

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Infekce primárních makrofágů a dendritických
buněk virem klíšťové encefalitidy**

Bakalářská práce

Lenka Doudová

Školitel: RNDr. Ján Štěrba, Ph.D.

Školitel specialista: Mgr. Hana Mašková

České Budějovice 2021

Doudová, L., 2021: Infekce primárních makrofágů a dendritických buněk virem klíšťové encefalitidy. [Infection of primary macrophages and dendritic cells by tick-borne encephalitis virus. Bc.Thesis, in Czech.] - 52 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The aim of this thesis was to investigate the effect of tick-borne encephalitis virus on primary macrophages and dendritic cells. The primary cells were derived from murine bone marrow (mice strain C57Bl/6N). Tick-borne encephalitis infection was performed by using two European subtypes, namely Hypr and Neudörfl. Viability of macrophages and dendritic cells was determined using the Alamar Blue™ assay. Relative quantification of viral RNA was done by qRT-PCR and calculated using Δ Ct method. Virions released into media were measured using plaque titration assay.

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

V Českých Budějovicích dne 14. 4. 2021

.....

Lenka Doudová

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala svému školiteli RNDr. Jánovi Štěřbovi, Ph.D. za odborné vedení mé bakalářské práce. Taktéž veliký dík patří Mgr. Hance Maškové za vstřícnost, ochotu, podnětné rady a také za velkou trpělivost nejen při učení nových metod. Dále děkuji i ostatním členům laboratoře za ochotu poradit a příjemnou atmosféru. Nakonec musím poděkovat svojí rodině za psychickou podporu.

Obsah

1	Úvod	2
1.1	Virus klíšťové encefalitidy	2
1.1.1	Struktura virionu	4
1.1.2	Replikační cyklus TBEV	5
1.1.3	Šíření TBEV v organismu.....	6
1.1.4	Klíšťová meningoencefalitida.....	7
1.1.5	Očkování	8
1.2	Imunitní buňky	9
1.2.1	Makrofágy	9
1.2.2	Dendritické buňky	12
2	Cíle práce	16
3	Materiál a metody	17
3.1	Materiál	17
3.1.1	Myši	17
3.1.2	Buněčné linie.....	17
3.1.3	Virus klíšťové encefalitidy.....	17
3.2	Metody	18
3.2.1	Derivace makrofágů a DC z buněk kostní dřeně	18
3.2.2	Magnetická separace CD11c+buněk.....	19
3.2.3	Nasazení PMJ2-R buněk.....	19
3.2.4	Infekce BMM, DC a PMJ2-R virem klíšťové encefalitidy.....	19
3.2.5	Měření viability buněk	20
3.2.6	Izolace RNA pomocí RNA Blue.....	21
3.2.7	Odstranění DNA ze vzorků.....	21
3.2.8	qRT-PCR.....	22
3.2.9	Plaková titrace	23
4	Výsledky	24
4.1	Vliv TBEV na přežívání buněk.....	24
4.2	Izolace RNA	27
4.3	Odstranění genomové DNA.....	27
4.4	Stanovení virové RNA ve vzorcích	28
4.5	Stanovení titru viru ve vzorcích.....	31

5	Diskuze.....	33
6	Závěr.....	37
7	Použitá literatura.....	38
7.1	Elektronické zdroje	49
8	Seznam příloh	50

Seznam použitých zkratk

AKT dráha	signální dráha s anti-apoptickými účinky podporující přežití
a.u.	relativní měrná jednotka intenzity (z anglického „arbitrary unit“)
BMM	makrofágy derivované z kostní dřeně (z anglického „bone marrow-derived macrophages“)
BOFES	bovinní fetální sérum (z anglického „bovine foetal serum“)
CD11c	diferenční skupina 11c (z anglického „cluster of differentiation“)
CD11c+ DC	dendritické buňky separované jako CD11c pozitivní
Ct	cyklus detekčního prahu (z anglického „cycle of threshold“)
DC	dendritické buňky (z anglického „dendritic cells“)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EDTA	kyselina ethylendiaminotetraoctová
GM-CSF	růstový faktor (z anglického „granulocyte macrophage colony-stimulating factor“)
H	Hypr
hpi	hodin po infekci
IL	interleukin
MACS pufr	magnetic-activated cell sorting pufr
M-CSF	růstový faktor (z anglického „macrophage colony stimulating factor“)
MEM	Eagle's minimal essential medium
N	Neudörfl
NK buňka	přirození zabíječi (z anglického „natural killer“)
NK	negativní kontrola
PFU/ml	plakotvorná jednotka/ml (z anglického „plaque forming unit“)
PK	pozitivní kontrola
qRT-PCR	quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
RPMI	médium pojmenované po místu vývoje Roswell Park Memorial Institute
TBE	klíšťová encefalitida (z anglického „tick-borne encephalitis“)
TBEV	virus klíšťové encefalidity (z anglického „tick-borne encephalitis virus“)
Th buňky	pomocné T lymfocyty (z anglického „helper“)

