

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Srovnání replikační dynamiky různých kmenů viru  
klíšťové encefalitidy u primárních lidských mikroglíí a  
myších embryonálních buněk (s odlišnou izoformou  
enzymu Dicer)**

Diplomová práce

**Bc. Lenka Nedvědová**

Školitel:	RNDr. Martin Palus, Ph.D.
Školitel specialista:	Mgr. Václav Hömig, Ph.D.
	Mgr. Veronika Prančlová

České Budějovice 2024

**Bibliografické údaje:**

Nedvědová, L., 2024: Srovnání replikační dynamiky různých kmenů viru klíšťové encefalitidy u primárních lidských mikroglíí a myších embryonálních buněk (s odlišnou izoformou enzymu Dicer). [Comparison of the replication dynamics of different tick-borne encephalitis virus strains in primary human microglia and mouse embryonic cells (with a different Dicer enzyme isoform). Mgr. Thesis, in Czech.] – 56 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Annotation:**

This thesis examines the role of microglia in tick-borne encephalitis virus infection. Strains of TBE virus differing in neurovirulence and neuropathogenicity are compared. The susceptibility of cultures to TBE virus was monitored using immunofluorescent labeling, demonstrating susceptibility of all cultures to TBE virus strains. Microglia play a role in antiviral immune defense against CNS infection by the virus. Furthermore, the thesis explores the role of Dicer protein, a component of the cell's internal antiviral mechanism RNA interference. The function of Dicer protein is extensively studied, particularly regarding cell resistance to viral infection. Mouse embryonic cultures infected with TBEV Hypr and EMCV were utilized for this purpose, assessing viral replication dynamics and immunofluorescent labeling to confirm infection presence.

**Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.**

V Českých Budějovicích,

dne.....

Podpis studenta .....

## **Poděkování**

Touto cestou bych ráda poděkovala celému kolektivu laboratoře RNDr. Martina Paluse, Ph.D. Patří jim mé nevýslovné díky za podporu a cenné rady, které mi poskytovali po celou dobu mého studia. Především chci poděkovat mému školiteli za jeho trpělivost, odborné vedení a příležitosti, které se mi pod jeho vedením naskytly. Dále bych chtěla jmenovitě poděkovat školitelům specialistům, Mgr. Václavu Hönigovi, Ph.D. a Mgr. Veronice Prančlové, kteří mi byli oporou nejen při studiu, ale i v těžkých životních okamžicích. Velice si vážím, že jsem měla tu čest být součástí tohoto vědeckého kolektivu, který mě tolik naučil. V neposlední řadě patří díky mé rodině a přátelům, kteří prožívali se mnou celou dobu studia a bez jejich pomoci by se tato moje studijní cesta neuskutečnila.

Tato práce byla finančně podpořena grantovým projektem GA ČR 20-30500S (řešitel RNDr. Martin Palus, Ph.D.) a projektem SGA (řešitel Bc. Lenka Nedvěďová).

# Obsah

1. Úvod .....	1
1.1. Virus klíšťové encefalitidy.....	1
1.1.1. Subtypy VKE.....	1
1.1.2. Variabilita mezi kmeny.....	2
1.1.3. Replikační cyklus.....	3
1.1.4. Šíření infekce .....	4
1.2. Antivirová imunitní odpověď .....	6
1.2.1. Buněčná vrozená imunita .....	7
1.2.2. Nebuněčná imunita .....	9
2. Cíle práce .....	14
3. Materiál a metody .....	15
3.1. Materiál .....	15
3.1.1. Buněčné kultury.....	15
3.1.2. Virus .....	16
3.2. Metody .....	18
3.2.1. Kultivace.....	18
3.2.2. Nepřímá imunofluorescence mikrogliálních kultur.....	21
3.2.3. Nepřímá imunofluorescence myších embryonálních kultur.....	22
3.2.4. Plaková titrace .....	23
3.2.5. Statistická analýza .....	24
4. Výsledky .....	25
4.1. Mikrogliální kultury a infekce VKE .....	25
4.2. Vliv testované izoformy proteinu Dicer na infekci VKE a EMCV .....	29
4.2.1. Kultivace.....	29
4.2.2. Stanovení koncentrace viru v supernatantu z kultivačního média infikovaných kultur.....	31
5. Diskuze .....	35
6. Závěr .....	38
7. Literární zdroje .....	39
8. Zkratky.....	50
9. Přílohy.....	52

# 1. Úvod

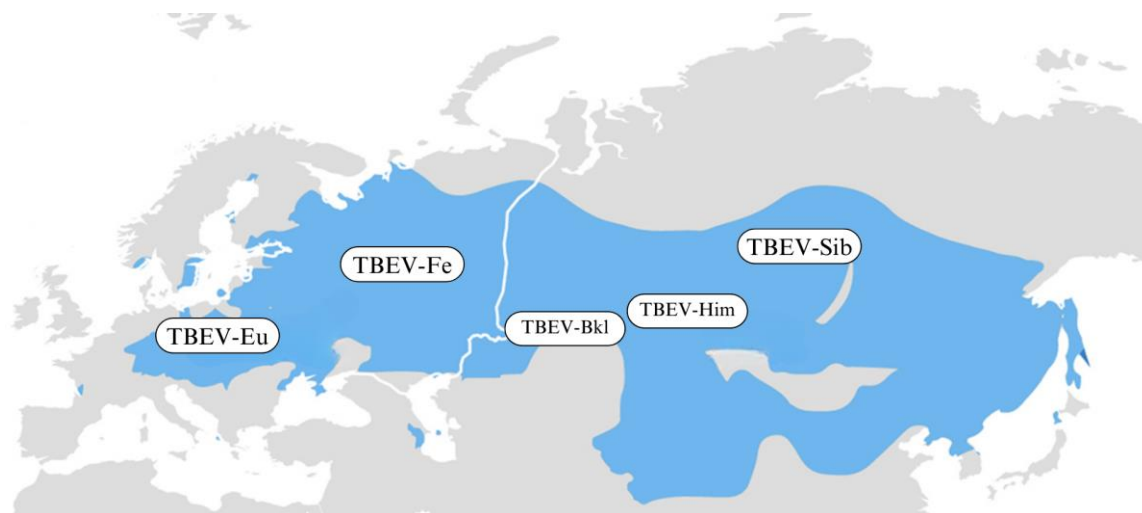
## 1.1. Virus klíšťové encefalitidy

Infekční virové onemocnění, známé pod názvem klíšťová encefalitida, je způsobeno virem klíšťové encefalitidy (VKE). Taxonomická klasifikace založena na genetické analýze situuje VKE do rodu *Orthoflavivirus* v rámci čeledi *Flaviviridae* (Westaway *et al.*, 1985, Kuhn *et al.*, 2022).

### 1.1.1. Subtypy VKE

Klasifikace viru klíšťové encefalitidy je nadále diferencována na jednotlivé subtypy na základě geografického výskytu. Tato taxonomická struktura zahrnuje tři hlavní subtypy: Evropský (TBEV-Eu), Sibiřský (TBEV-Sib) a Dálnovýchodní (TBEV-Fe) (Ecker *et al.*, 1997). Tyto subtypy jsou si geneticky velice blízké, variace v aminokyselinových sekvencích mezi jednotlivými subtypy je 5-6 % (Ecker *et al.*, 1999).

Do této skupiny byly v pozdějších letech začleněny subtypy Baikalský (TBEV-Bkl) (Kovalev a Mukhacheva, 2017) a Himálajský (TBEV-Him) (Demina *et al.*, 2010). Podrobná klasifikace má klíčový význam pro pochopení variability kmenů VKE a jejich případný vliv na patogenезi onemocnění (Ecker *et al.*, 1997).



**Obr.1:** Schématické znázornění výskytu VKE na území euroasijského kontinentu spolu s přibližným výskytem jednotlivých subtypů VKE. (převzato a upraveno z Pozzetto *et al.*, 2023).

Evropský subtyp se vyznačuje dvoufázovým průběhem onemocnění spojený s nízkou mortalitou (0,5-2 %). Převážná většina infekcí tímto subtypem probíhá asymptomaticky pouze ve 20-30 % případů dochází k rozvoji neurologických projevů. I když nákaza tímto subtypem se jeví jako mírnější v porovnání s nákazou východními subtypy, je častěji doprovázena dlouhodobými následky. Přibližně 5 % pacientů může trpět paralýzami a až 60 % pacientů může být postiženo postencefalitickým syndromem (Bogovič *et al.*, 2018; Barp *et al.*, 2020). Nejčastěji se tento subtyp nachází na území západní, střední a z části východní Evropy, avšak lze ho detekovat i na západním Uralu a Sibiři. V zemích východní Evropy a Ruska se setkáváme se subtypem TBEV-Fe. Jeho výskyt byl rovněž zaznamenán napříč území východní Asie. Nákaza tímto subtypem může mít akutní či subklinický průběh. Infekce TBEV-Fe je považována za nejednu z nejtěžších forem KE. Nejčastějším subtypem napříč Euroasijským kontinentem je však TBEV-Sib projevující se méně závažnou formou onemocnění ve srovnání s TBEV-Fe. Naproti tomu nákaza TBEV-Sib je doprovázena chronickými neurologickými či neuropsychiatrickými symptomy výrazně častěji než u ostatních subtypů. Tento subtyp byl detekován převážně na Sibiři, pobaltských zemích a severním Finsku (Dumpis, Crook a Oksi, 1999; Barp *et al.*, 2020).

### **1.1.2. Variabilita mezi kmeny**

Flaviviry sdílejí obdobnou strukturu virionu, genomu a životní cyklus. Jedná se o sférické obalené částice s průměrem 50 nm. Jejich obal je tvořen glykoproteinem E a proteinem M. Uvnitř se nachází nukleokapsida obsahující kapsidový protein C a virový genom, což je jednovláknová RNA s kladnou polaritou (+ssRNA). Tato RNA kóduje tři strukturální (C, prM, E) proteiny a sedm nestrukturních (NS) proteinů. Analýza virových genomových sekvencí odhalila mutace ve virových proteinech, které mají vliv na neuropatogenezi VKE (Kellman *et al.*, 2018).

Hlavními proteiny ovlivňující virulenci a patogenitu jsou strukturální protein E a nestrukturní protein NS5. Protein E má klíčovou roli při vstupu viru do buňky a aktivaci imunitní odpovědi, zatímco protein NS5 představuje RNA-dependentní polymerázu (Kellman *et al.*, 2018).

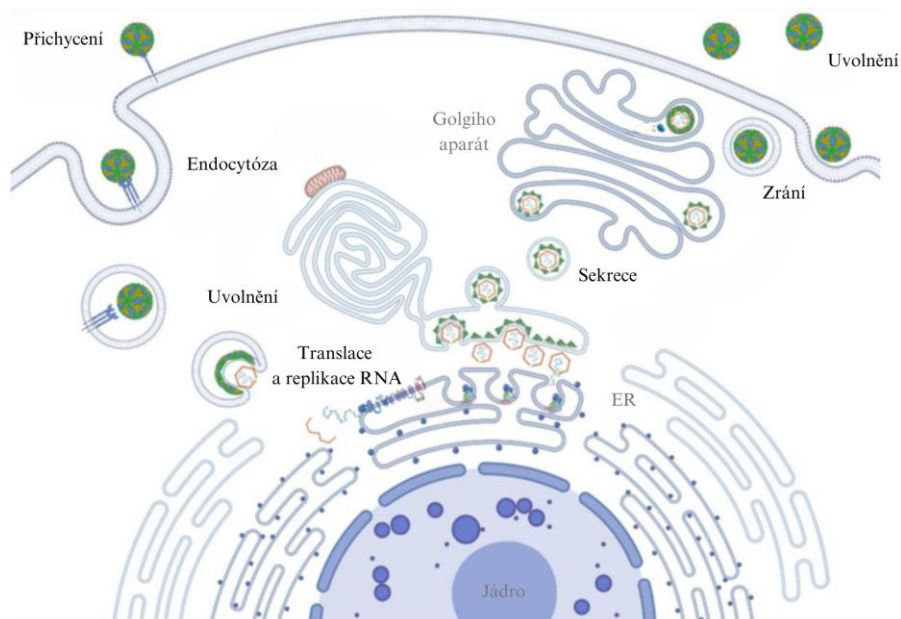
Viry KE sdílejí vysokou míru podobnosti sekvence aminokyselin v proteinu E (až 98%). Ten se sestává ze třech domén a kmenové kotevní oblasti. V sekvencích jednotlivých domén může docházet k nukleotidovým záměnám a tyto záměny se odrážejí na virulenci viru (Holzmann *et al.*, 1990; Ecker *et al.*, 1997; Helmová *et al.*, 2020).

Nestrukturní protein NS5, nejkonzervovanější mezi flavivirovými proteiny, přitahuje pozornost svou úlohou při imunitním úniku a jako účinný inhibitor signální dráhy interferonu typu I. Identifikováno bylo několik vazebných partnerů, podílejících se na neurální funkci. Vazba domény PDZ na NS5 je klíčová pro vývoj neurální dysfunkce během infekce VKE. Mutace v NS5 jsou spojeny se sníženou virulencí, přičemž rozdíly v oblasti antagonismus

IFN-I a možná vazba PDZ jsou hlavními determinanty virulence. Ztráta signalizace IFN-I v počáteční fázi infekce má pravděpodobně větší dopady na progresi onemocnění, neboť inhibuje správné zrání dendritických buněk a indukci proliferaci T buněk (Robertson *et al.*, 2014).

### **1.1.3. Replikační cyklus**

Virus vstupuje do hostitelské buňky pomocí receptorem zprostředkované endocytózy (viz. Obr. 2). Po internalizaci se virion uvolní z receptoru a jeho membrána se sloučí s endozomální membránou, čímž dojde k uvolnění ribonukleokapsidy do cytoplazmy. Nukleokapsida se následně degraduje, odhaluje virovou RNA. Ta je poté translatována ribozomy na povrchu hrubého endoplazmatického retikula (ER) (Westaway *et al.*, 1985). Replikace RNA probíhá formou tvorby kopií negativního řetězce, které slouží jako matrice pro syntézu genomu nové RNA pozitivní polarity. Nově syntetizovaná RNA je zabalena do nukleokapsidů, čímž vznikají nezralé viriony (Leary a Blair, 1980). Tyto nezralé viriony jsou transportovány do Golgiho aparátu, kde dochází k jejich konverzi do zralé infekční formy. Maturované viriony opouštějí buňku pomocí sekreční dráhy a uvolňují se z hostitelských buněk prostřednictvím fúze membrán transportního vezikulu s plazmatickou membránou (Mandl, 2005).



**Obr. 2:** Zjednodušený model replikačního cyklu flavivirů uvnitř buňky. (převzato a upraveno z Van Den Elsen, Quek and Luo, 2021).

#### 1.1.4. Šíření infekce

Virus KE se typicky přenáší do organismu hostitele během sání infikovaného klíštěte. V místě vstupu dochází k subkutánní replikaci viru. Podobně jako u dalších infekcí způsobených flaviviry je pravděpodobné, že Langerhansovy buňky a kožní neutrofilové jsou prvními buňkami, které podléhají infekci (Chambers a Diamond, 2003). Tyto buňky přispívají k přenosu viru do spádových uzlin, ze kterých se infekce šíří do lymfatických orgánů. Následně je virus transportován pomocí makrofágů do lymfatických uzlin, kde dochází k další replikaci viru, která ústí ve virémii. Během virémie dochází k průniku viru skrze hematoencefalickou bariéru (BBB, z ang. „*blood-brain barrier*“) a napadení centrální nervové soustavy (CNS) (Mandl, 2005). Primárním cílem infekce v CNS jsou neurony, virus též napadá astrocyty a další buněčné populace přítomné v mozkové tkáni (Gelpi *et al.*, 2005). Přesný mechanismus, kterým VKE proniká přes hematoencefalickou bariéru není doposud přesně objasněn, přesto je diskutováno několik možných cest, jak tak může virus učinit.



