

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Příprava monoklonálních protilátek specifických
proti antigenům viru klíšťové encefalitidy pro další
využití v imunodetekci**

Diplomová práce

Bc. Hana Šmídová

Školitel: Mgr. Jaroslava Liesková, Ph. D.

Školitel specialista: prof. RNDr. Jan Kopecký, CSc.

České Budějovice

2022

Šmídová H., 2022: Příprava monoklonálních protilátek specifických proti antigenům viru klíšťové encefalitidy pro další využití v imunodetekci. [Preparation of monoclonal antibodies specific against tick-borne encephalitis virus antigens for further use in immunodetection. Mgr. Thesis, in Czech.] – p. 47, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Monoclonal antibodies are immunoglobulins produced by a single clone of B cells and bind very specifically to a particular antigenic epitope. Hybridoma technology is used for their preparation and they are widely used for the treatment and diagnosis of many diseases. The aim of this study was to prepare monoclonal antibodies specific against tick-borne encephalitis virus antigens for further use in immunodetection, their characterization, and optimization of used detection methods.

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

V Českých Budějovicích, 13.4. 2022

Bc. Hana Šmídová

Poděkování

Tímto bych chtěla v první řadě poděkovat své školitelce Mgr. Jaroslavě Lieskovské, Ph. D. a školiteli specialistovi prof. RNDr. Janu Kopeckému, CSc. za vedení celé práce a veškerou pomoc a čas, které mi věnovali, a bez kterých by tato práce nevznikla. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Zuzaně Beránkové, Ing. Evě Výletové a Mgr. Anně Kovařikové, na které jsem se mohla obrátit v případě jakýchkoliv problémů či nejasností, se kterými jsem se při práci v laboratoři setkala.

Také bych chtěla poděkovat Monče, Danče a Nikče, protože bez nich by ty roky byly mnohem hůře zvládnutelné a byly mi neuvěřitelnou oporou. Děkuji, že Vás mám.

To největší poděkování patří mé rodině za jejich pochopení, podporu a motivaci po dobu celého studia, a zejména Anetce s rodinou, kteří si mě na více než rok osvojili a ulehčili mi tak fungování po celou dobu snažení se dostat se až sem.

Děkuji Vám všem.

Obsah

1. Úvod	1
2. Literární přehled	2
2.1. Virus klíšťové encefalitidy	2
2.1.1. Základní charakteristika	2
2.1.2. Životní cyklus viru	2
2.1.3. Strukturní proteiny	4
2.1.4. Nestrukturní proteiny	5
2.2. Imunitní reakce na TBEV	7
2.2.1. Patogeneze TBE	7
2.2.2. Vrozená imunita	8
2.2.3. Adaptivní imunita	8
2.2.4. Projevy onemocnění a diagnostika	9
2.3. Protilátky	9
2.3.1. Produkce protilátek	10
2.3.2. Monoklonální protilátky	11
2.3. Hybridomová technologie	11
3. Cíle práce	14
4. Materiály a metodika	15
4.1. Kultivace buněčných linií	15
4.1.1. SP2/0-Ag14 buňky	15
4.1.2. A549 buňky	15
4.2. Viry klíšťové encefalitidy	16
4.3. Hybridomová technologie	16
4.3.1. Infekce myši	16
4.3.2. Odebrání sleziny a krve	17
4.3.3. Hybridomová fúze	17
4.4. Klonování hybridomů	18
4.4.1. Metoda klonování	18
4.5. Testování produkce pomocí imunofluorescence	18
4.5.1. Nasazení, infekce, fixace buněk	19
4.5.2. Imunofluorescence	19
4.6. Western blot	20
4.6.1. Příprava buněčných lyzátů	20
4.6.2. SDS-PAGE elektroforéza a blotování	21
4.6.3. Aplikace protilátek a detekce	23

4.7. Měření koncentrace, purifikace a izotypizace protilátek	24
5. Výsledky.....	25
5.1. Příprava monoklonálních protilátek.....	25
5.2. Optimalizace detekčních metod	30
5.3. Charakterizace monoklonální protilátky.....	33
6. Diskuse	35
7. Závěr.....	39
8. Seznam použitých zkratk	40
9. Reference	41

1. Úvod

Monoklonální protilátky jsou charakteristické svou specifitou vůči jednomu konkrétnímu antigennímu epitopu. Tyto imunoglobuliny jsou produkovány jedním klonem B-lymfocytů, tedy přesněji plazmocytem, při kontaktu s konkrétním antigenem. V dnešní době jsou monoklonální protilátky hojně využívány pro analytické, diagnostické a terapeutické účely.

Pro jejich přípravu je dodnes nejčastěji využíváno hybridomové technologie, která byla poprvé praktikována v roce 1975, a tento proces se, až na malé detaily, od té doby zásadně nezměnil.

Cílem této práce bylo využití právě hybridomové technologie pro vytvoření monoklonálních protilátek specifických proti antigenům viru klíšťové encefalidity.

2. Literární přehled

2.1. Virus klíšťové encefalitidy

2.1.1. Základní charakteristika

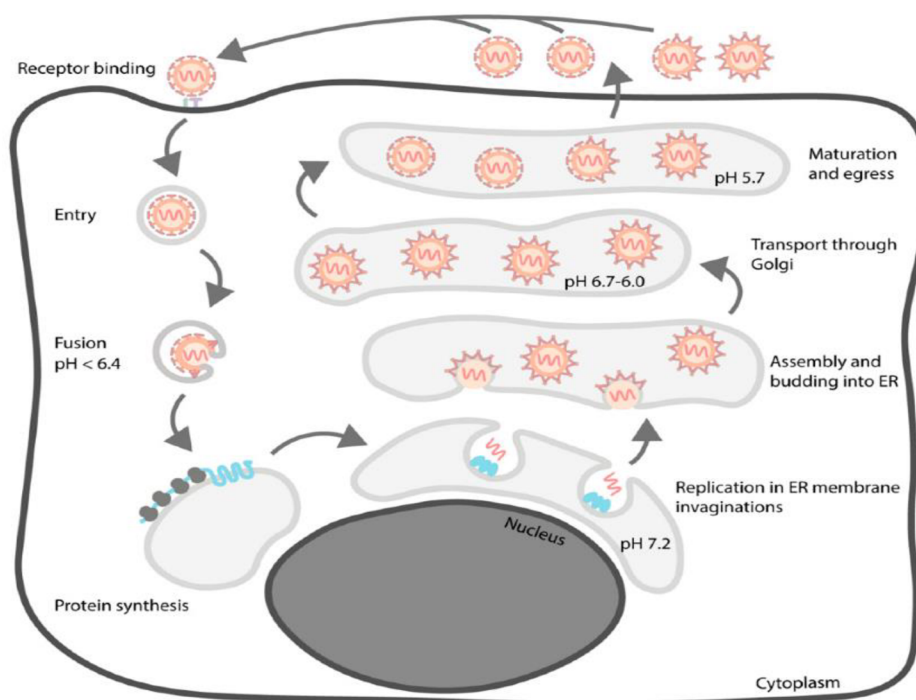
Virus klíšťové encefalitidy (TBEV) se řadí do rodu *Flavivirus* a čeledi *Flaviviridae*, kam můžeme zařadit i virus Japonské encefalitidy, virus Dengue nebo virus Žluté zimnice. Jedná se o arbovirus endemický zejména v Evropě a Asii a způsobuje u lidí vážná onemocnění, jako například meningoencefalitidy, poruchy hybnosti svalů či nervovou obrnu, s možnými trvalými následky. Fylogenetické analýzy během let odhalily tři hlavní subtypy TBEV: evropský, sibiřský a dálněvýchodní (Ličková *et al.*, 2021). Nedávno však byly popsány další dva subtypy TBEV: himalájský a bajkalský (Dai *et al.*, 2018; Kozlova *et al.*, 2018). Kromě této klasifikace, která je založena na geografické distribuci viru, se dají subtypy také rozdělit na základě více než 10% odlišnosti nukleotidové sekvence v ORF dvou virů. Tato klasifikace rozděluje TBEV do sedmi subtypů: TBEV-Eur (Evropský subtyp), TBEV-Sib (Sibiřský subtyp), TBEV-FE (Dálněvýchodní subtyp), TBEV-Ob (linie Obskaya, také možné označení TBEV-2871), TBEV-Him (Himalájský subtyp), TBEV-Bkl-1 (Bajkalský subtyp – ‚genotyp 4‘) a TBEV-Bkl-2 (Bajkalský subtyp – ‚genotyp 5‘) (Deviatkin *et al.*, 2020).

Stejně jako ostatní flaviviry je TBEV obalený virus s jednořetězcovou RNA o pozitivní polaritě. Genom o délce přibližně 11 kb kóduje jeden polyprotein ohraničený 5' a 3' nepřekládanými oblastmi (untranslated region, UTR). Po translaci je virový polyprotein rozštěpen virovými a buněčnými proteázami na tři strukturní (C, prM a E) a sedm nestrukturních (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B a NS5) proteinů, které usnadňují replikaci RNA a napomáhají viru unikat buněčné imunitě (Helmová *et al.*, 2020; Nicholls *et al.*, 2020). Virion se skládá z nukleokapsidy, která je obklopena membránou složenou z lipidů obdržených od hostitele. V těchto lipidech jsou zakomponovány proteiny virového obalu a membrány (protein E a M) (Füzik *et al.*, 2018). Nukleokapsida je tvořena několika kopiemi kapsidového proteinu (C protein) a jednou kopií genomu (Pulkkinen *et al.*, 2018).

2.1.2. Životní cyklus viru

Pro přenos TBEV jsou přenašečem členovci, primárně klíšťata, přičemž v Evropě je nejvýznamnějším přenašečem klíšť *Ixodes ricinus*, zatímco v Rusku a Asii je to *Ixodes persulcatus* (Michelitsch *et al.*, 2019). Dalším rizikovým faktorem přenosu TBEV na člověka se ukázala být také konzumace nepasterizovaného mléka nebo mléčných výrobků pocházejících z infikovaných hostitelů klíšťat, zejména koz, ovcí a krav (Buczek *et al.*, 2022).

Virus se naváže na povrch hostitelské buňky díky povrchovému proteinu E a vstupuje do buňky zejména receptorem zprostředkovanou endocytózou závislou na klathrinu (*Blom et al., 2018*). Nejčastěji skloňovanými receptory, co se TBEV v savčích buňkách týče, je laminin-vázající protein (laminin-binding protein, LBP), $\alpha V\beta 3$ integrin a heparan sulfát (*Rodrigues et al., 2019*). Po vstupu do buňky jsou viriony lokalizovány v endocytárních vezikulech, kde vlivem nízkého pH dochází ke konformačním změnám, které následně způsobují fúzi endosomální membrány s E proteinem, což má za následek uvolnění virového polyproteinu z nukleokapsidy do cytosolu buňky, odkud je transportován do endoplazmatického retikula. Zde dochází k zahájení replikace genomu a translaci (*Pulkkinen et al., 2018; Blom et al., 2018; Nicholls et al., 2020*). Replikace flavivirů probíhá ve dvou fázích. V časně fázi replikace je polyprotein štěpen na jednotlivé proteiny pomocí NS3 virové proteázy a hostitelských proteáz. Nestrukturní proteiny se následně uskupují do replikačního komplexu, který replikuje virovou RNA (*van den Elsen et al., 2021*). V pozdní fázi replikace interagují štěpené virové proteiny s hostitelskými buněčnými proteiny. Sekundární struktury lokalizované v 5' a 3' UTR virové ssRNA napomáhají cyklizaci a syntéze komplementárního negativního řetězce RNA (*Rastogi et al., 2016*). Z endoplazmatického retikula se nezralé viriony skrz lumen transportují do trans-Golgiho sítě, jejíž nízké pH podporuje maturaci virionů. Dochází zde k odštěpení prM domény proteinu pomocí proteázy furinu a následně se z buňky uvolňuje zralá virová částice (*Nicholls et al., 2020*).



Obr. 1: Schéma životní cyklu viru TBE v infikované buňce (*Pulkkinen et al., 2018*).

2.1.3. Strukturní proteiny

2.1.3.1. E protein

Obalový E protein o délce ~53 kDa je hlavní komponentou zralé TBEV částice a jako dimer je ukotven v její membráně. E protein hraje klíčovou roli v imunitní aktivaci, jelikož jedna z jeho čtyř domén zahrnuje virově specifické epitopy rozpoznávané neutralizačními protilátkami (Füzik *et al.*, 2018; Sanina *et al.*, 2018). Protein také zprostředkovává interakci virové částice s receptorem na povrchu hostitelské buňky a je díky němu umožněna fúze virového obalu s membránou endosomu po vstupu viru do buňky (Lattová *et al.*, 2020). Co se struktury E proteinu týče, lze ho definovat dle výše zmíněných domén. Tři N-terminální domény, složené většinou z β -řetězců, pokrývají povrch virionu. Doména I spojuje domény II a III a také obsahuje jediné glykosylační místo v TBEV, které se ukázalo být důležité pro sekreci virové částice z infikovaných buněk (Füzik *et al.*, 2018; Goto *et al.*, 2005). Doména II obsahuje smyčku nezbytně nutnou pro membránou fúzi v infikované buňce a umožnění tak dalšího procesu replikace a translace virové RNA. Doména III je potom tou, která byla již zmíněna ve spojitosti s neutralizačními protilátkami, které po navázání na tuto doménu znemožní v hostitelské buňce průběh konformačních změn vlivem pH nebo blokují vazbu na receptor. Doména IV je C-terminální částí E proteinu, která ho ukotvuje v membráně virové částice (Füzik *et al.*, 2018; Bressanelli *et al.*, 2004).

2.1.3.2. prM protein/M protein

M protein, takzvaný membránový, vzniká z prekurzoru, prM proteinu o velikosti 25 kDa, během maturace virionu v trans-Golgiho síti působením nízkého pH a následnými konformačními změnami, které mají za důsledek odštěpení pr domény od prM proteinu. Pr doména před oddělením zastává ochrannou funkci a zabraňuje předčasné fúzi nezralých virionů (Nicholls *et al.*, 2020). M protein se skládá z jedné periferní membránové helix, dvou transmembránových helixů a N-terminální smyčky, která je místem interakce s E proteiny (Pulkinen *et al.*, 2018). Ve formě dimeru společně s E proteinem tvoří heterotetramer a zároveň i základ zralého virionu. Interakce M proteinu s doménou II a s transmembránovou doménou E proteinu mu také zajišťuje větší stabilitu (Füzik *et al.*, 2018).

2.1.3.3. C protein

C protein, také zvaný kapsidový protein, je glykoprotein o velikosti ~11 kDa tvořící nukleokapsidu virové částice a chránící tak nukleovou kyselinu obsaženou v ní. Struktura kapsidového proteinu u TBEV nebyla dosud prozkoumána tak podrobně, jako protein E a M, ale bylo potvrzeno, že nukleokapsidové jádro neodpovídá ikosaedrické symetrii (Füzik *et al.*,

2018). C protein je nezbytný pro sestavení a zrání virových částic, a i proto je považován za slibný cíl eventuálního léku. V nezralém virionu je protein zabudován v membráně (označován jako anchC) a jeho štěpení virovou proteázou vytváří zralý C protein, který následně iniciuje štěpení prM proteinu furinem. AnchC je zároveň i signálním peptidem pro transport prM do lumenu endoplazmatického retikula (Zhang *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2017).

2.1.4. Nestruturní proteiny

2.1.4.1. NS1 protein

NS1 protein, který má velikost 46-55 kDa, se vyskytuje ve dvou formách. Jako dimer je intracelulární, volně v cytoplazmě nebo zakomponován v membráně, kde je důležitý pro replikaci virové RNA. Byla prokázána asociace NS1 s proteinem NS4, což zajišťuje stabilizaci a pomoc při replikaci. Intracelulární NS1 interaguje s ribozomálními proteiny podjednotky ribozomu 60S, které se účastní translace a některých extraribozomálních funkcí (Rastogi *et al.*, 2016). Naopak v hexamerické formě je secernován do extracelulárního prostoru, což má za následek vysoké hladiny specifických protilátek, a může proto být využit jako potenciální diagnostický marker pro flavivirové infekce v časném stadiu onemocnění. V neposlední řadě je také důležitý v aktivaci toll-like receptorů (TLRs) a inhibici komplementu (Giri *et al.*, 2020; Kubinski *et al.*, 2020). Díky jeho důležitosti ve virové patogenezi si protein NS1 získal pozornost v kontextu vývoje vakcín a terapeutik (Park *et al.*, 2020).