1 Úvod

Klíšťová encefalitida (TBE) je onemocnění virového původu způsobené virem klíšťové encefalitidy (TBEV), který řadíme mezi obalené viry s jednovláknovou RNA s pozitivní polaritou (Baltimore, 1971). Počet případů TBE celosvětově rok od roku roste, v České republice bylo za rok 2020 potvrzeno 854 případů nákazy (Informační systém infekční nemoci– ISIN, dříve EPIDAT, 2020). Onemocnění TBE způsobené různými podtypy TBEV se od sebe liší závažností, příznaky a úmrtností (Gritsun a kol., 2003b). Specifický lék proti onemocnění zatím neexistuje, proto je důležitá prevence v podobě očkování (Riccardi a kol., 2019). Infekce virem nastává obvykle prostřednictvím infikovaného klíštěte, které saje hostitelovu krev, a poté virus putuje spolu se slinami do hostitele. Virus se dostává do kůže, kde se vyskytují makrofágy a dendritické buňky, které rozšiřují virus dál do těla. Nicméně tyto zmíněné imunitní buňky hrají také významnou roli v boji proti infekci TBEV (Haglund a Günther, 2003, Dörrbecker a kol., 2010).

1.1 Virus klíšťové encefalitidy

Virus TBE řadíme mezi tzv. arboviry (z anglického „arthropod-borne viruses“). Arboviry jsou skupiny virů z různých čeledí, tedy i s odlišným typem genetického materiálu. Konkrétně do této skupiny virů zařazujeme jednovláknové RNA viry s pozitivní polaritou (+ssRNA) z čeledí *Flaviviridae* a *Togaviridae*, jednovláknové RNA viry s negativní polaritou z čeledí *Bunyaviridae*, *Rhabdoviridae* a *Orthomyxoviridae*, dvouvláknové RNA viry (dsRNA) z čeledi *Reoviridae* i dvouvláknové DNA viry (dsDNA) z čeledi *Asfarviridae* (Hubálek a kol., 2014, Go a kol., 2014). Společným znakem výše zmíněných čeledí virů a důvodem, proč je zahrnujeme pod arboviry, je podobné šíření onemocnění. Arboviry jsou přenášeny členovci. Významnými přenašeči arbovirů jsou komáři přenášející například virus žluté zimnice, virus horečky Dengue, virus Zika a klíšťata přenášející například virus TBE či virus Krymsko-konžské hemoragické horečky (Alonso-Palomares a kol., 2019; de la Fuente a kol., 2017).

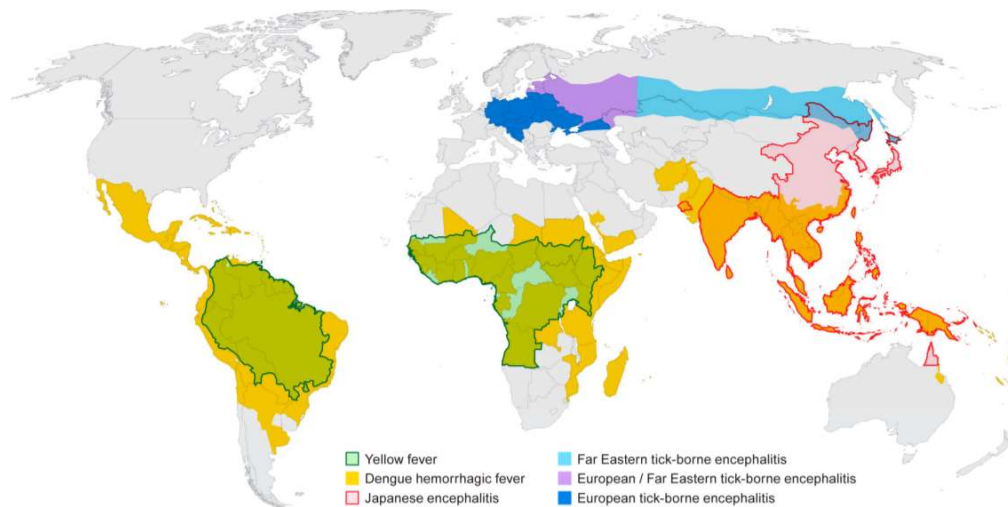
TBEV patří spolu s přibližně 70 dalšími druhy virů do rodu *Flavivirus*, čeledi *Flaviviridae*. Mezi flaviviry řadíme kromě TBEV např. taktéž výše zmíněný virus žluté zimnice, virus Zika a virus horečky Dengue, dále pak virus Japonské encefalitidy a západonilské horečky (Barrows a kol., 2018). Viry patřící do čeledi *Flaviviridae* jsou přenášeny klíšťaty nebo komáry (Zhang a kol., 2019).

