl použit albuminový standard naředěný dle protokolu na jednotlivé koncentrace. Panel se vzorky byl inkubován při 37 °C 30 min. Poté byla měřena absorbance při 562 nm. Z hodnot standardů byla vytvořena kalibrační přímka a z rovnice pro přímku vypočteny koncentrace vzorků.

Protilátky

K imunodetekci proteinů imunoblotem a fluorescenční mikroskopií byly používány protilátky: monoklonální anti-FLAG (Sigma-Aldrich) protilátka produkovaná v myši. Polyklonální anti-OASL protilátka (Thermo Fisher Scientific) byla produkovaná v králíkovi imunizací rekombinantním fragmentem proteinu odpovídajícímu oblasti prvních 274 aminokyselin lidského OASL. Monoklonální anti-GAPDH protilátka (Abcam) byla produkovaná v králíkovi imunizací rekombinantním fragmentem odpovídající 100 aminokyselinám C-konce. Pro imunoblot byly použity jako sekundární i terciární protilátky polyklonální protilátky značené křenovou peroxidázou, popř. alkalickou fosfatázou pro

kolorimetrické vyvolání (Vector Laboratories). Pro imunofluorescenci byly použity sekundární fluorescenčně značené protilátky DyLight 594 (Vector Laboratories).

Imunoblot

Proteiny pro imunoblot byly elektroforeticky (SDS-PAGE) separovány ve 12% polyakrylamidovém gelu s přidáním 0,5 % trichlorethanolu, jakožto Stain-free činidla pro vizualizaci proteinů pod UV zářením. V gelu byl obsažen akrylamid (30% akrylamid + bisakrylamid 37,5:1, Carl Roth), separační (1,5 M Tris base, 0,4% SDS, pH 8,8), popř. zaostřovací pufr (1 M Tris base, 0,4% SDS, pH 6,8), APS (amonium persulfát), TEMED (N,N,N',N' Tetramethylethylendiamin) a trichlorethanol při pH 8,8. Složení směsi pro jeden gel je uvedeno v Tabulce 4. Vzorky byly smíchány se 4x redukujícím pufrem (0,2% bromfenolová modř, 40% glycerol, 8% SDS, 0,2 M Tris, 100 mM dithiothreitol, pH 6,8) a nanášeny. Jako ladder byl použit Prestained Protein Marker VI 10 – 245 kDa (Applichem). Po separaci byly proteiny detekovány po aktivaci UV zářením fluroescenční detekcí (Stain-free; G:Box, Syngene). PVDF (GE Healthcare Life Sciences) membrána byla aktivována minutu v methanolu a poté inkubována cca 10 minut v blotovacím pufru (25 mM Tris, 192 mM glycin, 20% methanol). V blotovacím pufru byly také krátce inkubovány blotovací papíry a SDS-PAGE gely. Po sestavení blotovacího sloupce byly případné vzniklé bubliny vytlačeny poválením skleněné tyčinky. Blotováno bylo při 25 V 30 minut v blotovací aparatuře (Trans-Blot® Turbo™ Transfer System, Bio-Rad).

Tabulka 4: Množství komponent použitých pro přípravu jednoho polyakrylamidového gelu.

	Separační gel	Zaostřovací gel
30% akrylamid	2 ml	0,25 ml
4x separační / zaostřovací pufr	1,25 ml	0,38 ml
Deionizovaná voda	1,65 ml	0,85 ml
10% APS	100 µl	20 µl
TEMED	4 µl	2 µl
trichlorethanol	25 µl	7,5 µl

Po blotování byly membrány krátce promyty vodou a PBS-T (PBS, 0,05% Tween-20). Membrány byly blokovány 60 min v blokovacím roztoku (5% sušené odstředěné mléko v PBS-T), následně byla provedena inkubace v primární protilátce v ředění 1:500 v blokovacím roztoku (při 4 °C přes noc). Po inkubaci byly membrány promývány 3x 10 minut v PBS-T. Po promytí byly membrány inkubovány se sekundární protilátkou v ředění 1:1000

v blokovacím roztoku 60 minut. Následovalo promývání 3x 10 minut v PBS-T, inkubace s terciární protilátkou za stejných podmínek jako se sekundární a poslední promývání. K detekci bylo využíváno křenové peroxidázy konjugované s polyklonální sekundární i terciární protilátkou. Toto řešení bylo zvoleno z důvodu, že při absenci terciární protilátky nebyl detekován žádný signál. Po posledním promytí byly membrány opláchnuty v PBS a signál byl vyvolán chemiluminescenčním kitem pro křenovou peroxidázu (Western Blot Quantum, Advansta). Intenzita signálu byla analyzována v programu ImageJ.

Vybrané membrány byly vyvolány kolorimetricky pomocí alkalické fosfatázy. Bylo použito obdobné schéma, přičemž polyklonální sekundární a terciární protilátky byly namísto křenové peroxidázy konjugované s alkalickou fosfatázou. Pro vyvolání byl použit AP vyvolávací pufr (100 mM Tris, 100mM NaCl, 10 mM MgCl₂, pH 9,5) v množství 10 ml na membránu s přidáním 200 µl substrátu BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-fosfát + nitro-blue-tetrazolium). Po dostatečném vyvolání signálu byly membrány promyty v deionizované vodě a usušeny.

Stripping membrán a značení GAPDH

K normalizaci signálu byla využita detekce housekeeping proteinu GAPDH; pro maximální přesnost jsme se rozhodli analyzovat signál GAPDH na membráně použité pro vyvolání signálu OASL. Vyvolané membrány byly tedy inkubovány ve stripovacím pufru (2 % SDS, 62,5 mM Tris HCl pH 6,8, 0,8 % β-merkaptoethanol) 45 minut za stálého třepání při 50 °C. Následně byly membrány promývány pod tekoucí vodou 2 minuty a inkubovány 5 minut v PBS-T. Poté byly blokovány 60 minut v blokovacím roztoku, inkubovány v primární GAPDH protilátce v ředění 1:1000 v blokovacím roztoku 60 minut, promývány PBS-T 3x 10 minut a inkubovány 60 minut v sekundární protilátce (konjugované s křenovou peroxidázou) ředěné 1:1000 v blokovacím roztoku. Po inkubaci byly membrány promyty 3x 10 minut v PBS-T a vyvolány za použití kitu Western Blot Quantum (Advansta).

Barvení proteinů

Polyakrylamidové gely byly po blotování barveny metodou Blue Silver využívající barvivo Coomassie Brilliant Blue. Gely byly nejprve fixovány 20 minut v 50% ethanolu s přídavkem 2% H₃PO₄ a promyty 2x 20 minut ve vodě. Takto fixované gely byly barveny přes noc v roztoku CBB Silver Blue (10% H₃PO₄, 10% (NH₄)₂SO₄, 0,12% CBB G-250, 20% methanol). Gely byly následně promyty vodou a zdokumentovány.

Imunofluorescenční mikroskopie

Pro přípravu vzorků byla využita podložní skříčka s jamkami pro kultivaci buněčných kultur. Proces nasazení buněk byl standardní dle výše popsaného postupu. Koncentrace buněk byla 37 500 buněk/ml, nasazený objem 200 μ l. Buňky byly fixovány 4% paraformaldehydem v PBS připraveném ze zásobního roztoku. Zásobní roztok byl připraven rozpouštěním paraformaldehydu do 16 % v polovině konečného objemu deionizované vody za teploty 65-70 °C za přidání kapky 10M NaOH do klarifikace roztoku. K rozpouštěnému paraformaldehydu byl přidán stejný objem 8x PBS a roztok v alikvotech zamražen a uskladněn při -20°C. Transfekce byla provedena standardním protokolem upraveným na základě optimalizace (viz kapitola Optimalizace transfekce buněk DAOY HTB-186). Vzorky byly zpracovány po 24 a 48 hodinách od transfekce. Veškeré roztoky byly filtrovány přes 0,22 μ m PES filtr (VWR) a byly používány v objemu 200 μ l na jamku. Buňky byly po dobu 5 min promyty PBS. Po odsátí PBS byl přidán fixační roztok a vzorek byl inkubován 15 minut. Po ukončení fixace byl vzorek promýván PBS 3x 5 min pro důkladné odmytí fixačního činidla. Následně byl přidán permeabilizační roztok (0,1% Triton X-100 v PBS) na dobu 15 min. Po permeabilizaci byl vzorek promyt PBS 2x 5 min. Pro zablokování autofluorescence paraformaldehydu byl vzorek následně inkubován 2x 10 min. v roztoku 50 mM NH₄Cl v 1% BSA (Albumin – frakce V, Sigma-Aldrich) v PBS. Poté byl vzorek promyt 2x 5 min. PBS. Vzorek byl blokován 60 min. v 3% BSA v PBS. Po blokaci byl vzorek inkubován s primární protilátkou zředěnou v poměru 1:200 v 1% BSA v PBS 60 min. Jako primární protilátka byla použita anti-FLAG protilátka, stejná, jako v případě imunoblotu. Poté byl vzorek promýván v PBS 6x 5 min. Následně byl vzorek inkubován se sekundární fluorescenčně značenou protilátkou v 1% BSA v PBS v poměru 1:500 60 min ve tmě. Následné kroky byly prováděny za nízké hladiny osvětlení z důvodu minimalizace ztrát fluorescenční aktivity. Po inkubaci v sekundární protilátce byly vzorky promyty v PBS 6x 5 min. Skříčko bylo ponecháno ve tmě do úplného zaschnutí vzorků. Na každý vzorek bylo přidáno 12 μ l montovacího média VECTASHIELD Hard Mounting Media (Vector Laboratories), vzorek byl zakryt krycím skříčkem. Preparáty byly pozorovány konfokálním mikroskopem Fluoview FV10i (Olympus). Byl vypočten poměr počtu buněk exprimujících OASL (anti-FLAG) ku celkovému počtu buněk. Počet buněk byl určen při zvětšení 40x.

Izolace RNA

RNA pro qRT-PCR byly izolovány ze dvou jamek 24-jamkového panelu a pro Northern blot ze 4 jamek. Izolace byla prováděna fenolovým extrakčním činidlem RNA Blue. Pracovní prostor byl ošetřen přípravkem pro inaktivaci RNáz. Buňky byly zbaveny média a

opláchnuty 1 ml PBS. Po promytí bylo do každé jamky přidáno 200 μ l RNA Blue. Po 5 minutách v RNA Blue byly zbytky buněk mechanicky seškrábány, vzorky byly promíchány, odebrány a zamraženy při -70 °C pro pozdější izolaci.

Pro izolaci RNA byly ke vzorkům přidán chloroform v objemu 0,2 ml na 1 ml RNA Blue; vzorky byly důkladně 15 sekund protřepávány a ponechány při pokojové teplotě 5 minut. Po inkubaci byly vzorky centrifugovány 10 minut při 12000 ot.min⁻¹ a 4 °C. Po centrifugaci byla horní vodná fáze odebrána do čistých zkumavek. Vodná fáze byla precipitována přidáním 0,5 ml isopropylalkoholu na 1 ml RNA Blue při teplotě 4 °C alespoň 10 minut. Po precipitaci byl vzorek centrifugován 20 minut při 16000 ot.min⁻¹ a 4 °C. Po odebrání supernatantu byl přidán 1 ml 70% ethanolu v DEPC H₂O a vzorek byl centrifugován 10 minut při 16000 ot.min⁻¹ a 4 °C. Po centrifugaci a odsátí ethanolu byla peletka sušena při pokojové teplotě. Poté byla rozpuštěna v DEPC H₂O. Koncentrace rozpuštěné RNA byla změřena na přístroji NanoPhotometer (Implen).

DNázová reakce

Celkové vstupní množství do DNázové reakce bylo u detekce virové RNA 1700 ng totální RNA a pro detekci OASL bylo použito 2000 ng totální RNA. Objemy vzorků RNA byly do daného objemu doplněny DEPC vodou. Pro DNázovou reakci byla použita dsDNase (Thermo Fisher Scientific). Složení reakční směsi, kromě objemu RNA variabilního dle koncentrace, je uvedeno níže (Tabulka 5). Reakce probíhala 30 minut při 37 °C a byla ukončena zahřátím na 60 °C po dobu 5 minut.

Tabulka 5: Složení DNázové reakce v množství pro jeden vzorek.

10x DNáza pufr	1 μ l
enzym DNáza	1 μ l
Templátová RNA	Max 8 μ l
DEPC voda	Do 10 μ l

Příprava cDNA

Pro přípravu cDNA byl používán First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas/Thermo Fisher Scientific). Vstupním materiálem reakce byl kompletní objem DNázové reakce, k čemuž bylo přidáno 1,5 μ l náhodných hexamerů, 5 μ l DEPC vody, reakce byla zahřata na 65 °C na 5 min a poté schlazena na ledu. Objem byl rozdělen na 11 μ l pro syntézu cDNA a 5,5 μ l pro kontrolu bez enzymu. Poté bylo přidán mastermix, připraven dle Tabulky 6.

Připravené vzorky byly inkubovány 5 minut při 25 °C a následně 60 minut při 37 °C. Reakce byla ukončena zahřátím na 70 °C po dobu 5 minut.

Tabulka 6: Složení mastermixů pro syntézu cDNA a negativní kontrolu.

Reagencie	Reakční mastermix	Kontrolní mastermix (RT-)
DNázová reakce	11 µl	5,5 µl
5x reakční pufr	4 µl	2 µl
RiboLock inhibitor RNáz	1 µl	0,5 µl
10 mM dNTP mix	2 µl	1 µl
M-MuLV reverzní transkriptáza	2 µl	---
DEPC voda	---	1 µl

qRT-PCR

Pro qRT-PCR byly vzorky cDNA naředěny na 30 µl, RT- kontroly na 15 µl. Vzorky byly použity v technických triplikátech, kontrola v jednom opakování. Pro reakci byl použit qPCR 2x SYBR MasterMix (Top-Bio). Množství reagensů na jednu reakci je uvedeno v Tabulce 7. Reakce probíhala podle schématu uvedeném v Tabulce 8. Měření fluorescence vzorků probíhalo vždy na konci elongační fáze (při 72 °C), na závěr byla provedena tzv. melting analýza (analýza produktů na základě jejich denaturační teploty). Pro detekci virové RNA byly použity primery E01-F a E01-R, pro detekci OASL byly použity primery OASL qPCR F a OASL qPCR R, pro kontrolu množství použité RNA byly použity primery HPRT F a HPRT R detekující housekeeping gen HPRT. Výsledné získané hodnoty byly využity pro relativní kvantifikaci metodou $\Delta\Delta\text{-Ct}$ s normalizací k HPRT, jakožto referenčnímu genu.

Tabulka 7: Složení reakce pro qPCR.

Primer F	0,6 µl
Primer R	0,6 µl
2x SYBR MasterMix	10 µl
Voda	4,8 µl
cDNA vzorek	4 µl

Tabulka 8: Nastavení qPCR programu.