Infekce neurotropními viry může způsobovat změny v permeabilitě BBB a indukovat zánětlivé a protizánětlivé imunitní reakce (Chen and Li, 2021). Ve studii Růžek *et al* (2011) prokázali zvyšování permeability BBB v pozdějších stádiích infekce VKE kdy, již byla v mozku přítomna vysoká virová zátěž. V případě VKE tak bylo prokázáno, že virus je schopen pronikat do CNS ještě před samotným rozrušením BBB.

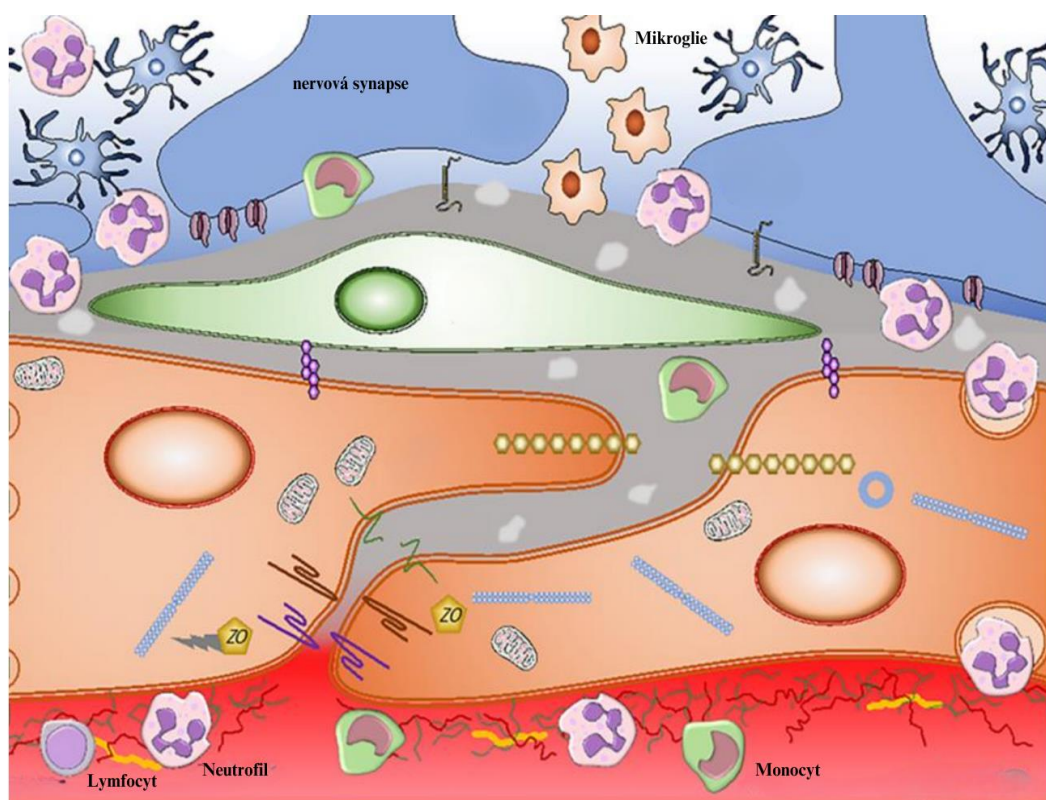
Jedním z možných způsobů viru pro překonání bariéry se jeví hematogenní cesta, a to paracelulární nebo transcelulární (Papa *et al.*, 2017; Al-Obaidi *et al.*, 2018).

Alternativní cestou k virové infekci CNS, aniž by se virus dostával do kontaktu s BBB, může být invaze čichového epitelu, následovaná infekcí čichových neuronů a vstupem do CNS. Další možností pro překonání BBB je mechanismus nazývaný ‘‘trojský kůň‘‘, kdy se infikované imunitní buňky, jako jsou dendritické buňky, makrofágy, neutrofilly, monocyty a T buňky, migrací dostanou do CNS, která může vyústit v infekci neuronů a dalších buněčných populací (Chen a Li, 2021).

#### **1.1.4.1. Hematoencefalitická bariéra**

Hematoencefalitická bariéra je biologická hranice mezi krevním řečištěm a mozkomíšním parenchymem. Tvoří ji komplexní soubor buněčných a extracelulárních složek, který zahrnuje endoteliální buňky, pericyty, kapilární bazální membránu a astrocyty, které jsou vzájemně propojeny těsnými spoji. Tyto komponenty vytvářejí funkční neurovaskulární jednotky, zajišťující homeostázu, ochranu centrálního nervového systému před vnějším prostředím a také zajišťují dodávku živin do mozku prostřednictvím specializovaných transportních systémů (Persidsky *et al.*, 2006).

Dále BBB reguluje pohyb zánětlivých buněk, což umožňuje adaptivní reakci na lokální změny v mikroprostředí CNS. Porucha integrity a funkce BBB (viz. Obr. 3) vede ke vzniku poruchy permeability, což umožňuje unikání škodlivých látek z krve do CNS a buněčnou infiltraci, která přispívá k neurologickým deficitům (Petty a Lo, 2002; Persidsky *et al.*, 2006).



**Obr. 3:** Schématické vyobrazení rozrušené hematoencefalitické bariéry. Znáznorněn je průchod buněk bílé krevní řady skrze, za fyziologických podmínek, nepropustný endotel pro tyto elementy. Dysfunkce BBB a zvýšení její permeability umožní průchod buňkám až do vnitřního prostředí mozku. (převzato a upraveno z Alonso-Alonso *et al.*, 2022).

## 1.2. Antivirová imunitní odpověď

Po vstupu viru do organismu hostitele dochází k jeho vystavování vůči složkám antivirové imunitní obrany, které jsou zaměřeny na neutralizaci infekčního agens nebo na inhibici a zpomalení průběhu infekce (Weber, 2021). Vrozenou imunitní obranu rozlišujeme na několik složek. Mimo mechanické a chemické bariéry se aktivují buněčné faktory, komplementový systém a biologicky aktivní látky, jež jsou uvolňovány v důsledku aktivace specifických buněk imunitního systému (Iannello *et al.*, 2005).

### **1.2.1. Buněčná vrozená imunita**

Do procesu antivirové obrany jsou zapojeny buňky vrozené imunitní odpovědi. Tyto komponenty vzájemně spolupracují a integrují se, aby vytvořili ochranný mechanismus proti virovým patogenům (Weber, 2021).

#### **1.2.1.1. NK buňky**

Během počáteční fáze antivirové imunitní obrany vynikají přirozeně zabíječské buňky (NK buňky), což jsou lymfocyty charakterizované absencí klonálně specifických receptorů (Cerwenka a Lanier, 2001). Jejich aktivace nastává při rozpoznání virových nebo stresových signálů pomocí aktivačních receptorů na povrchu buněčné membrány. Po aktivaci NK buňky ničí infikované buňky především uvolněním perforinů a granzymů a produkují prozánětlivé cytokiny (Van Erp *et al.*, 2019). Role NK buněk byla zkoumána v kontextu různých flavivirových infekcí např. viru Západonilské horečky či viru dengue. Studie prováděné s VKE ukazují určité spojitosti NK buněk se závažností průběhu onemocnění a jeho prognózou (Strauss-Albee *et al.*, 2015; Blom *et al.*, 2016). Reakce NK buněk na infekci VKE byla popsána Blom *et al.* (2016), kteří se zaměřili na analýzu NK buněk v sérech infikovaných pacientů. Jejich zjištění prokazují, že chování NK buněk při infekci VKE se odlišuje od jiných flavivirových infekcí.

#### **1.2.1.2. T lymfocyty**

T lymfocyty jsou aktivní jak v ochranných, tak patogenních reakcích proti virovým patogenům. CD4<sup>+</sup> T lymfocyty, známé jako pomocné T lymfocyty, podporují imunitní odpověď pomocí sekrece efektorových cytokinů, jako je interferon gama (IFN- $\gamma$ ) a tumor nekrosis faktor alfa (TNF- $\alpha$ ), stimulují cytotoxické T lymfocyty a podporují humorální imunitu (Marshall *et al.*, 2018). Cytotoxické (CD8<sup>+</sup>) T lymfocyty jsou schopny přímo likvidovat infikované buňky bez potřeby produkce efektorových cytokinů. Obě podskupiny T lymfocytů vytvářejí trvalé paměťové populace (Bonilla a Oettgen, 2010; Pardy a Richer, 2019).

### 1.2.1.3. Makrofágy

Makrofágy plní klíčovou roli v různých aspektech imunitní odpovědi na patogen. Jejich virová fagocytární funkce je spjata s detekcí, pohlcením a degradací viru, čímž eliminují infekci. Disponují schopností prezentovat antigenní fragmenty viru na svém povrchu, zásadní faktor pro aktivaci adaptivní imunitní odpovědi. Odpověď makrofágů na virovou infekci je komplexně regulována na základě molekulárních signálů (Yu *et al.*, 2022). Aktivované M1 makrofágy produkují prozánětlivé cytokiny jako TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 a IL-23, které podporují antivirovou reakci. Naopak makrofágy diferencované do fenotypu M2 produkují protizánětlivé cytokiny, které tlumí nadměrnou zánětlivou reakci a podporují tkáňové hojení (Shapouri-Moghaddam *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019).

### 1.2.1.4. Mikroglie

V případě, že virová infekce dokáže uniknout detekci buňkami imunitního systému, které se vyskytují v cirkulující krvi, a překoná hematoencefalitickou bariéru, dochází k významnému omezení v možnostech eliminace infekce. Jedinými rezidentními imunitními buňkami, které obývají mozkový parenchym jsou mikroglie. Tato skupina buněk hraje zásadní úlohu při rozvoji zánětlivého procesu v reakci na virovou infekci v CNS (Aguzzi, Barres a Bennett, 2013).

Na rozdíl od makrofágů CNS, které se nacházejí v mozkových plenách, choroidálním plexu a perivaskulárním prostoru, mikroglie představují tkáňové makrofágy lokalizované v mozkovém parenchymu. Vznikají během primitivní hematopoézy ve žloutkovém vaku z prekursorových makrofágů (Alliot, Godin a Pessac, 1999). Tyto primitivní makrofágy migrují do vyvíjející se nervové trubice během embryonálního vývoje, kde se transformují na mikroglie, které následně zůstávají v mozku po celý život (Ginhoux *et al.*, 2010).

Mikroglie jsou dlouho žijící a samoobnovující se buňky, které interagují s prvky neurovaskulární jednotky a složkami periferní imunity, integrují signály a v závislosti na nich modulují svůj fenotyp, aby ovlivnily funkce BBB (Kang *et al.*, 2020). Při patologickém poškození tkáně přecházejí mikroglie z klidového na aktivovaný fenotyp, jehož stupeň koreluje s typem a závažností poškození mozku (Ronaldson a Davis, 2020). Klasifikace buněk je často prováděna na základě systému odvozeného z klasifikace periferních makrofágů, který rozlišuje mezi M1 (prozánětlivý profil) a M2 (protizánětlivý profil) (Sica a Mantovani, 2012; Tang a Le, 2016). K rozpoznání poškozené tkáně či onemocnění disponují mikroglie receptory pro neurotransmitery a receptory rozpoznávající molekulární znaky spojené s nebezpečím (DAMP), jako je adenosin trifosfát (ATP) nebo molekulární

znaky asociované s patogeny (PAMP) např. lipopolysacharid či virová DNA a RNA. Tyto receptory poskytují signály, které vyvolávají změny mikroglialního profilu z homeostatického na aktivovaný (M1 či M2) (Colonna a Butovsky, 2017).

Aktivované mikroglie typu M2 se vyznačují účinky vedoucími k regeneraci poškozené tkáně. Zprostředkovávají produkci protizánětlivých cytokinů (IL-10, TGF- $\beta$ ) a široké škály růstových faktorů přispívajících k obnově tkáně. Produkci cytokinů snižují zánětlivou odpověď a nábor neutrofilů do místa poranění (Kang *et al.*, 2020). Podporují fagocytózu buněčných úlomků a rekonstrukci extracelulární matrix. Rovněž podporují přežití neuronů pomocí neurotrofických faktorů (Colonna a Butovsky, 2017; Nguyen *et al.*, 2017).

Naopak aktivované mikroglie fenotypu M1 jsou spojovány s progresí neurodegenerativního poškození. Tento typ aktivace mikroglíí ovlivňuje funkci samotné hematoencefalitické bariéry. Hlavními cytokiny a chemokiny, které produkují prozánětlivé mikroglie jsou TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  a IL-12. Dále exprimují celou řadu složek např. nikotinamid adenindinukleotid fosfát (NADH) oxidázu, integriny (CD11b, CD11c) a mnohé další látky. Uvolňování zánětlivých modulátorů vede k hyperpermeabilitě bariéry v jejímž důsledku, dochází k infiltraci mozkové tkáně imunitními buňkami z periferní krve, které zpětně ovlivňují samotné mikroglie (McGeer a McGeer, 1995; Ronaldson a Davis, 2020).

### **1.2.2. Nebuněčná imunita**

V humorální vrozené imunitní odpovědi hrají klíčovou úlohu cytokiny a chemokiny, jež mají významný vliv na reakci hostitele na virové infekce a imunopatologii spojenou s mnoha virovými onemocněními. Mnoho virových glykoproteinů interaguje s konkrétními buněčnými receptory, což přímo stimuluje buňky k sekreci cytokinů a chemokinů. Kromě toho interferuje virová RNA a řada virových proteinů s intracelulární lokalizací s transdukčními mechanismy buněčné signalizace a aktivitou transkripčních faktorů, což následně podporuje replikaci viru a expresi prozánětlivých proteinů (Mogensen a Paludan, 2001; Seth, Sun a Chen, 2006).

### **1.2.2.1. Antivirové cytokiny**

Antivirové cytokiny jsou klíčovými regulátory imunitního systému, které hrají zásadní roli v boji proti virům. Jedná se o skupinu signálních molekul produkovaných různými buňkami imunitního systému, jako jsou například lymfocyty, makrofágy a dendritické buňky. Mezi nejznámější antivirové cytokiny patří interferon typu I (např. IFN- $\alpha$  a INF- $\beta$ ) a interferony typu III (IFN- $\lambda$ ). Tyto cytokiny jsou produkovány jako odpověď na detekci virových částic v organismu a spouštějí řadu komplexních reakcí (Seth, Sun a Chen, 2006).

Jejich hlavní úlohou je potlačení replikace viru a šíření infekce skrze aktivaci signálních drah. Kromě toho mohou antivirové cytokiny stimulovat aktivitu imunitních buněk, které se specializují na likvidaci buněk infikovaných virem. Díky svým účinkům hrají antivirové cytokiny klíčovou roli v ochraně organismu před virovou infekcí a jsou důležitou součástí imunitního systému (Weber, 2021).

### **1.2.2.2. RNA interference**

RNA interference (RNAi) představuje regulační buněčný mechanismus, který ovlivňuje translační útlum genů po jejich transkripci. V důsledku přítomnosti virové +ssRNA VKE v buňce dochází k jejímu překladu do jednoho polyproteinu pomocí ribozomů ER. Vznikající polyprotein obsahuje jak strukturní, tak i nestrukturní proteiny, které jsou potřebné pro replikaci viru. Ten je poté štěpen na své základní části pomocí koaktivity virové proteázy NS3 a hostitelských proteáz. Během replikačního procesu se vytváří meziproducty, dvouvláknové RNA (dsRNA). Přítomnost dsRNA v buňce indukuje sekvenčně specifickou degradaci homologní RNA prostřednictvím proteinu Dicer. To vede k produkci fragmentů dsRNA o délce 21-23 nukleotidů, označovaných jako malé interferující RNA (siRNA) odvozené od viru (vsiRNA). Dalším krokem je načtení siRNA do multiproteinového komplexu, známého jako RNA-indukovaný umlčovací komplex (RISC), kde jsou rozděleny jednotlivé řetězce. Jeden z těchto řetězců (cestující) je odstraněn a degradován, zatímco druhý (vodící) zůstává v komplexu RISC. Toto vlákno je asociováno s proteiny komplexu RISC a společně s proteiny AGO vytvářejí funkční siRNA-RISC komplex. Díky přítomnosti antisense vlákna v RISC komplexu dochází k párování s mRNA, pokud vlákno obsahuje neshody na štěpitelném místě dochází k inhibici nebo štěpení mRNA, čímž je potlačena celková replikace (Rampersad a Tennant, 2018; Takahashi, Heaton a Parrish, 2021; Van Den Elsen, Quek and Luo, 2021).