2.1.4.2. NS2 protein

Nestruturní protein 2 se vyskytuje ve dvou transmembránových formách – NS2A a NS2B (Yau *et al.*, 2019).

Flavivirový NS2A je hydrofobní protein o velikosti ~22 kDa asociovaný s membránou a účastní se replikace RNA. N-konec a C-konec NS2A jsou tvořeny štěpením neznámou hostitelskou proteázou a virovou proteázou NS3 v komplexu s NS2B (Zhang *et al.*, 2019). Vysoce specificky se váže na 3' netranslatovanou oblast RNA a další složky replikačního systému. Mimo to má také úlohu v modulaci antivirové interferonové odpovědi a při sekreci a tvorbě virových částic (Leung *et al.*, 2008).

NS2B protein o velikosti ~14 kDa je integrován v membráně a skládá se ze tří domén: N – konce, C – konce a centrální oblasti. Centrální hydrofilní oblast membránového proteinu NS2B je v těsné interakci s proteinem NS3 a spojuje ho tak s membránou endoplazmatického retikula. Společně pak s hostitelskými proteázami specificky štěpí virový polyprotein na jednotlivé proteiny (Luo *et al.*, 2015).

2.1.4.3. NS3 protein

NS3 protein o velikosti ~69 kDa zastává několik nezbytných funkcí během virového životního cyklu. Jak již bylo zmíněno, N-terminální oblast NS3 funguje společně s NS2B jako proteáza štěpící virový polyprotein. Kromě toho tento komplex slouží jako replikační centrum flaviviru, moduluje virovou patogenezi a imunitní odpověď hostitele. C-terminální doména je aktivní jako RNA helikáza, nukleosid, RNA fosfatáza a účastní se replikace RNA a tvorby virových částic (Luo *et al.*, 2015). Díky této široké škále funkcí je komplex NS2B-NS3 často skloňovaným cílem pro objevování anti-flavivirových léků.

2.1.4.4. NS4 protein

NS4 protein je v průběhu přepisu zpracován na dva zralé nestrukturní proteiny – NS4A a NS4B (Guo *et al.*, 2018).

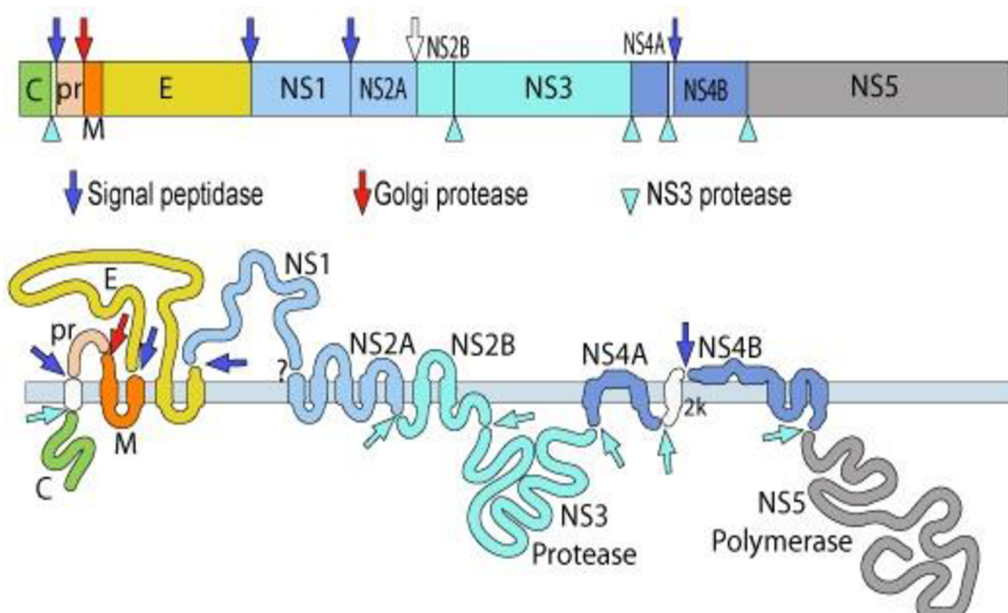
NS4A je transmembránový protein o velikosti ~16 kDa lokalizovaný na endoplazmatickém retikulu skládající se z N-terminální cytosolové oblasti a čtyř transmembránových segmentů (pTMS; predicted transmembrane segments). Segment pTSM2 se nachází převážně v lumenu ER, pTMS 1, pTMS3 a pTMS4 jsou zabudovány v membráně, přičemž poslední zmiňovaný funguje jako signální molekula pro lokalizaci NS4B. Bylo prokázáno, že NS4A je zodpovědný za remodelaci membrány vyvolanou flaviviry (Klaitong *et al.*, 2021).

NS4B o velikosti ~27 kDa inhibuje odpověď interferonů typu I (IFN α/β) prostřednictvím inhibice signální molekuly STAT1, která zprostředkovává antivirový účinek IFN (Blahove *et al.*, 2021). Flavivirový NS4B protein je součástí membrány a membránově vázaných virových replikačních komplexů. Je tedy schopen indukovat změny na membráně ER za vzniku odlišných membránových struktur, které poté poskytují prostor pro virovou replikaci (Kaufusi *et al.*, 2020).

2.1.4.5. NS5 protein

NS5 s velikostí 130 kDa je největším a nejkonzervovanějším flavivirovým nestrukturním proteinem. Vznikl přirozenou fúzí N-koncové metyltransferázy (MTázy) a C-koncové RNA-dependentní RNA polymerázy. U některých flavivirů, jako je například West Nile virus, se zapojuje do buněčných drah a má roli v úniku ze signální dráhy interferonů prostřednictvím inhibice fosforylace proteinových komponent této dráhy (Blahove *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2020). Oblíbeným cílem flavivirových proteinů NS5 pro modulaci IFN signalizačních kaskád za účelem zajištění perzistence viru je STAT2. Tento protein je nezbytný pro vývoj

transkripčních komplexů zapojených do signalizace IFN typu I a III a NS5 indukuje jeho degradaci. (Thurmond *et al.*, 2018).



Obr. 2: Schéma genomu TBEV a enzymů štěpících virový polyprotein. (Převzato z: https://viralzone.expasy.org/24?outline=all_by_species).

2.2. Imunitní reakce na TBEV

2.2.1. Patogeneze TBE

Virus po vstupu do buňky zdolává několik bariér snažících se zabránit jeho šíření. První, kožní bariéra je zdolána již při samotném přisátí klíštěte na hostitele. Klíštěcí sliny obsahují látky, které viru napomáhají k rozšíření infekce, ale také ovlivňují reakci hostitele, homeostázu, zánět a oba typy imunitní odpovědi na patogen. Po přisátí klíštěte se virus replikuje v Langerhansových buňkách a neutrofilech v kůži, odkud je dále transportován do lymfatických uzlin, kde dochází k primární virémii. Odsud je virus šířen do dalších orgánů, hlavně tedy do sleziny, jater a kostní dřeně, kde dochází k další replikaci a sekundární virémii. V poslední fázi infekce zdolává virus hematoencefalickou bariéru a napadá tak nervovou soustavu. Přesný mechanismus porušení hematoencefalické bariéry je stále předmětem mnoha diskusí, avšak byly stanoveny čtyři možné cesty, kterými virus tohoto cíle dosahuje. Možnostmi se zdá být přímá infekce mikrovaskulárních endoteliálních buněk, infekce přes čichové neurony, infekce přes periferní nervy či difúze viru mezi endoteliálními buňkami kapilár. Po překročení hematoencefalické bariéry se virus replikuje v mnoha částech mozku a

následně jsou pak nejčastěji pozorované lymfocytární meningeální a perivaskulární infiltráty s mikrogliálními noduly a neuronofagie jako důsledek infekce nervové soustavy způsobené TBEV (Růžek *et al.*, 2019; Haglund *et al.*, 2003; Bogovic *et al.*, 2010).

2.2.2. Vrozená imunita

Jako první na vstup patogenu do organismu reaguje vrozená imunita, pro kterou jsou typické chemické a anatomické bariéry a také imunitní buňky, jako například makrofágy, NK buňky, monocyty, dendritické buňky nebo neutrofily. Tyto buňky exprimují receptory rozpoznávající molekulární vzory (PRR, pattern recognition receptor), které rozpoznávají patogen-asociované molekulární vzory (PAMP, pathogen-associated molecular pattern). U viru klíšťové encefalitidy funguje jako PAMP jeho nukleová kyselina, tedy RNA, která je rozpoznávána zejména pomocí Toll-like receptorů (TLR) 3, 7, 8 a 9. Tyto receptory jsou intracelulární a nachází se na endoplazmatickém retikulu, endosomech a lysosomech. Při infekci RNA viry se také jako důležitý prokázal RIG-I like receptor (retinoic-acid-inducible gene I) a MDA-5 (melanoma differentiation-associated protein-5) (Kubinski *et al.*, 2020; Kawasaki *et al.*, 2014; Lindqvist *et al.*, 2018). Tyto dvě RNA helikázy při rozpoznání virové RNA aktivují transkripční faktory IRF3 a IRF7 indukující interferonovou stimulaci vedoucí k produkci interferonu typu I (IFN-I), který je hlavním aktérem v navození antivirového stavu (Saitoh *et al.*, 2011). Dráha IFN-I podporuje zpoždění virové replikace a aktivaci efektorových buněk (Klaitong *et al.*, 2021).

2.2.3. Adaptivní imunita

Co se adaptivní imunity týče, klíčovou roli v ochraně proti flavivirovým infekcím hraje specifická humorální a buněčná imunita zahrnující neutralizační a komplement fixující protilátky, T buňky s paměťovými, cytotoxickými i pomocnými funkcemi (Kubinski *et al.*, 2020). Virové antigeny jsou vystaveny na povrchu infikované buňky pomocí hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) třídy I, odkud jsou rozpoznávány cytotoxickými CD8+ T buňkami. Ty v důsledku toho zprostředkovávají přímé odstranění infikovaných buněk a produkují antivirové cytokiny. CD4+ T buňky rozpoznávají virové antigeny spojené s MHC třídy II na povrchu antigen prezentujících buněk a v návaznosti na to produkují cytokiny a aktivují B lymfocyty, jejichž aktivace vede k produkci protilátek (Li *et al.*, 2017; Girl *et al.*, 2020).

2.2.4. Projevy onemocnění a diagnostika

Většina případů infekce virem klíšťové encefalitidy bývá asymptomatická, což je hlavním důvodem toho, proč bývá diagnostika klíšťové encefalitidy obtížnou disciplínou. Inkubační doba onemocnění se různí, obvykle je to 7-14 dní, ale může být prodloužena až na jeden měsíc po přisátí klíštěte. Pokud se projeví symptomy, jsou často velmi nespecifické. V počáteční fázi může být přítomna horečka, únava, nevolnost a bolesti hlavy a těla. V této první fázi lze také pozorovat leukopenii, trombocytopenii a mírně zvýšené sérové transaminázy. Ve druhém stadiu se infekce může projevit jako lehká meningitida až těžká encefalitida s myelitidou (nebo bez ní) a může být také přítomna paralýza páteře.

Při analýze mozkomíšního moku pozorujeme pleocytózu s normální hladinou glukózy a laktátu a mírně zvýšenou hladinou bílkovin. V časném stadiu převažují polymorfonukleární buňky, které později nahrazuje dominance lymfocytů. V krvi může být zvýšený počet bílých krvinek, koncentrace C-reaktivního proteinu a rychlost sedimentace erytrocytů bývá normální.

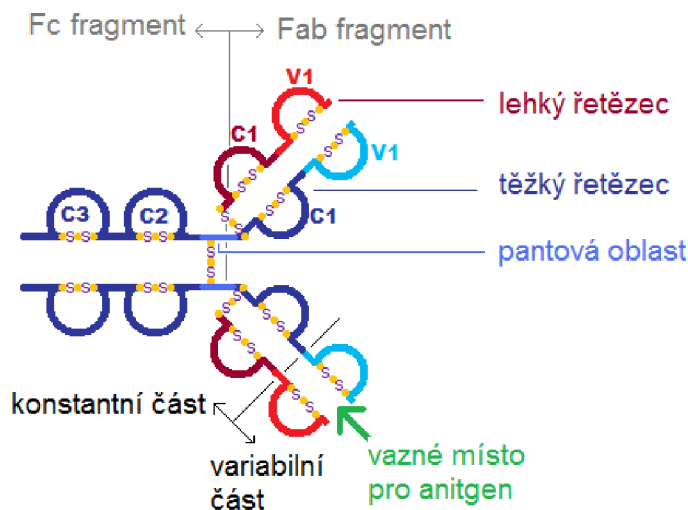
Vzhledem k těmto nespecifickým příznakům, které se příliš neliší od jiných virových meningoencefalitid, je hlavní diagnostickou metodou stanovení protilátek. Využívá se zejména metody ELISA a stanovuje se přítomnost IgM a IgG protilátek (*Bogovic et al., 2010; Lindquist et al., 2008; Barp et al., 2020*).

2.3. Protilátky

Protilátky, nebo také imunoglobuliny, jsou produktem adaptivní imunitní odpovědi na vnější antigen, kterým mohou být viry, bakterie nebo houby. Konkrétně jsou imunoglobuliny produkovány B buňkami lymfocytární řady bílých krvinek, také známých jako plazmatické buňky (*Salvo et al., 2020*).

Molekula imunoglobulinu (viz Obr. 3) se skládá ze dvou polypeptidových těžkých (H) a dvou lehkých (L) řetězců navzájem spojených disulfidickými můstky (*Yu et al., 2020*). Těžké řetězce se vyskytují v třídách μ , δ , α , γ a ϵ , což odpovídá následně celému typu protilátky, který může být IgM, IgD, IgA, IgG nebo IgE, přičemž u lidí se nejčastěji vyskytuje IgG. U lehkých řetězců odlišujeme pouze dva typy – kappa (κ) a lambda (λ) (*Maibom-Thomsen et al., 2019*). Každé rameno obsahuje fragment zvaný antigen vázající oblast (Fab), který se skládá z variabilní (-NH₂) a konstantní (-COOH) domény aminokyselinových sekvencí. Na lehkém řetězci můžeme nalézt pouze jednu konstantní doménu, zatímco těžké řetězce obsahují tři až čtyři tyto domény. Variabilní oblast je pouze jedna na konci každého řetězce (*Schroeder et al., 2010*). Koncová variabilní doména zahrnuje tři oblasti zvané komplementaritu určující

oblasti (complementarity-determining regions, CDRs), přičemž ze spojení CDRs lehkého a těžkého řetězce vzniká paratop, který je schopen se vázat na epitop antigenu (*Salvo et al., 2020*).



Obr. 3: Struktura monomerní imunoglobulinové částice (*Genský M., 2010*).

2.3.1. Produkce protilátek

Protilátky obecně jsou produkovány B lymfocyty. Vývoj B buněk je započat v kostní dřeni z multipotentních kmenových buněk, které následně dávají vzniknout progenitorům pro myeloidní a lymfoidní řadu. Lymfocyty a NK buňky vznikají z lymfoidního progenitoru, na rozdíl od progenitoru myeloidního, který dává vzniknout erytrocytům, leukocytům a megakaryocytům. Pro lymfocytární řadu je vývoj složitou záležitostí vzhledem ke své funkci v imunitním systému a probíhá zásadně v primárních (thymus a kostní dřeň) a sekundárních (lymfatické uzliny a slezina) lymfatických orgánech.

T lymfocyty se diferencují v thymu, kde zároveň dochází ke kontaktu s dendritickými buňkami a makrofágy, které se tímto kontaktem nebo produkcí specifických cytokinů spouští dozrávání T lymfocytů na CD4⁺ T lymfocyty (tzv. helper nebo pomocné) a na CD8⁺ lymfocyty (tzv. supressor nebo cytotoxické). B lymfocyty se diferencují v kostní dřeni. Společně pak opouští primární lymfatické orgány a setkávají se s antigenem ve formě infekčního agens, nádorovými buňkami apod. V této chvíli se z naivních buněk stávají buňky paměťové nebo efektorové (*Hořejší et al., 2005; Yau et al., 2019*).