95 °C	10 minut	40 cyklů
95 °C	15 sekund	
60 °C	30 sekund	
72 °C	30 sekund	
95 °C	Kontinuální analýza křivky tání	

Northern blot

Denaturační gel

Elektroforetické rozdělení RNA vzorků pro Northern blot probíhalo v denaturačním gelu v pufovacím prostředí 1x MOPS pufru při 80 V. Složení denaturačního gelu je uvedeno v Tabulce 9. Společně se vzorky byl nanesen i ladder RiboRuler High Range RNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). Vzorky včetně ladderu byly v požadované koncentraci smíchány s 2x koncentrovaným nanášecím puftrem (Megascript Kit; Life Technologies/Thermo Fisher Scientific). Následně byla RNA denaturována při 75 °C po dobu 10 minut. Následně byly vzorky nanesený na denaturační gel a separovány 2-3 hodiny. RNA v gelu byla vizualizována pomocí interkalačního barviva GelRed (Biotium), které bylo přidáno do gelu při jeho přípravě.

Tabulka 9: Složení denaturačního gelu.

DEPC voda	86 ml
Agaróza	1,44 g
10x MOPS pufr	12 ml
36% Formaldehyd	22 ml
GelRed (10000x koncentrovaný)	12 μ l

Po elektroforetické separaci byl gel promýván 30 min v DEPC vodě, 15 minut v 50 mM NaOH a nakonec 30 minut v 20x SSC pufru (3M NaCl, 0,3M citrát sodný, pH 7). Pro blotování byla použita nylonová membrána (Zeta Probe Blotting Membrane, Bio-Rad). Přenos RNA na membránu probíhal na principu kapilárního vztlínání savým papírem v 20x SSC pufru po dobu 24 hodin. RNA na membráně byla zafixována vysušením membrány a následným UV-crosslinkováním (1,2 J.cm⁻²).

Příprava sondy pro Northern blot

Pro PCR na přípravu templátu pro výrobu sondy byla použita Q5 Hot Start High-Fidelity DNA polymerase (New England Biolabs). Jako templát byl použit expresní plasmid pro OASLa. PCR byla namíchána ve čtyřech stejných reakcích po 50 ul. V níže uvedených tabulkách je popsáno složení reakce (Tabulka 10) a reakční podmínky (Tabulka 11).

Tabulka 10: Složení PCR reakce pro OASL sondu.

5x Q5-HS pufr	10 µl
5x Q5-HS enhancer	10 µl
10 mM dNTPs	2 µl
Primer OASL probe F	1,5 µl
Primer OASL probe R	1,5 µl
PCR voda	24 µl
Templátová DNA	0,5 µl
Q5-HS polymeráza	0,5 µl

Tabulka 11: Podmínky amplifikace fragmentu pro OASL sondu.

98 °C	30 sekund	40 cyklů
98 °C	10 sekund	
72 °C	20 sekund	
72 °C	20 sekund	
72 °C	2 minuty	

Proběhlé reakce byly separovány v 1,5% agarózovém gelu, produkty o požadované velikosti vyříznuty a izolovány kitem NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Machery-Nagel) použitím jedné kolony na všechny čtyři reakce. Postupováno bylo přesně dle protokolu výrobce. Po izolaci byla změřena koncentrace pomocí přístroje NanoPhotometer (Implen).

Pro přípravu radioaktivně značené sondy byl použit kit DecaLabel DNA Labeling Kit (Thermo Fisher Scientific). Jako zdroj radiačního signálu byl použit [α - 32 P]-dCTP 6000 Ci.mmol⁻¹, 9,25 MBq (Hartmann Analytic). Pro minimalizaci kontaminace materiálu radioizotopem bylo maximum práce provedeno ve standardní laboratoři, pouze nezbytně nutné práce s radioaktivním materiálem byly prováděny v izotopové laboratoři na

Parazitologickém ústavu BC AVČR po zaškolení odpovědným pracovníkem Dr. Zdeňkem Parisem.

První fáze přípravy sondy, primer-templátová směs (Tabulka 12) byla míchána pro 100 ng DNA následujícím způsobem.

Tabulka 12: Složení primer-templátové směsi.

DNA templát (100 ng)	2,78 μ l
dekanukleotidy v 5x pufu	10 μ l
PCR grade voda	27,2 μ l

Vzorek byl inkubován 10 min. při 100 °C, schlazen na ledu a poté k němu byly přidány další reagenty (viz Tabulka 13).

Tabulka 13: Složení druh části směsi reagentů pro syntézu sondy.

Mix C	3 μ l
[α - ³² P]-dCTP	6 μ l
Klenow fragment (5U)	1 μ l

Reakce byla inkubována 5 min. při 37 °C. Poté byly přidány 4 μ l dNTPs mixu a inkubováno opět 5 min. při 37 °C.

Prehybridizace a hybridizace membrán

Prehybridizace membrán probíhala 2 hodiny při 65 °C v hybridizačním pufu PerfectHyb™ Plus Hybridization Buffer (Sigma-Aldrich) s obsahem denaturované DNA z lososích spermií v konečné koncentraci 0,1 mg.ml⁻¹. Po uplynutí doby prehybridizace byl přidán celý obsah zkumavky s připravenou sondou a membrány byly následně inkubovány 20-24 hodin při 42 °C. Následně byly membrány promývány dle schématu v Tabulce 14. Promývání bylo před jednotlivými kroky kontrolováno orientačním mapováním aktivity pomocí Geiger-Müllerova počítače.

Tabulka 14: Průběh promývání membrán.

2x SSC + 0,1% SDS	nahřáto na 42 °C ihned vylito
2x SSC + 0,1% SDS	42 °C 15 min
1x SSC + 0,1% SDS	50 °C 15 min
0,5x SSC + 0,1% SDS	60 °C 10 min

Membrány byly zabaleny do běžné potravinářské folie a ve vyvolávacích kazetách ponechány 3 dny. Poté byly kazety skenovány přístrojem Typhoon Scanner 9410 (Amersham Biosciences/GE Healthcare).

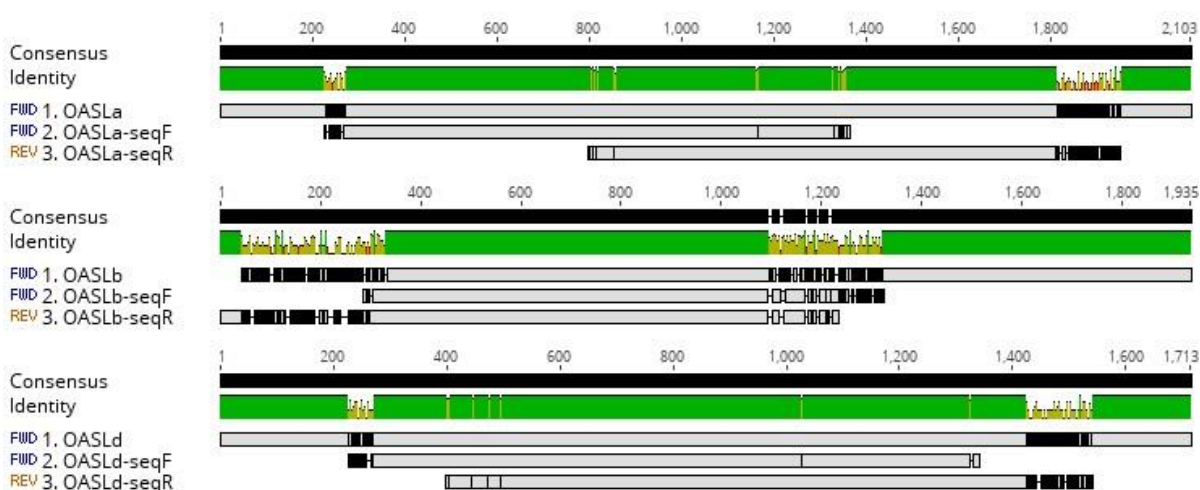
Plaková titrace

Stejně jako infekce buněk i provádění plakové titrace bylo nutné provádět v režimu BSL2. Pro plakovou titraci byly využity vzorky média odebrané z infikovaných buněk. Na panel bylo naneseno 180 μl média do každé jamky. Poté bylo do první jamky naneseno 20 μl testovaného vzorku, směs byla promíchána a z této směsi byla vytvořena dekadická ředící řada s exponentem ředění -1 až -6. Vzorky byly promíchány s 300 μl suspenze PS buněk v koncentraci 300 tisíc buněk. ml^{-1} . Panely byly ponechány po dobu 5 hodin při 37 °C v atmosféře 0,5% CO_2 . Po uplynutí 5 hodin byly buňky převrstveny krycím roztokem (1:1 roztok 1,8% karboxymethylcelulózy a 2x média, v:v). Takto připravené panely byly inkubovány 5 dní. Po pěti dnech inkubace byly panely barveny. Nejprve byly panely ponořeny do 0,9% roztoku NaCl. Poté byl promývací roztok vypuštěn do dezinfekčního roztoku a panely byly zality barvicím a fixačním roztokem naftalenové černi (0,1% naftalenová čern, 6% ledová kyselina octová, 1,36% octan sodný). Barvení a fixace probíhaly 45 minut. Po obarvení byly panely propláchnuty vodou a usušeny. Pro výpočet byly využity dvě jamky s nejnižší ředěním, kde bylo možno rozlišit jednotlivé plaky. Hodnoty byly získány dle vztahu $x = \frac{a+b}{0,198 \times n}$ kde „a“ je počet plaků v jamce s největším ředěním, „b“ počet plaků v jamce s druhým největším ředěním, koeficient 0,198 vychází z objemu použitého média vzhledem k započítání obou jamek a „n“ značí největší počítané ředění. Výsledné hodnoty jsou vyjádřeny jako počet plakotvorných jednotek (PFU – plaque forming units) na 1 mililitr, tedy $\text{PFU} \cdot \text{ml}^{-1}$, které v ideálním případě odpovídají počtu infekceschopných virionů. Hodnoty $\text{PFU} \cdot \text{ml}^{-1}$ byly následně převedeny do dekadického logaritmu.

Výsledky

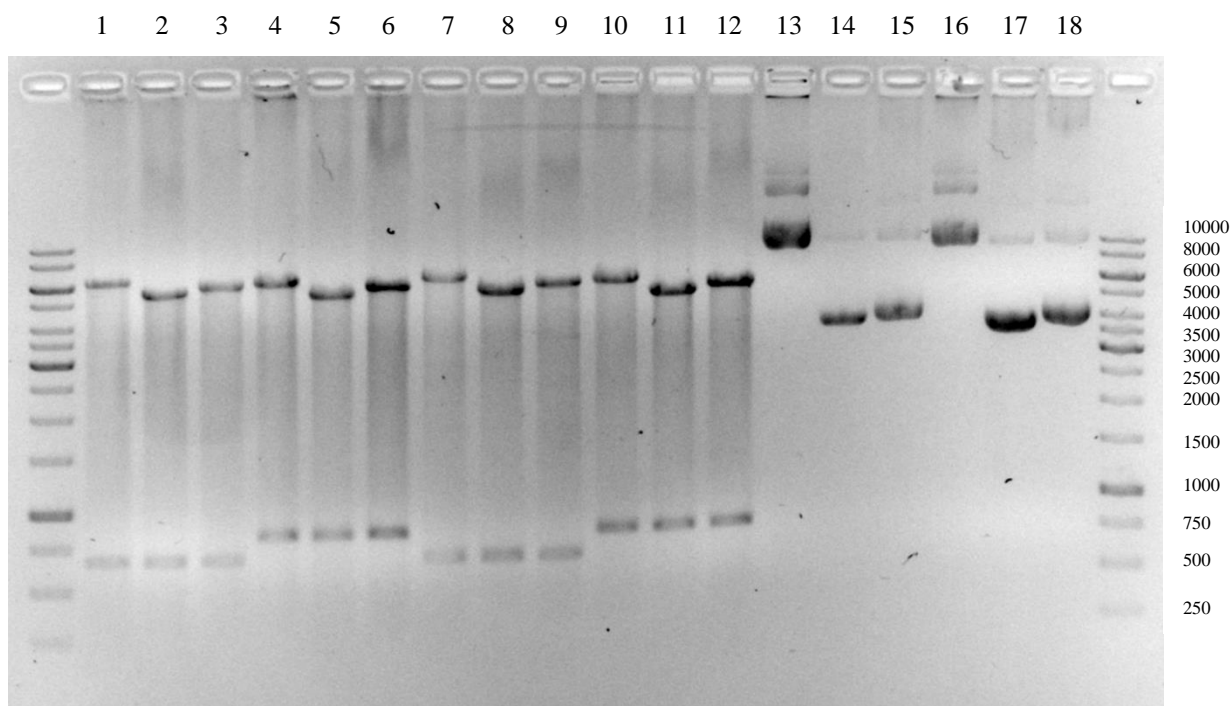
Amplifikace expresních vektorů a ověření sekvencí OASL

Prvotním úkonem byla amplifikace OASL vektorů a ověření sekvence jednotlivých expresních variant. Po transformaci kompetentních bakterií vektory všech tří variant OASL byla provedena kontrolní PCR k potvrzení přítomnosti plasmidů pro OASL v koloniích narostlých na selektivní LB agarové půdě. Z klonů pozitivních na přítomnost plasmidu byla izolována plasmidová DNA. Pomocí sekvenování jsme ověřili správnost sekvencí pro všechny OASL varianty: k sekvenaci (GATC Biotech) byly použity primery T7 F a BGH 123 R. Získané sekvence byly porovnány (Obrázek 7) se sekvencemi pro mRNA jednotlivých variant získaných z NCBI databáze: OASLa (NM_003733), OASLb (NM_198213) a OASLd (NM_001261825).



Obrázek 7: Srovnání sekvencí jednotlivých variant OASL (program Geneious).

Kontinuita sekvenčně ověřených plasmidů všech tří variant byla ověřena restriční analýzou, a to dvěma kombinacemi restričních enzymů (Obrázek 8). Vstupním materiálem byl jednak zásobní izolát jednotlivých plasmidů pro OASL od firmy GeneScript (Obrázek 8, jamky 1-6, 13-15) a jednak vzorky izolovaných plasmidů s pracovní koncentrací 200 ng.μl⁻¹ (jamky 7-12, 16-18). Při použití kombinace *Xho*I a *Nde*I by měl mít menší produkt velikost 812 bazí a větší pro OASLa 6126 bazí, pro OASLb 5349 bazí a pro OASLd 5736 bazí. Při použití samotného *Kpn*I by měl menší produkt mít 670 bazí a větší pro OASLa 6268 bazí, pro OASLb 5491 bazí a pro OASLd 5878 bazí. Jako kontrola byly použity neštěpené plasmidy (jamky 13-18).