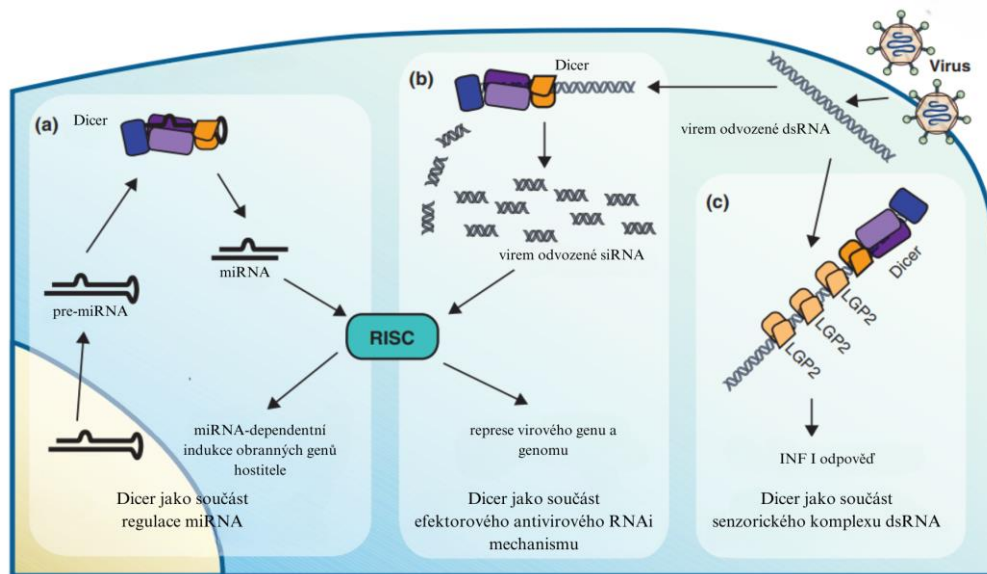
Doposud byla účinnost RNAi široce zkoumána a uznávána jako jeden z nejdůležitějších antivirových mechanismů u rostlin a hmyzu. Naproti tomu v savčích buňkách virové nukleové kyseliny indukují hlavně vrozenou antivirovou imunitní obranu. Posouzení, do jaké míry je antivirová odpověď vázána na RNAi komplikuje několik faktorů. Virová dsRNA je spouštěčem nescifické interferonové odpovědi, která tak do značné míry může nahradit funkci RNAi (Goubau, Deddouche a Reis e Sousa, 2013). Pozorování stěžují i samotné savčí virové proteiny, které dokáží vykazovat aktivitu podobnou virovým supresorům RNAi (VSR) (Haasnoot, Westerhout a Berkhout, 2007).

### 1.2.2.3. Dicer

Protein Dicer představuje nezbytný antivirový faktor v mnoha organismech, včetně rostlin, bezobratlých živočichů a savců. Jedná se o velký enzym s více doménami, které zastávají odlišné funkce. Díky své úloze v několika buněčných procesech, jako je regulace genové exprese, reakce na poškození DNA, buněčný růst a diferenciaci, je nezbytný pro udržení fyziologie organismu (Francia *et al.*, 2012).

Přítomnost proteinu Dicer byla potvrzena jak v buněčném jádře, tak v cytoplazmě. Jeho přítomnost v jádře je v mnoha zdrojích spojována s úlohou při umlčování transkripce, post-translačním zpracování RNA a odstranění dsRNA (Francia *et al.*, 2012; Svobodova, Kubikova a Svoboda, 2016).

Lokalizace v cytoplazmě hraje klíčovou roli v antivirové odpovědi, kde se podílí na vazbě a štěpení cizorodé dsRNA, včetně RNA odvozené od virů, a zprostředkovává tak virovou supresi v RNAi dráze hostitelského organismu (viz Obr. 4). Jeho enzymatická aktivita RNázy III je odpovědná za tvorbu malých RNA z větších prekurzorů a zajišťuje štěpení pre-miRNA na zralé miRNA a dsRNA na siRNA. Díky tomu funguje Dicer jako senzor virové RNA v cytoplazmě (MacKay, Wang a Kurt-Jones, 2014).



**Obr. 4:** Existují tři potenciální mechanismy pro uplatnění Diceru. (a) Za prvé, Dicer hraje roli jako enzym produkující miRNA a ovlivňuje signální dráhy vrozené imunity, tím že reguluje produkci miRNA. (b) Za druhé, dicer dokáže zpracovat RNA odvozené od viru a zavést je do RNAi dráhy, což vede k přímé interferenci s virovými transkripty nebo genomy. (c) Dicer funguje jako součást většího detekčního komplexu vázaného na virovou RNA, čím zesiluje antivirový účinek. (převzato a upraveno z MacKay, Wang a Kurt-Jones, 2014).

Přestože nemáme kompletní obraz o všech možných způsobech, kterými by mohl protein Dicer přímo ovlivnit odpověď na infekci flaviviry, lze identifikovat několik klíčových funkcí tohoto enzymu, které byly pozorovány u některých zástupců rodu *Orthoflavivirus*. Ačkoliv již bylo odhaleno, že flaviviry indukují produkci vsiRNA v hmyzích buňkách, dosud nebylo prokázáno, zda tyto viry také indukují produkci vsiRNA a antivirovou RNAi v diferencovaných savčích buňkách. Absence dostatečného množství vsiRNA ve virem infikovaných a diferencovaných savčích buňkách je pravděpodobně způsobena přítomností silných virových supresorů (VSR) (Qiu *et al.*, 2020).

Za silný virový supresor je považován jeden z nestrukturních flavivirových proteinů, NS2A, který interaguje s endoplazmatickým retikulem a potlačuje syntézu dsRNA. Následně tak dochází k tlumení produkce vsiRNA a RNAi odpovědi infikovaných buněk, což vede ke zvýšení virové replikace (Qiu *et al.*, 2020).



Dalším silným modulátorem se ukázala být kapsida Zika viru (ZIKV), která cílí na doménu linkeru mezi dvěma funkčními doménami RNázy II a tak může ZIKV modulovat funkce Diceru, aby usnadnila replikaci viru (Zeng *et al.*, 2020).

Ačkoli je RNAi konzervována ve všech eukaryotech, dlouhodobou otázkou je, proč infekce flaviviry nedokáže spustit hojnou produkci vsiRNA v diferencovaných savčích buňkách, ale může tak snadno učinit v hmyzích buňkách. Srovnání ukazuje, že hmyz disponuje silnějším Dicerovým aparátem pro zpracování vRI-dsRNA. Dalším aspektem se zdá, že savčí Dicer nese určitou vnitřní inhibici. Bylo pozorováno, že N-terminální helikázová doména hDicer může autoinhibovat svou aktivitu zpracování siRNA (Kennedy *et al.*, 2015). Nedávná studie odhalila, že infekce ZIKV může vyvolat produkci hojných vsiRNA v lidských nervových progenitorových buňkách (hNPC), které postrádají odpověď na IFN-I, ale ne v neuronech diferencovaných od hNPC, což naznačuje, že aktivita Diceru a RNAi jsou různě regulované u odlišných stádií buněčné diference (Xu *et al.*, 2019).

## **2. Cíle práce**

- 2.1.** Vypracovat literární rešerši zabývající se rozdíly mezi jednotlivými kmeny viru klíšťové encefalitidy (charakteristika kmenů, odlišnosti v jejich neurovirulenci, faktory ovlivňující virulenci kmenů, RNAi interferenci).
- 2.2.** Stanovení proinfikovanosti pro vybrané kmeny VKE u mikroglálních kultur a embryonální kultury se zkrácenou izoformou enzymu dicer (nepřímá imunofluorescence).
- 2.3.** Stanovení replikační dynamiky kmenu VKE u embryonální kultury s odlišnou izoformou enzymu dicer (izolace, plaková titrace).

## 3. Materiál a metody

### 3.1. Materiál

#### 3.1.1. Buněčné kultury

V práci byly použity lidské mikroglialní kultury pro studium vnímavosti mikroglíí vůči kmenům VKE a myší embryonální kultury, u kterých byl sledován vliv přítomnosti proteinu Dicer na replikační dynamiku VKE a viru encefalomyelitidy (EMCV) v buněčné kultuře.

##### 3.1.1.1. Mikroglialní kultury

###### HMC3

Jsou široce využívanou buněčnou linií, která byla vytvořena v laboratoři prof. Tardieu (Janabi *et al.*, 1995). V této laboratoři rovněž byla rozsáhle charakterizována jejich buněčná morfologie a buněčná funkce. Buňky jsou schopny reagovat na vliv chemokinů a zánětlivých stimulů regulující expresi typických aktivačních markerů mikroglíí. Zároveň si tato linie zachovává většinu původních antigenních markerů a exprimují také specifické mikroglialní markery (Dello Russo *et al.*, 2018). Pro tyto vlastnosti jsou lidské liniové mikroglie (HMC3) považovány za jedinečný experimentální model.

###### HM-IM; Innoprot

Tato mikroglialní linie byla odvozena z lidských primárních mikroglíí prostřednictvím imortalizace pomocí viru SV40. Imortalizované mikroglie byly získány od firmy Innoprot (HM IM, kat. #P10354-IM, *Innoprot*).

###### HM; Lidské primární mikroglie

Primární mikroglie jsou získávány z fetální tkáně nebo odběrem postmortálně přímo z mozkové tkáně dárce. Původ mikroglíí se odráží na jejich genetické variabilitě v rámci populace. Tento typ mikroglíí je hojně používán při studiu neurozánětlivých procesů právě kvůli podobnosti s buňkami *in vivo*. Kultivace těchto buněk je poměrně náročná, kultura vyžaduje specifické podmínky, aby se zachovala jejich homogenita a zabránilo se předčasnému stárnutí kultury či její diferenciaci v další subtypy mikroglíí. Primární mikroglie využity pro experimentální část byly pořízeny od firmy ScienCell (kat. #1900, *ScienCell*).

### **3.1.1.2. Myší embryonální kultury**

Role Dicer proteinu byla studována na dvou nezávislých buněčných liniích. Jednalo se o divoký typ mESC (1282 WT) a mESC se zkrácenou isoformou diceru (1356 DicerOO). Kultura 1356 disponuje izoformou Dicer, u které došlo k pozměnění štěpící aktivity. V důsledku inserce retrotranspozomu MT je docíleno upregulace RNAi ve srovnání s ES kulturou divokého typu (Flemr *et al.*, 2013; Svobodova, Kubikova and Svoboda, 2016).

Pro oba typy kultur byla dodržena identická manipulace během kultivace a následných experimentů. Kultury byly poskytnuty laboratoří prof. Petra Svobody z Ústavu molekulární genetiky AV ČR, v. v. i.

### **3.1.2. Virus**

#### **3.1.2.1. Virus klíšťové encefalitidy**

Proinfikovanost mikroglálních kultur byla sledována pro tři kmeny VKE. Jednalo se o virulentní prototypový kmen Neudorfl (VKE Neu) a český prototypový kmen Hypr (VKE Hypr). Oba tyto kmeny VKE byly velmi detailně studovány a jsou známy jejich genomické sekvence (Zhang *et al.*, 2022).

Skupina kmenů VKE byla doplněna o přirozeně avirulentní kmen VKE 280, který je však schopen pronikat do CNS a indukovat imunitní odpověď (Petry *et al.*, 2021). Zásobní virová suspenze VKE Hypr byla pomnožena v mozcích sajících myší. Pro infekci buněk byla použita 8. mozková pasáž viru (Růžek *et al.*, 2008a).

Pro experimenty s kmenem VKE Neudorfl byla použita 4. mozková pasáž viru. V případě kmenu 280 byla použita 5. mozková pasáž viru. Virové suspenze byly uchovávány při teplotě -80 °C.

### 3.1.2.2. Virus encefalomyokarditidy

Virus encefalomyokarditidy (EMCV) je řazen do čeledi *Picornaviridae*, rodu *Cardiovirus*. Jedná se o malý neobalený jednovláknový RNA virus (Share, 1976). Poprvé byl izolován v roce 1945 od samce gibbona. EMCV byl detekován u celé řady jak divokých, tak i domácích zvířat v různých oblastech po celém světě (Helwig a Schmidt, 1945). Tento zoonotický virus je schopen způsobovat neurologické projevy onemocnění, které se projevují jako encefalitidy doprovázené vysokými horečkami či paralýzami, obdobně jako se tomu děje v případě infekce VKE. Infekce u člověka je poměrně běžná, ale většina těchto případů probíhá asymptomaticky nebo s mírnými klinickými projevy (Adachi *et al.*, 1975).

Pro experimenty s myšími embryonálními buňkami pro pozorování vlivu proteinu Dicer na průběh infekce byla použita 6. pasáž viru EMCV. Zásobní virová suspenze byla uchovávána při teplotě -80 °C.

## 3.2. Metody

### 3.2.1. Kultivace

#### 3.2.1.1. Mikroglíální kultury

Lidské liniové mikroglie (kat. #CRL-3304, *ATCC*®) byly kultivovány v kompletním kultivačním médiu připraveném dle tabulky níže (viz Tab. I). Pasážování kultur bylo prováděno při 90% konfluenci kultury. Kultura byla zbavena kultivačního média a promyta roztokem 1 × PBS (kat. #LM-S2041/500, *Biosera*), poté byl přidán roztok trypsin/EDTA (kat. #LM-T1706, *Biosera*). Po 10 minutách byla kultura přenesena do centrifugační zkumavky spolu s 10 ml kultivačního média. Centrifugace probíhala po dobu 10 minut při 165 G. Po centrifugaci byl supernatant nahrazen 10 ml čerstvého kultivačního média, ve kterém byl buněčný pelet resuspendován. Z této buněčné suspenze byla odebrána 1/3 objemu a přenesena do kultivační lahve spolu s 15 ml kultivačního média. Následovala kultivace při teplotě 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>.

**Tab. I:** Složky a jejich výsledné koncentrace použity pro přípravu kompletního kultivačního média kultury HMC3.

Produkt	Kód produktu	Výrobce	Výsledná koncentrace
Minimum Essential Medium	LM-E1142/500	Biosera	87 %
Fetální bovinní sérum	FB-1001 B/500	Biosera	10 %
Penicilin – Streptomycin	XC-A4110	Biosera	1 %
Glutamin	XC-T1755/100	Biosera	1 %
Pyruvát sodný	113-24-6	Sigma-Aldrich®	1 %

Imortalizované lidské mikroglie (kat. #P10354-IM, *Innoprot*®) byly udržovány v kompletním kultivačním médiu (viz Tab. II). Kultura byla pasážována při dosažení 90% konfluencie. Po odstranění kultivačního média a promytí roztokem 1 × PBS a byl přidán roztok trypsin/EDTA.