TBEV můžeme rozdělit na 3 podtypy: středoevropský, sibiřský a dálněvýchodní. Mezi jednotlivými subtypy byly zjištěny rozdíly v sekvencích aminokyselin, a to až 9 %, taktéž variabilita nukleotidů se pohybuje kolem 17,3 % (Pogodina a kol., 2007; Domnich a kol., 2014).

Středoevropský podtyp TBEV se vyskytuje ve střední Evropě. Přenašečem tohoto subtypu je klíště obecné (*Ixodes ricinus*). Onemocnění způsobené středoevropským podtypem se vyskytuje v České republice, Německu, Rakousku, ale i v dalších západoevropských zemích. Přenos TBEV je závislý na vhodných přírodních podmínkách pro klíště (Lindquist a Vapalahti, 2008). Úmrtnost na onemocnění způsobené středoevropským typem je 0,5-2 % (Yoshii, 2019). Mezi standardní kmeny středoevropského podtypu řadíme kmeny Neudörfl a Hypr. Kmen Neudörfl má nejdelší známý genom, spolu s 30-250 nukleotidů dlouhým polyadenylovým řetězcem, zatímco středoevropský vysoce virulentní podtyp Hypr postrádá jeho značnou část. Virus s kratším polyadenylovým řetězcem je geneticky stabilnější než virus s dlouhým řetězcem a od délky polyadenylového řetězce se také odvíjí míra patogenity a replikace (Wallner a kol., 1995; Asghar a kol., 2016).

Kmeny sibiřského a dálněvýchodního podtypu se nacházejí v Rusku, Japonsku a východní Asii (Bogovic, 2015). Přenašečem sibiřského a dálněvýchodního podtypu je klíště sibiřské (*Ixodes persulcatus*) (Mansfield a kol., 2009; Yoshii a kol., 2017). Dálněvýchodní podtyp je považován za podtyp, který způsobuje nejzávažnější formu onemocnění. Způsobuje vážné nervové poruchy a mortalita dosahuje 20-40 % případů (Gritsun a kol., 2003a; Shi a kol., 2018). Nejvýznamnějším zástupcem dálněvýchodního podtypu je kmen zvaný Sofjin. Standardním kmenem sibiřského subtypu je kmen zvaný Vasilchenko vyskytující se převážně na území Ruska. Úmrtnost na klíšťovou encefalitidu způsobenou sibiřským podtypem je 2-3 % (Yoshii, 2019).

Výše zmíněná geografická rozšíření jednotlivých subtypů TBEV korelují s výskytem jednotlivých druhů klíšťat typických pro přenos daného subtypu TBEV. Z tohoto faktu vyplývá, že TBEV je endemickým patogenem Evropy a Asie (Obrázek 1). Nicméně, v dnešní době vlivem sociálních, podnebných a demografických faktorů, se podmínky pro život a rozmnožování klíštěte zlepšují, a to vede k rozšiřování klíšťat i výskytu onemocnění TBE (Süss, 2008). Jako příklad lze uvést Nizozemsko, které do roku 2016 nemělo žádný případ klíšťové encefalitidy. Až v roce 2016 byl prokázán středoevropský podtyp TBEV v nizozemském klíštěti a v témže roce byl zaznamenán první případ onemocnění TBE (de Graaf a kol., 2016).



Obrázek 1: Rozšíření onemocnění způsobených flaviviry (převzato od Holbrook, 2017).

1.1.1 Struktura virionu

Všechny viry z čeledi *Flaviviridae* mají tvar obaleného dvacetistěnu a obsahují genetickou informaci ve formě +ssRNA. Dle Baltimorovy klasifikace je tedy řadíme do IV. skupiny virů (Baltimore, 1971). TBEV má 11 kb dlouhý genom, který kóduje 1 polyprotein. Tento polyprotein je štěpen pomocí hostitelských i virových proteáz na 3 strukturní a 7 nestrukturních proteinů. Mezi strukturní proteiny patří proteiny C (kapsida), prM/M (premembrána/membrána) a E (obal) (Blitvich a Firth, 2017). Nestrukturní proteiny jsou NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B a NS5. Hlavními úkoly nestrukturních proteinů jsou převážně únik před přirozenou imunitou organismu a pomoc při replikaci TBEV v hostitelské buňce (Nambala a Su, 2018).