2.3.2. Monoklonální protilátky

Monoklonální protilátky (MAbs) mají monospecifickou povahu a jsou produkovány jedním klonem identických B lymfocytů, které jsou vysoce afinní a specifické proti jednomu antigennímu epitopu (*Parray et al., 2020*). Monospecifita těchto protilátek je využitelná při hodnocení změn v konformaci molekuly, proteinových interakcí nebo fosforylačních stavech. Nevýhodou MAbs jsou omezení v jejich použitelnosti, která mohou vznikat při změně struktury epitopu v důsledku např. genetického polymorfismu, denaturace nebo glykosylace, což může ve výsledku významně ovlivnit jejich funkci. Výhodou však zůstává, že po vytvoření produkčního hybridomu získávají MAbs obnovitelný zdroj a mohou být konstantně generovány (*Lipman et al., 2005*).

MAbs mají schopnost se vázat na virus a neutralizovat ho v těle infikovaného pacienta, což je hlavní charakteristický rys, který se využívá v jejich využití při léčbě virových onemocnění. Problémem zůstával fakt, že příprava těchto protilátek pomocí hybridomové technologie měla za výsledek pro člověka cizorodé myší protilátky a jejich aplikace vyvolávala u lidí komplikace ve formě tvorby protilátek HAMA (human anti-mouse antibodies) (*Cwiertka et al., 2004*). Postupem času se rozvinula výroba lidských, humanizovaných a chimérických monoklonálních protilátek, čímž se snížil výskyt nežádoucích imunitních odpovědí. Myší MAbs získaly všechny své složky z myší, lidské naopak z lidí. Humanizované MAbs mají CDRs získané z myší, zatímco u chimérických MAbs je variabilní oblast myší protilátky fúzována s konstantní oblastí lidské protilátky (*Jin et al., 2021*).

Monoklonální protilátky mají široké využití, byly schváleny k léčbě onemocnění onkologických, autoimunitních, kardiovaskulárních, respiračních, neurologických a mnohým dalším. Jsou využívány také pro snížení morbidit onemocnění, modifikaci progresu onemocnění a potenciální změnu anatomického vývoje (*Weiner et al., 2015; Pelletier et al., 2020*).

2.3. Hybridomová technologie

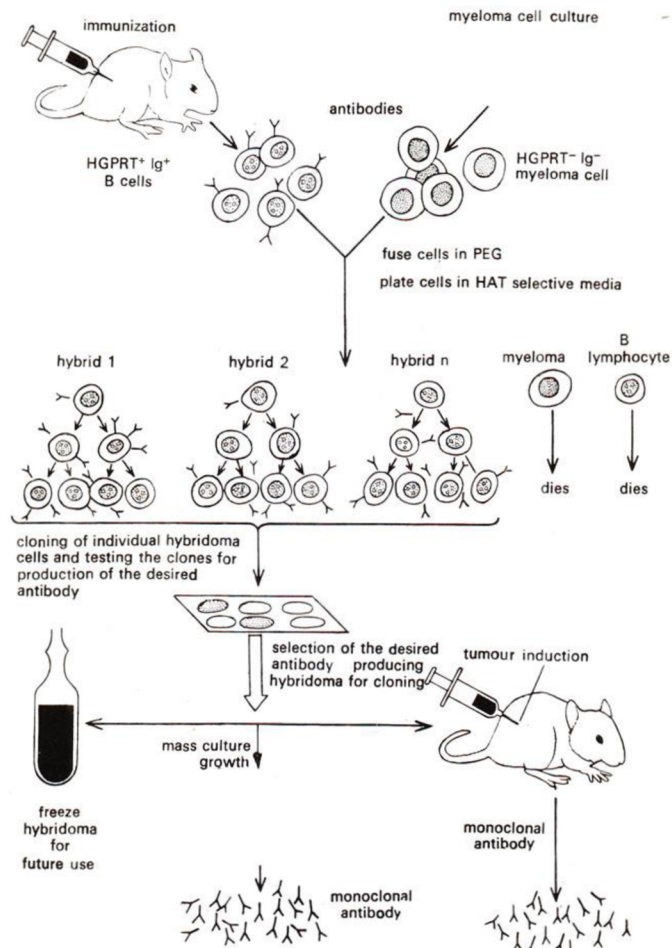
Hybridomová technologie byla poprvé popsána Köhlerem a Milsteinem již v roce 1975 (*Köhler et al., 1975*). Cílem této metody je vytvořit buňky produkující monoklonální protilátky proti konkrétnímu patogennímu agens. Samotné B lymfocyty není možné použít z důvodu jejich pomalého růstu a vysoké citlivosti. Využívá se tak vlastností myelomových buněk, které jsou, co se růstu a citlivosti týče, pravým opakem B lymfocytů. Spojením těchto dvou buněčných linií získáme již zmiňované hybridomové buňky, které pak nesou vlastnosti

obou. Hybridomy tedy mají schopnost produkce protilátek, velmi vysoké odolnosti a schopnost rychle se dělit (*Holzlohner et al., 2017*).

Hybridomová technologie je postavena na třech důležitých pilířích potřebných pro úspěšné dokončení celé této metody. První z nich je sterilní práce a správné vybavení pro tuto práci. Je nutné pracovat dle daných zásad sterilní práce a vyhnout se tak případným kontaminacím. Druhou nezbytností je inkubátor se stabilní teplotou a potřebnou koncentrací CO₂ pro udržení hybridomů v růstové fázi po celou dobu provádění této metody. Další nepostradatelnou součástí tohoto procesu je mrazicí nádoba s tekutým dusíkem. Hybridomová technologie je časově náročná metoda. Od počátku pokusu až po úspěšnou výrobu produkčních hybridomů uběhne i několik měsíců, proto je nutné hybridomy v průběhu, a hlavně výsledné produkční hybridomy, zamrazit a uchovávat při nízké teplotě, aby nedošlo k jejich znehodnocení a zároveň tak ke ztrátě výsledků celé práce (*Hurrel, 1982*).

První fází metody je imunizace modelového organismu patogenním agens, proti kterému požadujeme specifitu výsledné protilátky. Imunizace organismu spustí kaskádu imunitních odpovědí, na jejímž konci dojde k aktivaci B buněk, u kterých dochází k produkci protilátek. Největší koncentrace těchto buněk je v lymfatických orgánech živočicha, zejména tedy ve slezině, která je následně odebrána pro zpracování. *In vitro* kultivovaná linie myelomových buněk je fúzí spojena se získanými splenocyty a dá vznik hybridomovým buňkám, pro jejichž selekci se využívá médium obsahující hypoxantin, aminopterin a thymidin. V tomto mediu přežívají pouze buňky nesoucí enzym hypoxantin-guanin fosforibosyl transférazu (HGPRT) a thymidin kinázu. Myelomové buňky tento enzym nemají, lymfocyty ano, ale vzhledem k jejich citlivosti nepřežívají *in vitro*. Proto v selekčním mediu přežijí pouze hybridomové buňky (viz Obr. 4).

Takto připravené hybridomové buňky produkují polyklonální protilátky. Jejich klonováním získáme specifické kolonie vyrostlé z jedné buňky, produkované protilátky jsou v této fázi již monoklonálního charakteru a jsou určeny k dalšímu využití (*Pelletier et al., 2020; Holzlohner et al., 2017; Limpan et al., 2005*).



Obr. 4: Schéma přípravy monoklonálních protilátek pomocí metody hybridomové technologie.

Převzato z:

https://biocyclopedia.com/index/genetics/genetic_engineering_and_biotechnology_hybridoma_and_monoclonal_antibodies/hybridoma_and_the_production_of_monoclonal_antibodies.php.

3. Cíle práce

- 1) Příprava monoklonálních protilátek proti viru klíšťové encefalitidy.
- 2) Optimalizace detekčních metod.
- 3) Charakterizace monoklonálních protilátek.

4. Materiály a metodika

4.1. Kultivace buněčných linií

Pro kultivaci a pasáže buněčných linií byly použity buněčné linie a media uvedena v tabulce I.

Tab. I: Použité buněčné linie a media pro kultivaci a pasáže.

NÁZEV	SPECIFIKA/SLOŽENÍ/KONCENTRACE
Buněčná linie A549	adenokarcinomové lidské alveolární bazální epiteliální buňky
Buněčná linie SP2/0-Ag14	myší myelomová B-buněčná linie
Kultivační medium DMEM (Biosera; kat. č. LM-D1102)	DMEM, 10% BOFES, glutamin, ATB
Kultivační medium RPMI-1640 (Biowest, kat. č. L0490)	RPMI-1640, 10% BOFES, 0,1% 2-merkaptoetanol, glutamin, 1% ATB (PNC, SMC, fungizol)
Trypsin	
10 x PBS pufr	1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 18 mM KH ₂ PO ₄ , 100mM Na ₂ HPO ₄ , dH ₂ O; pH 7,4

4.1.1. SP2/0-Ag14 buňky

Tyto buňky byly kultivovány a pasážovány za účelem hybridomové fúze s myšími slezinnými buňkami. Buňky byly kultivovány v kultivační lahvi v mediu RPMI-1640 a pasážovány při konfluenci 70-80%. Před každou pasáží bylo medium zahřáto na teplotu 37°C ve vodní lázni. Z adherovaných buněk bylo odebráno staré medium, přidány 2 ml nového media a buňky byly uvolněny pipetou, případě škrabkou. Buněčná suspenze o objemu 1 ml byla doplněna čerstvým mediem na požadovaný finální objem. Pasáže byly prováděny obden.

4.1.2. A549 buňky

Tyto buňky kultivovány za účelem jejich využití při imunofluorescenci a tvorbě buněčných lyzátů. Byly kultivovány v kultivační lahvi v DMEM mediu zahřátém na teplotu 37°C a pasážovány při stejné konfluenci jako buňky výše zmíněné. Z adherovaných buněk bylo odebráno staré medium a buňky byly 2× opláchnuty 1×PBS pufr. Bylo přidáno 0,5 ml trypsinu, kterým se buňky omyly a poté byl odsán. Následně se přidalo znovu 0,5 ml trypsinu, jehož působení při 37°C po dobu cca 2 minut způsobí uvolnění buněk ode dna kultivační lahve.

Po této době se přidaly 2 ml kultivačního media, buňky se rozsuspendovaly, ponechal se pouze 1 ml suspenze a doplnil na požadovaný objem čerstvým mediem.

4.2. Viry klíšťové encefalitidy

Termosenzitivní mutant TBEV TS-280 je přirozeně avirulentní kmen viru klíšťové encefalitidy, který byl izolován z klíšťat *I. ricinus* v roce 1987 v České republice. Kmen Neudörfl byl vyizolován v Rakousku v roce 1971 z infikovaného klíšťete *I. ricinus*. Kmen Hypr byl získán izolací v roce 1953 v České republice z krve dětského pacienta s diagnostikovanou klíšťovou encefalitidou. Kmeny byly získány pomnožením ve Vero buňkách.

4.3. Hybridomová technologie

Materiály a reagentie použité při metodě hybridomové technologie popisuje tabulka (Tab. II).

Tab. II: Materiály a reagentie použité pro hybridomovou technologii.

NÁZEV	SPECIFIKA/SLOŽENÍ/KONCENTRACE
Myši BALB/c	VELAZ Praha, dospělé samice SPF
Virus TBE	termosenzitivní mutant TBEV TS-280
Kultivační medium RPMI-1640 bez ATB (Biowest, kat. č. L0490)	RPMI-1640, 10% BOFES, 0,1% 2-merkaptoetanol, glutamin
Kultivační medium RPMI s ATB (Biowest, kat. č. L0490)	RPMI-1640, 10% BOFES, 0,1% 2-merkaptoetanol, glutamin, 1% ATB
Polyetylen glykol (Sigma-Aldrich, Co.; kat. č. P7181)	Polyethylene glycol solution, Hybri-Max™
HT suplement (Sigma-Aldrich, Co.; kat. č. H0137)	HT Media Supplement (50×) Hybri-Max™; 2ml/100ml media
HAT suplement (Sigma-Aldrich, Co.; kat. č. H0262)	HAT Media Supplement (50×) Hybri-Max™, 2ml/100ml media
DMSO (Sigma-Aldrich, Co.; kat. č. D4540)	Dimethyl sulfoxide, ≥99.5%

4.3.1. Infekce myši

Myši byly imunizovány virem klíšťové encefalitidy, konkrétně kmenem TS-280.

Myš č. 1 byla imunizována intraperitoneálně dávkou 10^3 PFU. Pro imunizaci myši č. 2, která proběhla stejným způsobem, bylo použito 10^4 PFU. Objem injektovaného viru byl u obou dávek 100 μ l.

Myši č. 1 byla po 4 týdnech podána druhá dávka, tzv. booster, o stejné koncentraci a stejným způsobem, jako byla podána dávka první. Třetí den po aplikaci boosteru byla provedena fúze slezinných buněk s buňkami SP2/0 – Ag14.

4.3.2. Odebrání sleziny a krve

Třetí den po aplikaci boosteru byla myš č. 1 usnuta v éterové narkóze, byla vykrvena z ramenního pletence a byla jí odebrána slezina pro následnou separaci slezinných buněk. Odebraná krev byla použita na kontrolní test přítomnosti protilátek provedený pomocí imunofluorescence.

4.3.3. Hybridomová fúze

Vyjmutá slezina byla umístěna do media bez séra. Splenocyty byly získány protlačením sleziny skrz sítko a dvojitým promytím mediem bez séra o objemu 5 ml. Následně byla provedena centrifugace při 160 g po dobu 5 minut.

Pro myelomové SP2 buňky platí, že pro fúzi jsou potřeba v log fázi růstu, což vyžaduje výměnu jejich media jeden den před fúzí. V den fúze byly myelomové buňky dvakrát promyty v centrifugační zkumavce mediem bez séra a následně smíchány se splenocyty. Doporučený poměr je 10^8 splenocytů na 3×10^7 myelomových buněk.

Směs buněk byla centrifugována v centrifugační zkumavce (50ml) při 230 g po dobu 5 minut, následně byl odsán supernatant do sucha, zkumavka ponořena do vodní lázně (37° - 39° C) a během 1 minuty byl k buňkám přikapáván 1 ml vytemperovaného roztoku polyethylenglykolu za stálého míchání špičkou pipety. Směs byla míchána ještě další minutu a poté se za stálého míchání po dobu 10 minut přidávalo 10 ml vytemperovaného media. Buňky byly zcentrifugovány (230 g, 5 minut), rozsuspendovány ve 200 ml kultivačního media s HAT (2ml/100ml media) a rozpipetovány po 200 μ l do 10 96-jamkových panelů. Inkubace probíhala při 37° C a 5% CO_2 .

Po 3 až 4 dnech inkubace se začaly objevovat první kolonie hybridomových buněk. Po 10 až 14 dnech byly kolonie dostatečně narostlé a byl odebrán vzorek media pro test na produkci protilátek. Produkující hybridomové buňky byly pasážovány, pomnoženy a zamrazeny pro další možné využití.

4.4. Klonování hybridomů

4.4.1. Metoda klonování

Metoda je založena na limitním ředění, které se provádí za účelem získání buněčné monoklonální populace z polyklonální směsi buněk. Toho dosáhneme vytvořením ředění buněčné suspenze tak, aby po vysetí požadovaného objemu na kultivační desku každá jamka obsahovala pouze jednu buňku, ze které následně vyrostou monoklonální kolonie buněk. Produkční hybridomové buňky byly spočítány v Bürkerově komůrce, byla vypočítána jejich koncentrace na 1 ml a naředily se v kultivačním mediu s HT (2 ml/100 ml media) tak, aby ve 200 μ l byla jedna nebo pět buněk. Tato suspenze se poté rozpipetovala po 200 μ l do 96 jamkových panelů. Po 7 až 10 denní inkubaci se panely prohlížely pod mikroskopem a na produkci monoklonálních protilátek byly testovány jamky, ve kterých byla přítomna pouze jedna kolonie buněk.

4.5. Testování produkce pomocí imunofluorescence

Pro testování hybridomů na produkci protilátky byly použity materiály a reagentie zmíněné v tabulce (Tab. III).

Tab. III: Materiály a reagentie použité pro imunofluorescenci.