Po 5 minutové inkubaci, nebo dokud buňky nebyly dostatečně odděleny, byla kultura přenesena do centrifugační zkumavky spolu s 5 ml FBS roztoku (kat. #F1283, *Sigma-Aldrich*®). Centrifugace probíhala 10 minut při 165 G. Následně byl supernatant odstraněn

a nahrazen kultivačním médiem, ve kterém byl buněčný pelet resuspendován. Ze vzniklé suspenze byla přenesena 1/3 až 1/5 objemu do nové kultivační lahve.

Následovala kultivace při teplotě 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>. Pro podpoření buněčné adheze kultury HMC3 a HM IM byly materiály ošetřeny roztokem krysího kolagenu typu I (kat. #A1048301, *ThermoFisher Scientific, Inc*).

**Tab. II:** Složky kompletního kultivačního média pro kultivaci lidských imortalizovaných mikroglií.

Produkt	Kód produktu	Výrobce	Výsledná koncentrace
Microglial Basal Medium	#P60116	Innoprot®	87 %
Fetální bovinní sérum	#F1283	Sigma-Aldrich®	20 %
Mikroglialní růstové faktory	#1952	Innoprot®	1 %
Penicilin – Streptomycin	XC-A4110	Biosera	1 %

Kultivační médium pro kultivaci lidských primárních mikroglií (kat. #1900, *Sciencell®*) bylo připraveno dle tabulky níže (viz Tab. 3). Kultivační lahve byly ošetřeny roztokem poly-L-lysinu (kat. #0413, *Sigma-Aldrich®*). Pasáž kultury probíhala po dosažení 90% konfluence. Následně byla kultura promyta pomocí 1 × PBS roztoku, poté byl přidán roztok trypsin/EDTA. Po 2-3 minutách trypsinizace, kdy byly buňky dostatečně odděleny, bylo přidáno 5 ml kultivačního média a buněčná suspenze byla přenesena do centrifugační zkumavky. Kultura byla stáčena při 165 G po dobu 10 minut. Následně byl odstraněn supernatant a buněčný pelet byl resuspendován v 10 ml kultivačního média. Kultivační lahev byla dvakrát promyta sterilní vodou, až poté do ní byla přenesena část buněčné suspenze doplněna o 10 ml kultivačního média. Kultivace byla rovněž uchovávána při teplotě 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>.

**Tab. III:** Složky kompletního kultivačního média kultury lidských primárních mikroglií

Produkt	Kód produktu	Výrobce	Výsledná koncentrace
Microglial Medium	#1901	Sciencell®	86,5 %
Fetální bovinní sérum	#0025	Sciencell®	10 %
Mikroglialní růstové faktory	#1952	Sciencell®	1 %
Penicilin – Streptomycin	#0503	Sciencell®	2,5%

### 3.2.1.2. Myší embryonální kultury

Kultivace myších embryonální kultury (mESC) byla prováděna na kultivačních lahvích, potažené 0,1% roztokem želatiny za použití kompletního kultivačního média připraveného dle uvedené tabulky (viz Tab. IV). Roztok 0,2% želatiny (kat. #0423, *ScienCell*) byl zředěn ve sterilní vodě do výsledné koncentrace 0,1%. Potažení lahví před jejich samotným použitím probíhala po dobu 1 hodiny při teplotě 37 °C následně byl želatin odsán a nahrazen kultivačním médiem.

Před pasáží byly kultury zbaveny kultivačního média a promyty roztokem 1 × PBS. Poté byl přidán roztok trypsin/EDTA pro separaci buněk. Po oddělení buněk byla kultura přenesena do centrifugační zkumavky s 5 ml kultivačního média a stočena při 165 G po dobu 10 minut. Buněčný pelet byl rozsuspendován a 1/5 až 1/10 jeho objemu byla nadále kultivována. Následovala kultivace při teplotě 37 °C.

**Tab. IV:** Složky kompletního kultivačního média myších embryonálních kultur

Produkt	Kód produktu	Výrobce	Výsledná koncentrace
Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose	#LM-D1110	Biosera	Doplnění do výsledného objemu
Fetální bovinní sérum	#FB-1001 B/500	Biosera	15%
Neesenciální aminokyseliny	#XC-E1154	Biosera	1000 U/mL
Penicilin – Streptomycin	#XC-A4110	Biosera	1%
L – Glutamin		Biosera	1%
Pyruvát sodný	#113-24-6	Sigma-Aldrich®	1%
B – merkaptoethanol	#M-6250	Sigma-Aldrich®	50 µM
Leukemický inhibiční faktor	#ESG1106	Sigma-AldrichESGRO®	1000 U/mL
Inhibitor dráhy MEK/ERK	#HY-10255	Stemcell™ Technologies	1 µM
Selektivní inhibitor GSK-32	#HY-10182-5	Stemcell™ Technologies	3 µM



### 3.2.2. Nepřímá imunofluorescence mikroglálních kultur

Tato technika byla použita k detekci specifických antigenů v buňkách a souběžně sloužila pro stanovení proinfikovanosti kultur a zachycení případných morfologických změn.

#### Kultivace buněk

Buňky kultur byly nasazeny na 16 jamková mikroskopická sklíčka (*Thermo Fisher Scientific, Inc.*), která byla 24 hodin před samotným použitím ošetřena roztokem krysího kolagenu typu I (kat. #A1048301, Gibco™). Mikroglální kultury HMC3 a HM IM byly nasazeny v množství  $2 \times 10^4$  buněk v objemu 200  $\mu$ l na jamku. HM byly nasazeny v množství  $1,5 \times 10^4$  buněk v objemu 20  $\mu$ l na jamku. Po 4 hodinách od nasazení buněk na sklíčka, byly kultury infikovány kmeny VKE ve výsledné koncentraci 1 MOI.

#### Imunofluorescenční barvení

Po uplynutí inkubační doby bylo sklíčko ponořeno do 4% roztoku paraformaldehydu, ve které bylo ponecháno 1 hodinu při pokojové teplotě (kat. #047392,9M, *ThermoFisher Scientific, Inc.*). Následně byl fixační roztok vymyt z jamek pomocí 0,05% PBS-Tween 20 (kat. #PPB005, *Sigma-Aldrich*) (3x5 minut). Dalším krokem byla inkubace s roztokem Tritonu™-X100 (kat. #9036-19-5, *Sigma-Aldrich*) po dobu 5 minut pro zlepšení membránové permeabilizace buněk.. Následovalo odstranění roztoku Tritonu™-X100 a promytí jamek pomocí 0,05% PBS – Tween 20. Do jamek byl přidán blokační roztok k dosažení blokace nespecifických vazebných míst, složen z 10% BOFES, 5% kozího séra a 0,05% PBS-Tween 20. Blokace probíhala 30 minut při pokojové teplotě. Poté byl blokační roztok nahrazen směsí primárních protilátek ředěných v blokačním roztoku. Primární protilátky byly ředěny v poměry 1:250. Pro značení obalového glykoproteinu E byla použita myší monoklonální anti flavivirová protilátka (Mab10216, *Sigma-Aldrich*), pro značení Iba – 1 byla použita králičí monoklonální anti-Iba 1 protilátka (kat. #EPR16589, *Abcam*). Protilátky byly inkubovány 1 hodinu při teplotě 37 °C.

Poté byly jamky důkladně promyty 0,05% PBS – Tween 20 a přidána směs sekundárních protilátek. Jednalo se o anti myší protilátku Alexa Fluor 488 (kat. #A11029, *Invitrogen*) a anti králičí protilátku Alexa Fluor 594 (kat. #A11037, *Invitrogen*), které jsou nositelé fluorescenční značky. Sekundární protilátky byly ředěny v poměru 1:500 v 0,05% PBS – Tween 20. Inkubace opět probíhala po dobu 1 hodiny v temnu při teplotě 37 °C. Nenavázané protilátky byly odmyty pomocí 0,05% PBS – Tween 20 (4x 5 minut). Ke značení buněčných jader byl přidán roztok DAPI Fluoroshield (kat. #00-4959-52, *ThermoFisher Scientific, Inc.*), preparát byl zakryt krycím sklíčkem a opatřen lakem na nehty

k zabránění vyschnutí preparátu. Zhotovené preparáty byly pozorovány ve fluorescenčním mikroskopu Olympus BX60 při stonásobném zvětšení. Pro bližší pozorování změn morfologie kultury byly preparáty zvětšeny 400x. Výsledná proinfikovanost byla počítána jako procentuální poměr infikovaných buněk ku celkovému počtu buněk.

### **3.2.3. Nepřímá imunofluorescence myších embryonálních kultur**

Kultur byly rovněž jako v případě mikroglálních kultur nasazeny na 16 jamková mikroskopická sklíčka (*Thermo Fisher Scientific, Inc.*). Komůrky mikroskopického sklíčka byly 24 hodin před použitím sklíčka ošetřeny roztokem 0,02% želatinu. Před nasazením buněk byl roztok odstraněn a komůrky byly třikrát promyty deionizovanou vodou. Fixace sklíčka, blokace i permeabilizace buněk byla provedena shodně s barvením mikroglálních buněk. V experimentech s mESC však byl blokační roztok po uplynutí inkubační doby nahrazen roztokem, který obsahoval pouze jednu primární protilátku, Mab10216 ředěnou v poměru 1:250 s blokačním roztokem. Inkubace primární protilátky probíhala 1 hodinu při teplotě 37 °C. Po uplynutí inkubační doby byla primární protilátka odmyta roztokem 0,05% PBS – Tween 20 a nahrazena sekundární protilátkou Alexa Fluor 488, ředěné v poměru 1:500 s blokačním roztokem. Preparát byl nadále inkubován po dobu 1 hodiny při teplotě 37 °C v temnu. Následovalo promytí sklíček roztokem 0,05 % PBS – Tween 20 pro odstranění protilátek, které se nebyly schopny utvořit vazbu. V posledním kroku barvení byl na preparáty nanesen roztok DAPI Fluoroshield (kat. #00-4959-52, *Thermofisher Scientific, Inc*). Preparát byl zakryt krycím sklíčkem a hrany sklíčka potřeny lakem na nehty pro zamezení vyschnutí preparátu.

#### **Vyhodnocení**

Zhotovené preparáty byly pozorovány ve fluorescenčním mikroskopu Olympus BX60 při stonásobném zvětšení. Fotky kultur byly sestaveny pomocí softwaru CorelDRAW Standard 2021. Výsledná proinfikovanost byla počítána jako procentuální poměr infikovaných buněk ku celkovému počtu 1 000 buněk.

### 3.2.4. Plaková titrace

Metoda plakové titrace je ve virologii využívána pro kvantifikační stanovení koncentrace infekčních virových částic v buněčné kultuře. Pro experimenty s mikroglialními kulturami i myšími embryonálními kulturami byl dodržen shodný postup.

#### **Virová suspenze**

Pro plakovou titraci byly použity supernatanty infikovaných buněčných linií. Dané kultury byly nasazeny v množství  $2 \times 10^4$  buněk na jamku a infikovány virovou suspenzí o výsledné koncentraci 1 MOI. Ve stanovený časový interval byl supernatant odebrán, stočen při 165 G po dobu 10 minut a uchován při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Jednalo se o intervaly 12 h, 24 h a 72 hodin po infekci (hpi).

#### **Kultivace viru**

Plaková titrace byla provedena na 96 jamkovém panelu. V prvním kroku bylo do jamek vpraveno čerstvé kultivační médium (180  $\mu\text{l}$ ). Do první jamky byl přidán vzorek (20  $\mu\text{l}$ ) a ředěn desítkovou řadou. Následně byla přidána buněčná suspenze (130  $\mu\text{l}$ ). Buňky byly nasazeny v množství  $2 \times 10^4$  buněk na jamku. Vzorky byly nadále inkubovány 2 h při teplotě  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , po uplynutí inkubační doby bylo do jamek přidáno 100  $\mu\text{l}$  3% roztoku karboxymethylcelulózy, která byla připravena naředěním v poměru 1:1 v 2x koncentrovaném médiu L15.

#### **Barvení**

Kultivace vzorků probíhala po dobu 5 dnů, následovaná barvením 96 jamkového panelu. Panel byl nejprve promyt fyziologickým roztokem s cílem odstranění spotřebovaného média a případných odumřelých buněk. Následně byl panel ponořen do roztoku naftalenové černě, kde setrval po dobu 2 hodin pro vizualizaci plaků.

Roztok naftalenové černi byl připraven z 1 g naftalenové černě, 60 ml kyseliny octové, 13,6 g octanu sodného a destilované vody pomocí které byl roztok doplněn do celkového objemu 1 l.

### **Výpočet koncentrace viru**

Koncentrace viru byla vypočtena na základě počtu plaků a známého objemu viru, který byl přidán k buňkám. Pro metodu byl stanoven detekční limit, který představuje hodnotu  $3,70 \cdot 10^1$ . Výpočet byl proveden dle následujícího vzorce.

$$\frac{\text{PFU}}{\text{ml}} = (A \times R \times 1000) / 180$$

V tomto vzorci A představuje počet plaků v jamce, R je hodnota ředění původního vzorku a výsledná jednotka je PFU/ml (plakotvorná jednotka na 1 ml).

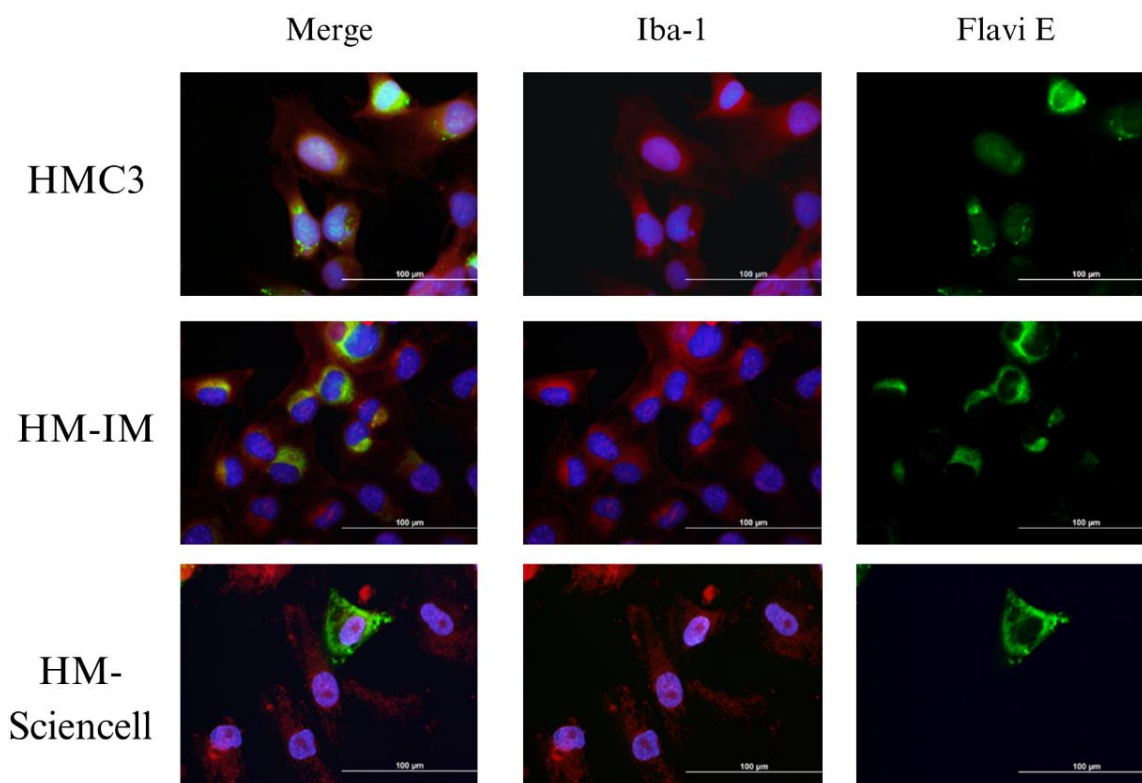
### **3.2.5. Statistická analýza**

Výsledky získané pomocí plakové titrace byly vyhodnoceny pomocí statistického softwaru GraphPad Prism 7 (*GraphPad Software, Inc.*). Pro stanovení statistické průkaznosti rozdílů průměrů hodnot mezi dvěma skupinami byl zvolen t-test jako statistická metoda, kterou byla data vyhodnocována.