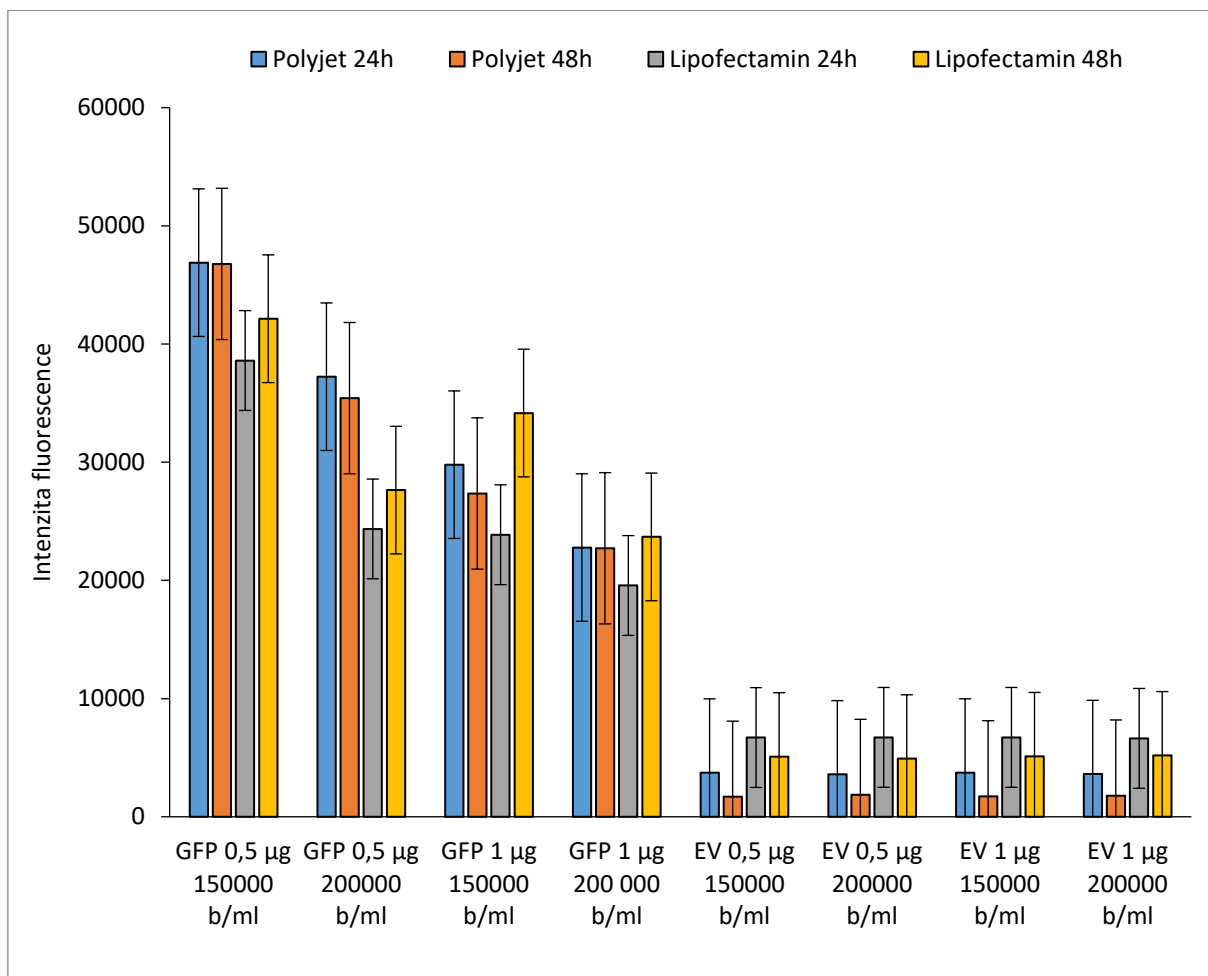


Obrázek 8: Restrikční analýza izolovaných plasmidů všech variant OASL. Legenda: OASLa (1,4,7,10,13,16), OASLb (2,5,8,11,14,17) OASLd (3,6,9,12,15,18), zásobní izolát (1-6, 13-15), ředěné plasmidy (7-12, 16-18) *XhoI* a *NdeI* (4-6, 10-12), *KpnI* (1-3, 7-9).

Velikost detekovaných fragmentů odpovídá předpokládané velikosti vypočítané ze znalosti sekvencí vektoru a konstruktů OASL. Zároveň nebyly detekovány žádné další arteficiální fragmenty. Následně proběhla izolace plasmidů z takto zkontrolovaných klonů ve větším objemu.

Optimalizace transfekce buněk DAOY HTB-186

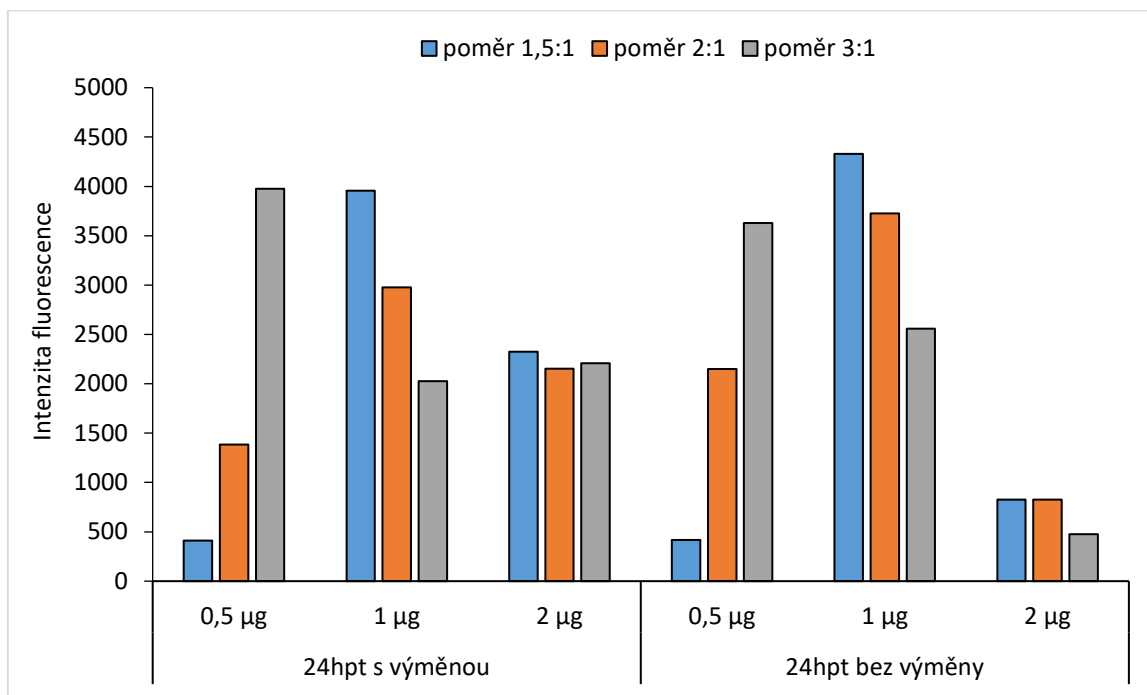
Druhým hlavním krokem bylo stanovení ideálních transfekčních podmínek pro používanou medulloblastovou linii DAOY HTB-186. Pro prvotní optimalizační pokusy bylo využito vektoru pHMGFP kódujícího protein GFP a přímé měření intenzity fluorescence. Pro optimalizaci transfekce byly využity různé kombinace počtu nasazených buněk a množství plasmidové DNA. Zároveň byly na všechny vyzkoušené kombinace použity dvě transfekční reagensy: PolyJet a Lipofectamin 2000. Transfekce a měření byly provedeny v triplicátech a naměřené intenzity jsou sumarizovány na Obrázku 9. Měření probíhalo v čtečce mikroděstiček BioTek s excitací světlem o vlnové délce 485 nm a emitovaného světla o vlnové délce 510 nm.



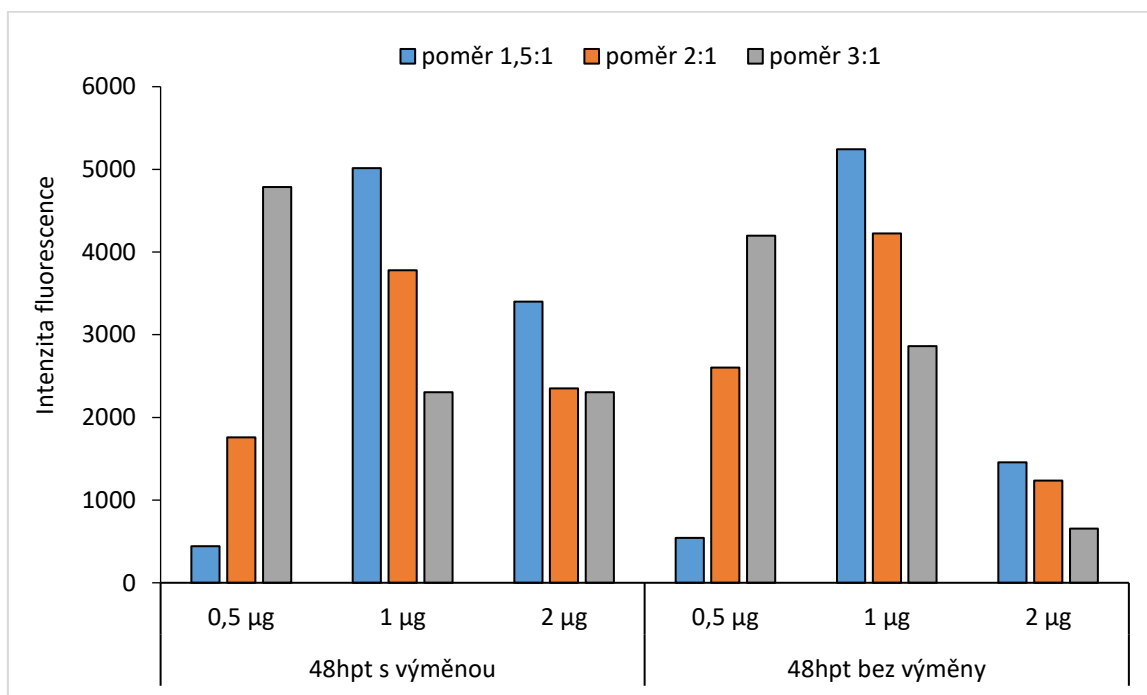
Obrázek 9: Intenzita fluorescence proteinu GFP v závislosti na podmínkách transfekce a použitém transfekčním reagens. Zobrazené hodnoty představují průměrné hodnoty naměřené intenzity fluorescence (n=3) společně se směrodatnými odchylkami.

Z měření intenzity fluorescence proteinu GFP je patrné, že obecně buňky transfekované PolyJet vykazovaly vyšší intenzitu fluorescence oproti použití Lipofectamin 2000. Dále je zřejmé, že nejvyšší hodnoty fluorescence byly naměřeny u vzorku transfekovaného pomocí Polyjet s použitím 0,5 µg DNA na 150000 buněk.

Dalším krokem optimalizace bylo upřesnění transfekčních podmínek pro PolyJet. Byly použity různé kombinace množství DNA a poměru DNA:PolyJet. Sledován byl také vliv výměny média 5 hodin po transfekci za čerstvé. Intenzita fluorescence proteinu GFP 24 hodin po transfekci v závislosti na podmínkách transfekce je porovnána na Obrázku 10; Obrázek 11 pak znázorňuje intenzitu signálu 48 hodin po transfekci.



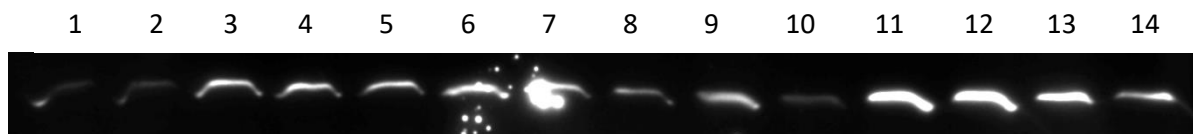
Obrázek 10: Intenzita fluorescence GFP v buňkách 24 hodin po transfekci (n=1).



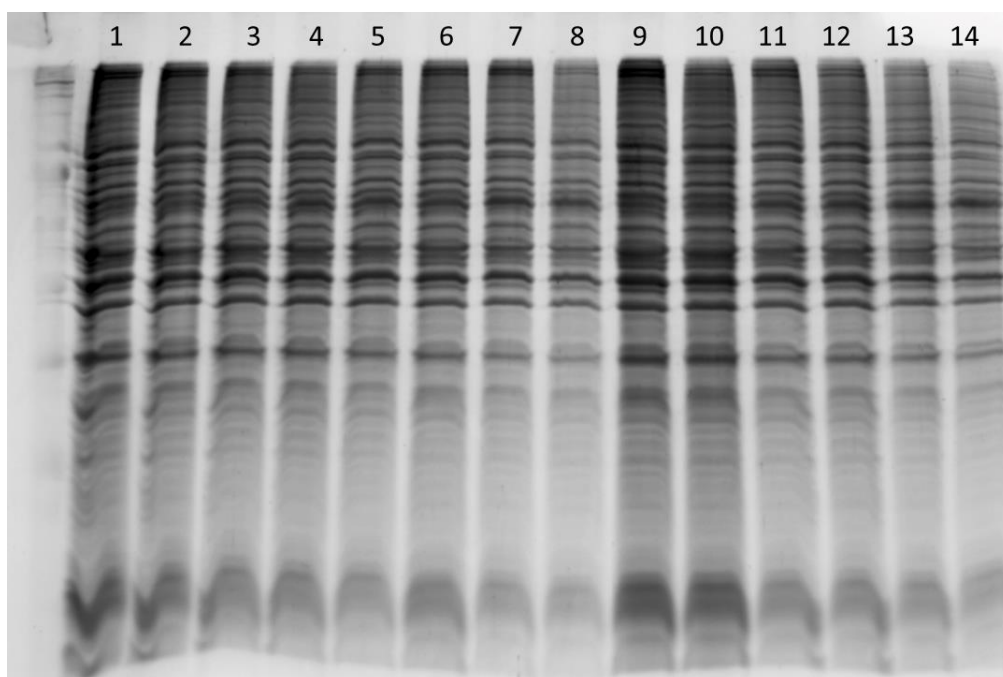
Obrázek 11: Intenzita fluorescence GFP v buňkách 48 hodin po transfekci (n=1).

Výsledky měření intenzity fluorescence proteinu GFP poukázaly na možné vhodné kombinace množství DNA a Polyjet. Nejméně vhodné byly vyřazeny a pro další ověření bylo vybráno 14 kombinací. Tyto kombinace byly ověřeny pomocí detekce isoformy OASLa za použití imunoblotu. Použitá protilátka byla anti-FLAG (Obrázek 12) a množství nanášených

proteinů bylo shodně 15 µg, na základě měření koncentrace pomocí BCA reakce. Po blotování byl gel obarven CBB (Obrázek 13).



Obrázek 12: Imunoblot proteinu OASLa v různých kombinacích množství DNA a PolyJet při shodném množství nanášeného proteinu dle BCA. Detekce chemiluminiscence. Odebíráno 24 hpt. Legenda **1)** 0,5 µg / 1:1,5 **2)** 0,5 µg / 1:2 **3)** 0,5 µg / 1:3 **4)** 1 µg / 1:1,5 **5)** 1 µg / 1:2 **6)** 1 µg / 1:3 **7)** 2 µg / 1:1,5 **8)** 2 µg / 1:2 **9)** 2 µg / 1:3 **10)** 0,5 µg / 1:2 **11)** 0,5 µg / 1:3 **12)** 1 µg / 1:1,5 **13)** 1 µg / 1:2 **14)** 1 µg / 1:3. **(1-9)** Výměna média. **(10-14)** Bez výměny média.