NÁZEV	SPECIFIKA/SLOŽENÍ/KONCENTRACE
10 x PBS pufr	1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 18 mM KH ₂ PO ₄ , 100mM Na ₂ HPO ₄ , dH ₂ O; pH 7,4
PBS-T	1 x PBS, 0,01% Tween 20
Kultivační medium DMEM (Biosera; kat. č. LM-D1102)	DMEM, 10% BOFES, glutamin, ATB
Buněčná linie A549	adenokarcinomové lidské alveolární bazální epiteliální buňky
Fixační roztok	Aceton (CH ₃ COCH ₃), Methanol (CH ₃ OH), ředění 1:1
Blokační roztok	10% BOFES v PBS
Vir TBE	kmen Neudörfl, stock 10 ⁷ PFU
Primární protilátka (EMD Milipore Corp.; kat. č. MAB10216)	Mouse Anti-Flavivirus group antigen monoclonal antibody; ředění 1:250 v PBS-T
Sekundární protilátka (Cell Signaling Technology, Inc.; kat. č. 4408)	Anti-mouse IgG (H+L), F(ab') ₂ Fragment (Alexa Fluor® 488 Conjugate); ředění 1:500 v PBS-T

4.5.1. Nasazení, infekce, fixace buněk

Byla spočítána koncentrace A549 buněk kultivovaných v DMEM mediu pomocí Bürkerovy komůrky a následně naředěna na potřebnou koncentraci, tzn. 10^4 buněk/200 μ l media. Tento objem byl následně napipetován do každé jamky 96 jamkového panelu. Takto nasazené buňky se inkubovaly 24 hodin při 37°C a 5% CO₂.

Po 24 hodinové inkubaci byly buňky adherované v jamkách panelu infikovány. Virový stock byl naředěn v kultivačním mediu tak, aby výsledná koncentrace odpovídala MOI 1, což odpovídá koncentraci 10^5 PFU/ml. Z buněk bylo odebráno medium a do každé jamky bylo přidáno 100 μ l virového roztoku naředěného na požadovanou koncentraci. Takto připravené panely byly ponechány 24 hodin při 37°C a 5% CO₂. Zároveň byl připraven fixační roztok acetonu a methanolu v poměru 1:1, který byl vychlazen v mrazáku na -20°C.

Následující den byly infikované buňky fixovány. Z jamek byl odebrán virový roztok a po přidání fixačního roztoku byly buňky inkubovány po dobu 10 minut v lednici. Následně byl odebrán fixační roztok a k fixovaným buňkám bylo přidáno 150 μ l PBS. Takto fixované buňky jsou připraveny pro samotnou imunofluorescenci.

4.5.2. Imunofluorescence

Prvním krokem imunofluorescenčního barvení je blokace. Byl připraven blokační roztok (viz Tab. III). Z buněk bylo odebráno PBS a do každé jamky bylo přidáno 50 μ l blokačního roztoku. Inkubováno po dobu 30 minut při pokojové teplotě.

Po 30 minutách byl odstraněn blokační roztok a do každé jamky přidáno 50 μ l primární protilátky ředěné 1:250 v PBS-T. Inkubace probíhala ve vlhké komůrce při 37°C po dobu 1 h. Po uplynutí inkubační doby byly jamky promyty PBS-T 3 \times po dobu 5 minut.

Po promytí a odstranění PBS-T bylo přidáno 50 μ l značené sekundární protilátky ředěné 1:500 v PBS-T s následnou inkubací ve vlhké komůrce při 37°C po dobu 1 h. Následně byly jamky opět promyty PBS-T 3 \times po dobu 5 minut. Poté byl odstraněn promývací roztok a do každé jamky bylo napipetováno 150 μ l PBS pro zabránění vyschnutí buněk. Takto připravené buňky byly prohlíženy pod fluorescenčním mikroskopem. Panely byly uchovány v alobalu bez přístupu světla v lednici po dobu několika týdnů.

Část pozitivně testovaných kolonií byla zamrazena a část byla dál pasážována. Zároveň bylo sbíráno kultivační medium obsahující protilátku, které bylo následně použito na další testování.

4.6. Western blot

4.6.1. Příprava buněčných lyzátů

Materiály a reagentie použité pro přípravu buněčných lyzátů jsou znázorněny v tabulce (Tab. IV).

Tab. IV: Materiály a reagentie použité pro přípravu buněčných lyzátů.

NÁZEV	SPECIFIKA/SLOŽENÍ/KONCENTRACE
Buněčná linie A549	adenokarcinomové lidské alveolární bazální epiteliální buňky
Viry TBE	kmeny Neudörfl, Hypr
RIPA Buffer (Sigma-Aldrich, Co.; kat. č. R0278)	150 mM NaCl, 1.0% IGEPAL® CA-630, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris, pH 8.0; NaF (42 mg/10 ml)
Inhibitory proteáz (BioVision Inc.; kat. č. K272)	EZBlock™ Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-Free
Orthovanadičnan sodný	Na ₃ VO ₄ , inhibitor ATPáz a fosfatáz

Buňky A549 byly nasazeny do tří kultivačních lahví o objemu 25 cm² v počtu 1×10⁶ buněk a nechaly se adherovat po dobu 24 hod. Následující den se z adherovaných buněk odstranilo medium a přidalo se 5 ml kultivačního media obsahujícího 2×10⁶ virových částic (odpovídající MOI 2). Toto bylo provedeno pro kmen Neudörfl i Hypr. Do třetí lahve bylo přidáno medium z neinfikovaných buněk. Buňky byly inkubovány do následujícího dne.

24 hodin po infekci byly buňky lyzovány. Nejprve byl namíchnán lyzační roztok. K RIPA pufru s NaF byl přidán proteázový koktejl (v poměru 1:100) a Na₃VO₄ (v poměru 1:100). Inhibitory byly k pufru přidány až bezprostředně před použitím a celá práce probíhala na ledu. Z kultivačních lahví s infikovanými buňkami bylo odebráno medium, do každé lahve bylo přidáno 500 µl lyzačního roztoku s inhibitory a ponecháno 15 minut na ledu. Po inkubaci byly zlyzované buňky přeneseny do ependorfky (seškrábnuto ze dna kultivační lahve škrabkou a pipetou odebráno) a stočeny 10 min při 13 550 g v předem nachlazené centrifuze na 4°C. Supernatant (= proteinový lyzát) byl přenesen do čisté ependorfky a uchováván při teplotě -20°C.

4.6.2. SDS-PAGE elektroforéza a blotování

Materiály a reagenty použité pro přípravu gelů, elektroforézu a blotování jsou zaznamenány v tabulkách (Tab. V a Tab. VII).

4.6.2.1. Příprava gelů

Tab. V: Reagenty použité pro přípravu gelů.

NÁZEV	SPECIFIKA/SLOŽENÍ/KONCENTRACE
dH₂O	
Bisacrylamide (VWR International, LLC; kat. č. 0311)	Acryl/Bis™ 29:1, 40%
4 × Tris-Cl/SDS	1,5 M TRIS, 0,4% SDS (pH 8,8); 0,5 M TRIS, 0,4% SDS (pH 6,8)
APS (Sigma-Aldrich, Co; kat. č. A3678)	Ammonium persulfate, 10% (1g APS na 10ml miliQ H ₂ O)
TEMED (VWR International, LLC; kat. č. 0761)	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine, Ultrapure, ≥99%
Isopropanol	C ₃ H ₈ O

Gely byly připraveny den před samotným provedením western blotu. Při přípravě gelů je důležité přidat APS a TEMED až těsně před nalitím (jsou iniciátorem a katalyzátorem polymerizace). Požadovaný gel byl připraven dle množství reagentů uvedených v tabulce (Tab. VI), přičemž procento gelu se odvíjelo od velikosti detekovaného proteinu.

Tab. VI: Tabulka pro přípravu gelů.

Separáčn ^í gel	6%	7,5%	8%	10%	12%
40% Bisacrylamide	2,25 ml	2,8 ml	3 ml	3,75 ml	4,5 ml
4x Tris-Cl/SDS – pH 8,8	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml
H ₂ O	9 ml	8,45 ml	8,25 ml	7,5 ml	6,75 ml
10% APS	60 μl	60 μl	60 μl	60 μl	60 μl
TEMED	12 μl	12 μl	12 μl	12 μl	12 μl

Koncentračn ^í gel	
40% Bisacrylamide	490 μl
4x Tris-Cl/SDS – pH 6,8	1,25 ml
H ₂ O	3,2 ml
10% APS	30 μl
TEMED	6 μl

Namíchaný separační gel byl nalit do sestavené aparatury jako první, na něj bylo navrstveno 250 µl isopropanolu na jeden gel a necháno přibližně hodinu tuhnout. Před nalitím koncentračního gelu byl isopropanol odebrán a gel byl opláchnut destilovanou vodou. Následně byl nalit koncentrační gel, vložen požadovaný hřebínek a ponechán polymerizovat přibližně 20 minut. Takto připravený gelu byl uložen ve vlhkém ubrousku a sáčku do lednice a připraven k použití.

4.6.2.2. Elektroforéza a blotování

Tab. VII: Materiály a reagentie použité pro elektroforézu a blotování.

NÁZEV	SPECIFIKA/SLOŽENÍ/KONCENTRACE
10 x ELFO pufr	15,1 g TRIS, 72 g glycin, 5 g SDS, 1000 ml H ₂ O
ELFO marker (Thermo Scientific™; kat. č. 26619)	PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa
10 x TBS	23,24 g TRIS base, 86,66 g NaCL, 800 ml H ₂ O, pH 7,5
Tween® 20 (Sigma-Aldrich, Co.; kat. č. P1379)	Polyethylene glycol sorbitan monolaurate
Promývací roztok	TBS-T, 1 x TBS, 0,1% Tween20
10 x Transferový pufr	15,5 g TRIS, 72 g glycin, 2,5 g SDS, 500 ml H ₂ O
Methanol (Lach-ner, s.r.o.; kat. č. 20038-AT0-M1000-1)	CH ₃ OH
PVDF membrána (Thermo Scientific™; kat. č. 88518)	PVDF Transfer Membrane, 0.45 µm, 26.5 cm x 3.75 m
2- Mercaptoethanol	C ₂ H ₆ SO
4 × Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad Laboratories, Inc.; kat. č. 1610747)	premixed 4x Laemmli protein sample buffer for SDS-PAGE

Byla připravena elektroforetická aparatura, do které byla umístěna skříčka s gely a upevněna svorkami. Skříčka byla zalita 1 x ELFO pufrem (100 ml 10 x ELFO pufru + 900 ml H₂O) a následně byl vytažen hřebínek. Do jamek byly nanášeny vzorky, které byly připraveny tímto způsobem:

- příprava nanášecího pufru (4 × Laemmli Sample bufferu s merkaptoethanolem v poměru 9:1)
- smíchání vzorků s loading bufferem v poměru 3:1
- inkubace vzorků 3 min při 95°C

Takto připravené vzorky byly nanесeny do jamek gelu v objemu 30 µl na jamku a do jedné jamky byl napipetován marker o objemu 4 µl.

Aparatura byla připojena do zdroje, který byl nastaven na hodnoty 80 mA a 250 V (hodnoty pro 2 gely) a nechala se proběhnout elektroforéza po dobu 1 hod.

Následně byl připraven tzv. „sandwich“ pro blotování, který skládáme v tomto pořadí:

1. 3 vrstvy filtračního papíru
2. PVDF membrána
3. gel se separovanými proteiny
4. 3 vrstvy filtračního papíru

Před složením sandwiche na aparaturu byla membrána aktivována namočením do methanolu a každá komponenta sandwiche byla namočena do 1 x Transfer pufru (100 µl 10 x Transfer pufru + 200 µl methanolu + 700 µl H₂O). „Semi-dry“ blotovací aparatura byla připojena ke zdroji, nastavena na 126 mA, 250 V (pro blotování 2 membrán) a nechána probíhat 60–80 minut.

4.6.3. Aplikace protilátek a detekce

Reagencie použity pro aplikaci protilátek a detekci jsou zaznamenány v tabulce (Tab. VIII).

Tab. VIII: Reagencie použity pro aplikaci protilátek a detekci.

NÁZEV	SPECIFIKA/SLOŽENÍ/KONCENTRACE
Promývací pufr	1x TBS, 0,1% Tween
Blokovací pufr	5 % odtučněné mléko v promývacím roztoku
Rekombinantní proteiny TBEV	NS1 protein, NS3 protein, NS5 protein, C protein; 50% glycerinové roztoky
Sekundární protilátka (Vector Laboratories, Inc.; kat. č. PI-2000-1)	Horse Anti-Mouse IgG Antibody (H+L), konjugována s křenovou peroxidázou
Vyvolávací roztok (Advansta Inc., kat. č. K-12042-D20)	Western Blot™ Quantum

Membrány s přebílenými vzorky byly omyty od transfer pufru v promývacím pufru, umístěny do blokovacího pufru a ponechány na třepače po dobu 1 hod při pokojové teplotě. Jako primární protilátka bylo použito hybridomové medium s přítomnými protilátkami (toto medium netřeba ředit) nebo purifikovaná protilátka ředěna v blokovacím roztoku. Na jednu membránu bylo použito cca 8 ml media/blokovacího roztoku s primární protilátkou. Membrána byla ponechána s primární protilátkou při 4°C v chladové místnosti na rotátoru do druhého dne.

Druhý den byla membrána 2× opláchnuta v promývacím roztoku a následně byla ponechána promývat 15 minut na třepače. Stejným způsobem byla promývána ještě 2×5 minut.

Sekundární protilátka byla naředěna v blokačním roztoku 1:1500 a membrána v ní byla inkubována na třepače po dobu 1 hod při pokojové teplotě. Po skončení inkubace opět promyjeme v promývacím roztoku 3×5 minut.

Proteiny byly vizualizovány chemiluminiscenční metodou použitím kitu Western Blot™ Quantum. Vyvolávací roztok byl připraven smícháním roztoků A a B v poměru 1:1 těsně před použitím. Na jednu membránu byl namíchán roztok o objemu 1,5 ml. Membrána byla lehce osušena papírovým ubrouskem, zalita vizualizačním roztokem na jednu minutu, umístěna mezi dvě fólie a chemiluminiscence byla měřena v přístroji Uvitec.

4.7. Měření koncentrace, purifikace a izotypizace protilátek

Kity použité pro měření koncentrace, purifikaci a izotypizaci protilátek jsou zaznamenány v tabulce (Tab. IX) a metody byly provedeny podle protokolů dostupných nebo dohledatelných pro každý tento kit.

Tab. IX: Kity použité pro měření koncentrace, purifikaci a izotypizaci protilátek.

NÁZEV	SPECIFIKA/SLOŽENÍ/KONCENTRACE
Kit pro měření koncentrace (Thermo Scientific™; kat. č. 23225)	Pierce™ BCA Protein Assay Kit
Kit pro purifikaci (Milipore; kat. č. ACK5003PA)	Amicon® Pro Affinity Concentration Kit Protein A with 3kDa Amicon® Ultra-0.5 Device
Kit pro izotypizaci (Thermo Scientific™; kat. č. A38550)	Pro-Detect™ Rapid Antibody Isotyping Assay Kit, mouse

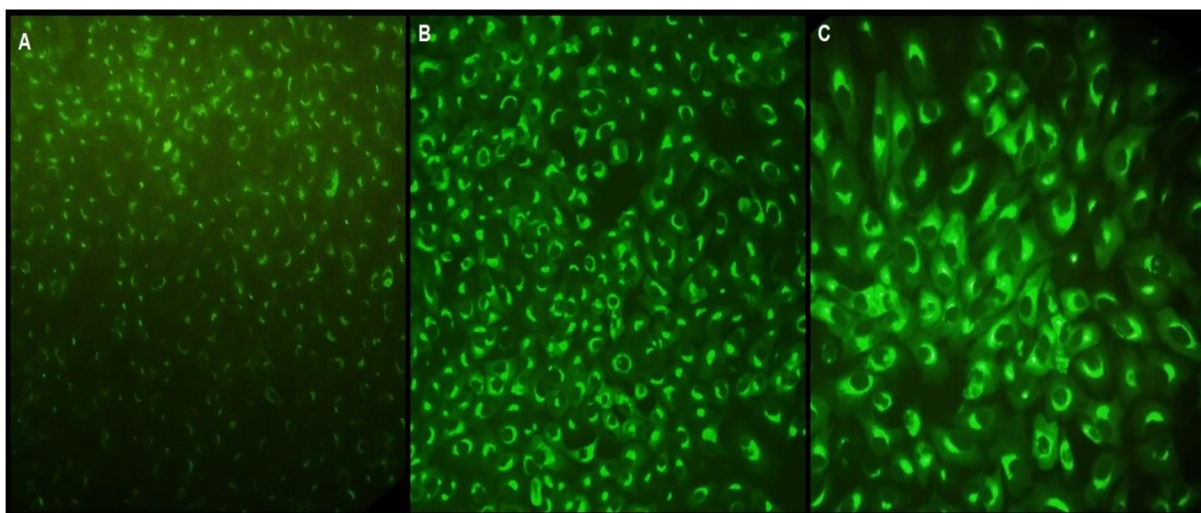
5. Výsledky

5.1. Příprava monoklonálních protilátek

Prvním cílem bylo připravit monoklonální protilátku proti viru klíš'ové encefalitidy pomocí hybridomové technologie. Úspěšně se povedlo imunizovat jednu z myší. Myš č. 2, tedy myš infikována větší virovou dávkou, zemřela třetí týden po imunizaci první dávkou. Myši č. 1 byl o týden později podán booster a za následující tři dny jí byla odebrána slezina pro hybridomovou fúzi.