## 4. Výsledky

### 4.1. Mikroglální kultury a infekce VKE

U studovaných mikroglálních kultur byl na počátku ověřen jejich buněčný původ prostřednictvím metody nepřímé imunofluorescence. Cílovým antigenem, který byl značen pomocí imunologického značení, byl specifický protein Iba-1. Expresi tohoto proteinu lze pozorovat v rámci všech subpopulací mikroglálních buněk, a proto je značení tohoto proteinu nejčastěji používaným markerem při identifikaci mikroglálních buněk (Shapiro *et al.*, 2009). Ze snímků (Obr. 5) je patrné, že původ mikroglíí byl potvrzen jak u buněk, které byly infikovány virem tak i buněk, u kterých k infekci nedošlo. Výsledné procentuální proinfikovanosti pro jednotlivé kultury jsou pro přehlednost znázorněny v tabulce V.



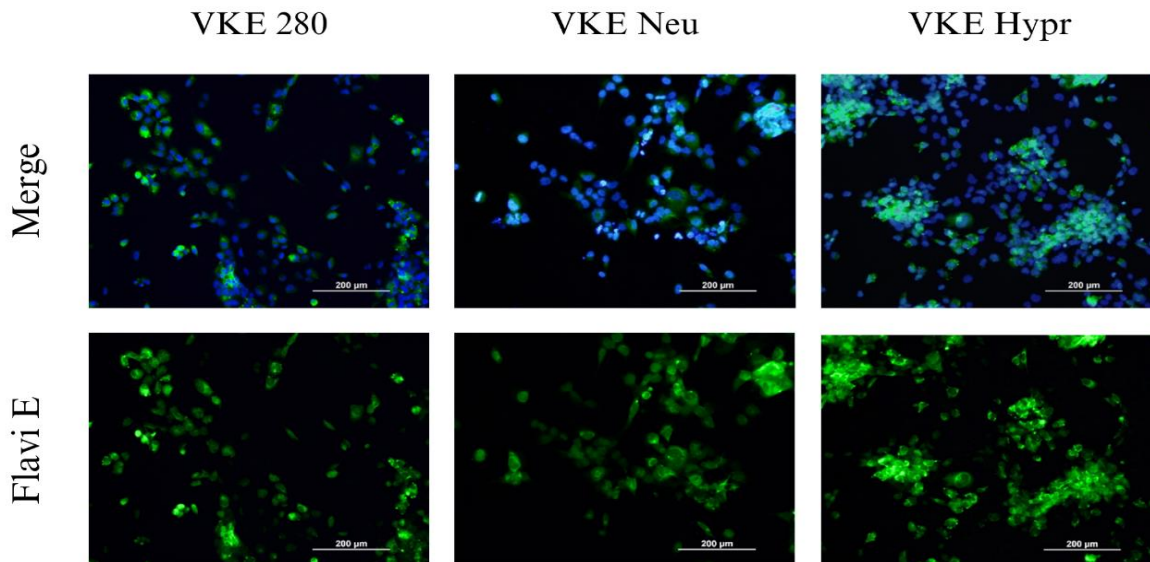
**Obr. 5:** Značení specifického mikroglálního markeru Iba-1 (červená barva), dále flavivirovému proteinu E – Flavi E (zelená barva) značící infikované buňky. Buněčná jádra mikroglíí byla značena pomocí DAPI (modrá barva). Měřítka je zahrnuto na snímcích (100 μm).

Metoda nepřímé imunofluorescence ukázala citlivost testovaných mikroglálních kultur vůči kmenům VKE, spolu s tím byla pozorována odlišná procentuální proinfikovanost v daných kulturách (viz. Tab. V).

**Tab V.:** Srovnání proinfikovanosti mikroglíí kmeny VKE

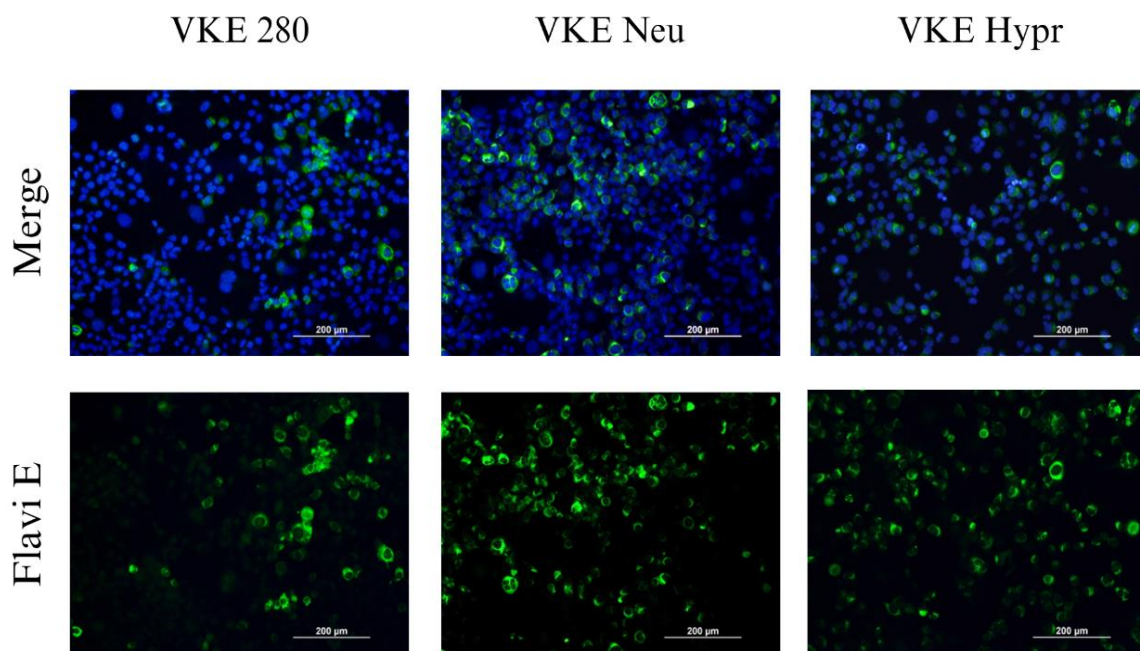
Mikroglální kultura	Kmen VKE		
	VKE 280	VKE Neu	VKE Hypr
HMC3	56 %	48 %	42 %
HM IM	14 %	33 %	50 %
HM	28 %	16 %	10 %

Snímky kultur (viz Obr. 6) zachycují, že nejvyšší procento infikovaných buněk u kultury HMC3 bylo detekováno při infekci VKE 280 (56 %). VKE Neudoerfl infikoval 48 % buněk a nejnižší procento infikovaných buněk způsobil VKE Hypr (46 %).



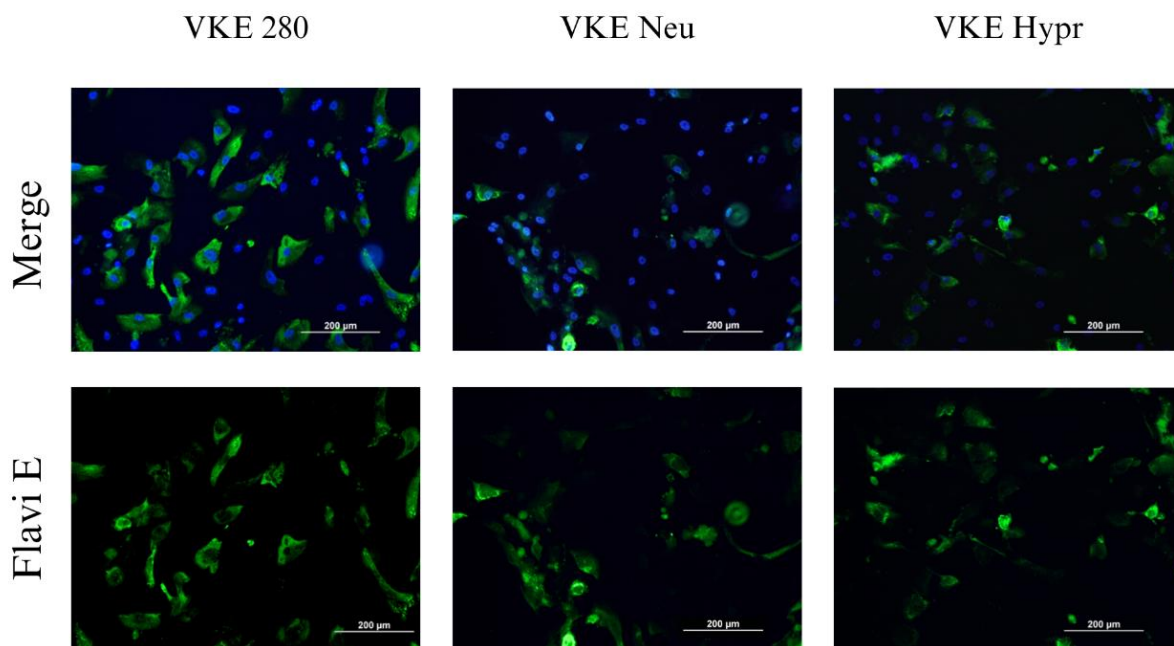
**Obr. 6:** Lidské liniové mikroglie (HMC3) infikovány třemi kmeny VKE. Pro průkaz infikovaných buněk bylo provedeno značení flavivirového proteinu – Flavi E (zelená barva), jádra buněk byla kontrastně obarvena DAPI (modrá barva). Měřítka je součástí snímků (200 µm).

Dále byla zkoumána proinfikovanost kultury HM IM při infekci kmene VKE (viz Obr. 7). U této kultury dosáhl nejvyššího procenta infikovaných buněk VKE Hypr (50 %). Kmeny o nižší virulenci v tomto případě vedly k nižším procentům infikovaných buněk (VKE Neudoerfl 33 %, VKE 280 14 %).



**Obr. 7:** Srovnání proinfikovanosti imortalizovaných mikroglíí (HM IM) Značení obalového glykoproteinu E kmene VKE 280, Neudoerfl a Hypr. Jádra buněk byla kontrastně obarvena DAPI (zobrazeno modře). Měřítka je součástí snímků (200  $\mu\text{m}$ ).

Ani při pozorování kultury lidských primárních mikroglíí společnosti Sciencell (ozn. HM) (viz. Obr. 8) nebyl zaznamenán cytopatický efekt, rovněž tomu bylo u kultury HMC3 a HM IM. Nejvyšší procento infikovaných buněk způsobil VKE 280 (28 %), VKE Neudoerfl vedl k procentuální proinfikovanosti 16 % a nejnižší procento infikovaných buněk způsobil VKE Hypr (10 %).



**Obr. 8:** Porovnání proinfikovanosti v případě lidských primárních mikroglíí (HM). Pro detekci infikovaných buněk bylo použito značení proteinu flaviviry – Flavi E (zelená barva). Zatímco jádra buněk jsou značena pomocí DAPI (modrá barva). Měřítka je součástí snímků (200 µm).



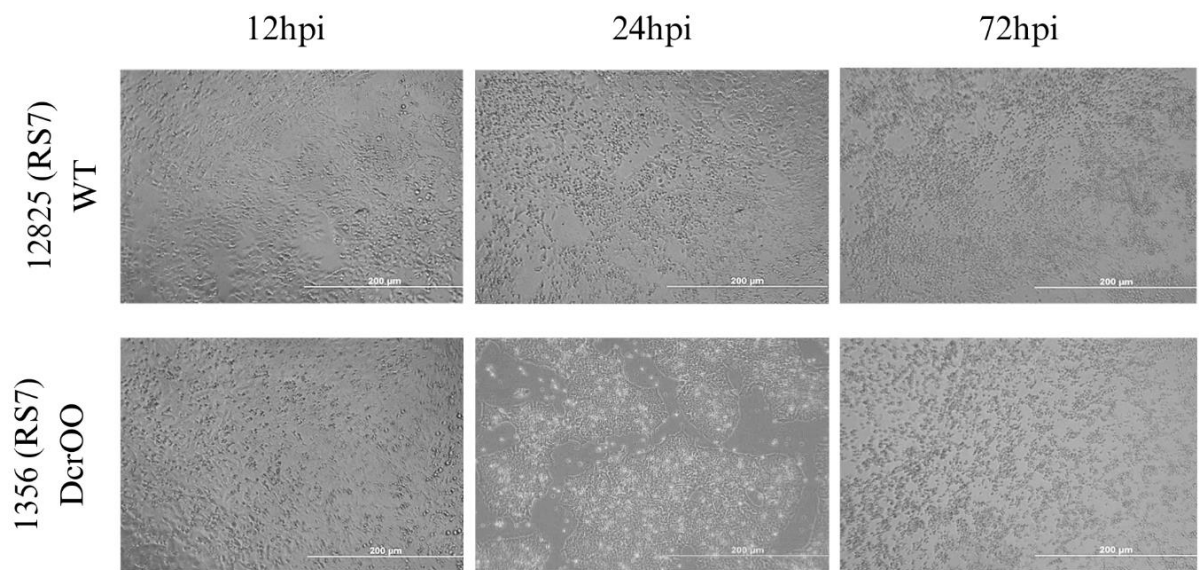
## 4.2. Vliv izoformy proteinu Dicer na infekci VKE a EMCV

### 4.2.1. Kultivace

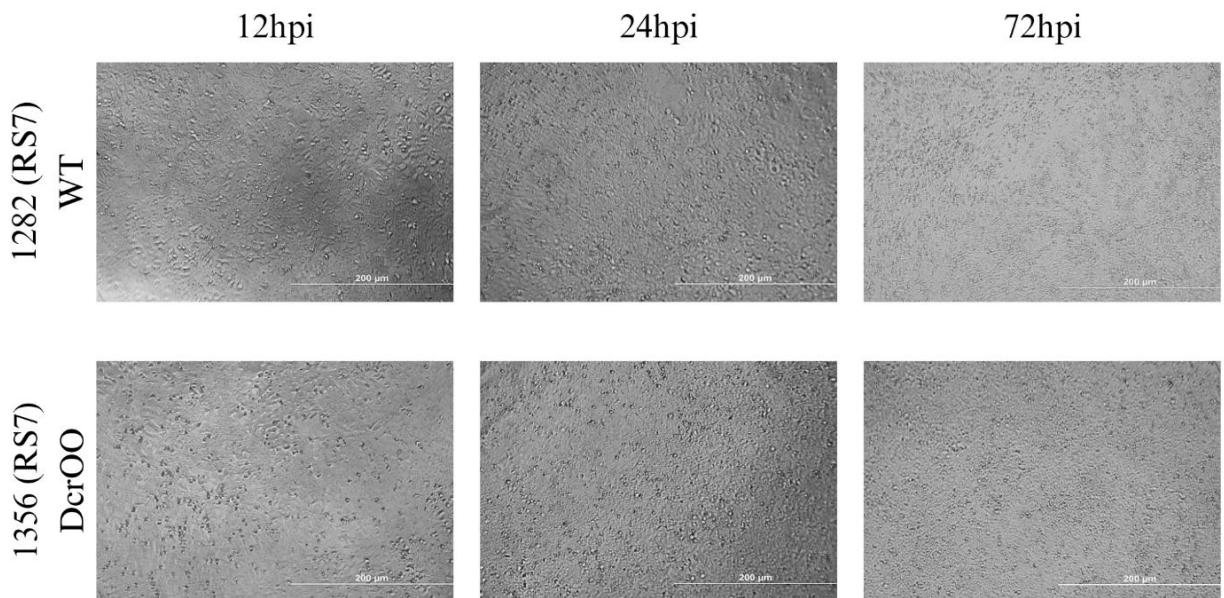
Embryonální kultury byly pozorovány po dobu 72 hodin po infekci (hpi) příslušným virem a ve stanovených intervalech byly zaznamenány morfologické změny pomocí světelného mikroskopu. Pro posouzení účinku VKE Hypr na mESC kultury byly výsledky srovnávány s účinky viru EMCV. Využití viru EMCV bylo na základě dostupných zdrojů, které prokázaly vnímavost kultury mESC vůči tomuto viru (Weber *et al.*, 2006; Maillard *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2021).