Každý strukturní protein má specifickou funkci. Mnoho kopií proteinu C s jednou kopií +ssRNA tvoří nukleokapsidu. Nukleokapsida je ohraničená membránou složenou z lipidů hostitele. V membráně zralého virionu jsou zakotveny proteiny E a prM/M. Nezralé virové částice obsahují prekurzor proteinu M (prM), který je při dozrávání v Golgiho aparátů štěpen, a tím vzniká zralý virion obsahující protein M (Pulkkinen a kol., 2018). Protein E má významnou roli v patogenitě TBEV. Dle publikované studie bylo zjištěno, že pokud není protein E glykosylovaný, TBEV se nemůže množit účinně v periferních tkáních a dokonce ani nemůže vniknout do myšního mozku a následně způsobit onemocnění TBE (Yoshii a kol., 2013).

Nejen protein E je hlavním cílem protilátek v rozpoznávání cizorodé částice, ale taktéž proteiny prM, NS1 a NS3 hrají roli v imunitní odpovědi proti TBEV a mohou je ovlivňovat (Domnich a kol., 2014). Příkladem ovlivnění může být nestrukturní protein NS1 u viru Zika, jenž se podílí na inhibici produkce interferonu typu I, čímž dochází k potlačení imunitní odpovědi proti němu (Wu a kol., 2017).

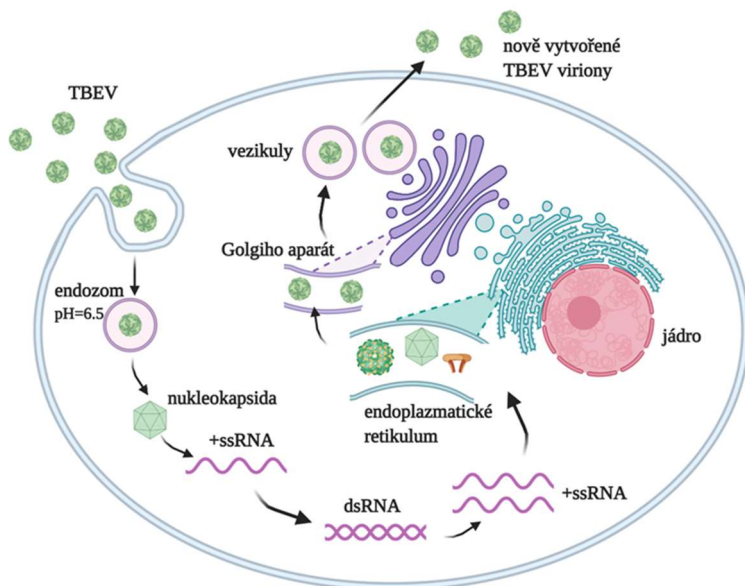
1.1.2 Replikační cyklus TBEV

Vektor TBEV, klíště, prochází třemi stádii vývoje, a to konkrétně stádiem larvy, nymfy a dospělce. Klíště se může nakazit ve všech stádiích vývoje, a to i ve stádiu vajíčka, přenosem z infikované matky (tzv. vertikální přenos). Nákaza je poté přenášena do dalších vývojových stádií (Danielova a kol., 2002). Klíště se může nakazit vícero způsoby, například při sání krve z infikovaného jedince, nejčastěji hlodavce (Mansfield a kol., 2009). TBEV se taktéž může přenést z jednoho klíšete na druhého pomocí tzv. „co-feedingu“, při němž saje vícero klíšťat z jednoho hostitele naráz. V případě přenosu pomocí „co-feedingu“ nemusí být hostitel nakažen, ale stále přenos mezi klíšťaty nastává (Jones a kol., 1987; Labuda a kol., 1997). Sání krve však trvá klidně i dny, virus má tedy vyšší možnost spolu s klíšetěcími slinami proniknout do hostitele (Mansfield a kol., 2017). Klíště člověka nevyhledává účelně, člověk je jen náhodný hostitel.

Replikační cyklus TBEV (Obrázek 2) začíná vstupem TBEV do buňky receptorem zprostředkované endocytózy. Hlavními receptory, na které se váže virový protein E při vstupu do hostitelské buňky, jsou laminin-binding protein a $\alpha V\beta 3$ integrin (Pulkinen a kol., 2018). V buňce se virion nachází ve vezikulu s kyselým pH. Kyselé pH zajistí změny v proteinu E a ten se mění z dimeru na trimer (Allison a kol., 1995). Virová membrána se spojí s endozomální membránou, což vede k uvolnění nukleokapsidy do cytoplazmy. Nukleokapsida se rozpadá a virová RNA je uvolněna do cytoplazmy. Jednovláknová RNA se přepisuje a vytváří se nový templát pro replikaci.