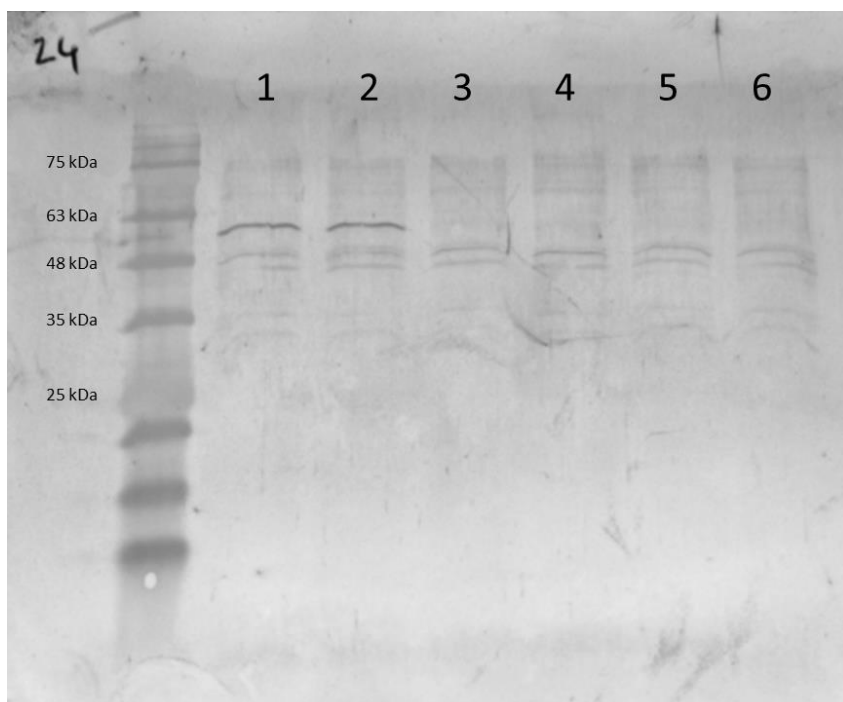
Obrázek 13: SDS-PAGE vzorků různých kombinací množství použitého PolyJet a DNA. Odebíráno 24 hpt. Legenda **1)** 0,5 µg / 1:1,5 **2)** 0,5 µg / 1:2 **3)** 0,5 µg / 1:3 **4)** 1 µg / 1:1,5 **5)** 1 µg / 1:2 **6)** 1 µg / 1:3 **7)** 2 µg / 1:1,5 **8)** 2 µg / 1:2 **9)** 2 µg / 1:3 **10)** 0,5 µg / 1:2 **11)** 0,5 µg / 1:3 **12)** 1 µg / 1:1,5 **13)** 1 µg / 1:2 **14)** 1 µg / 1:3. **(1-9)** Výměna média. **(10-14)** Bez výměny média. Obarveno CBB.

Po vyhodnocení intenzity chemiluminiscence imunoblotu byly vybrány dvě nejvhodnější kombinace (Obrázek 12, vzorek 11 a 12). Vzhledem k nižší spotřebě DNA pro transfekci byl standardní protokol upraven na 0,5 µl DNA, 1,5 µl PolyJet (poměr 1:3) a ponechání transfekční směsi v jamkách bez výměny média. Zároveň byl detekován větší signál u vzorků odebraných 24 hodin po transfekci oproti 48 hodinám po transfekci.

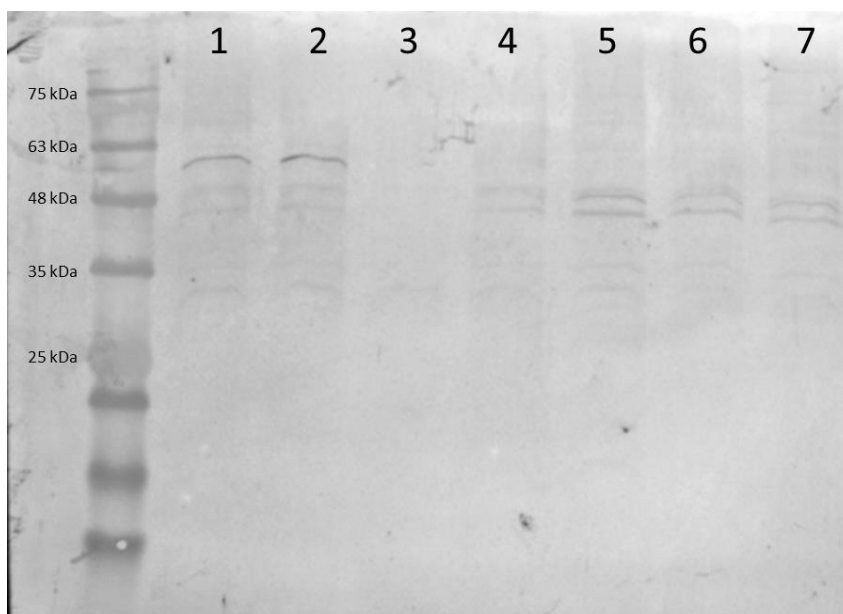
Detekce variant OASL na proteinové úrovni

Pro analýzu overexprese variant OASL byl proveden imunoblot vzorků buněk odebraných 24 hodin (Obrázek 14) a 48 hodin (Obrázek 15) po transfekci vektory pro

jednotlivé varianty OASL. Jako kontrola byly použity netransfekované buňky. Použita byla anti-FLAG protilátka a sekundární protilátka konjugovaná s alkalickou fosfatázou s následnou kolorimetrickou detekcí signálu.



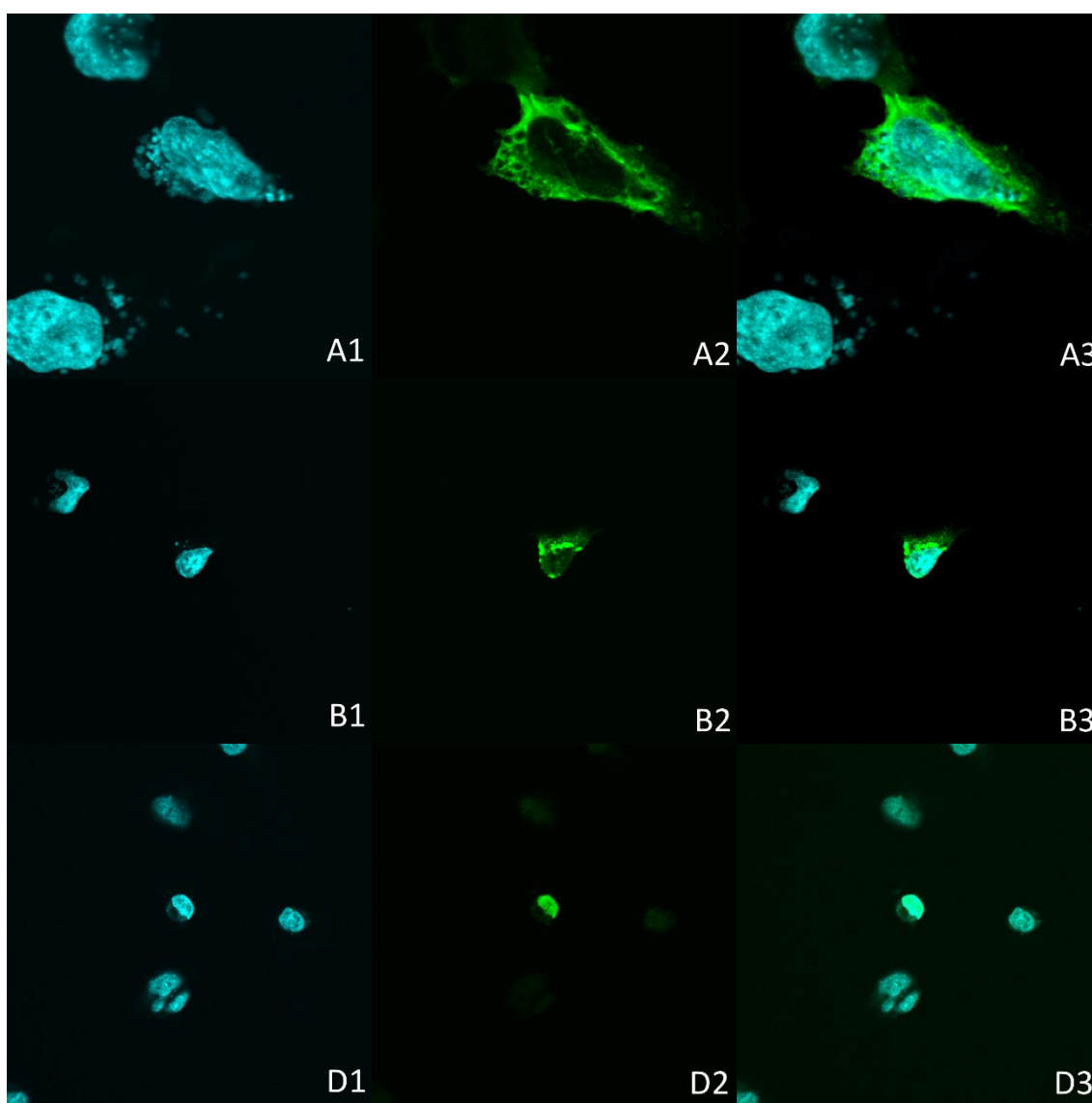
Obrázek 14: Detekce variant proteinu OASL 24 hodin po transfekci. OASLa 59 kDa (1,2), OASLb 30 kDa (3,4), OASLd 45 kDa (5,6).



Obrázek 15: Detekce variant OASL a kontroly 48 hodin po transfekci. OASLa 59 kDa (1,2), kontrola (3), OASLb 30 kDa (4,5), OASLd 45 kDa(6,7).

Ve vzorcích byla detekována jen varianta OASLa, varianty OASLb a OASLd nebyly detekovány. Zároveň signál pro OASLa ve vzorku 24 hodin po transfekci byl vyšší, než po 48 hodinách.

Imunofluorescenční mikroskopií byla zjišťována buněčná lokalizace overexprimovaných proteinů (Obrázek 16). Zároveň byla porovnávána účinnost anti-OASL a anti-FLAG protilátek, přičemž v případě použití anti-OALS protilátek nebyl detekován žádný signál (výsledky nejsou uvedeny) a tyto protilátky dále nebyly používány.



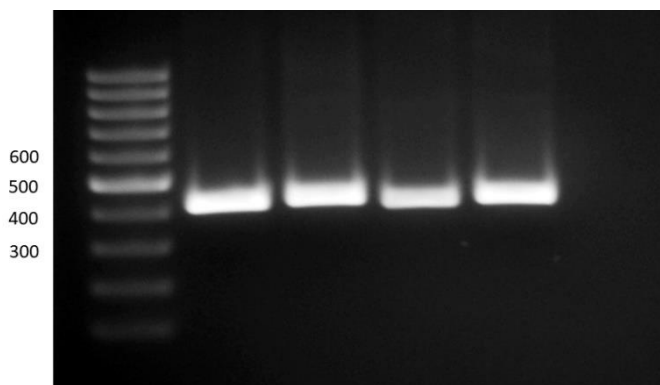
Obrázek 16: Buněčná lokalizace overexprimovaných variant proteinu OASL. Legenda: Písmena A, B, D označují variantu OASL, číslo 1 – DAPI, 2 – anti-FLAG, 3 – kombinace. Pozorováno pod zvětšením 60x.

Na základě imunofluorescenční mikroskopie byla pozorována buněčná lokalizace variant proteinu OASL detekcí protilátkou specifickou proti FLAG-tagu. Pro detekci protilátkou anti-OASL nebylo možné detekovat signál. OASLa byl pozorován v oblasti cytoplasmy, u OASLb byly pozorovány shluky vyskytující se kolem jádra a u OASLd se lokalizace signálu pro protein shodovala se signálem jádra značeným DAPI. Spočtením množství buněk bylo zjištěno, že varianta OASLa je exprimována v 8,2 % buněk (40 ze 490), OASLb v 1,3 % buněk (3 z 230) a OASLd v 2,3 % buněk (15 ze 648).

Detekce variant OASL na úrovni mRNA

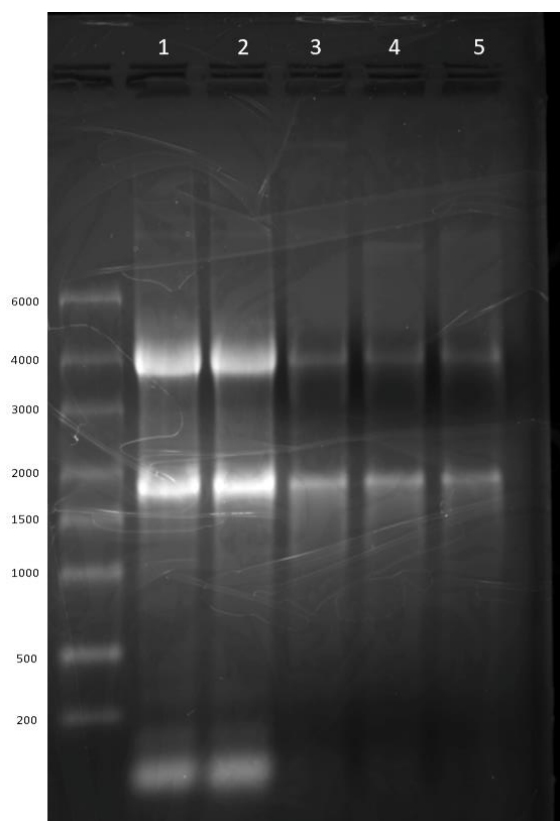
Vzhledem k velmi nízké produkci variant OASLb a OASLd jsme se rozhodli pro ověření, zda jsou sekvence v plasmidech kódující jednotlivé varianty proteinů OASL transkribované do mRNA. Z těchto důvodů byla provedena detekce mRNA pomocí sondy specifické pro OASL za použití Northern blotu. Kromě vzorků totální RNA z transfekovaných buněk byly rovněž analyzovány buňky infikované VKE (48 hodin po infekci).

Pro přípravu sond byl použit fragment OASL odpovídající společné sekvenci všech variant (exony 1 – 3) a tedy umožňující detekci všech tří variant. Fragment byl amplifikován pomocí PCR a po ověření jeho velikosti (393 bp; Obrázek 17) byl vyizolován z gelu ($c = 35,9 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$).