Při inkubaci viru encefalomyokarditidy v kulturách mESC (viz Obr. 9) byl pozorován cytopatický účinek viru již po 12 hodinách od infekce, který se následně stupňoval. V intervalu 72 hodin od infekce je patrná výrazná granulace buněk spolu s morfologickými změnami.

Na snímcích (viz. Obr. 10) není patrné, že by se VKE Hypr projevil cytopatickým účinkem, který byl naopak pozorován při inkubaci s EMCV. Zvýšená granulace, která byla pozorována v intervalu 72 hpi se připisuje přerůstáním kultury než následku přítomnosti viru. Embryonální kultury jsou rychle dělicí se buňky, které při nedostatku prostoru přerůstají a vytvářejí tak vrstvicí se shluky buněk.



**Obr. 9:** Pozorování myších embryonálních kultur při kultivaci viru encefalomyokarditidy. Měřítka je součástí snímků (200  $\mu\text{m}$ ).

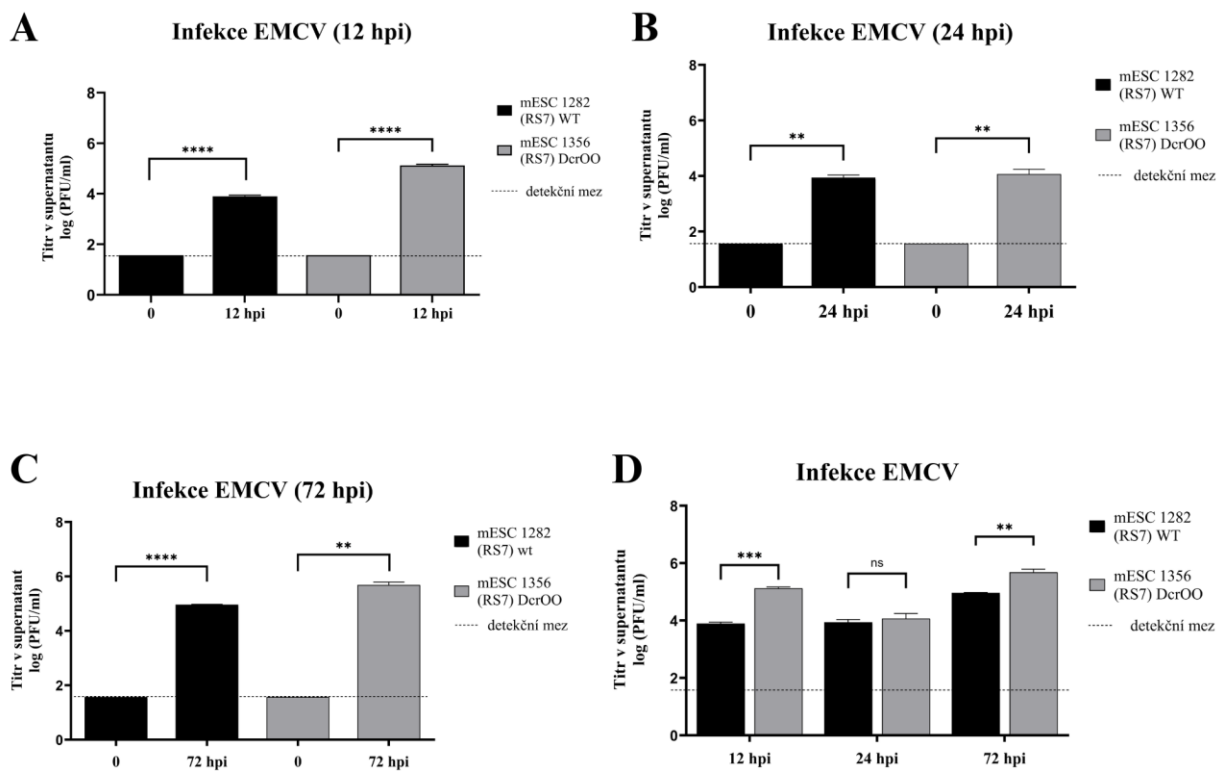


**Obr. 10:** Kultivace VKE Hypr s myšími embryonálními kulturami. Měřítka je zahrnuto na snímcích (200  $\mu\text{m}$ ).

#### **4.2.2. Stanovení koncentrace viru v supernatantu z kultivačního média infikovaných kultur**

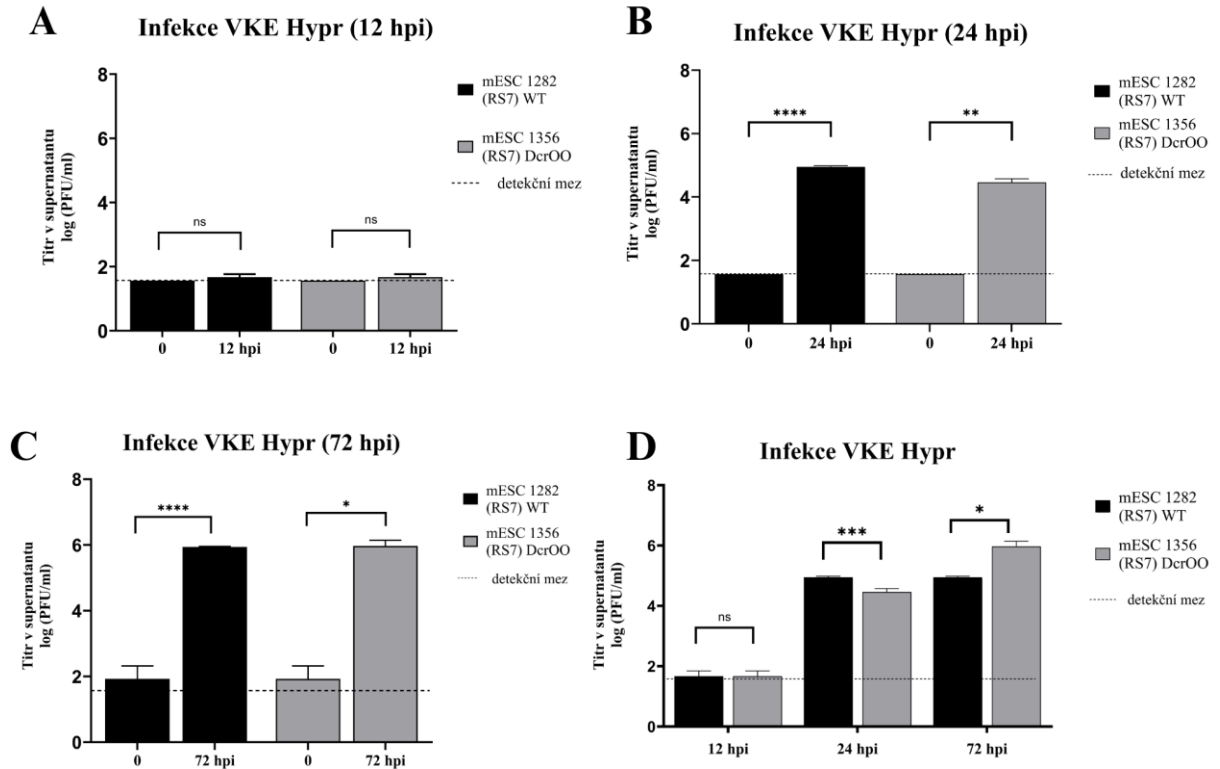
Během kultivace virů s embryonálními kulturami byl pravidelně odebrán supernatant k posouzení virové produkce v daných časových intervalech. Tento supernatant byl následně využit k provedení plakového testu s cílem zhodnotit schopnost EMCV a VKE Hypr produkovat infekční virové částice. Získané hodnoty jsou zahrnuty v tabulce VI a tabulce VII, které jsou součástí příloh.

Hodnoty vynesené do grafu (viz Obr. 11) představují hodnoty získané z experimentu, který byl proveden v triplikátech. Statistická analýza byla provedena pomocí t-testu s Graphpad Prism V6.0.1. ns. Z výsledků vyplývá, že přítomnost viru EMCV byla prokázána po celou dobu sledování (72 hodin). Při srovnání kultur (viz. Tab. I) byla u kultury 1282 (RS7) WT pozorována konstantní koncentrace viru mezi 12 a 24 hpi (viz. Obr 11D). U kultury 1356 (RS7) DcrOO došlo k mírnému poklesu koncentrace viru mezi intervaly 12 a 24 hpi, která v intervalu 72 hpi následně vzrostla (viz. Obr. 11D).



**Obr. 11:** Koncentrace viru EMCV v supernatantu infikovaných kultur. Koncentrace viru v intervalech (A) 12 hpi, (B) 24 hpi a (C) 72 hpi. (D) Srovnání koncentrací viru v mESC v daném intervalu. Data byla porovnána pomocí t-testu (ns>0.05, \*p<0.05,\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.002, \*\*\*\*p<0.0001). Detekční mez je znázorněna pomocí přerušované přímky.

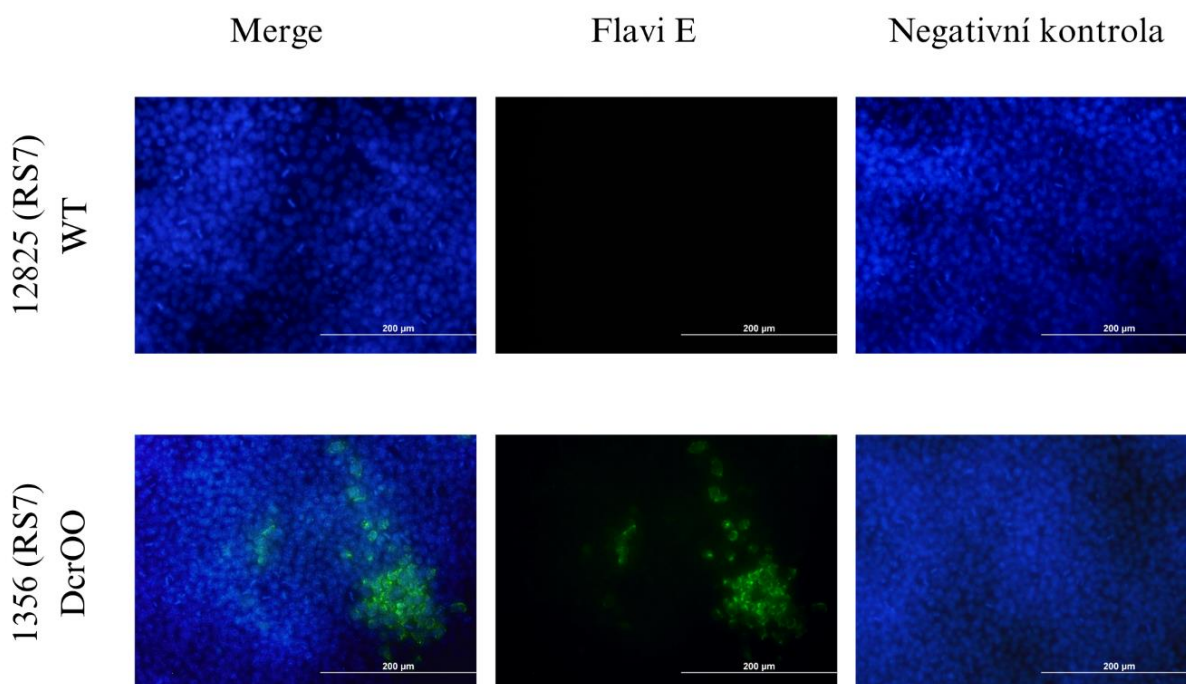
Koncentrace viru v supernatantu získaném z kultur infikovaných VKE Hypr byly rovněž jako v případě viru EMC vyneseny do grafu (viz. Obr. 12).



**Obr. 12:** Supernatant byl odebrán od infikovaných kultur mESC v intervalu (A) 12 hpi, (B) 24 hpi a (C) 72 hpi. (D) Srovnání koncentrace VKE Hypr v mESC v jednotlivých intervalech. Data byla porovnána pomocí t-testu ns>0.05, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.002, \*\*\*\*p<0.0001). Detekční mez je znázorněna pomocí přerušované přímky.

### 4.2.3. Myší embryonální kultury a infekce VKE Hypr

Pro identifikaci a stanovení proinfikovanosti kultur bylo provedeno imunofluorescenční barvení, při kterém byla použita protilátka zaměřená proti obalovému glykoproteinu E. Vzorky byly zpracovány v duplikátech a barvení bylo provedeno 72 hodin po infekci buněk. Na snímcích na obrázku 13 je zachycen pozitivní signál, který byl zaznamenán u kultury 1356 (RS7) DcrOO, zatímco u kultury 12825 (RS7) WT nebyl signál detekován. Infekce VKE Hypr způsobila proinfikovanost kultury 1356 (RS7) DcrOO ve výši 8 %. Tento údaj byl vypočítán jako počet infikovaných buněk z celkového počtu 1 000 buněk. Pro každou kulturu byla rovněž zahrnuta kontrola obsahující neinfikované buňky (ozn. negativní kontrola).



**Obr. 13:** Při infekci kultury mESC kmenem VKE Hypr bylo zjištěno zastoupení flavivirového proteinu E (označeného zeleně). Buněčná jádra byla zvýrazněna pomocí barviva DAPI (modrá barva). Měřítka je součástí snímků (200 µm).

## 5. Diskuze

Onemocnění, známe jako klíšťová encefalitida (KE), je způsobeno virem klíšťové encefalitidy. Průběh tohoto onemocnění je ovlivněn řadou faktorů, jak ze strany hostitele, tak ze strany patogenu. Závažnost průběhu onemocnění KE je spojována s konkrétními virovými subtypy, který onemocnění vyvolávají. Tyto subtypy se liší nejen v patogenitě, ale také geografickým rozšířením, což je spojeno s výskytem konkrétních vektorů (Růžek *et al.*, 2019, Černý *et al.*, 2019).

Virus KE patří mezi flaviviry, které jsou schopny proniknout přes BBB a vyvolávat encefalitidu či infikovat mikroglie. Z rodiny flavivirů jsou toho schopny např. virus Zika či virus Dengue (Tsai *et al.*, 2016; Lum *et al.*, 2017). V centrální nervové soustavě (CNS) se virus zaměřuje primárně na infekci neuronů (Gelpi *et al.*, 2005). Nicméně virus je schopen infikovat i další buněčné populace, které se v této oblasti nacházejí. Z buněčných populací, které rovněž podléhají infekci VKE jsou to např. astrocyty (Palus *et al.*, 2014, Selinger *et al.*, 2022), mikrovaskulární endoteliální buňky (Palus *et al.*, 2017) či mikroglie (Fares *et al.*, 2020).

Infekce mikroglíí dokáže ovlivnit vnitřní prostředí mozku a další buňky. Během infekce zastávají mikroglie významnou roli, zejména díky své schopnosti sekrece biologicky aktivních molekul. Tyto molekuly, v závislosti na konkrétním fenotypu mikroglie, zahrnují cytokiny a chemokiny, které ovlivňují funkci hematoencefalitické bariéry a buněk v mozковém parenchymu (Hanisch, 2002; Smith *et al.*, 2012).