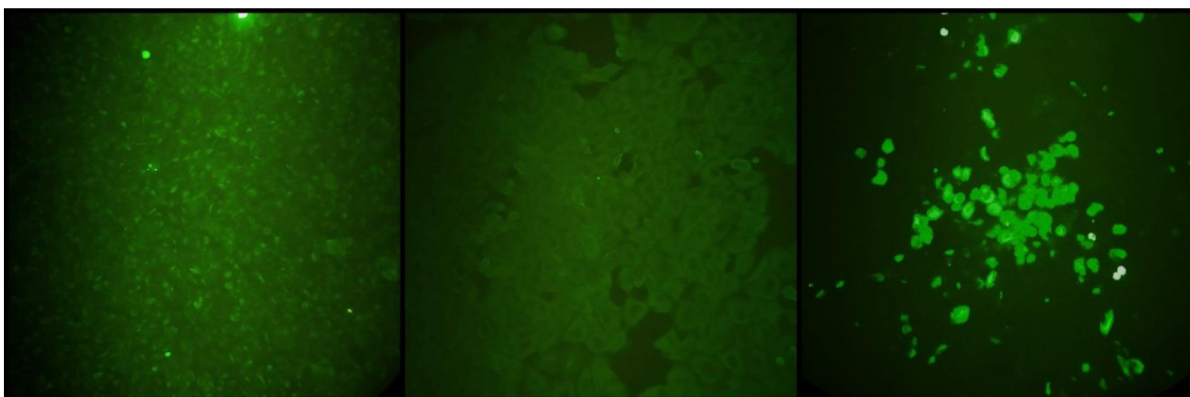
Samotná hybridomová fúze proběhla úspěšně. Po fúzi slezinných myších buněk s myelomovou linií byly buňky rozesety do 11 kultivačních panelů, přesněji do 1034 jamek kultivačních panelů, a ponechány inkubovat při daných podmínkách. První testy na produkci protilátek byly u vybraných buněčných kolonií provedeny desátý den od nasazení buněk a postupně s tím, jak dorůstaly zbylé kolonie, byla testována také jejich produktivita. Ve výsledku bylo dostatečně narostlých kolonií pro testování 873, tedy téměř 85% ze všech hybridomových kolonií.

Pomocí imunofluorescence se povedla prokázat produkce u 47 hybridomových linií, z nichž u 10 byl signál velmi silný a jasný. U 37 byl signál viditelný, ale jeho intenzita nebyla tak vysoká jako u zmiňovaných deseti. Příklad pozitivního signálu při imunofluorescenční metodě je zachycen na obrázku (viz Obr. 5).



Obr. 5: Pozitivní signál hybridomových sér. Imunofluorescenční barvení buněk infikovaných kmenem Neudörfl. Prohlíženo na mikroskopu Olympus IX70 přes WB filtr; A – zvětšení 100x; B – zvětšení 200x; C – zvětšení 400x.

U zbylých hybridomů nebyl pozorovatelný žádný signál nebo byl pozorovatelný nespecifický signál. Příklady nespecifického signálu jsou zachyceny na obrázku (viz Obr. 6).



Obr. 6: Příklady nespecifických signálů. Imunofluorescenční barvení buněk A549 infikovaných kmenem Neudörfel. Prohlíženo na mikroskopu Olympus IX70 přes WB filtr; zvětšení 100x.

Pozitivně testovaných 47 hybridomů bylo dále pasážováno a před provedením klonování byly znovu testovány na produkci. Mnoho z vybraných hybridomů ztratilo svou produkční schopnost, a tak bylo na následné klonování vybráno 5 hybridomů s prokazatelně vysokou produkční schopností. Jednalo se o hybridomy:

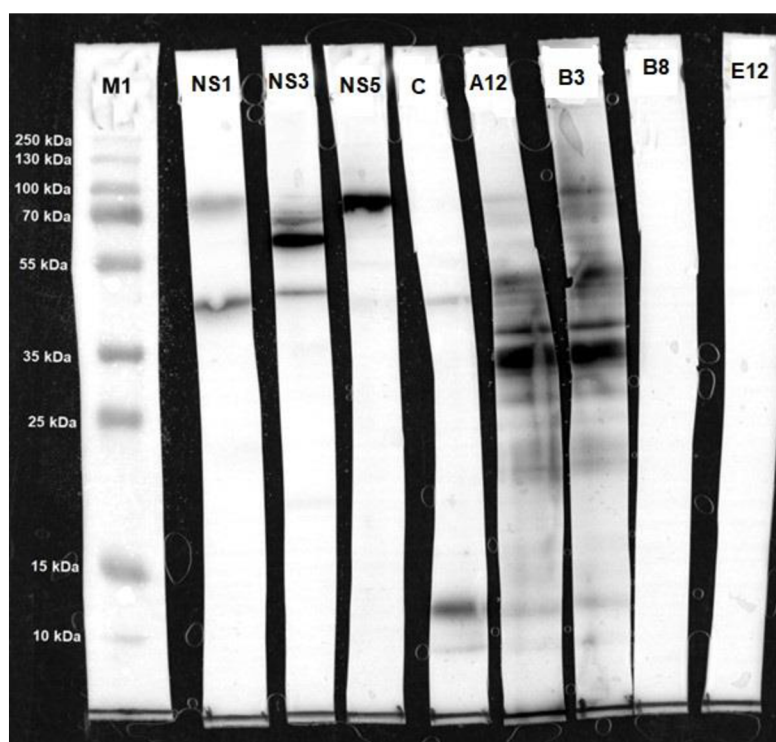
- 1/A2
- 1/A6
- 2/C2
- 3/A4
- 4/A3

Tyto hybridomy byly rozklonovány do 96 jamkových panelů vždy tak, aby na jednom panelu byla obsažena 1 buňka na jamku a 5 buněk na jamku. Následně byly pro testování produkce vybrány pouze kolonie narostlé z jedné původní buňky. Klony se ponechaly inkubovat 7 až 10 dní, přičemž již 7. den byly některé z kolonií narostlé tak, aby bylo možné otestovat jejich produkci. Postupně byly otestovány všechny monoklonální kolonie. Pozitivně bylo testováno 12 klonů:

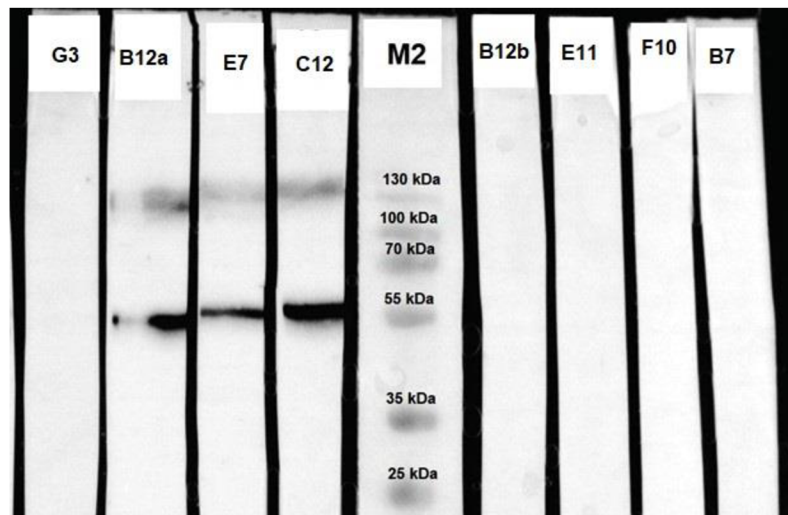
- | | |
|---------------------|----------------------|
| • 1/A2 – kA12 (A12) | • 2/C2 – kB12 (B12a) |
| • 1/A2 – kB3 (B3) | • 2/C2 – kC12 (C12) |
| • 1/A2 – kB8 (B8) | • 2/C2 – kE7 (E7) |

- 1/A6 – kE12 (E12)
- 1/A6 – kG3 (G3)
- 1/A6 – kB7 (B7)
- 3/A4 – kB12 (B12b)
- 3/A4 – kE11 (E11)
- 3/A4 – kF10 (F10)

Těchto 12 klonů bylo následně testováno metodou western blot s použitím proteinového lyzátu z buněk infikovaných virem TBE, konkrétně kmenem Neudörfl. Tato metoda umožňuje zjistit podle velikosti detekovaného proteinu specifitu protilátky produkované daným hybridomovým klonem. Pro lepší identifikaci detekovaných virových proteinů byla zároveň použita polyklonální séra získaná imunizací s rekombinantními proteiny NS1, NS3, NS5 nebo kapsidovým proteinem (laskavě poskytnuto Dr. Martinem Selingerem). Výsledek western blotu je zobrazen na obrázku (viz Obr. 7 a 8).



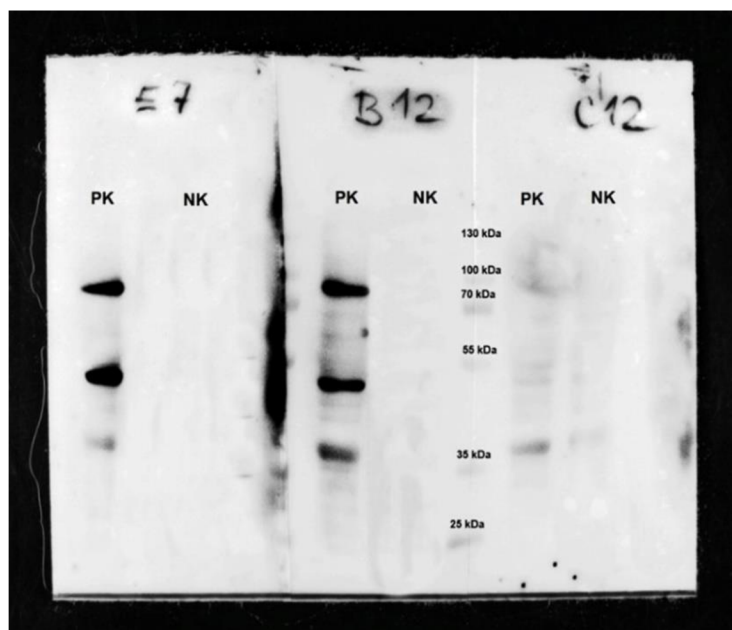
Obr. 7: Test klonů pomocí metody western blotting. Testováno použitím membrány s proteinovým lyzátem z buněk A549 infikovaných kmenem Neudörfl; M1 – velikostní marker; NS1 – jako primární protilátka použito polyklonální sérum získané imunizací rekombinantním proteinem NS1; NS3 – jako primární protilátka použito polyklonální sérum získané imunizací rekombinantním proteinem NS3; NS5 – jako primární protilátka použito polyklonální sérum získané imunizací rekombinantním proteinem NS5; C – jako primární protilátka použito polyklonální sérum získané imunizací rekombinantním kapsidovým proteinem; A12, B3, B8, E12 – jako primární protilátka použito kultivační medium uvedených hybridomů.



Obr. 8: Test klonů pomocí metody western blotting. Testováno použitím membrány s proteinovým lyzátem z buněk A549 infikovaných kmenem Neudörfl; M2 – velikostní marker; G3, B12a, E7, C12, B12b, E11, F10, B7 – jako primární protilátka použito kultivační medium uvedených hybridomů.

Z výsledků western blotu vyšly jako pozitivně reagující s virovými proteiny 3 hybridomové klony – B12a (dále již jen jako B12), C12 a E7. Podle velikosti zobrazených bandů (cca 55 kDa) jsme určili, že protilátky rozeznávají virový NS1 protein. U klonů A12 a B3 byl také viditelný signál, ale vzhledem k velkému množství zobrazených bandů, nečistému pozadí a tomu, že velikost nejsilnějšího bandu neodpovídala žádnému z virovým strukturních ani nestrukturních proteinů, byl tento signál považován za nespecifický. Pro kontrolu tohoto tvrzení byl proveden kontrolní blotting klonu A12, kde byl tento klon porovnán s pozitivně testovaným klonem B12 a jako negativní kontrola byl použit lyzát z neinfikovaných buněk. Protilátka produkovaná klonem A12 reagovala stejně jak s pozitivní, tak i s negativní kontrolou, tedy virem neinfikovanými buňkami, a proto lze říci, že tyto protilátky nebyly specifické proti žádnému virovému proteinu přítomnému v lyzátu z buněk infikovaných virem klíšťové encefalitidy.

Před samotnou purifikací protilátky z hybridomového kultivačního media byla tato media ještě jednou otestována a produkce protilátek byla potvrzena pouze u klonů B12 a E7. Výsledek je možné vidět na obrázku (viz Obr. 9).



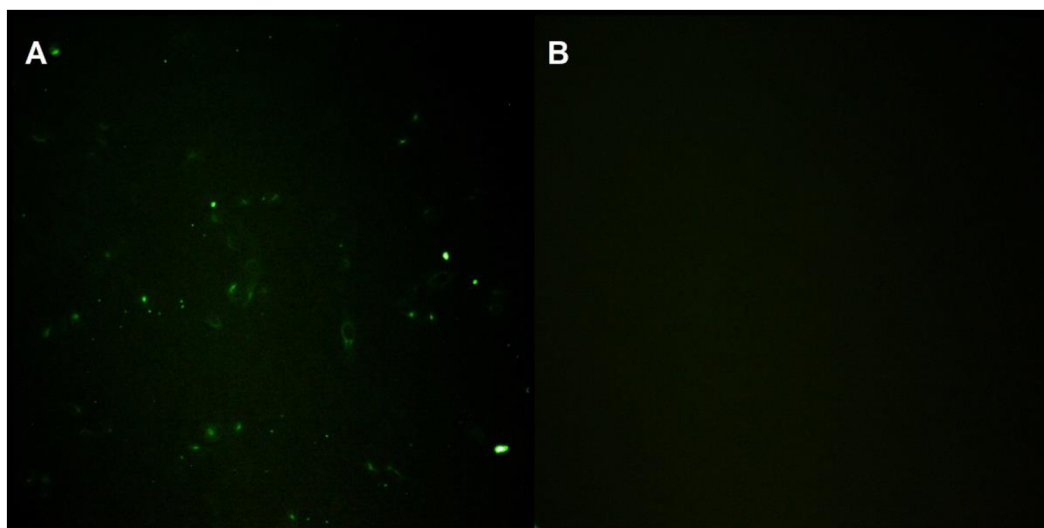
Obr. 9: Kontrolní testování pomocí metody western blotting na přítomnost protilátek v kultivačním mediu hybridomů E7, B12 a C12. Testováno použitím membrány s proteinovým lyzátem z buněk A549 infikovaných kmenem Neudörfl (PK); jako negativní kontrola (NK) byl použit lyzát z neinfikovaných A549 buněk.