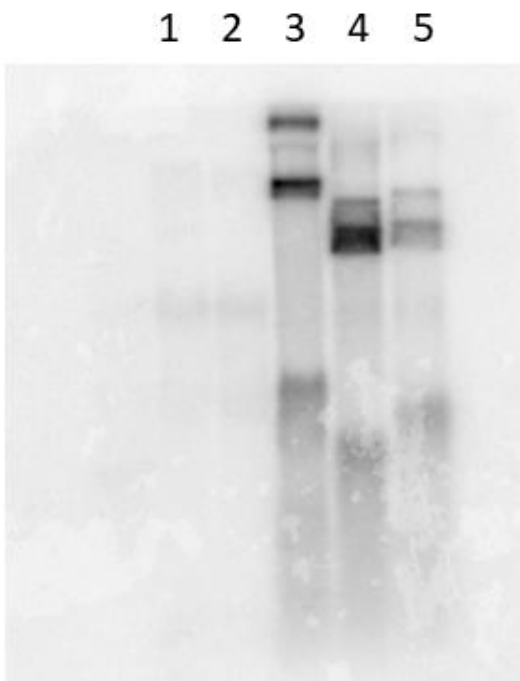
Obrázek 17: Amplifikovaný fragment PCR reakce s templátovou OASL DNA pro izolaci DNA na přípravu sondy.

Vzorky pro detekci arteficiálně produkované mRNA byly získány z buněk transfekovaných plazmidy kódujícími jednotlivé varianty OASL 24 hodin po transfekci. Vzorky pro detekci přirozené exprese pocházejí z buněk infikovaných virem a odebraných 48 hodin po infekci. Po separaci RNA v gelu byl pořízen snímek pro kontrolu kvality a integrity RNA (Obrázek 18). První Northern blot byl proveden bez předchozího použití DNázy.



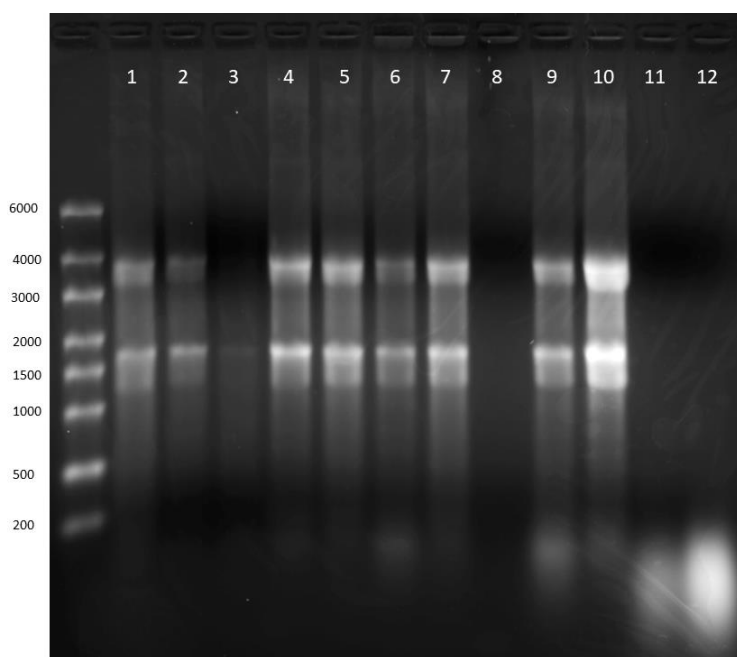
Obrázek 18: Gel se vzorky RNA před provedením prvního northern blotu. Vzorky RNA z buněk infekce po 48 hodinách (1 a 2), OASLa (3), OASLb (4) a OASLd (5).

Na základě přítomnosti ribosomální RNA (28S a 18S) byla ověřena integrita RNA a následně provedeno blotování a značení pro detekci OASL mRNA v jednotlivých vzorcích (Obrázek 19). Po vyvolání signálu byly detekovány zřetelné fragmenty odpovídající velikostně DNA expresního vektoru. Fragmenty s menší intenzitou a menší velikostí odpovídají mRNA jednotlivých variant OASL. Pořadí vzorků na membráně odpovídá vzorkům v denaturačním gelu.



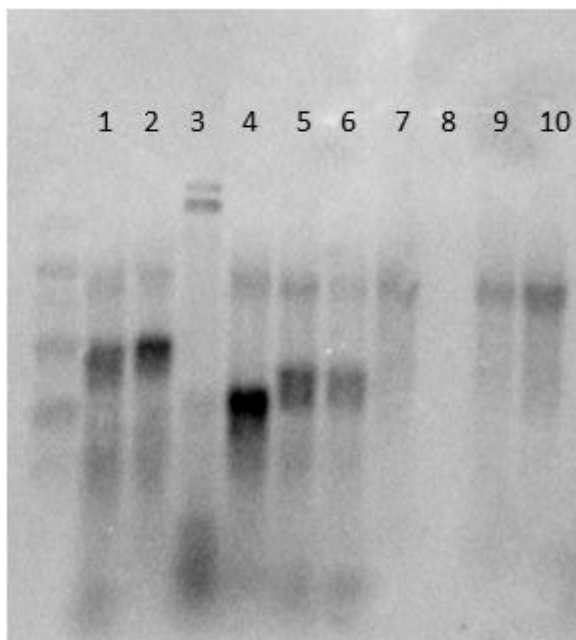
Obrázek 19: Detekce RNA ve vzorcích pro jednotlivé varianty OASL a v kontrolních vzorcích po infekci. Bez předchozí DNázové reakce. Infikované buňky 48 hpi (vzorky 1, 2), buňky transfekované plasmidy kódujícími proteiny OASLa (3), OASLb (4), OASLd (5).

Pro kontrolu správnosti postupu byl proveden další Northern blot. Pro odstranění signálu plasmidové DNA byly vzorky ošetřeny DNázou. Před blotováním byl pořízen snímek pro kontrolu kvality a integrity RNA (Obrázek 20).



Obrázek 20: Elektroforéza vzorků izolované RNA před blotováním. Vzorky RNA pro OASLa (1,2), OASLb (3,4), OASLd (5,6), prázdný vektor (7,8), vzorky z infekce 48 h (9), mozkové suspenze 48 h (10), infekce 72 h (11), mozková suspenze 72 h (12).

U vzorků 3, 8, 11 a 12 (Obrázek 20) nebyly detekovány fragmenty odpovídající ribosomální RNA (28S a 18S). Z důvodu nedetekované kontrolní ribosomální RNA v jamkách 11 a 12 byl northern blot o tyto jamky zmenšen (Obrázek 21).



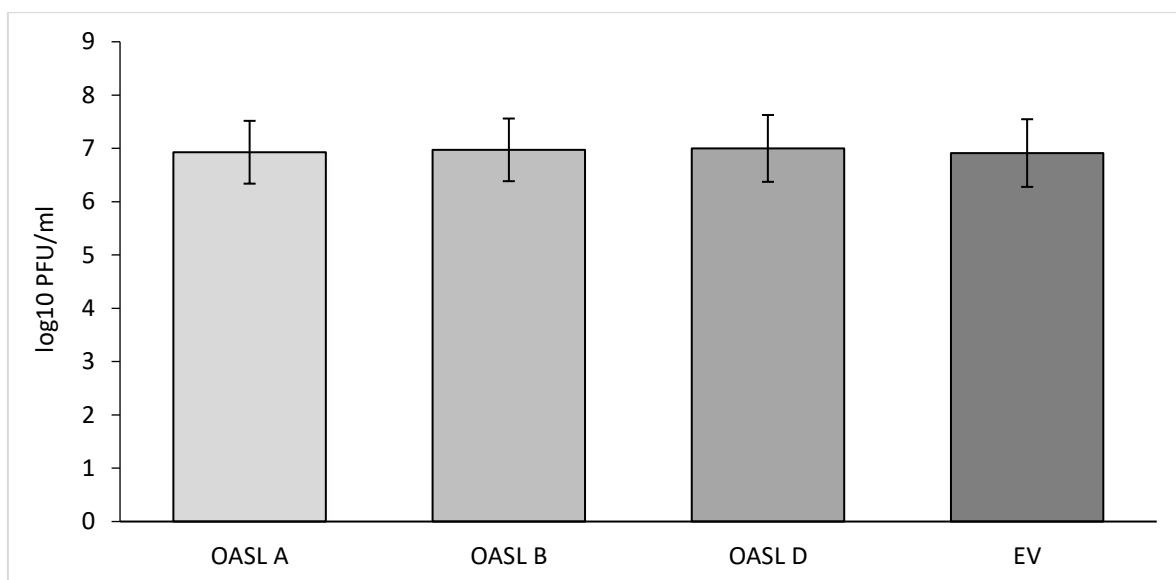
Obrázek 21: Detekce RNA ve vzorcích pro jednotlivé varianty proteinu OASL a v infikovaných kontrolách pomocí Northern blotu. Pořadí vzorků stejné jako u výchozího gelu.

U vzorků získaných z buněk transfekovaných jednotlivými variantami OASL byla opět detekována mRNA velikostně odpovídající variantám OASL. Zároveň nebyla detekována žádná mRNA kódující OASL varianty u infikovaných buněk, stejně jako u negativní kontroly mozkovou suspenzí a prázdného vektoru.

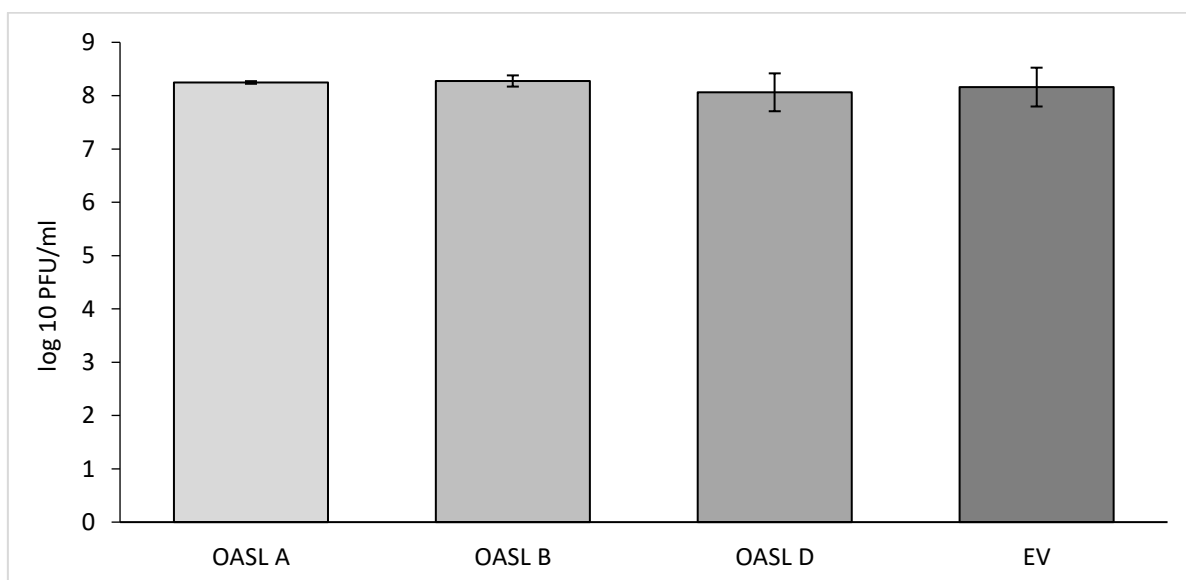
Vliv OASL na průběh infekce

Pro zjištění vlivu proteinu OASL na průběh infekce VKE byla analyzována produkce viru v buňkách overexprimujících jednotlivé varianty OASL za použití plakových titrací. Pro získání vzorků byly odebírány triplikáty vzorků infikovaných 24 hodin po transfekci. Odběry proběhly 24 hodin (Obrázek 22) a 48 hodin po infekci (obrázek 23). Počet produkovaných virionů vyjádřený v PFU.ml⁻¹ u vzorků pocházející z buněk transfekovaných variantami OASL odpovídá hladinám změřených u kontrolních vzorků transfekovaných prázdným

vektorem. Z výsledků plakové titrace je zřejmé, že ke změnám v množství virionů uvolňovaných do média nedochází.

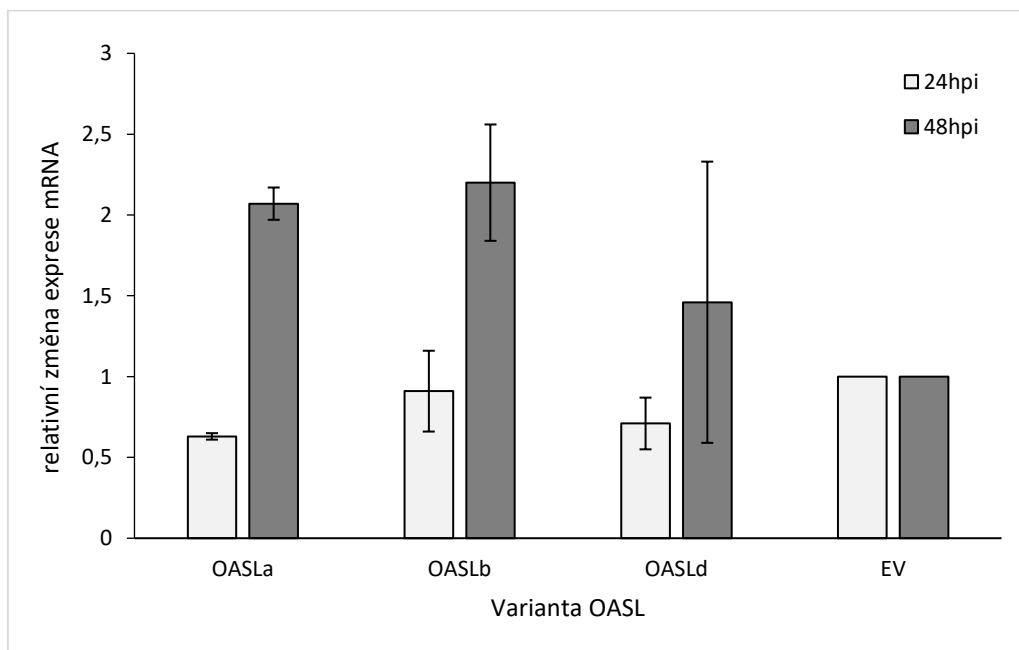


Obrázek 22: Množství viru ve vzorcích média odebraných transfekovaným buňkám 24 hodin po infekci. Měřeno plakovou titrací, uvedeno v logaritmu PFU/ml.



Obrázek 23: Množství viru ve vzorcích média odebraných transfekovaným buňkám 48 hodin po infekci. Měřeno plakovou titrací, uvedeno v logaritmu PFU/ml.