Cílem této práce bylo objasnit vnímavost lidských mikroglíálních kultur na infekci VKE, které se při studiu této problematiky využívají. Studovanými mikroglíemi byly lidské primární mikroglie (HM), lidské imortalizované mikroglie (HM IM) a lidské liniové mikroglie (HMC3). Zda-li mikroglie podléhají infekci subtypy VKE bylo ověřeno pomocí třech kmenů VKE, které se odlišují ve své neuropatogenitě.

Imunofluorescenční analýzou byla prokázána citlivost všech testovaných kultur na tři virulentně odlišné kmeny VKE. V našich experimentech byla zjištěna procentuální variabilita infikovaných buněk mikroglíálních kultur v závislosti na kmenu VKE. Při použití lidských liniových mikroglíí byla pozorována snižující se proinfikovanost korelující se zvyšující se virulencí použitého kmene VKE. Nejvyšší proinfikovanosti kultury dosáhl kmen VKE 280 oproti kmenu VKE Neu a Hypr. Kmen VKE Hypr patří k vysoce virulentním kmenům, který se projevuje u mnoha gliových buněčných linií svým charakteristickým

cytopatickým efektem. Cytopatický efekt na gliové buňky detailně popsal Fares *et al.* (2020). V našem případě však nebyla zaznamenána změna v morfologii HMC3.

Hodnoty proinfikovaností kmenů VKE byly v případě liniových mikroglíí několika násobně vyšší, než jak tomu bylo následně u lidských immortalizovaných a primárních mikroglíí. Výrazně nižší hodnoty by mohly být z části způsobeny samotným přežíváním buněk během experimentů. Zatímco u experimentů s liniovými mikroglíemi bylo pozorována přibližná 50% konfluence, při experimentech s HM IM a HM došlo k výraznému úbytku buněk, přestože byl postup barvení optimalizován. Za vysokými ztrátami buněk by mohl být samotný virus VKE Hypr, který by mohl způsobit buněčnou apoptózu. Pro zhodnocení, zdali však byl úbytek zapříčiněn přítomností VKE Hypr a celkové buněčné morfologie by bylo příhodnější přistoupit k detailnějším zobrazovacím technikám např. elektronové mikroskopii a metodám detekce apoptózy (Roingeard *et al.*, 2019).

Nejnižší procento infikovaných buněk v kultuře HM měl kmen VKE Hypr, pouze 10 %. Kmen VKE Neudoerfl a VKE 280, které jsou v porovnání s VKE Hypr méně virulentní, dosáhly vyšších procent infikovaných buněk. U primárních mikroglíí byla rovněž pozorována odlišná distribuce virového antigenu. Zatímco u kmene VKE 280 byl antigen detekován převážně v buněčných výbězcích, u kmenů VKE Neu a VKE Hypr byl antigen lokalizován blíže k buněčnému jádru. Obdobný účinek VKE Hypr byl již pozorován u odlišných buněk CNS, konkrétně neuronů a astrocytů (Fares *et al.*, 2020).

Antivirová odpověď savčích buněk je založena na několika mechanismech, které mají za cíl eliminovat patogen. U savců se časná rezistence vůči virům opírá o interferony, které chrání diferencované buňky, ale nikoliv kmenové buňky před virovou replikací. Mnoho organismů se spoléhá na RNAi zprostředkovanou proteinem Dicer, který štěpí virovou dsRNA. Zda RNAi také přispívá k antivirové imunitě savců, zůstává z velké části neobjasněno. Aby bylo možné sledovat účinky proteinu Dicer na VKE Hypr byly použity myší embryonální buňky. Role Dicer proteinu při infekci flaviviry je studována u širokého spektra embryonálních kultur. Pro tyto kultury nacházíme záznamy o jejich vnímavosti vůči studovaným virům, rovněž i zapojení proteinu Dicer do antivirové obrany (Xu *et al.*, 2019; Qiu *et al.*, 2020; Zeng *et al.*, 2020). V případě myších embryonálních kultur byla prokázána virová exprese pro virus Západonilské horečky (WNV), virus dengue a virus Zika (Tang *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2018). Pro neuroinvasivitu nacházíme údaje pouze pro WNV, u dalších virů nejsou zdroje dostupné. Toto zjištění poukazuje na obecný předpoklad, že pluripotentní buňky mESC mohou být infikovány pouze určitými viry. Kromě zjištěných rozdílů ve schopnosti infikovat kultury, které se mezi flaviviry objevují, nacházíme rovněž údaje o



variabilitě mezi buněčnými receptory, které flaviviry využívají pro vazbu virových částic (Laureti *et al.*, 2018; Potokar, Jorgačevski a Zorec, 2019). Tento virový tropismus by mohl hrát roli i v případě VKE.

V této práci byly pozorovány byly dvě kultury s odlišnou aktivitou proteinu Dicer a to kultura, která disponuje divokým typem proteinu Dicer, a kultura jež má aktivitu Dicer zesílenou (Svobodova, Kubikova and Svoboda, 2016).

Pozorování vývoje infekce virem EMCV ukázalo cytopatický efekt již během prvních 12 hodin od infekce a tento účinek viru dále narůstal. Naše pozorování se tak shoduje s výzkumy, které již byly dříve publikovány (Craighead, 1966; Oren, Shahar and Monzain, 1975).

Během inkubace VKE Hypr s mESC nebyl pozorován očekávaný cytopatický efekt. Imunofluorescenční značení flavivirového antigenu ukázalo infekci pouze u jedné z embryonálních kultur, konkrétně u kultury 1356 (RS7) DcrOO, která disponuje izoformou proteinu Dicer. Proinfikovanost této kultury činila 8 % infikovaných buněk. Procento infikovaných buněk sledovali u neuroprogenitorových kultur Fares *et al.* (2020), kteří zaznamenali obdobné hodnoty proinfikovanosti v časných intervalech infekce VKE Hypr. Nepřímá imunofluorescence byla provedena 3 dny po infekci, na základě zjištěných rozdílů mezi embryonálními kulturami jsme očekávali rozdíly v tomto intervalu i ve výsledcích plakové titrace.

Schopnost replikace EMCV v embryonálních buňkách byla prokázána metodou plakové titrace, toto pozorování tak je v souladu s výsledky Kelly, Shanley and Sears, (1983). Rostoucí koncentrace EMCV byla pozorována již 12 hodin po infekci. Naše zjištění tak korelují s poznatky Shahar and Monzain (1975).

V závislosti na nedostatečných zdrojích, které by se zaměřovaly na studium interakce VKE Hypr s mESC byly naše výsledky porovnávány se studii zabývající se interakcemi dalších flavivirů (ZIKV, WNV, DENV) s pluripotentními buňkami. Shodně s poznatky Desole *et al.*, (2019) a Poirier *et al.* (2021), kteří ve své práci využívali pluripotentní kmenové buňky a embryonální buňky, jsme zaznamenali schopnost VKE Hypr replikace v mESC. I v našem případě vzrůstala koncentrace VKE Hypr od intervalu 24 hodin po infekci, obdobně jako v případě ZIKV, WNV a DENV v hiPSC (Desole *et al.*, 2019).

## 6. Závěr

Experimenty zaměřeny na stanovení proinfikovanosti mikroglálních kultur kmeny VKE, potvrdily vnímavost mikroglálních kultur vůči všem kmenům VKE. U kultur byly sledovány odlišnosti v procentuální proinfikovanosti v závislosti na daném kmenu VKE.

Pozorování vlivu izoformy v genu proteinu Dicer při infekci virulentním VKE Hypr neprokázalo vliv její přítomnosti na schopnost kultury odolávat infekci VKE Hypr. Plaková titrace potvrdila přítomnost VKE Hypr ve studovaných myších embryonálních kulturách po sledovanou dobu. Procentuální proinfikovanost pomocí imunofluorescenčního značení byla prokázána pouze pro kulturu disponující izoformou v genu proteinu Dicer.

Inkubace EMCV s myšími embryonálními kulturami potvrdila pomocí plakového testu vnímavosti kultury vůči tomuto viru. Zaznamenán byl silný cytopatický účinek EMCV vůči daným kulturám.

## 7. Literární zdroje

Adachi, M. *et al.* (1975) 'Ultrastructural alterations of tissue cultures from human fetal brain infected with the E variant of EMC virus', *Acta Neuropathologica*, 32(2), pp. 133–142. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00689567>.

Aguzzi, A., Barres, B.A. and Bennett, M.L. (2013) 'Microglia: Scapegoat, Saboteur, or Something Else?', *Science*, 339(6116), pp. 156–161. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1227901>.

Alliot, F., Godin, I. and Pessac, B. (1999) 'Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain', *Developmental Brain Research*, 117(2), pp. 145–152. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0165-3806\(99\)00113-3](https://doi.org/10.1016/S0165-3806(99)00113-3).

Al-Obaidi, M.M.J. *et al.* (2018) 'Disruption of the blood brain barrier is vital property of neurotropic viral infection of the central nervous system', *Acta Virologica*, 62(1), pp. 16–27. Available at: [https://doi.org/10.4149/av\\_2018\\_102](https://doi.org/10.4149/av_2018_102).

Alonso-Alonso, M.L. *et al.* (2022) 'Need for a Paradigm Shift in the Treatment of Ischemic Stroke: The Blood-Brain Barrier', *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16), p. 9486. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms23169486>.

Barp, N. *et al.* (2020) 'Clinical and laboratory findings in tick-borne encephalitis virus infection', *Parasite Epidemiology and Control*, 10, p. e00160. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2020.e00160>.

Blom, K. *et al.* (2016) 'NK Cell Responses to Human Tick-Borne Encephalitis Virus Infection', *The Journal of Immunology*, 197(7), pp. 2762–2771. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600950>.

Bogovič, P. *et al.* (2018) 'The long-term outcome of tick-borne encephalitis in Central Europe', *Ticks and Tick-borne Diseases*, 9(2), pp. 369–378. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.12.001>.

Černý, J. *et al.* (2019) 'Hard ticks and tick-borne pathogens in Mongolia—A review', *Ticks and Tick-borne Diseases*, 10(6), p. 101268. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.101268>.

Cerwenka, A. and Lanier, L.L. (2001) 'Natural killer cells, viruses and cancer', *Nature Reviews Immunology*, 1(1), pp. 41–49. Available at: <https://doi.org/10.1038/35095564>.

Colonna, M. and Butovsky, O. (2017) 'Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration', *Annual Review of Immunology*, 35(1), pp. 441–468. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052358>.

Craighead, J.E. (1966) 'Pathogenicity of the M and E variants of the encephalomyocarditis (EMC) virus. I. Myocardiotropic and neurotropic properties', *The American Journal of Pathology*, 48(2), pp. 333–345.

Dello Russo, C. *et al.* (2018) 'The human microglial HMC3 cell line: where do we stand? A systematic literature review', *Journal of Neuroinflammation*, 15(1), p. 259. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1288-0>.

Demina, T.V. *et al.* (2010) 'Genotyping and characterization of the geographical distribution of tick-borne encephalitis virus variants with a set of molecular probes', *Journal of Medical Virology*, 82(6), pp. 965–976. Available at: <https://doi.org/10.1002/jmv.21765>.

Desole, G. *et al.* (2019) 'Modelling Neurotropic Flavivirus Infection in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Systems', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21), p. 5404. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms20215404>.

Dumpis, U., Crook, D. and Oksi, J. (1999) 'Tick-Borne Encephalitis', *Clinical Infectious Diseases*, 28(4), pp. 882–890. Available at: <https://doi.org/10.1086/515195>.

Ecker, M. *et al.* (1997) 'Characterization of monoclonal antibody-escape mutants of tick-borne encephalitis virus with reduced neuroinvasiveness in mice.', *Journal of General Virology*, 78(1), pp. 31–37. Available at: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-1-31>.

- Ecker, M. *et al.* (1999) 'Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia.', *Journal of General Virology*, 80(1), pp. 179–185. Available at: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-1-179>.
- Fares, M. *et al.* (2020) 'Pathological modeling of TBEV infection reveals differential innate immune responses in human neurons and astrocytes that correlate with their susceptibility to infection', *Journal of Neuroinflammation*, 17(1), p. 76. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01756-x>.
- Flemr, M. *et al.* (2013) 'A Retrotransposon-Driven Dicer Isoform Directs Endogenous Small Interfering RNA Production in Mouse Oocytes', *Cell*, 155(4), pp. 807–816. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.001>.
- Francia, S. *et al.* (2012) 'Site-specific DICER and DROSHA RNA products control the DNA-damage response', *Nature*, 488(7410), pp. 231–235. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature11179>.
- Gelpi, E. *et al.* (2005) 'Visualization of Central European Tick-Borne Encephalitis Infection in Fatal Human Cases', *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 64(6), pp. 506–512. Available at: <https://doi.org/10.1093/jnen/64.6.506>.
- Ginhoux, F. *et al.* (2010) 'Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages', *Science*, 330(6005), pp. 841–845. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1194637>.
- Goubau, D., Deddouche, S. and Reis e Sousa, C. (2013) 'Cytosolic Sensing of Viruses', *Immunity*, 38(5), pp. 855–869. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.05.007>.
- Haasnoot, J., Westerhout, E.M. and Berkhout, B. (2007) 'RNA interference against viruses: strike and counterstrike', *Nature Biotechnology*, 25(12), pp. 1435–1443. Available at: <https://doi.org/10.1038/nbt1369>.
- Hanisch, U. (2002) 'Microglia as a source and target of cytokines', *Glia*, 40(2), pp. 140–155. Available at: <https://doi.org/10.1002/glia.10161>.

Helmová, R. *et al.* (2020) ‘Tick-Borne Encephalitis Virus Adaptation in Different Host Environments and Existence of Quasispecies’, *Viruses*, 12(8), p. 902. Available at: <https://doi.org/10.3390/v12080902>.

Chambers, T.J. and Diamond, M.S. (2003) ‘Pathogenesis of flavivirus encephalitis’, in *Advances in Virus Research*. Elsevier, pp. 273–342. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(03\)60008-4](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(03)60008-4).

Chen, Z. and Li, G. (2021) ‘Immune response and blood–brain barrier dysfunction during viral neuroinvasion’, *Innate Immunity*, 27(2), pp. 109–117. Available at: <https://doi.org/10.1177/1753425920954281>.

Helwig, F.C. and Schmidt, C.H. (1945) ‘A Filter-Passing Agent Producing Interstitial Myocarditis in Anthropoid Apes and Small Animals’, *Science*, 102(2637), pp. 31–33. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.102.2637.31>.

Holzmann, H. *et al.* (1990) ‘A single amino acid substitution in envelope protein E of tick-borne encephalitis virus leads to attenuation in the mouse model’, *Journal of Virology*, 64(10), pp. 5156–5159. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.64.10.5156-5159.1990>.

Iannello, A. *et al.* (2005) ‘Viral strategies for evading antiviral cellular immune responses of the host’, *Journal of Leukocyte Biology*, 79(1), pp. 16–35. Available at: <https://doi.org/10.1189/jlb.0705397>.

Janabi, N. *et al.* (1995) ‘Establishment of human microglial cell lines after transfection of primary cultures of embryonic microglial cells with the SV40 large T antigen’, *Neuroscience Letters*, 195(2), pp. 105–108. Available at: [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(94\)11792-H](https://doi.org/10.1016/0304-3940(94)11792-H).

Kang, R. *et al.* (2020) ‘The Dual Role of Microglia in Blood-Brain Barrier Dysfunction after Stroke’, *Current Neuropharmacology*, 18(12), pp. 1237–1249. Available at: <https://doi.org/10.2174/1570159X18666200529150907>.

Kellman, E. *et al.* (2018) ‘Viral Determinants of Virulence in Tick-Borne Flaviviruses’, *Viruses*, 10(6), p. 329. Available at: <https://doi.org/10.3390/v10060329>.

Kelly, P.M., Shanley, J.D. and Sears, J. (1983) 'Replication of encephalomyocarditis virus in various mammalian cell types', *Journal of Medical Virology*, 11(3), pp. 257–264. Available at: <https://doi.org/10.1002/jmv.1890110309>."