Tyto dva produkční klony byly dále pasážovány a jejich medium bylo sbíráno pro následnou purifikaci monoklonální protilátky obsažené v něm. Na purifikaci bylo použito 9 ml media z B12 hybridomu a 9 ml media z E7 hybridomu s využitím purifikačního kitu Amicon® Pro Affinity Concentration Kit Protein A with 3kDa Amicon® Ultra-0.5 Device. Výtěžek z tohoto objemu činil 30 μ l protilátky. Tento proces byl opakován čtyřikrát, tedy celkový objem získaných protilátek byl 120 μ l.

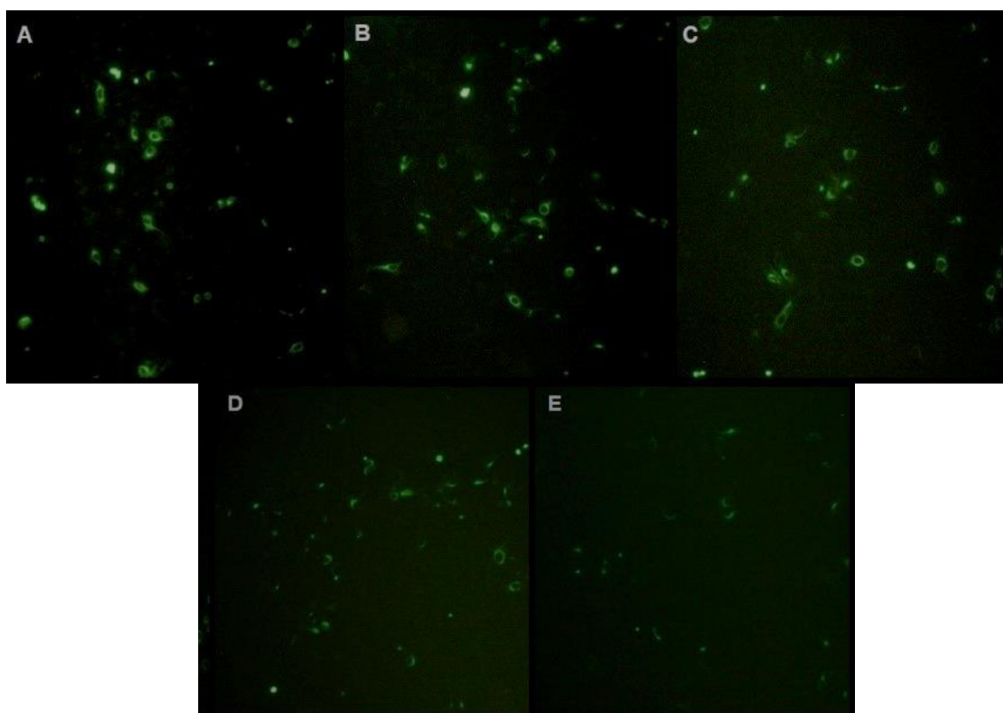
Pomocí metody BCA assay byla následně změřena koncentrace obou vypurifikovaných monoklonálních protilátek použitých pro optimalizaci detekčních metod. Byla sestavena kalibrační křivka závislosti absorbance na koncentraci a dle rovnice křivky byla vypočítána koncentrace obou protilátek. Koncentrace protilátky B12 byla 766 μ g/ml a koncentrace protilátky E7 byla 555 μ g/ml.

5.2. Optimalizace detekčních metod

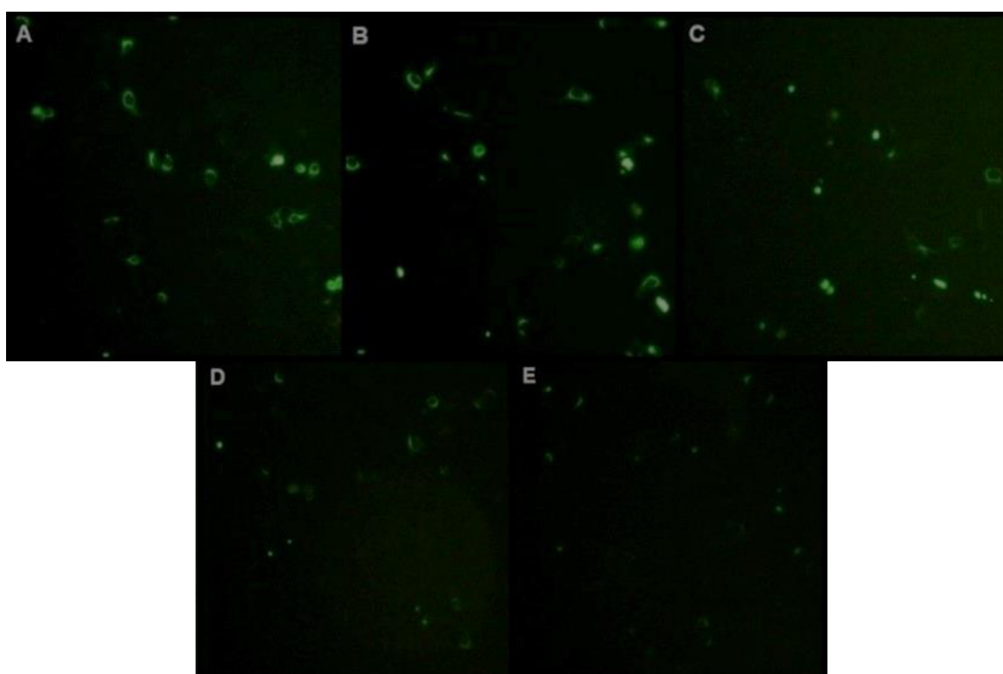
Optimalizace byla provedena u dvou metod, které jsem používala v průběhu celé práce, tedy imunofluorescence a western blot. U imunofluorescence byla použita opět buněčná linie A549 a buňky byly infikovány virem Neudörfl. Purifikované protilátky z media dvou hybridomových klonů byly naředěny v poměrech: 1:100, 1:250, 1:500, 1:750 a 1:1000. Výsledek imunofluorescenčního barvení lze vidět na obrázcích (viz Obr. 10, 11 a 12).



Obr. 10: Imunofluorescenční barvení; A – pozitivní kontrola, použity buňky A549 infikované kmenem Neudörfl s komerční protilátkou ředěnou 1:250; B – negativní kontrola, použity neinfikované buňky A549. Prohlíženo na mikroskopu Olympus IX70 přes WB filtr; zvětšení 100x.



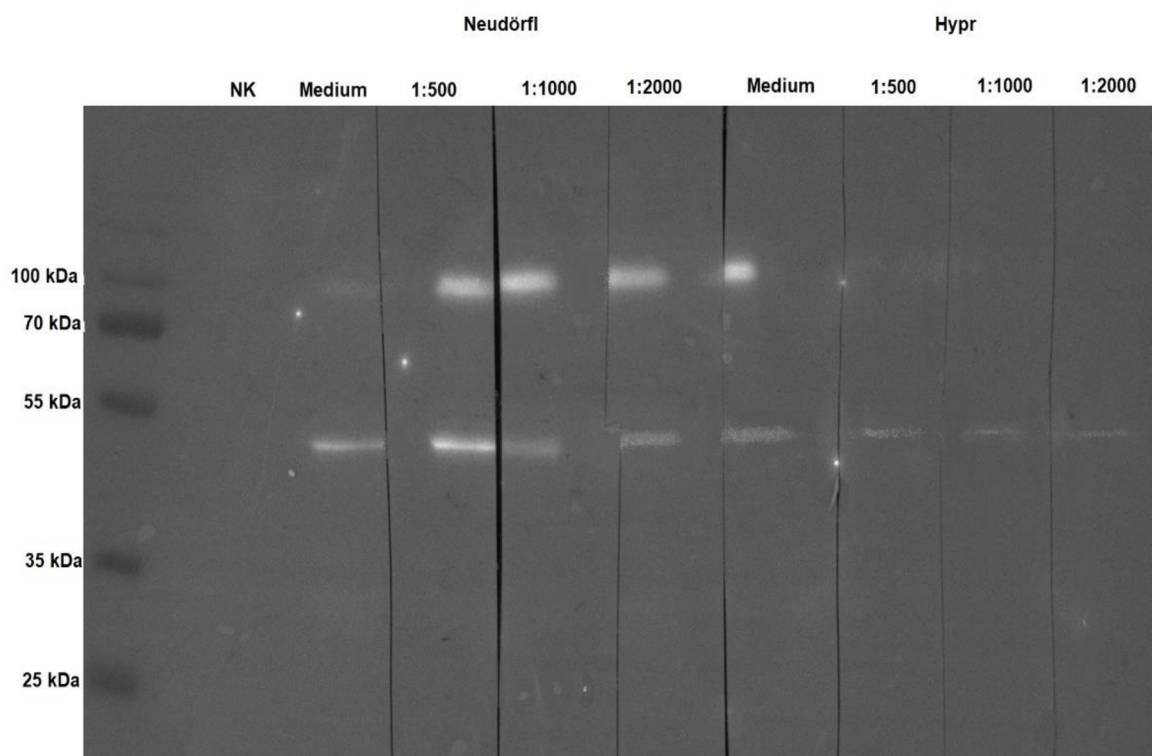
Obr. 11: Imunofluorescenční signál při značení protilátkou B12. Testováno na buňkách A459 infikovaných kmenem Neudörfl; A – ředění 1:100; B – ředění 1:250; C – ředění 1:500; D – ředění 1:750; E – ředění 1:1000. Prohlíženo na mikroskopu Olympus IX70 přes WB filtr, zvětšení 100x.



Obr. 12: Imunofluorescenční signál při značení protilátkou E7. Testováno na buňkách A459 infikovaných kmenem Neudörfl; A – ředění 1:100; B – ředění 1:250; C – ředění 1:500; D – ředění 1:750; E – ředění 1:1000. Prohlíženo na mikroskopu Olympus IX70 přes WB filtr, zvětšení 100x.

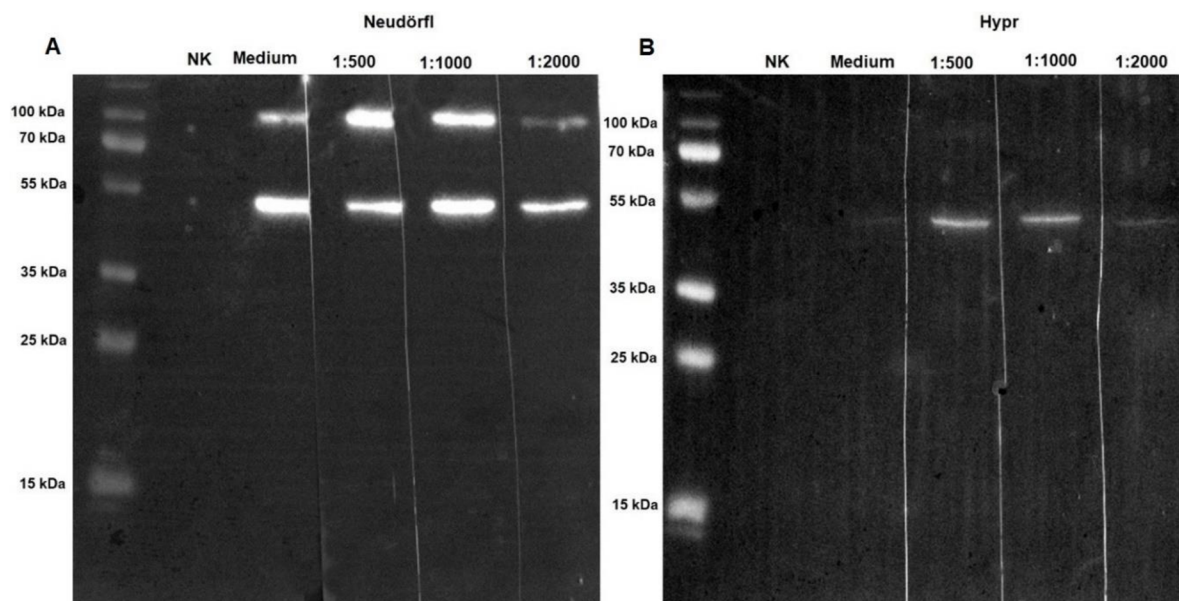
Na fotkách z optimalizace fluorescenčního barvení je zřejmé, že postupné zvyšování ředění se projevuje snižováním signálu.

Optimalizace metody western blot byla provedena jak pro lyzát z buněk infikovaných kmenem Neudörfl, tak i pro buňky infikované kmenem Hypr. Byla použita ředění 1:500, 1:1000 a 1:2000. Výsledky western blotu lze vidět na fotkách níže (viz Obr. 13 a 14).



Obr. 13: Optimalizace metody western blotting pro monoklonální protilátku E7. Různé ředění protilátky (1:500, 1:1000, 1:2000) bylo testováno použitím membrány s proteinovým lyzátem z buněk A549 infikovaných kmenem Neudörfl a Hypr. Jako kontrola k testovaným protilátkám bylo použito kultivační medium z hybridomů (Medium) a jako negativní kontrola (NK) byl použit lyzát z neinfikovaných buněk.

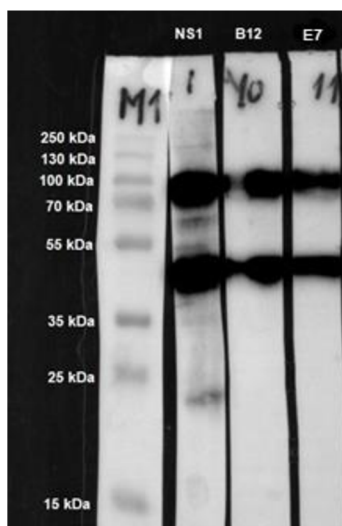
Na fotce lze pozorovat rozdíl v intenzitě signálu mezi buněčným lyzátem z buněk infikovaných kmenem Neudörfl a buněčným lyzátem z buněk infikovaných kmenem Hypr (viz. Obr. 13).



Obr. 14: Optimalizace metody western blotting pro monoklonální protilátku B12. Různé ředění protilátky (1:500, 1:1000, 1:2000) bylo testováno použitím membrány s proteinovým lyzátem z buněk A549 infikovaných kmenem Neudörfl (14A) a Hypr (14B). Jako kontrola k testovaným protilátkám bylo použito kultivační medium z hybridomů (Medium) a jako negativní kontrola (NK) byl použit lyzát z neinfikovaných buněk.

5.3. Charakterizace monoklonální protilátky

Pomocí metody western blotting byla stanovena velikost proteinu reagujícího s mediem obsahujícím dané protilátky. Tato metoda prokázala, že jde o protilátky proti nestrukturnímu proteinu NS1 o délce 45-55 kDa. Abychom opravdu ověřili, zda se jedná o protilátku proti tomuto proteinu, byl na gel nanesen rekombinantní protein NS1 a na něm testováno polyklonální sérum získané imunizací rekombinantním proteinem NS1 a naše dvě protilátky (viz Obr. 15). Dalším potvrzením byly provedené western bloty s již vypořizovanými protilátkami, kde velikost reagujícího proteinu s protilátkou odpovídá velikosti nestrukturního proteinu 1 (viz. Obr 13, 14).



Obr. 15: Charakterizace monoklonálního hybridomového séra pomocí metody western blotting.

Testováno použitím membrány s rekombinantním proteinem NS1 (500ng/jamku); M1 – velikostní marker; NS1 – jako primární protilátka použito sérum získané imunizací rekombinantním proteinem NS1, B12 – jako primární protilátka použita monoklonální protilátka B12; E7 – jako primární protilátka použita monoklonální protilátka E7.

Dalším cílem v rámci charakterizace monoklonální protilátky bylo určení jejího izotypu, což bylo provedeno pomocí kitu Pro-Detect™ Rapid Antibody Isotyping Assay Kit založeného na dipstick metodě. Výsledky ukázaly, že obě protilátky jsou totožné, tedy že se jedná o protilátky IgG1 s přítomností těžkých kappa řetězců. Výsledky lze vidět a obrázku (viz Obr. 16).



Obr. 16: Test na stanovení izotypu protilátek. Vlevo zobrazeny stripy určující izotyp protilátky E7. Vpravo zobrazeny stripy určující izotyp protilátky B12. U obou protilátek je viditelný proužek určující izotyp IgG₁ a přítomnost kappa řetězců.