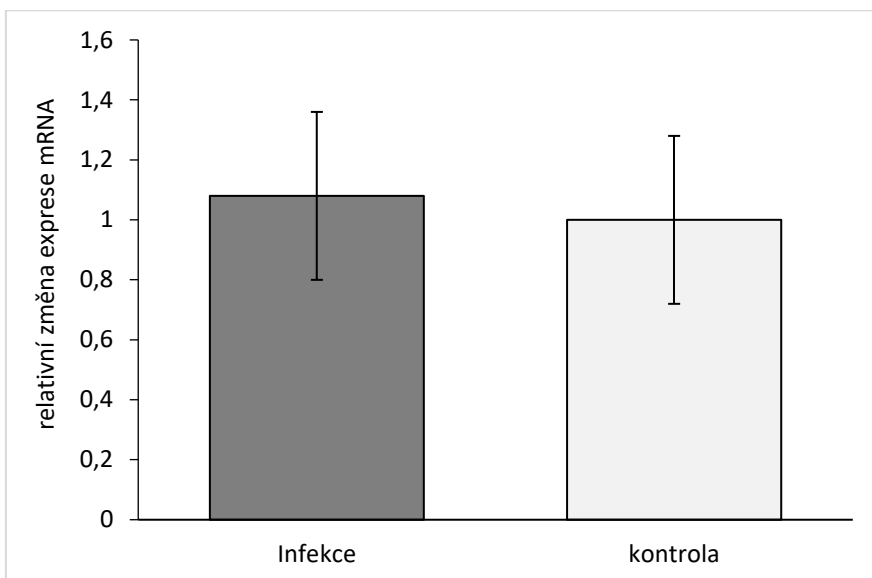
K ověření výsledků plakové titrace byla provedena qRT-PCR pro detekci virové RNA v buňkách. Triplikáty vzorků RNA byly získány ze stejného dílčího pokusu, jako vzorky pro plakovou titraci. Získané hodnoty Ct (threshold cycle) pro genomovou RNA VKE a pro mRNA referenčního genu HPRT byly zpracovány relativní kvantifikací za použití metody $\Delta\Delta$ -Ct (Obrázek 24). Součástí detekce byly i RT- kontroly.



Obrázek 24: qRT-PCR detekce virové RNA ve vzorcích odebraných 24 a 48 hodin po infekci. Analyzováno metodou $\Delta\Delta$ -Ct.

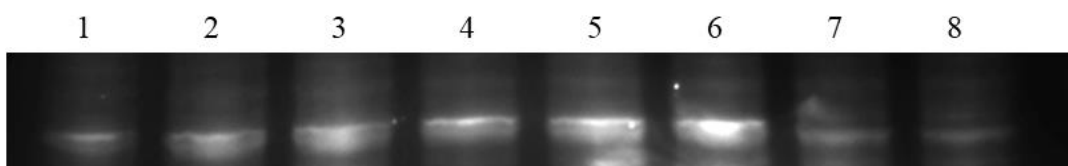
U varianty OASLa došlo ke snížení množství virové RNA 24 hodin po infekci 0,63x (t-test; $p = 0,001471$); za dalších 24 hodin (tj. 48 hodin po infekci) však dochází ke zvýšení množství virové genomové RNA, a to 2,07x (t-test; $p = 0,004715$). U varianty OASLb je na hladině významnosti 5% signifikantní změna pouze u vzorku 48 hodin po infekci, tedy zvýšení hladiny 2,2x (t-test; $p = 0,042221$).

Vzhledem k předchozím výsledkům (velice nízká produkce variant OASLb a OASLd) bylo v následujících pokusech pracováno pouze s variantou OASLa. Pro detekci možného vlivu infekce VKE na overexpresi proteinu OASLa byla provedena analýza jak na úrovni transkripce, tak na úrovni tranlace (detekcí proteinu). OASLa mRNA byla detekována pomocí qRT-PCR (Obrázek 25) použitím primerů OASL qPCR F a OASL qPCR R. Protein OASLa byl detekován imunoblotem využitím protilátky anti-FLAG. Vzorky byly získány z buněk transfekovaných plasmidem OASLa 24 hodin po infekci VKE. Vzorek byl zpracován pomocí RNA Blue (současná izolace RNA i proteinů). V infikovaných buňkách nebyly detekovány odlišné hladiny OASLa mRNA oproti neinfikovaným kontrolním buňkám.

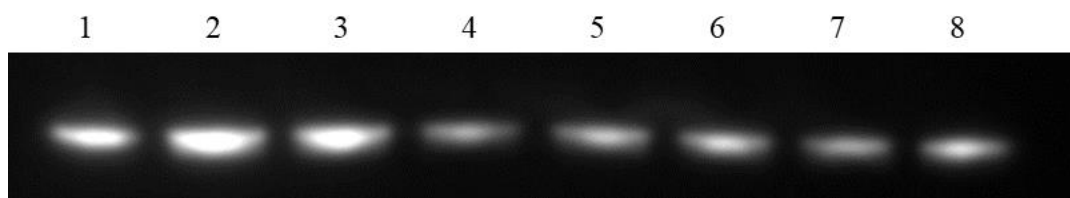


Obrázek 25: qRT-PCR detekce mRNA pro OASLa v infikovaných a kontrolních buňkách DAOY. Analyzováno metodou $\Delta\Delta$ -Ct.

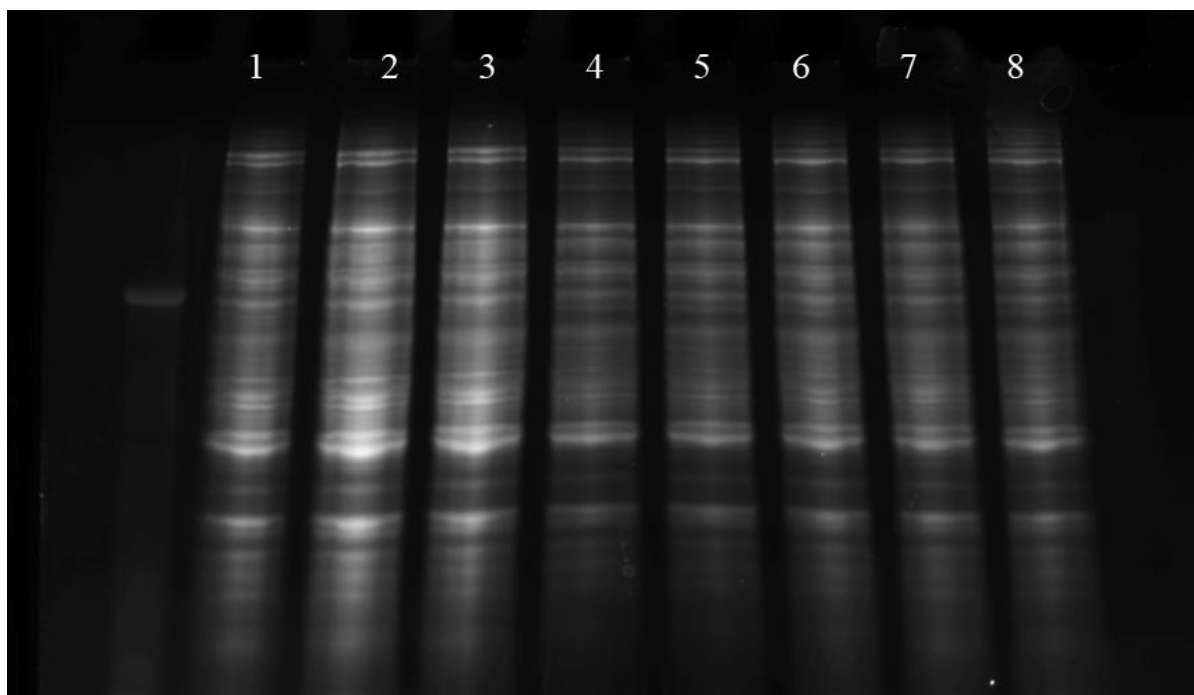
Pro detekci proteinu OASLa v buňkách byl proveden imunoblot za pomoci anti-FLAG protilátek (Obrázek 26); následně byla membrána stripována a provedena nanášecí kontrola za použití anti-GAPDH protilátek (Obrázek 27). Jako další nanášecí kontrola byl pořízen Stain-free obrázek gelu před blotováním (Obrázek 28). Pořadí vzorků pro obrázky (Obrázky 26 – 28) je shodné, neboť pochází z jedné SDS-PAGE. Vzorky infikované jsou označeny čísly 1-3, vzorky bez infekce čísly 4-6, vzorky prázdného vektoru bez infekce 7 a 8.



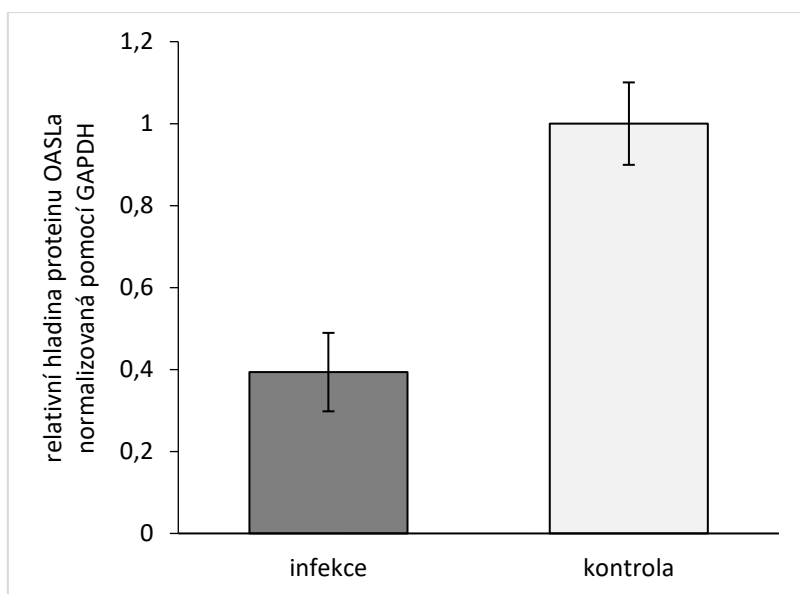
Obrázek 26: Western blot vzorků proteinu OASLa po infekci virem. Infekce (1-3), bez infekce (4-6), prázdný vektor (7,8). Chemiluminiscence.



Obrázek 27: GAPDH nanášecí kontrola vzorků proteinu OASLa. Chemiluminiscence.



Obrázek 28: SDS-PAGE vzorků proteinu OASLa po infekci, Stain free gel před blotováním.



Obrázek 29: Expres proteinu OASLa v infikovaných buňkách vztažená k neinfikované kontrole. Kvantifikace měřením intenzity chemiluminiscence (normalizováno pomocí GAPDH) (t-test; $p = 0,002945$).

Na základě měření intenzity signálu chemiluminiscence byl detekován signifikantní pokles overexpres proteinu OASLa v infikovaných buňkách, a to 0,39x ve srovnání s buňkami neinfikovanými (t-test; $p = 0,002945$).

Diskuse

Naše země má, co se týče infekcí virem KE, jednu z největších prevalencí, ani v některých dalších státech nejsou podobná čísla neobvyklá (Süss 2008). Přestože proti klíšťové encefalitidě se již dlouho běžně očkuje, infekce virem KE stále patří k závažným infekčním onemocněním nervové soustavy, na které navíc neexistuje kauzální léčba. Principem léčby je stále jen tlumení příznaků, ne zacílení na příčinu onemocnění. Navíc právě Jihočeský kraj je co do výskytu infikovaných klíšťat a počtu pacientů na špičce republikových žebříčků (Kříž et al. 2013).

Přestože první zprávy o protivirovém účinku oligořetězce adenosinu byly publikovány na počátku osmdesátých let (Hovanessian and Wood, 1980), tak poslední popsany člen skupiny proteinů OAS, protein OASL, byl popsán až koncem let devadesátých (Hartmann et al. 1998). Studium jeho potenciálu ohledně zefektivnění protivirové imunity je ale záležitostí posledních let. Protivirový účinek proteinu OASL byl pozorován u několika virů, jako například u viru hepatitidy C (Ishibashi et al. 2010), viru encefalomyokarditidy (EMCV) (Marquez et al. 2008), respiračnímu syncytiálnímu viru (Dhar et al. 2015), Sendai viru a virus vezikulární stomatitidy (Zhu et al. 2014). Vliv interferonu, infekce virem KE a jejich kombinací na změny v transkripční aktivitě genů stimulovaných interferony v lidských medulloblastech (Selinger et al. 2017). Na základě těchto dat z transkriptomiky byly geny takto ovlivněné rozděleny na indukované a reprimované. Jedním z genů indukovaných infekcí virem KE a kombinací vlivu viru a interferonu byl i gen pro OASL, jímž se zabývá tato práce. Pro veškeré pokusy s infekcí byly používány buněčné linie DAOY derivované ze zhoubného nádoru oblasti mozečku – myeloblastomu (Jacobsen et al. 1985). Tyto buňky byly využity na základě skutečnosti, že právě neurony mozečku jsou jedním z privilegovaných cílů viru KE (Gelpi et al. 2005). Ve výše zmíněné práci s transkriptomiky byl i potvrzen neuronální, též i nádorový, původ buněk DAOY detekcí specifických markerů neuronálního původu, resp. markerů zhoubného bujení. Ze zmíněných pokusů bylo zjištěno i ideální množství viru používaného k infekci právě této buněčné linie (Selinger et al. 2017).

Prvotní fází projektu bylo namnožení expresních vektorů a zároveň ověření sekvence ORF pro všechny tři expresní varianty OASL. Expresní vektory byly dodány komerčně ve formě vektoru pro savčí buňky s cytomegalovirovým (CMV) promotorem a otevřeným čtecím rámcem dané varianty OASL. Jako kontrolní prázdný vektor byl použit vektor s genem pro ampicilinovou rezistenci a CMV promotorem bez kódující sekvence (Teng et al., 2012). Po úspěšné transformaci a selekci pozitivních klonů byla sekvenací vyloučená přítomnost možných mutací v genu, popř. posun čtecího rámce, čímž by vznikly defektní proteiny

postrádající vlastnosti původních proteinů OASL. Restrikční analýzou byla následně ověřena kontinuita expresního vektoru.

Pro neuspokojivé výsledky ohledně viability buněk po transfekci reagensí Lipofectamin 2000, který byl běžně používaným reagens v laboratoři, byla ověřena možnost použití nového transfekčního reagens PolyJet. Pro možnost rychlé kvantifikace výsledků bylo využito GFP vektoru. Na základě měření intenzity fluorescence proteinu GFP a následně i intenzity chemiluminiscence při použití western blotu (imunodetekce OASLa varianty anti-FLAG protilátkami) se podařilo určit vhodné transfekční podmínky pro použitou buněčnou linii DAOY. Takto optimalizované podmínky transfekce pro linii DAOY byly následně využívány pro veškeré další dílčí pokusy, ale také pro pokusy ostatních kolegů pracujících s touto linií. Správně probíhající overexprese všech variant proteinu OASL byla ověřována na transkripční i translační úrovni. V rámci analýzy produkce na úrovni proteinů jsem otestoval detekci OASL variant pomocí anti-OASL a anti-FLAG protilátek (imunodetekce pomocí western blotu a imunofluorescenční mikroskopie). Pomocí anti-OASL protilátek jsme nebyli schopni detekovat žádný signál ani u jedné z dvou metod. V případě anti-FLAG protilátek jsem byl pomocí imunoblotu schopen detekovat pouze OASLa variantu (pomocí terciárního značení), zatímco za použití imunofluorescenční mikroskopie jsem byl schopen detekovat jak OASLa, tak v menší míře i OASLb a OASLd varianty. Důvod pro nižší míru produkce variant OASLb a OASLd není zcela jasný, může být zapříčiněna jejich přímou degradací v transfekovaných buňkách a změnou stabilitou mRNA u různých splice variant podobně jako u jiných proteinů (‘t Hoen et al. 2011); obě varianty postrádají určitou část sekvence, která může být klíčová pro jejich stabilitu a funkci ve zkoumané linii DAOY. Toto platí zejména u varianty OASLb, která díky posunutí čtecího rámce obsahuje na začátku pátého exonu stopkodon a nekóduje tedy C-terminální část s dvěma UBQ doménami zodpovědnými za interakci s receptorem RIG-I (Guo et al., 2012; Zhu et al., 2014).