Kennedy, E.M. *et al.* (2015) 'Production of functional small interfering RNAs by an amino-terminal deletion mutant of human Dicer', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(50). Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1513421112>.

Kovalev, S.Y. and Mukhacheva, T.A. (2017) 'Reconsidering the classification of tick-borne encephalitis virus within the Siberian subtype gives new insights into its evolutionary history', *Infection, Genetics and Evolution*, 55, pp. 159–165. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.09.014>.

Kuhn, J.H. *et al.* (2022) '2022 taxonomic update of phylum Negarnaviricota (Riboviria: Orthornavirae), including the large orders Bunyavirales and Mononegavirales', *Archives of Virology*, 167(12), pp. 2857–2906. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05546-z>.

Laureti, M. *et al.* (2018) 'Flavivirus Receptors: Diversity, Identity, and Cell Entry', *Frontiers in Immunology*, 9, p. 2180. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02180>.

Leary, K. and Blair, C.D. (1980) 'Sequential events in the morphogenesis of Japanese encephalitis virus', *Journal of Ultrastructure Research*, 72(2), pp. 123–129. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(80\)90050-7](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(80)90050-7).

Lum, F.-M. *et al.* (2017) 'Zika Virus Infects Human Fetal Brain Microglia and Induces Inflammation', *Clinical Infectious Diseases*, 64(7), pp. 914–920. Available at: <https://doi.org/10.1093/cid/ciw878>.

MacKay, C.R., Wang, J.P. and Kurt-Jones, E.A. (2014) 'Dicer's role as an antiviral: still an enigma', *Current Opinion in Immunology*, 26, pp. 49–55. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.coi.2013.10.015>.

Maillard, P.V. *et al.* (2013) ‘Antiviral RNA Interference in Mammalian Cells’, *Science*, 342(6155), pp. 235–238. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1241930>.

Mandl, C.W. (2005) ‘Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that affect neuropathogenesis’, *Virus Research*, 111(2), pp. 161–174. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.04.007>.

Marshall, J.S. *et al.* (2018) ‘An introduction to immunology and immunopathology’, *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 14(S2), p. 49. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0278-1>.

Mcgeer, P. and Mcgeer, E. (1995) ‘The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases’, *Brain Research Reviews*, 21(2), pp. 195–218. Available at: [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(95\)00011-9](https://doi.org/10.1016/0165-0173(95)00011-9).

Mogensen, T.H. and Paludan, S.R. (2001) ‘Molecular Pathways in Virus-Induced Cytokine Production’, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(1), pp. 131–150. Available at: <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.1.131-150.2001>.

Nguyen, H.M. *et al.* (2017) ‘Differential Kv1.3, KCa3.1, and Kir2.1 expression in “classically” and “alternatively” activated microglia’, *Glia*, 65(1), pp. 106–121. Available at: <https://doi.org/10.1002/glia.23078>.

Oren, R., Shahar, A. and Monzain, R. (1975) ‘Demyelination and cytopathic effects in cultures of mammalian dorsal root ganglia infected with encephalomyocarditis virus’, *Journal of Virology*, 16(2), pp. 356–365. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.16.2.356-365.1975>.

Palus, M. *et al.* (2014) ‘Infection and injury of human astrocytes by tick-borne encephalitis virus’, *Journal of General Virology*, 95(11), pp. 2411–2426. Available at: <https://doi.org/10.1099/vir.0.068411-0>.

Palus, M. *et al.* (2017) ‘Tick-borne encephalitis virus infects human brain microvascular endothelial cells without compromising blood-brain barrier integrity’, *Virology*, 507, pp. 110–122. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.04.012>.



Papa, M.P. *et al.* (2017) ‘Zika Virus Infects, Activates, and Crosses Brain Microvascular Endothelial Cells, without Barrier Disruption’, *Frontiers in Microbiology*, 8, p. 2557. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02557>.

Pardy, R.D. and Richer, M.J. (2019) ‘Protective to a T: The Role of T Cells during Zika Virus Infection’, *Cells*, 8(8), p. 820. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells8080820>.

Persidsky, Y. *et al.* (2006) ‘Blood–brain Barrier: Structural Components and Function Under Physiologic and Pathologic Conditions’, *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 1(3), pp. 223–236. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11481-006-9025-3>.

Petty, M.A. and Lo, E.H. (2002) ‘Junctional complexes of the blood–brain barrier: permeability changes in neuroinflammation’, *Progress in Neurobiology*, 68(5), pp. 311–323. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(02\)00128-4](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(02)00128-4).

Poirier, E.Z. *et al.* (2021) ‘An isoform of Dicer protects mammalian stem cells against multiple RNA viruses’, *Science*, 373(6551), pp. 231–236. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.abg2264>.

Potokar, M., Jorgačevski, J. and Zorec, R. (2019) ‘Astrocytes in Flavivirus Infections’, *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), p. 691. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms20030691>.

Pozzetto, B. *et al.* (2023) *Arboviral Risk Associated with Solid Organ and Hematopoietic Stem Cell Grafts: The Prophylactic Answers Proposed by the French High Council of Public Health in a National Context*. preprint. Biology and Life Sciences. Available at: <https://doi.org/10.20944/preprints202308.0299.v1>.

Qiu, Y. *et al.* (2020) ‘Flavivirus induces and antagonizes antiviral RNA interference in both mammals and mosquitoes’, *Science Advances*, 6(6), p. eaax7989. Available at: <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax7989>.

Rampersad, S. and Tennant, P. (2018) ‘Replication and Expression Strategies of Viruses’, in *Viruses*. Elsevier, pp. 55–82. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811257-1.00003-6>.

Robertson, S.J. *et al.* (2014) ‘Tick-Borne Flaviviruses Antagonize Both IRF-1 and Type I IFN Signaling To Inhibit Dendritic Cell Function’, *The Journal of Immunology*, 192(6), pp. 2744–2755. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302110>.

Roingard, P. *et al.* (2019) ‘Virus detection by transmission electron microscopy: Still useful for diagnosis and a plus for biosafety’, *Reviews in Medical Virology*, 29(1), p. e2019. Available at: <https://doi.org/10.1002/rmv.2019>.

Ronaldson, P.T. and Davis, T.P. (2020) ‘Regulation of blood–brain barrier integrity by microglia in health and disease: A therapeutic opportunity’, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 40(1\_suppl), pp. S6–S24. Available at: <https://doi.org/10.1177/0271678X20951995>.

Růžek, D. *et al.* (2011) ‘Breakdown of the Blood-Brain Barrier during Tick-Borne Encephalitis in Mice Is Not Dependent on CD8+ T-Cells’, *PLoS ONE*. Edited by A.R. Fooks, 6(5), p. e20472. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020472>.

Ruzek, D. *et al.* (2019) ‘Tick-borne encephalitis in Europe and Russia: Review of pathogenesis, clinical features, therapy, and vaccines’, *Antiviral Research*, 164, pp. 23–51. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.01.014>.

Selinger, M. *et al.* (2022) ‘Integrative RNA profiling of TBEV-infected neurons and astrocytes reveals potential pathogenic effectors’, *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 20, pp. 2759–2777. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.05.052>.

Seth, R.B., Sun, L. and Chen, Z.J. (2006) ‘Antiviral innate immunity pathways’, *Cell Research*, 16(2), pp. 141–147. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310019>.

Shapiro, L.A. *et al.* (2009) 'Morphological and ultrastructural features of Iba1-immunolabeled microglial cells in the hippocampal dentate gyrus', *Brain Research*, 1266, pp. 29–36. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.02.031>.

Shapouri-Moghaddam, A. *et al.* (2018) 'Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease', *Journal of Cellular Physiology*, 233(9), pp. 6425–6440. Available at: <https://doi.org/10.1002/jcp.26429>.

Share, J.B. (1976) 'Review of drug treatment for Down's syndrome persons', *American Journal of Mental Deficiency*, 80(4), pp. 388–393.

Sica, A. and Mantovani, A. (2012) 'Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas', *Journal of Clinical Investigation*, 122(3), pp. 787–795. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI59643>.

Strauss-Albee, D.M. *et al.* (2015) 'Human NK cell repertoire diversity reflects immune experience and correlates with viral susceptibility', *Science Translational Medicine*, 7(297). Available at: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aac5722>.

Svobodova, E., Kubikova, J. and Svoboda, P. (2016) 'Production of small RNAs by mammalian Dicer', *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, 468(6), pp. 1089–1102. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00424-016-1817-6>.

Takahashi, T., Heaton, S.M. and Parrish, N.F. (2021) 'Mammalian antiviral systems directed by small RNA', *PLOS Pathogens*. Edited by C.B. Wilen, 17(12), p. e1010091. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010091>.

Tang, H. *et al.* (2016) 'Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth', *Cell Stem Cell*, 18(5), pp. 587–590. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.02.016>.

Tang, Y. and Le, W. (2016) 'Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases', *Molecular Neurobiology*, 53(2), pp. 1181–1194. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12035-014-9070-5>.

Thongtan, T. *et al.* (2010) ‘Highly permissive infection of microglial cells by Japanese encephalitis virus: a possible role as a viral reservoir’, *Microbes and Infection*, 12(1), pp. 37–45. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.09.013>.

Tsai, T.-T. *et al.* (2016) ‘Microglia retard dengue virus-induced acute viral encephalitis’, *Scientific Reports*, 6(1), p. 27670. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep27670>.

Van Den Elsen, K., Quek, J.P. and Luo, D. (2021) ‘Molecular Insights into the Flavivirus Replication Complex’, *Viruses*, 13(6), p. 956. Available at: <https://doi.org/10.3390/v13060956>.

Van Erp, E. *et al.* (2019) ‘Viral Infection of Human Natural Killer Cells’, *Viruses*, 11(3), p. 243. Available at: <https://doi.org/10.3390/v11030243>.

Wang, L. *et al.* (2019) ‘M2b macrophage polarization and its roles in diseases’, *Journal of Leukocyte Biology*, 106(2), pp. 345–358. Available at: <https://doi.org/10.1002/JLB.3RU1018-378RR>.

Weber, F. *et al.* (2006) ‘Double-Stranded RNA Is Produced by Positive-Strand RNA Viruses and DNA Viruses but Not in Detectable Amounts by Negative-Strand RNA Viruses’, *Journal of Virology*, 80(10), pp. 5059–5064. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.80.10.5059-5064.2006>.

Weber, F. (2021) ‘Antiviral Innate Immunity: Introduction’, in *Encyclopedia of Virology*. Elsevier, pp. 577–583. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21290-9>.

Westaway, E.G. *et al.* (1985) ‘Flaviviridae’, *Intervirology*, 24(4), pp. 183–192. Available at: <https://doi.org/10.1159/000149642>.

Wu, X. *et al.* (2018) ‘Intrinsic Immunity Shapes Viral Resistance of Stem Cells’, *Cell*, 172(3), pp. 423–438.e25. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.018>.

Xu, Y.-P. *et al.* (2019) ‘Zika virus infection induces RNAi-mediated antiviral immunity in human neural progenitors and brain organoids’, *Cell Research*, 29(4), pp. 265–273. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0152-9>.

Zeng, J. *et al.* (2020) ‘The Zika Virus Capsid Disrupts Corticogenesis by Suppressing Dicer Activity and miRNA Biogenesis’, *Cell Stem Cell*, 27(4), pp. 618-632.e9. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.07.012>.

Zhang, M. *et al.* (2022) ‘The comparative genomic analysis provides insights into the phylogeny and virulence of tick-borne encephalitis virus vaccine strain Senzhang’, *PLOS ONE*. Edited by A. Marcello, 17(8), p. e0273565. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0273565>.

## 8. Zkratky

ATP	adenosin tri fostát
BBB	z angl. <i>Blood brain barrier</i>
CD11	marker dendritických buněk
CNS	centrální nervová soustava
DAMP	molekulární vzory spojené s poškozením (z angl. <i>Damage-associated molecular patterns</i> )
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dsRNA	dvoušroubová RNA
EMCV	virus encefalomyelitidy
ER	endoplazmatické retikulum
FBS	fetální bovviní sérum
Flavi E	flavivirový E protein
hDicer	lidský Dicer (z ang. <i>human Dicer</i> )
HM	lidské mikroglie
HMC3	lidské liniové mikroglie
HM IM	lidské imortalizované mikroglie
hNPC	lidské neuro progenitorové buňky
hpi	hodin po infekci
Iba 1	alografický faktor 1
IL	interleukin
INF	interferon
KE	klíšťová encefalitida
mESC	myší embryonální buňky (z ang. <i>Mouse embryonic stem cell</i> )
MOI	multiplicita infekce (z angl. <i>Multiplicity of infection</i> )
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NK buňky	z ang. <i>Natural killer</i>
NS5	nestruturní protein 5 (z ang. <i>Nonstructural protein</i> )
PAMP	molekulární vzory spojené s patogeny
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok
PDZ	akronym kombinace prvních písmen třech proteinů protein PSD95 ( <i>postsynaptic density protein</i> ) DlgA ( <i>Drosophila disclarge tumor suppressor</i> ) a zo-1 ( <i>zonula occludens -1 protein</i> )
PFU	plakotvorná jednotka (z ang. <i>Plaque formit unit</i> )
RISC	ribonukleoproteinový komplex
RNA	ribonukleová kyselina
RNAi	RNA umlčovací komplex
SEM	z angl. <i>standard error of the mean</i>
siRNA	z angl. <i>small interfering RNA</i>
TBEV	z angl. <i>Tick-borne encephalitis virus</i>

TNF

z angl. *tumor necrosis factor*

## 9. Přílohy

**Tab. VI:** Koncentrace EMCV viru v embryonálních kulturách

	<b>vzorky</b>	<b>PFU/ml</b>
<b>Interval 12hpi</b>	1282 0	$6,67 \cdot 10^2$
	1282 (RS7) WT	$1,48 \cdot 10^2$
	1356 0	$3,70 \cdot 10^1$
	1356 (RS7) DcrOO	$2,10 \cdot 10^2$
<b>Interval 24hpi</b>	<b>vzorky</b>	<b>PFU/ml</b>
	1282 0	$1,11 \cdot 10^3$
	1282 (RS7) WT	$1,23 \cdot 10^5$
	1356 0	$9,14 \cdot 10^2$
	1356 (RS7) DcrOO	$8,40 \cdot 10^4$
<b>Interval 72hpi</b>	<b>vzorky</b>	<b>PFU/ml</b>
	1282 0	$9,14 \cdot 10^2$
	1282 (RS7) WT	$3,46 \cdot 10^5$
	1356 0	$5,43 \cdot 10^2$
	1356 (RS7) DcrOO	$8,64 \cdot 10^5$

**Tab. VII:** Koncentrace viru VKE kmene Hypr v embryonálních kulturách

	<b>vzorky</b>	<b>PFU/ml</b>
<b>Interval 12hpi</b>	1282 0	$3,95 \cdot 10^2$
	1282 (RS7) WT	$7,90 \cdot 10^3$
	1356 0	$3,70 \cdot 10^1$
	1356 (RS7) DcrOO	$1,33 \cdot 10^5$
<b>Interval 24hpi</b>	<b>vzorky</b>	<b>PFU/ml</b>
	1282 0	$9,88 \cdot 10^1$
	1282 (RS7) WT	$8,89 \cdot 10^3$
	1356 0	$1,11 \cdot 10^2$
	1356 (RS7) DcrOO	$1,23 \cdot 10^4$
<b>Interval 72hpi</b>	<b>vzorky</b>	<b>PFU/ml</b>
	1282 0	$9,88 \cdot 10^1$
	1282 (RS7) WT	$9,1 \cdot 10^4$
	1356 0	$1,11 \cdot 10^2$
	1356 (RS7) DcrOO	$4,94 \cdot 10^5$