6. Diskuse

Monoklonální protilátky jsou v dnešní době hojně využívány jak ve výzkumu, tak zejména jako diagnostický nebo terapeutický nástroj v medicíně. Od roku 1985 bylo dle webu The Antibody Society (2022) jako léčivo oficiálně schváleno více než 100 monoklonálních protilátek, přičemž další přibývají, a to v rámci mnoha medicínských oborů. Nejvýznamnější roli hrají v nádorové terapii a v aktuálním dění kolem pandemie COVID-19 byly jedním z nejdiskutovanějších témat, co se léčby viru SARS-CoV-2 týče. Nelze tedy monoklonálním protilátkám upřít jejich významnost napříč obory a je, dle mého názoru, velmi důležité využívat jejich potenciál i nadále. Vzhledem k tomu, že do dnešní doby neexistuje na klíšťovou encefalitidu žádná specifická léčba, je v tomto ohledu důležité dbát na prevenci, v endemických oblastech zejména formou vakcinace. Jak uvádí Státní úřad pro kontrolu léčiv, vakcína obsahuje inaktivovaný virus, je specifická proti TBEV, v základu vyžaduje 3 dávky a následně přeočkování každých 3-5 let. Pokud však dojde k infekci, léčba je nastavena dle symptomů pacienta, a čím dříve dojde ke správnému určení diagnózy, tím větší je šance na vyléčení bez většího rizika možných trvalých následků. Významnost protilátek jak pro terapii, tak pro možnost využití při vakcinaci proti TBEV, ve své studii uvádí a zdůvodňuje *Agudelo a kol.* (2021). *Matveev a kol.* (2020) ve své studii zmiňují protektivní účinnost monoklonální protilátky vytvořené proti glykoproteinu E TBEV, a to i v případě, kdy se jednalo o podání vysoké dávky viru. Pokud jde tedy o roli protilátek v onemocnění virem klíšťové encefalitidy, zdá se jejich využití být klíčové vzhledem k absenci dalších možností.

Jak již bylo řečeno, monoklonální protilátky jsou specifické vždy pouze proti jednomu antigenu, jejich výhodou je tedy vysoká homogenita, nízké riziko zkřížené reaktivity a větší citlivost v kvantifikačních metodách. Jejich nevýhodou je naopak finanční a časová náročnost výroby. Avšak ve fázi, kdy je vytvořen stabilní, produkční hybridom, který je správně uchován, lze říci, že je získán minimálně dlouhodobý zdroj dané monoklonální protilátky, kterou je možno opakovaně purifikovat z kultivačního media hybridomu a využívat pro mnoho laboratorních či diagnostických metod. Dle *Zaroff a Tan* (2019) lze monoklonální protilátky využít i mimo laboratoř. Hovoří zejména o neinvazivní *in vivo* diagnostice přínosné pro klinické lékaře, kteří pomocí vysoce specifické zobrazovací metody, kde je hlavním rozdílem oproti klasickým zobrazovacím metodám imunitní zobrazení konkrétního místa označeného konjugátem protilátky s radioizotopem nebo fluoroforem, mohou diagnostikovat progresi onemocnění přímo v těle pacienta.

Hlavním cílem práce bylo připravit monoklonální protilátky proti antigenům viru klíšťové encefalitidy metodou hybridomové technologie. Výhody této metody shledávám v její reprodukovatelnosti a velmi přínosném výsledku v případě jeho úspěšného dosažení. Během této metody se však nelze vyhnout i mnohým úskalím. Metoda je časově náročná, hybridomové buňky jsou velmi náchylné ke kontaminaci, proto je nutné pracovat v opravdu sterilním prostředí a dodržovat zásady sterilní práce. Dalším, a dle mého názoru, největším úskalím této metody je nízká účinnost buněčné fúze a vysoká úmrtnost buněk během celého procesu. S tím se ve svém článku ztotožňují i *Mitra a Tomar (2021)*, kteří uvádí, že umírá více než 99% buněk, čímž se snižuje účinnost metody a samozřejmě také možný výtěžek protilátek.

Když se dostaneme ke shrnutí námi provedené metody hybridomové technologie, hybridomovou fúzi lze označit za nadměrně úspěšnou, jelikož v selekčním mediu pro hybridomy narostly kolonie v téměř 85% ze všech nasazených jamek. Toto číslo se pak s postupným přibýváním dalších pasáží a testů, a to zejména na produkci protilátek, snižovalo. Pro detekci produkce protilátek je při tvorbě monoklonálních protilátek nejčastěji využíváno metody ELISA. *Parry a kol. (2020)* ve své publikaci zmiňují hlavní nevýhody této metody, a to zejména fakt, že klony produkující vysoké hladiny protilátek s nízkou afinitou mohou poskytovat ekvivalentní signál jako nízké hladiny protilátek s vysokou afinitou, čímž může docházet k tomu, že méně afinní klony budou potlačeny těmi více afinními. Z toho plyne možná ztráta potenciálně produkčních klonů. Jako alternativní metody uvádí průtokovou cytometrii nebo novou metodu screeningu pomocí microarray technologie, kterou ve své studii popisují *Paul a Weller (2020)*. Při našem testování bylo využito metody imunofluorescenčního barvení vzorků v 96 jamkovém panelu, což nelze považovat za standardní postup. Prokázali jsme však, že lze tuto metodu využít na potvrzení produkční schopnosti hybridomových klonů. Během prohlížení na invertovaném fluorescenčním mikroskopu bylo možné rozeznat i specifický signál od nesespecifického (viz Obr. 5 a 6). Nelze však rozeznat rozdíly v afinitě protilátek, tedy nelze říci, že by v tomto ohledu byla imunofluorescence výhodnější metodou než ELISA. Imunofluorescence v tomto případě posloužila velmi dobře jako vizualizační a lokalizační metoda, při které nebyl získán žádný číselný výstup, avšak pokud zvážíme výše zmíněné nedostatky detekce pomocí metody ELISA, nelze ani spektrofotometrické měření považovat za směrodatné, ale spíše orientační. Hlavní výhodou imunofluorescence tedy shledávám nenáročnost a robustnost metody, relativně rychlé provedení (v porovnání např. s metodou western blotting) a hlavně možnost rychlého prohlížení výsledného imunofluorescenčního signálu.

V další fázi pokusu bylo nutné charakterizovat získané protilátky produkované hybridomovými klony, k čemuž byla využita metoda western blotting. Bylo provedeno porovnání s polyklonálními séry, které rozeznávají virové proteiny, kde bylo prokázáno, že protilátka obsažená v kultivačním mediu rozpoznává nestrukturní protein NS1. Tento nestrukturní protein je velmi diskutovaným tématem v případě dosud dostupných vakcín proti TBEV. *Salát a kol.* (2020) prokázali, že vakcíny FSME-IMMUN® a Encepur®, používané proti TBEV, obsahují kromě strukturálních antigenů virové částice také NS1 antigen, přičemž vyvolaná indukce NS1-specifických protilátek může zvýšit ochranný účinek vakcín proti TBEV. Tato hypotéza se však ve studii *Stiasny a kol.* (2021) nepotvrdila, což připisují různým možným proměnným, jako například typu a šarži vakcíny nebo historii očkování a věku u vakcinovaných jedinců. Cílem budoucích studií zabývajících se tímto nestrukturním proteinem by tak mělo být objasnění této teorie. Bylo také zjištěno, že NS1 protein je přítomný v dimerické formě. Tento jev zřejmě nelze považovat za nespecifitu, jelikož je z mnoha studií známo, že NS1 se u flavivirů vyskytuje ve více formách, což zahrnuje i formu dimeru (viz 2.1.4.1.). V rámci charakterizace vyrobených protilátek byl stanoven jejich izotyp pomocí dipstick metody, jejíž výsledky jsou uvedeny výše (viz Obr. 16). Tento výsledek je velmi přínosný pro případnou další purifikaci těchto protilátek z kultivačního media uchovaných produkčních hybridomů. Bylo stanoveno, že jde o izotyp protilátky IgG₁, a to v obou případech. Pro purifikaci námi vytvořených protilátek byl použit purifikační kit využívající vazbu protilátky na protein A. Jak ovšem uvádí výrobce MerckMillipore (2013) v protokolu pro purifikaci, protein A vykazuje pouze nízkou afinitu k myším imunoglobulinům třídy IgG₁ v porovnání např. s myšími imunoglobuliny třídy IgG₂. Pokud by tedy bylo potřeba dosáhnout vyšší koncentrace protilátek, bylo by vhodnější zvolit purifikační kit s proteinem G, který se vyznačuje vyšší afinitou k protilátkové třídě IgG₁.

Nakonec byla provedena optimalizace dvou metod, které byly používány v průběhu celého experimentu, pro obě vytvořené protilátky. Pro optimalizaci imunofluorescenční metody bylo použito pět různých ředění protilátky. U protilátky B12 s vyšší koncentrací byl signál viditelný již při ředění 1:1000, optimálně bych však použila ředění 1:750, což by odpovídalo koncentraci 1,02 µg/ml. U protilátky E7, která měla nižší koncentraci, byl signál u největšího ředění méně znatelný, proto bych při dalším použití této metody zvolila pro tuto protilátku ředění o něco menší, tedy 1:750, optimálně však 1:500. Toto ředění by odpovídalo koncentraci 1,11 µg/ml. Z tohoto můžeme soudit, že co se imunofluorescence týče, lze tyto protilátky využít v téměř stejné koncentraci s totožným výsledkem, avšak vzhledem ke koncentraci

počátečního roztoku monoklonální protilátky je nutné použít rozdílné ředění. Pro porovnání s komerční primární protilátkou, která byla použita v ředění 1:250, stejně jako ve studii *Štefánika a kol. (2022)*, je tedy u námi vyrobených protilátek zapotřebí vyššího ředění pro dosažení signálu podobné intenzity.

U optimalizace metody western blotting je nutné vyzdvihnout rozdíly, které jsou viditelné mezi lyzáty z buněk infikovaných virem Neudörfl a Hypr. Byla použita tři ředění protilátek: 1:500, 1:1000 a 1:2000. U obou monoklonálních protilátek byl prokázán při stejném ředění silnější signál v buňkách infikovaným kmenem Neudörfl, což se projevilo silou proužku zobrazeného při detekci. Menší signál u buněk infikovaných kmenem Hypr by mohl být důsledkem menšího množství proteinu naneseného na gel. Hypr, jakožto virulentnější kmen, mohl způsobit větší cytopatický efekt než kmen Neudörfl, a proto by obsah buněčných proteinů, a posléze i virových proteinů, mohl být v lyzátu menší. Je teoreticky možné, že protilátky mají vyšší afinitu k NS1 kmene Neudörfl než k NS1 kmene Hypr. Ale vzhledem k faktu, že slabší signál byl pozorovaný po detekci oběma monoklonálními protilátkami, je tato možnost méně pravděpodobná. Z fotek pořízených při optimalizaci metody pro protilátku B12 na Neudörflu (viz Obr. 13 a 14A) lze konstatovat, že optimální ředění pro protilátku B12 je 1:1000. U protilátky E7 (viz Obr. 13 a 14B) bych jako optimální ředění volila 1:500.

7. Závěr

Během práce se povedlo úspěšně zvládnout metodu hybridomové technologie, vyselektovat produkční hybridomové buňky a získat pomocí purifikace z kultivačního media dvě monoklonální protilátky. Produkční hybridomy byly uchovány a zamraženy při podmínkách, které umožňují jejich opětovné využití pro produkci dalších monoklonálních protilátek. Byla provedena charakterizace těchto protilátek, která zahrnovala jejich izotypizaci a stanovení jejich specifity. Dále byly pomocí těchto protilátek optimalizovány dvě imunodetekční metody, z nichž metoda western blotting byla optimalizována pro dva buněčné lyzáty infikované různými kmeny viru klíšťové encefalidity.

8. Seznam použitých zkratek

CDRs	komplementaritu určující oblasti
CO₂	oxid uhličitý
ER	endoplazmatické retikulum
HAMA	lidské anti-myši protilátky
HAT supplement	hypoxantin, aminopterin a thymidin suplement
HGPRT	hypoxantin-guanin fosforibosyltransferáza
HT supplement	hypoxantin a thymidin suplement
INF	interferon
IRF	interferon regulující faktor
kb	kilobáze
kDa	kilodalton
LBP	laminin vázající protein
MAb/s	monoklonální protilátka/protilátky
MDA-5	melanoma differentiation-associated protein-5
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
NK buňky	„natural killer“ buňky
NS protein	nestrukturní protein
ORF	otevřený čtecí rámeček
PAMPs	patogen-asociované molekulární vzory
PFU	jednotky tvořící plaky
PRRs	receptory rozpoznávající molekulární vzory
pTMS	předpokládané transmembránové segmenty
RIG-I	retinoic acid-inducible gen
RNA	ribonukleová kyselina
STAT	přenašeč signálu a aktivátor transkripce
TBE	klíšťová encefalitida
TBEV	virus klíšťové encefalitidy
TLRs	toll-like receptory
UTR	nepřekládaná oblast genomu

9. Reference

- Agudelo, M., Palus, M., Keefe, J. R., Bianchini, F., Svoboda, P., Salát, J., Peace, A., Gazumyan, A., Cipolla, M., Kapoor, T., Guidetti, F., Yao, K.-H., Elsterová, J., Teislerová, D., Chrdle, A., Hönig, V., Oliveira, T., West, A. P., Lee, Y. E., ... Nussenzweig, M. C. (2021). Broad and potent neutralizing human antibodies to tick-borne flaviviruses protect mice from disease. *Journal of Experimental Medicine*, 218(5). <https://doi.org/10.1084/jem.20210236>.
- Buczek, A. M., Buczek, W., Buczek, A., & Wysokińska-Miszczuk, J. (2022). Food-Borne Transmission of Tick-Borne Encephalitis Virus-Spread, Consequences, and Prophylaxis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(3). <https://doi.org/10.3390/ijerph19031812>.
- Barp, N., Trentini, A., di Nuzzo, M., Mondardini, V., Francavilla, E., & Contini, C. (2020). Clinical and laboratory findings in tick-borne encephalitis virus infection. *Parasite Epidemiology and Control*, 10, e00160. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2020.e00160>.
- Blom, K., Cuapio, A., Sandberg, J. T., Varnaite, R., Michaëlsson, J., Björkström, N. K., Sandberg, J. K., Klingström, J., Lindquist, L., Gredmark Russ, S., & Ljunggren, H.-G. (2018). Cell-Mediated Immune Responses and Immunopathogenesis of Human Tick-Borne Encephalitis Virus-Infection. *Frontiers in Immunology*, 9, 2174. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02174>.
- Bressanelli, S., Stiasny, K., Allison, S. L., Stura, E. A., Duquerroy, S., Lescar, J., Heinz, F. X., & Rey, F. A. (2004). Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. *The EMBO Journal*, 23(4), 728–738. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600064>.
- Blahove, M. R., & Carter, J. R. (2021). Flavivirus Persistence in Wildlife Populations. *Viruses*, 13(10). <https://doi.org/10.3390/v13102099>.
- Bogovic, P., Lotric-Furlan, S., & Strle, F. (2010). What tick-borne encephalitis may look like: Clinical signs and symptoms. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 8(4), 246–250. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2010.05.011>.
- Cwiertka K., Trojanec R., Špačková K., & Hajdúch M. (2004). Terapeutické monoklonální protilátky v onkologii. *Klin Farmakol Farm*, 18, 165–170.
- Dai, X., Shang, G., Lu, S., Yang, J., & Xu, J. (2018). A new subtype of eastern tick-borne encephalitis virus discovered in Qinghai-Tibet Plateau, China. *Emerging Microbes & Infections*, 7(1), 74. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0081-6>.
- Databáze léčiv:** FSME-IMMUN. SÚKL: Státní ústav pro kontrolu léčiv [online]. 2021 [cit. 2022-04-06].
Dostupné z: <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0218852&tab=texts>