Abychom vyloučili možnost degradace mRNA variant OASLb a OASLd, provedli jsme analýzu exprese mRNA pro všechny varianty OASL pomocí Northern blotu. Silný signál velikostně odpovídající mRNA všech tří variant OASL prokázal, že ke změnám v expresi u OASLb a OASLd dochází na úrovni translace. Nepřítomnost signálu pro OASL mRNA u vzorků infikovaných VKE odhalila, že hladiny přirozeně transkribované OASL mRNA jsou pod hranicí detekovatelnosti touto metodou.

Na základě pozorování z imunofluorescence byla určena buněčná lokalizace jednotlivých variant OASL. OASLa byl lokalizován v cytoplasmě, OASLb v granulích poblíž

buněčného jádra a OASLd se nacházel v jádře. Jaderná lokalizace odpovídá přítomnosti jaderného signálního peptidu na C-konci proteinu (Choi et al. 2015). Lokalizace OASL obsahujícího UBP domény v jádře a stresových granulích byla u OASL také popsána (Zhu et al. 2014).

Po charakterizaci kinetiky transientní exprese byl testován vliv všech variant OASL na průběh infekce VKE, a to analýzou produkce virových částic (plaková titrace) a relativní kvantifikací genomové RNA VKE uvnitř buněk (qRT-PCR). Žádná z OASL variant výrazně neovlivnila produkci viru v pozorovaných intervalech (24 a 48 hodin po infekci). Analýza produkce genomové RNA VKE ovšem odhalila náznak antivirového efektu v případě OASLa – 24 hodin po infekci byla hladina genomové RNA VKE signifikantně snížena oproti kontrole. Tento efekt však po dalších 24 hodinách mizí. Snížení produkce virové RNA může naznačovat zpomalení produkce nových virionů v počáteční fázi infekce. V rozmanitosti výsledků pokusu s infekcí virem KE může být začleněn faktor, že již byly pozorována tkáňová specifita některých virů ze IV. Skupiny Baltimorovy klasifikace. Jelikož nervové buňky odlišného anatomického určení mají různé mechanismy imunitní odpovědi, mohou se i tyto výsledky lišit od možných výsledků při použití jiné neuronální linie (Cho et al. 2013).

Po zamyšlení nad výsledky pokusu zjistit možný vliv proteinů OASL na průběh infekce byl navržen i obrácený postup – zda není overexprese proteinů OASL ovlivněna přítomností viru KE v buňkách. Tyto jevy, tedy virem indukované snížení produkce mRNA, potažmo proteinu, byly již v minulosti pozorovány (Aranda and Maule 1998, Lloyd 2006, Hanson et al. 2012). Jelikož vliv bylo nutné detekovat jak na úrovni RNA, tak i na úrovni proteinů, byly prováděny pouze pokusy s variantou OASLa, u které se nám podařilo úspěšně detekovat mRNA i protein. Na úrovni RNA nedocházelo k žádným virem-indukovaným změnám v hladinách OASLa mRNA v infikovaných buňkách vůči kontrole. Kvantifikace OASLa na proteinové úrovni odhalila překvapivé výsledky – přítomnost VKE vedla ke statisticky signifikantnímu snížení hladiny OASLa. Tyto výsledky naznačují virem indukovanou inhibici translace či cílenou degradaci OASLa, jakožto efektoru imunitní odpovědi hostitelské buňky. V případě virem-indukované obecné inhibice iniciace translace existuje řada studií popisujících rozmanité mechanismy daného jevu; například zastavení vlastního translačního procesu na základě buněčné detekce virové RNA opatřené 5' čepičkou a poly-A koncem (Khapersky et al. 2014) nebo ovlivněním translační aktivity fosforylací eukaryotického iniciačního faktoru 2 (Toribio and Ventoso 2010). U flavivirů však tento jev nebyl dosud popsán. Naopak specifická degradace určitého proteinu byla popsána i u flavivirů; konkrétně se jedná o ISG viperin (indukce degradace proteinu viperin proteasomem či

degradace mRNA RNA-interferencí) (Chan et al. 2008) či skupinu RNA vázajících proteinů G3BP (přímá inhibice jejich aktivity vazbou virové RNA a tím inhibice translace ISG) (Bidet et al. 2014). Na základě předběžných výsledků naší laboratoře (Selinger, nepublikovaná data) je vysoce pravděpodobné, že infekce VKE obecně snižuje celkovou translační aktivitu infikovaných buněk.

Závěr:

- 1) Expresní plasmidy pro jednotlivé varianty proteinu OASL byly namnoženy a byla ověřena správnost sekvence těchto plasmidů.
- 2) Transfekční podmínky pro použití expresních plasmidů na lidských DAOY buňkách byly optimalizovány a byla stanovena základní kinetika exprese varianty proteinu OASLa. Navíc byla zjištěna buněčná lokalizace exprese všech variant proteinu OASL. Také byla ověřena funkčnost expresních vektorů detekcí mRNA pro jednotlivé varianty OASL.
- 3) Nebyl detekován vliv proteinu OASL na množství viru klíšťové encefalitidy v buňkách. Byl detekován vliv proteinu OASLa na snížení virové RNA v buňkách v rané fázi infekce. Zároveň bylo detekováno snížení exprese proteinu OASLa v infikovaných buňkách. Nebylo však detekováno snížení produkce mRNA pro OASLa v infikovaných buňkách.

Seznam literatury

Abt MC, Osborne LC, Monticelli LA, Doering TA, Alenghat T, Sonnenberg GF, Paley MA, Antenus M, Williams KL, Erikson J, Wherry EJ, Artis D. (2012) Commensal bacteria calibrate the activation threshold of innate antiviral immunity. *Immunity*. 37:158–170.

Akira S, Takeda K. (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 4:499–511.

Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*. 413:732–738.

Aranda M, Maule A. (1998) Virus-induced host gene shutoff in animals and plants. *Virology*. 243:261-267.

Baltimore D (1971). Expression of animal virus genomes. *Bacteriological reviews*, Bancerek J, Poss ZC, Steinparzer I, Sedlyarov V, Pfaffenwimmer T, Mikulic I, Dölken L, Strobl B, Müller M, Taatjes DJ, Kovarik P. (2013) CDK8 kinase phosphorylates transcription factor STAT1 to selectively regulate the interferon response. *Immunity*. 38:250–262.

Bidet K, Dadlani D, Garcia-Blanco MA. (2014) G3BP1, G3BP2 and CAPRIN1 are required for translation of interferon stimulated mRNAs and are targeted by a dengue virus non-coding RNA. *PLoS Pathog*. 10:e1004242.

Bonnevie-Nielsen V, Field LL, Lu S, Zheng DJ, Li M, Martensen PM, Nielsen TB, Beck-Nielsen H, Lau YL, Pociot F. (2005) Variation in antiviral 2',5'-oligoadenylate synthetase (2' 5' AS) enzyme activity is controlled by a single-nucleotide polymorphism at a splice-acceptor site in the OAS1 gene. *Am J Hum Genet*. 76:623–633.

Bowie A, O'Neill LA. (2000) The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol*. 67:508–514.

Bruns AM, Leser GP, Lamb RA, Horvath CM. (2014) The innate immune sensor LGP2 activates antiviral signaling by regulating MDA5-RNA interaction and filament assembly. *Mol Cell*. 55:771-781.

de Weerd NA, Nguyen T. (2012) The interferons and their receptors--distribution and regulation. *Immunol Cell Biol.* 90:483-91.

Decker T, Müller M, Stockinger S. (2005) The yin and yang of type I interferon activity in bacterial infection. *Nat Rev Immunol.* 5:675-87.

Dhar, J., Cuevas, R. A., Goswami, R., Zhu, J., Sarkar, S. N., & Barik, S. (2015). 2'-5'-Oligoadenylate synthetase-like protein inhibits Respiratory syncytial virus replication and is targeted by the viral nonstructural protein 1. *J Virol.* 89:10115–10119.

Dixit E, Boulant S, Zhang Y, Lee AS, Odendall C, Shum B, Hacohen N, Chen ZJ, Whelan SP, Fransen M, Nibert ML, Superti-Furga G, Kagan JC. (2010) Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity. *Cell.* 141:668-681.

Dobler G, Gniel D, Petermann R, Pfeffer M. (2012) Epidemiology and distribution of tick-borne encephalitis. *Wiener Medizinische Wochenschrift Wiener Medizinische Wochenschrift.* 162:230-238.

Dobler G. (2010) Zoonotic tick-borne flaviviruses. *Vet Microbiol.* 140:221-228.

Dumpis U, Crook D, Oksi J. (1999) Tick-borne encephalitis. *Clin Inf Dis.* 28: 882-890.

Ecker M, Allison SL, Meixner T, Heinz FX (1999) Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *J Gen Virol.* 80:179-185

Eskildsen S, Hartmann R, Kjeldgaard NO, Justesen J. (2002) Gene structure of the murine 2'-5'-oligoadenylate synthetase family. *Cell Mol Life Sci.*; 59:1212–1222.

Fuchs SY. (2013) Hope and fear for interferon: the receptor-centric outlook on the future of interferon therapy. *J Interferon Cytokine Res.* 33:211–225.

Gack MU, Shin YC, Joo CH, Urano T, Liang C, Sun L, Takeuchi O, Akira S, Chen Z, Inoue S, Jung JU. (2007) TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature.* 446:916-920.

Ge Y, Mansell A, Ussher JE, Brooks AE, Manning K, Wang C, Taylor JA. (2013) Rotavirus NSP4 triggers secretion of pro-inflammatory cytokines from macrophages via Toll-Like Receptor-2. *J Virol.* 87:11160-11167.

Gelpi E, Preusser M, Laggner U, Garzuly F, Holzmann H, Heinz FX, Budka H. (2006) Inflammatory response in human tick-borne encephalitis: analysis of postmortem brain tissue. *J Neurovirol.* 12:322-327.

Ghosh A, Sarkar SN, Guo WD, Bandyopadhyay S, Sen GC. (1997) Enzymatic activity of 2'-5'-oligoadenylate synthetase is impaired by specific mutations that affect oligomerization of the protein. *J Biol Chem.* 272:33220–33226.

Goubau D, Deddouche S, Reis ESC. (2013) Cytosolic sensing of viruses. *Immunity.* 38:855–869.

Gough DJ, Messina NL, Clarke CJ, Johnstone RW, Levy DE. (2012) Constitutive type I interferon modulates homeostatic balance through tonic signaling. *Immunity.* 36:166–174.

Gracias DT, Stelekati E, Hope JL, Boesteanu AC, Doering TA, Norton J, Mueller YM, Fraietta JA, Wherry EJ, Turner M, Katsikis PD. (2013) The microRNA miR-155 controls CD8⁺ T cell responses by regulating interferon signaling. *Nature Immunol.* 14:593–602.

Grygorczuk S, Mierzynska D, Zrodowska A, Zajkowska J, Pancewicz S, Kondrusik M, Swierzbinska R, Pryszyk J, Hermanowska-Szpakowicz T. (2002) Tick-borne encephalitis in north-eastern Poland in 1997–2001: a retrospective study. *Scand J Infect Dis.* 34:904-909

Günther G, Haglund M, Lindquist L, Forsgren M, Sköldenberg B (1997) Tick-borne encephalitis in Sweden in relation to aseptic meningoencephalitis of other etiology: a prospective study of clinical course and outcome *J Neurol.* 244:230-238

Guo X, Li X, Xu Y, Sun T, Yang G, Wu Z, Li E. (2012) Identification of OASL d, a splice variant of human OASL, with antiviral activity. *Int J Biochem Cell Biol.* 44:1133-1138.

Haglund M, Günther G. (2003) Tick-borne encephalitis-pathogenesis, clinical course and long-term follow-up. *Vaccine.* 21(Suppl 1):S11–S18

Haglund M, Forsgren M, Lindh G, Lindquist L. (1996) A 10-year follow-up study of tick-borne encephalitis in the Stockholm area and a review of the literature: need for a vaccination strategy *Scand J Infect Dis.* 28:217-224

Hanson PJ, Zhang HM, Hemida MG, Ye X, Qiu Y, Yang D. (2012) IRES-dependent translational control during virus-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Front Microbiol.* 3:92.

- Hayashi K, Iwasaki A. (2013) Different routes to the same destination. *Elife*. 2:e00572.
- Heinz FX, Allison SL (2003) Flavivirus structure and membrane fusion. *Adv Virus Res*. 59:63-97.
- Holzmann H. (2003) Diagnosis of tick-borne encephalitis. *Vaccine*. 21(Suppl 1): S 36–S40.
- Horner SM, Liu HM, Park HS, Briley J, Gale M Jr. (2011) Mitochondrial-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) form innate immune synapses and are targeted by hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci*. 108:14590-14595.
- Hovanessian AG, Wood JN. (1980) Anticellular and antiviral effects of pppA(2'p5'A)n. *Virology*. 101:81-90.
- Hovnanian A, Rebouillat D, Mattei MG, Levy ER, Marié I, Monaco AP, Hovanessian AG. (1998) The human 2',5'-oligoadenylate synthetase locus is composed of three distinct genes clustered on chromosome 12q24.2 encoding the 100-, 69-, and 40-kDa forms. *Genomics*. 52:267–277.
- Hu X, Herrero C, Li WP, Antoniv TT, Falck-Pedersen E, Koch AE, Woods JM, Haines GK, Ivashkiv LB. (2002) Sensitization of IFN- γ Jak-STAT signaling during macrophage activation. *Nature Immunol*. 3:859–866.
- Chan YL, Chang TH, Liao CL, Lin YL. (2008) The cellular antiviral protein viperin is attenuated by proteasome-mediated protein degradation in Japanese encephalitis virus-infected cells. *J Virol*. 82:10455-10464.
- Cheon H, Holvey-Bates EG, Schoggins JW, Forster S, Hertzog P, Imanaka N, Rice CM, Jackson MW, Junk DJ, Stark GR. (2013) IFN β -dependent increases in STAT1, STAT2, and IRF9 mediate resistance to viruses and DNA damage. *EMBO J*. 32:2751–2763.
- Cho H, Proll SC, Szretter KJ, Katze MG, Gale M Jr, Diamond MS. (2013) Differential innate immune response programs in neuronal subtypes determine susceptibility to infection in the brain by positive-stranded RNA viruses. *Nat Med*. 19:458-64.
- Choi UY, Kang JS, Hwang YS, Kim YJ. (2015) Oligoadenylate synthase-like (OASL) proteins: dual functions and associations with diseases. *Exp Mol Med*. 6;47:e144.
- Ishibashi M, Wakita T, Esumi M. (2010) 2',5'-Oligoadenylate synthetase-like gene highly induced by hepatitis C virus infection in human liver is inhibitory to viral replication in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 392:397-402.