- Deviatkin, A. A., Karganova, G. G., Vakulenko, Y. A., & Lukashev, A. N.** (2020). TBEV Subtyping in Terms of Genetic Distance. *Viruses*, 12(11). <https://doi.org/10.3390/v12111240>.
- Füzik, T., Formanová, P., Růžek, D., Yoshii, K., Niedrig, M., & Plevka, P.** (2018). Structure of tick-borne encephalitis virus and its neutralization by a monoclonal antibody. *Nature Communications*, 9(1), 436. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02882-0>.
- Girl, P., Bestehorn-Willmann, M., Zange, S., Borde, J. P., Dobler, G., & von Buttlar, H.** (2020). Tick-Borne Encephalitis Virus Nonstructural Protein 1 IgG Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Differentiating Infection versus Vaccination Antibody Responses. *Journal of Clinical Microbiology*, 58(4). <https://doi.org/10.1128/JCM.01783-19>.
- Goto, A., Yoshii, K., Obara, M., Ueki, T., Mizutani, T., Kariwa, H., & Takashima, I.** (2005). Role of the N-linked glycans of the prM and E envelope proteins in tick-borne encephalitis virus particle secretion. *Vaccine*, 23(23), 3043–3052. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.11.068>.
- Guo, H.-Y., Zhang, X.-C., & Jia, R.-Y.** (2018). Toll-Like Receptors and RIG-I-Like Receptors Play Important Roles in Resisting Flavivirus. *Journal of Immunology Research*, 2018, 6106582. <https://doi.org/10.1155/2018/6106582>.
- Haglund, M., & Günther, G.** (2003). Tick-borne encephalitis—pathogenesis, clinical course and long-term follow-up. *Vaccine*, 21, S11–S18. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00811-3](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00811-3).
- Helmová, R., Hönig, V., Tykalová, H., Palus, M., Bell-Sakyi, L., & Grubhoffer, L.** (2020). Tick-Borne Encephalitis Virus Adaptation in Different Host Environments and Existence of Quasispecies. *Viruses*, 12(8). <https://doi.org/10.3390/v12080902>.
- Holzlohner, P., & Hanack, K.** (2017). Generation of Murine Monoclonal Antibodies by Hybridoma Technology. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 119. <https://doi.org/10.3791/54832>.
- Hořejší V., Bartůňková J.** (2005). *Základy imunologie*. Praha: Triton, 3. vydání. ISBN 80-7254-686-4.
- Hurrel J.G.R.** (1982). *Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications*. Boca Raton: CRC Press, Taylor&Francis Group. 1. vydání. ISBN 13: 978-1-351-07482-7. Dostupné na: https://scholar.google.cz/scholar?q=monoclonal+hybridoma+antibodies+techniques+and+applications&hl=cs&as_sdt=0&as_vis=1&oi=scholar.
- Jin, K.-T., Chen, B., Liu, Y.-Y., Lan, H. uan-R., & Yan, J.-P.** (2021). Monoclonal antibodies and chimeric antigen receptor (CAR) T cells in the treatment of colorectal cancer. *Cancer Cell International*, 21(1), 83. <https://doi.org/10.1186/s12935-021-01763-9>.
- Kaufusi, P. H., Tseng, A. C., Kelley, J. F., & Nerurkar, V. R.** (2020). Selective Reactivity of Anti-Japanese Encephalitis Virus NS4B Antibody Towards Different Flaviviruses. *Viruses*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/v12020212>.

Kawasaki, T., & Kawai, T. (2014). Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in Immunology*, 5, 461. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00461>.

Klaitong, P., & Smith, D. R. (2021). Roles of Non-Structural Protein 4A in Flavivirus Infection. *Viruses*, 13(10). <https://doi.org/10.3390/v13102077>.

Kozlova, I. v., Demina, T. v., Tkachev, S. E., Doroshchenko, E. K., Lisak, O. v., Verkhovina, M. M., Karan, L. S., Dzhioev, Yu. P., Paramonov, A. I., Suntsova, O. v., Savinova, Yu. S., Chernovanova, O. O., Ruzek, D., Tikunova, N. v., & Zlobin, V. I. (2018). Characteristics of the Baikal subtype of tick-borne encephalitis virus circulating in Eastern Siberia. *Acta Biomedica Scientifica (East Siberian Biomedical Journal)*, 3(4), 53–60. <https://doi.org/10.29413/ABS.2018-3.4.9>.

Köhler G., & Milstein C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(7), 495–497.

Kubinski, M., Beicht, J., Gerlach, T., Volz, A., Sutter, G., & Rimmelzwaan, G. F. (2020). Tick-Borne Encephalitis Virus: A Quest for Better Vaccines against a Virus on the Rise. *Vaccines*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/vaccines8030451>.

Lattová, E., Straková, P., Pokorná-Formanová, P., Grubhoffer, L., Bell-Sakyi, L., Zdráhal, Z., Palus, M., & Ruzek, D. (2020). Comprehensive N-glycosylation mapping of envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus grown in human and tick cells. *Scientific Reports*, 10(1), 13204. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70082-2>.

Leung, J. Y., Pijlman, G. P., Kondratieva, N., Hyde, J., Mackenzie, J. M., & Khromykh, A. A. (2008). Role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly. *Journal of Virology*, 82(10), 4731–4741. <https://doi.org/10.1128/JVI.00002-08>.

Li, G., Poulsen, M., Fenyvuesvolgyi, C., Yashiroda, Y., Yoshida, M., Simard, J. M., Gallo, R. C., & Zhao, R. Y. (2017). Characterization of cytopathic factors through genome-wide analysis of the Zika viral proteins in fission yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(3), E376–E385. <https://doi.org/10.1073/pnas.1619735114>.

Ličková, M., Fumačová Havlíková, S., Sláviková, M., & Klempa, B. (2021). Alimentary Infections by Tick-Borne Encephalitis Virus. *Viruses*, 14(1). <https://doi.org/10.3390/v14010056>.

Lindqvist, R., Upadhyay, A., & Överby, A. K. (2018). Tick-Borne Flaviviruses and the Type I Interferon Response. *Viruses*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/v10070340>.

Lindquist, L., & Vapalahti, O. (2008). Tick-borne encephalitis. *The Lancet*, 371(9627), 1861–1871. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60800-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60800-4).

Lipman, N. S., Jackson, L. R., Trudel, L. J., & Weis-Garcia, F. (2005). Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. *ILAR Journal*, 46(3), 258–268. <https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.258>.

Luo, D., Vasudevan, S. G., & Lescar, J. (2015). The flavivirus NS2B–NS3 protease–helicase as a target for antiviral drug development. *Antiviral Research*, *118*, 148–158. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.03.014>.

Maibom-Thomsen, S. L., Trier, N. H., Holm, B. E., Hansen, K. B., Rasmussen, M. I., Chailyan, A., Marcatili, P., Højrup, P., & Houen, G. (2019). Immunoglobulin G structure and rheumatoid factor epitopes. *PloS One*, *14*(6), e0217624. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217624>.

Matveev, A., Matveev, L., Stronin, O., Baykov, I., Emeljanova, L., Khlusevich, Y., & Tikunova, N. (2020). Characterization of neutralizing monoclonal antibody against tick-borne encephalitis virus in vivo. *Vaccine*, *38*(27), 4309–4315. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.04.051>

MerckMillipore. Amicon Pro Affinity Concentration Kit - Protein A: Rapid purification or depletion of selective immunoglobulin species. [online]. In: 2013 [cit. 2022-04-05]. Dostupné z: https://www.merckmillipore.com/CZ/cs/product/Amicon-Pro-Affinity-Concentration-Kit-Protein-A-with-3kDa-Amicon-Ultra-0.5-Device,MM_NF-ACK5003PA#documentation.

Michelitsch, A., Wernike, K., Klaus, C., Dobler, G., & Beer, M. (2019). Exploring the Reservoir Hosts of Tick-Borne Encephalitis Virus. *Viruses*, *11*(7). <https://doi.org/10.3390/v11070669>.

Mitra, S., & Tomar, P. C. (2021). Hybridoma technology; advancements, clinical significance, and future aspects. *Journal, Genetic Engineering & Biotechnology*, *19*(1), 159. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00264-6>.

Nicholls, C. M. R., Sevvana, M., & Kuhn, R. J. (2020). Structure-guided paradigm shifts in flavivirus assembly and maturation mechanisms. *Advances in Virus Research*, *108*, 33–83. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2020.08.003>.

Park, C., Kim, W.-B., Cho, S.-Y., Oh, E.-J., Lee, H., Kang, K., Lee, Y., & Lee, D.-G. (2020). A Simple Method for the Design and Development of Flavivirus NS1 Recombinant Proteins Using an In Silico Approach. *BioMed Research International*, *2020*, 3865707. <https://doi.org/10.1155/2020/3865707>.

Parray, H. A., Shukla, S., Samal, S., Shrivastava, T., Ahmed, S., Sharma, C., & Kumar, R. (2020). Hybridoma technology a versatile method for isolation of monoclonal antibodies, its applicability across species, limitations, advancement and future perspectives. *International Immunopharmacology*, *85*, 106639. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106639>.

Paul, M., & Weller, M. G. (2020). Antibody Screening by Microarray Technology-Direct Identification of Selective High-Affinity Clones. *Antibodies (Basel, Switzerland)*, *9*(1). <https://doi.org/10.3390/antib9010001>.

Pelletier, J. P. R., & Mukhtar, F. (2020). Passive Monoclonal and Polyclonal Antibody Therapies. In *Immunologic Concepts in Transfusion Medicine* (pp. 251–348). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-67509-3.00016-0>.

Petry, M., Palus, M., Leitzen, E., Mitterreiter, J. G., Huang, B., Kröger, A., Verjans, G. M. G. M., Baumgärtner, W., Rimmelzwaan, G. F., Růžek, D., Osterhaus, A., & Prajeeth, C. K. (2021). Immunity to TBEV Related Flaviviruses with Reduced Pathogenicity Protects Mice from Disease but Not from TBEV Entry into the CNS. *Vaccines*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/vaccines9030196>.

Pulkkinen, L. I. A., Butcher, S. J., & Anastasina, M. (2018). Tick-Borne Encephalitis Virus: A Structural View. *Viruses*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/v10070350>.

Rastogi, M., Sharma, N., & Singh, S. K. (2016). Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein. *Virology Journal*, 13, 131. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0590-7>.

Rodrigues, R., Danskog, K., Överby, A. K., & Arnberg, N. (2019). Characterizing the cellular attachment receptor for Langkat virus. *PLoS One*, 14(6), e0217359. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217359>.

Růžek, D., Avšič Županc, T., Borde, J., Chrdle, A., Eyer, L., Karganova, G., Kholodilov, I., Knap, N., Kozlovskaya, L., Matveev, A., Miller, A. D., Osolodkin, D. I., Överby, A. K., Tikunova, N., Tkachev, S., & Zajkowska, J. (2019). Tick-borne encephalitis in Europe and Russia: Review of pathogenesis, clinical features, therapy, and vaccines. *Antiviral Research*, 164, 23–51. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.01.014>

Saitoh, T., Satoh, T., Yamamoto, N., Uematsu, S., Takeuchi, O., Kawai, T., & Akira, S. (2011). Antiviral protein Viperin promotes Toll-like receptor 7- and Toll-like receptor 9-mediated type I interferon production in plasmacytoid dendritic cells. *Immunity*, 34(3), 352–363. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.010>

Salat, J., Mikulasek, K., Larralde, O., Pokorna Formanova, P., Chrdle, A., Haviernik, J., Elsterova, J., Teislerova, D., Palus, M., Eyer, L., Zdrahal, Z., Petrik, J., & Ruzek, D. (2020). Tick-Borne Encephalitis Virus Vaccines Contain Non-Structural Protein 1 Antigen and may Elicit NS1-Specific Antibody Responses in Vaccinated Individuals. *Vaccines*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/vaccines8010081>

Salvo, P., Vivaldi, F. M., Bonini, A., Biagini, D., Bellagambi, F. G., Miliani, F. M., Francesco, F. di, & Lomonaco, T. (2020). Biosensors for Detecting Lymphocytes and Immunoglobulins. *Biosensors*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/bios10110155>

Sanina, N., Chopenko, N., Mazeika, A., Davydova, L., Leonova, G., Stenkova, A., Uversky, V. N., & Kostetsky, E. (2018). Immunogenicity and Protective Activity of a Chimeric Protein Based on the Domain III of the Tick-Borne Encephalitis Virus E Protein and the OmpF Porin of *Yersinia pseudotuberculosis* Incorporated into the TI-Complex. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10). <https://doi.org/10.3390/ijms19102988>

Schroeder, H. W., & Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2 Suppl 2), S41-52. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046>

Singh, S., Kumar, N. K., Dwiwedi, P., Charan, J., Kaur, R., Sidhu, P., & Chugh, V. K. (2018). Monoclonal Antibodies: A Review. *Current Clinical Pharmacology*, *13*(2), 85–99. <https://doi.org/10.2174/1574884712666170809124728>

Štefánik, M., Bhosale, D. S., Haviernik, J., Straková, P., Fojtíková, M., Dufková, L., Huvarová, I., Salát, J., Bartáček, J., Svoboda, J., Sedlák, M., Růžek, D., Miller, A. D., & Eyer, L. (2022). Diphyllin Shows a Broad-Spectrum Antiviral Activity against Multiple Medically Important Enveloped RNA and DNA Viruses. *Viruses*, *14*(2). <https://doi.org/10.3390/v14020354>

The Antibody Society. Therapeutic monoclonal antibodies approved or in review in the EU or US. (date accessed); www.antibodysociety.org

Weiner, G. J. (2015). Building better monoclonal antibody-based therapeutics. *Nature Reviews. Cancer*, *15*(6), 361–370. <https://doi.org/10.1038/nrc3930>.

Thurmond, S., Wang, B., Song, J., & Hai, R. (2018). Suppression of Type I Interferon Signaling by Flavivirus NS5. *Viruses*, *10*(12). <https://doi.org/10.3390/v10120712>

van den Elsen, K., Quek, J. P., & Luo, D. (2021). Molecular Insights into the Flavivirus Replication Complex. *Viruses*, *13*(6), 956. <https://doi.org/10.3390/v13060956>

Wu, J., Ye, H.-Q., Zhang, Q.-Y., Lu, G., Zhang, B., & Gong, P. (2020). A conformation-based intra-molecular initiation factor identified in the flavivirus RNA-dependent RNA polymerase. *PLoS Pathogens*, *16*(5), e1008484. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008484>

Yau, W.-L., Nguyen-Dinh, V., Larsson, E., Lindqvist, R., Överby, A. K., & Lundmark, R. (2019). Model System for the Formation of Tick-Borne Encephalitis Virus Replication Compartments without Viral RNA Replication. *Journal of Virology*, *93*(18). <https://doi.org/10.1128/JVI.00292-19>

Yu, Y., Wang, Q., Huang, Z., Ding, L., & Xu, Z. (2020). Immunoglobulins, Mucosal Immunity and Vaccination in Teleost Fish. *Frontiers in Immunology*, *11*, 567941. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.567941>

Zaroff, S., & Tan, G. (2019). Hybridoma technology: the preferred method for monoclonal antibody generation for *in vivo* applications. *BioTechniques*, *67*(3), 90–92. <https://doi.org/10.2144/btn>

Zhang, X., Xie, X., Zou, J., Xia, H., Shan, C., Chen, X., & Shi, P.-Y. (2019). Genetic and biochemical characterizations of Zika virus NS2A protein. *Emerging Microbes & Infections*, *8*(1), 585–602. <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1598291>

Zhang, X., Zhang, Y., Jia, R., Wang, M., Yin, Z., & Cheng, A. (2021). Structure and function of capsid protein in flavivirus infection and its applications in the development of vaccines and therapeutics. *Veterinary Research*, *52*(1), 98. <https://doi.org/10.1186/s13567-021-00966-2>

Zdroje obrázků

Obrázek 1:

Pulkkinen, L. I. A., Butcher, S. J., & Anastasina, M. (2018). Tick-Borne Encephalitis Virus: A Structural View. *Viruses*, *10*(7). <https://doi.org/10.3390/v10070350>.

Obrázek 2:

Genome. In: ViralZone: Flavivirus [online]. [cit. 2022-04-09]. Dostupné z: https://viralzone.expasy.org/resources/Flavivirus_genome.png

Obrázek 3:

GENSKÝ, M., Monomer IgG. WikiSkripta [online]. 2010 [cit. 2022-04-05]. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Soubor:Imunoglobulin.png>

Obrázek 4:

Procedure for making and selecting hybridomas for the production of monoclonal antibodies. Biocyclopedia: Hybridoma and the production of monoclonal antibodies [online]. [cit. 2022-04-07]. Dostupné z: <https://biocyclopedia.com/index/genetics/images/figure/f43.1.jpg>