Iwasaki A. (2012) A virological view of innate immune recognition. *Annu. Rev. Microbiol.* 66:177–196.

Jacobsen PF, Jenkyn DJ, Papadimitriou JM. (1985) Establishment of a human medulloblastoma cell line and its heterotransplantation into nude mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 44:472–485.

Jaenson TG, Talleklint L, Lundqvist L, Olsen B, Chirico J, Mejlom H. (1994) Geographical distribution, host associations, and vector roles of ticks (Acari: *Ixodidae*, *Argasidae*) in Sweden *J Med Entomol.* 31:240-256.

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.

Kaiser R. (2008) Tick-borne encephalitis. *Infectious Disease. Clinics of North America.* 22: 561-575.

Kawai T, Akira S. (2007) Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med.* 13:460–469.

Kawai T, Akira S. (2011) Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity.* 34:637–650.

Kawashima T, Kosaka A, Yan H, Guo Z, Uchiyama R, Fukui R, Kaneko D, Kumagai Y, You DJ, Carreras J, Uematsu S, Jang MH, Takeuchi O, Kaisho T, Akira S, Miyake K, Tsutsui H, Saito T, Nishimura I, Tsuji NM. (2013) Double-stranded RNA of intestinal commensal but not pathogenic bacteria triggers production of protective interferon- β . *Immunity.* 38:1187–1197.

Khaperskyy DA, Emara MM, Johnston BP, Anderson P, Hatchette TF, McCormick C. (2014) Influenza A virus host shutoff disables antiviral stress-induced translation arrest. *PLoS Pathog.* 10:e1004217.

Kowalinski E, Lunardi T, McCarthy AA, Luber J, Brunel J, Grigorov B, Gerlier D, Cusack S. (2011) Structural basis for the activation of innate immune pattern-recognition receptor RIG-I by viral RNA. *Cell.* 147:423-435

KREJSEK, Jan a Otakar KOPECKÝ. (2004) *Klinická imunologie.* 1. vyd. Hradec Králové: NUCLEUS HK, 941 s. ISBN 808622550X.

Kristiansen H, Scherer CA, McVean M, Iadonato SP, Vends S, Thavachelvam K, Steffensen TB, Horan KA, Kuri T, Weber F, Paludan SR, Hartmann R. (2010) Extracellular

2'-5' oligoadenylate synthetase stimulates RNase L-independent antiviral activity: a novel mechanism of virus-induced innate immunity. *J Virol.* 84:11898–11904.

Kříž B, Beneš C, Daniel M, Malý M. (2013) [Incidence of tick-borne encephalitis in the Czech Republic in 2001-2011 in different administrative regions and municipalities with extended power]. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 2013 62:9-18. Czech.

Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP, Tripp RA, Walsh EE, Freeman MW, Golenbock DT, Anderson LJ, Finberg RW. (2000) Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol.* 1:398–401.

Kwon YC, Kang JI, Hwang SB, Ahn BY. (2013) The ribonuclease L-dependent antiviral roles of human 2',5'-oligoadenylate synthetase family members against hepatitis C virus. *FEBS Lett.* 587:156–164.

Langereis MA, Feng Q, van Kuppeveld FJ. (2013) MDA5 localizes to stress granules, but this localization is not required for the induction of type I interferon. *J Virol.* 87:6314-6325.

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell.* 86:973–983.

Li X, Stark GR. (2002) NF κ B-dependent signaling pathways. *Exp Hematol.* 30:285–296.

Lin RJ, Yu HP, Chang BL, Tang WC, Liao CL, Lin YL. (2009) Distinct antiviral roles for human 2',5'-oligoadenylate synthetase family members against dengue virus infection. *J Immunol.* 183:8035–8043.

Lloyd RE. (2006) Translational control by viral proteinases. *Virus Res.* 119:76-88.

Mansfield KL, Johnson N, Phipps LP, Stephenson JR, Fooks AR, Solomon T. (2009) Tick-borne encephalitis virus – A review of an emerging zoonosis. *J Gen Virol.* 90:1781-1794.

Marques J, Anwar J, Eskildsen-Larsen S, Rebouillat D, Paludan SR, Sen G, Williams BR, Hartmann R. (2008) The p59 oligoadenylate synthetase-like protein possesses antiviral activity that requires the C-terminal ubiquitin-like domain. *J Gen Virol.* 89:2767-2772.

Mickiene A, Laiskonis A, Günther G, Vene S, Lundkvist A, Lindquist L (2002) Tick-borne encephalitis in an area of high endemicity in Lithuania: disease severity and long-term prognosis. *Clin Infect Dis.* 35:650-658.

Misić Majerus L, Daković Rode O, Ruzić Sabljic E. (2009) Post-encephalitic syndrome in patients with tick-borne encephalitis (in Croatian). *Acta Medica Croatica.* 63:269-278.

Mogensen TH, Paludan SR. (2005) Reading the viral signature by Toll-like receptors and other pattern recognition receptors. *J Mol Med (Berl).* 83:180–192.

Mukhin KY, Mameniskiene R, Mironov MB, Kvaskova NE, Bobylova MY, Petrukhin AS, Wolf P (2012) Epilepsia partialis continua in tick-borne Russian spring-summer encephalitis. *Acta Neurologica Scandinavica.* 125:345-352.

Oganesyan G, Saha SK, Guo B, He JQ, Shahangian A, Zarnegar B, Perry A, Cheng G. (2006) Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and independent antiviral response. *Nature.* 439:208–211.

Onomoto K, Jogi M, Yoo JS, Narita R, Morimoto S, Takemura A, Sambhara S, Kawaguchi A, Osari S, Nagata K, Matsumiya T, Namiki H, Yoneyama M, Fujita T. (2012) Critical role of an antiviral stress granule containing RIG-I and PKR in viral detection and innate immunity. *PLoS ONE.* 7:e43031

Osterlund PI, Pietila TE, Veckman V, Kotenko SV, Julkunen I. (2007) IFN regulatory factor family members differentially regulate the expression of type III IFN (IFN-lambda) genes. *J Immunol.* 179:3434–3442.

Paludan SR, Bowie AG. (2013) Immune sensing of DNA. *Immunity.* 38:870–880.

Palus M, Vancova M, Sirmarova J, Elsterova J, Perner J, Růžek D. (2017) Tick-borne encephalitis virus infects human brain microvascular endothelial cells without compromising blood-brain barrier integrity. *Virology.* 507:110-122.

Patel JR, Jain A, Chou YY, Baum A, Ha T, García-Sastre A. (2013) ATPase-driven oligomerization of RIG-I on RNA allows optimal activation of type-I interferon. *EMBO Rep.* 14:780-787.

Peisley A, Lin C, Wu B, Orme-Johnson M, Liu M, Walz T, Hur S. (2011) Cooperative assembly and dynamic disassembly of MDA5 filaments for viral dsRNA recognition. *Proc Natl Acad Sci.* 108:21010-21015.

Peisley A, Wu B, Yao H, Walz T, Hur S. (2013) RIG-I forms signaling-competent filaments in an ATP-dependent, ubiquitin-independent manner. *Mol Cell*. 51:573-583.

Pikelj F, Tomazic M, Maticic M, Socan M, I Muzlovic M. (1995) Severe forms of tick-borne meningoencephalitis in Slovenia. *J Infect*. 31:83-85.

Poponnikova TV. (2006) Specific clinical and epidemiological features of tick-borne encephalitis in Western Siberia. *Int J Med Microbiol*. 296(Suppl 40):59-62.

Qiao Y, Giannopoulou EG, Chan CH, Park SH, Gong S, Chen J, Hu X, Elemento O, Ivashkiv LB. (2013) Synergistic activation of inflammatory cytokine genes by interferon- γ -induced chromatin remodeling and Toll-like receptor signaling. *Immunity*. 39:454-469.

Rebouillat D, Hovanessian AG. (1999) The human 2',5'-oligoadenylate synthetase family: interferon-induced proteins with unique enzymatic properties. *J Interferon Cytokine Res.*; 19:295-308.

Roach JC, Glusman G, Rowen L, Kaur A, Purcell MK, Smith KD, Hood LE, Aderem A. (2005) The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102:9577-9582.

Runge S, Sparrer KM, Lässig C, Hembach K, Baum A, García-Sastre A, Söding J, Conzelmann KK, Hopfner KP. (2014) In vivo ligands of MDA5 and RIG-I in measles virus-infected cells. *PLoS Pathog*. 10:e1004081.

Růžek D, Dobler G, Donoso Mantke O. (2010) Tick-borne encephalitis: Pathogenesis and clinical implications. *Travel Medicine and Infectious Disease*. 8:223-232.

Saito T, Hirai R, Loo YM, Owen D, Johnson CL, Sinha SC, Akira S, Fujita T, Gale M Jr. (2007) Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proc Natl Acad Sci*. 104:582-587.

Satoh T, Kato H, Kumagai Y, Yoneyama M, Sato S, Matsushita K, Tsujimura T, Fujita T, Akira S, Takeuchi O. (2010) LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Proc Natl Acad Sci*. 107:1512-1517.

Selinger M, Wilkie GS, Tong L, Gu Q, Schnettler E, Grubhoffer L, Kohl A. (2017) Analysis of tick-borne encephalitis virus-induced host responses in human cells of neuronal origin and interferon-mediated protection. *J Gen Virol*. 98:2043-2060.

Schoggins JW, et al. Schoggins JW, Wilson SJ, Panis M, Murphy MY, Jones CT, Bieniasz P, Rice CM. (2011) A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature*. 472:481–485.

Stark GR, Darnell JE., Jr (2012) The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity*. 36:503–514.

Su X, Yee LJ, Im K, Rhodes SL, Tang Y, Tong X, Howell C, Ramcharran D, Rosen HR, Taylor MW, Liang TJ, Yang H; Virahep-C Study Group. (2008) Association of single nucleotide polymorphisms in interferon signaling pathway genes and interferon-stimulated genes with the response to interferon therapy for chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 49:184–191.

Süss J. (2003) Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. *Vaccine*. 21:S19-S35.

Süss J. (2008) Tick-borne encephalitis in Europe and beyond – The epidemiological situation as of 2007. *Euro Surveill*. 13:18916.

Süss J. (2011) Tick-borne encephalitis: Epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia – An overview. *Ticks Tick-Borne Dis*. 2:2-15.

't Hoen PA, Hirsch M, de Meijer EJ, de Menezes RX, van Ommen GJ, den Dunnen JT. (2011) mRNA degradation controls differentiation state-dependent differences in transcript and splice variant abundance. *Nucleic Acids Res*. 39:556-66.

Takamatsu S, Onoguchi K, Onomoto K, Narita R, Takahasi K, Ishidate F, Fujiwara TK, Yoneyama M, Kato H, Fujita T. (2013) Functional characterization of domains of IPS-1 using an inducible oligomerization system. *PLoS ONE*. 8:e53578.

Takeuchi O, Akira S. (2010) Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 140:805-820.

Tamura T, Yanai H, Savitsky D, Taniguchi T. (2008) The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annu Rev Immunol*. 26:535–584.

Teng TS, Foo SS, Simamarta D, Lum FM, Teo TH, Lulla A, Yeo NK, Koh EG, Chow A, Leo YS, Merits A, Chin KC, Ng LF. (2012) Viperin restricts chikungunya virus replication and pathology. *J Clin Invest*. 122:4447-60.

Tenover BR, Ng SL, Chua MA, McWhirter SM, García-Sastre A, Maniatis T. Multiple functions of the IKK-related kinase IKK ϵ in interferon-mediated antiviral immunity. *Science*. 315:1274–1278.

Toribio R, Ventoso I. (2010) Inhibition of host translation by virus infection in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:9837-9842.

van Boxel-Dezaire AH, Rani MR, Stark GR. (2006) Complex modulation of cell type-specific signaling in response to type I interferons. *Immunity*. 25:361–372.

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 Biol*. 3:RESEARCH0034.1-RESEARCH0034.11.

Venkataraman T, Valdes M, Elsby R, Kakuta S, Caceres G, Saijo S, Iwakura Y, Barber GN. (2007) Loss of DExD/H box RNA helicase LGP2 manifests disparate antiviral responses. *J Immunol*. 178:6444-6455.

Wang JQ, Jeelall YS, Ferguson LL and Horikawa K (2014) Toll-like receptors and cancer: MYD88 mutation and inflammation. *Front Immunol*. 5:367.

Weber M, Gawanbacht A, Habjan M, Rang A, Borner C, Schmidt AM, Veitinger S, Jacob R, Devignot S, Kochs G, García-Sastre A, Weber F. (2013) Incoming RNA virus nucleocapsids containing a 5'-triphosphorylated genome activate RIG-I and antiviral signaling. *Cell Host Microbe*. 13:336-346.

Wu B, Peisley A, Richards C, Yao H, Zeng X, Lin C, Chu F, Walz T, Hur S. (2013) Structural basis for dsRNA recognition, filament formation, and antiviral signal activation by MDA5. *Cell*. 152:276-289.

Xu H, He X, Zheng H, Huang LJ, Hou F, Yu Z, de la Cruz MJ, Borkowski B, Zhang X, Chen ZJ, Jiang QX. (2014) Structural basis for the prion-like MAVS filaments in antiviral innate immunity. *eLife*. 3:e01489.

Yakub I, Lillibridge KM, Moran A, Gonzalez OY, Belmont J, Gibbs RA, Twardy DJ. (2005) Single nucleotide polymorphisms in genes for 2'-5'-Oligoadenylate synthetase and RNase L in patients hospitalized with West Nile virus infection. *J Infect Dis*. 192:1741–1748.

Yarilina A, Park-Min K-H, Antoniv T, Hu X, Ivashkiv LB. (2008) TNF activates an IRF1-dependent autocrine loop leading to sustained expression of chemokines and STAT1-dependent type I interferon-response genes. *Nature Immunol.* 9:378–387.

Yoneyama M, Fujita T. (2010) Recognition of viral nucleic acids in innate immunity. *Rev Med Virol.* 20:4-22.

Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Foy E, Loo YM, Gale M Jr, Akira S, Yonehara S, Kato A, Fujita T. (2005) Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol.* 175:2851-2858.

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. *Nat Immunol.* 5:730-737.

Yoshimura A, Naka T, Kubo M. (2007) SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nature Rev. Immunol.* 7:454–465.

Zhu J, Zhang Y, Ghosh A, Cuevas RA, Forero A, Dhar J, Ibsen MS, Schmid-Burgk JL, Schmidt T, Ganapathiraju MK, Fujita T, Hartmann R, Barik S, Hornung V, Coyne CB, Sarkar SN. (2014) Antiviral activity of human OASL protein is mediated by enhancing signaling of the RIG-I RNA sensor. *Immunity.* 40:936-48.