Replikace probíhá v blízkosti membrány endoplazmatického retikula. Nově syntetizovaný genom je obklopen kopiemi proteinu C a tím je vytvořena nová nukleokapsida (Pulkinen a kol., 2018). V membráně endoplazmatického retikula dochází k heterodimerizaci proteinu E s prekurzorem prM a pučením nukleokapsidy přes membránu ER vzniká nezralá částice (Stadler a kol., 1997). V trans-Golgiho aparátu je nezralá částice vystavena kyselému pH, které způsobuje konformační změnu v proteinu E. Díky působení furinu se protein prM rozděluje na pr a M fragmenty. Pr fragment však zůstává nadále asociovaný s virionem. Nové

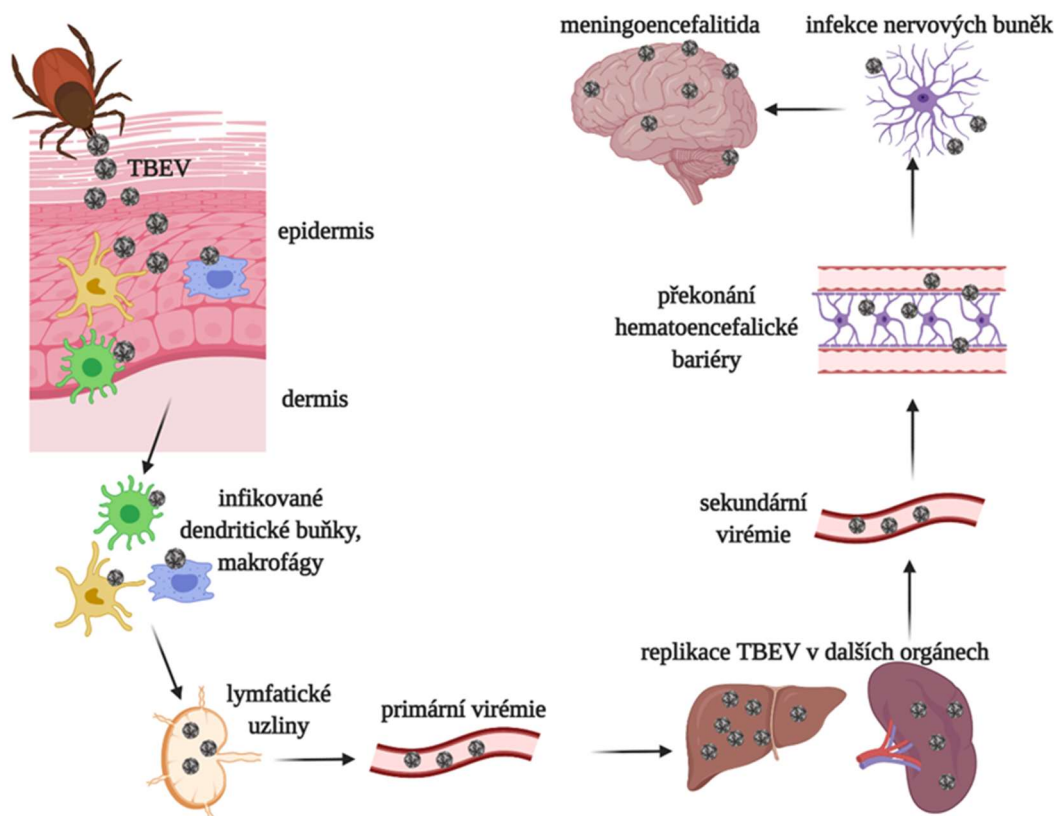
viriony jsou uvolněny pomocí exocytózy z buňky do těla, kde díky neutrálnímu pH se od virové částice odštěpí pr fragment. Po odštěpení pr fragmentu je virion schopen infikovat další buňky v těle (Yu a kol., 2008). Nezralé částice TBEV nemohou infikovat jiné buňky, ale částečně zralé částice jsou již schopné napadat další buňky (Pulkkinen a kol., 2018).



Obrázek 2.: Replikační cyklus TBEV (vytvořeno v programu BioRender.com).

1.1.3 Šíření TBEV v organismu

Jakmile se nakažené klíště přisaje na člověka, přenáší se TBEV s klíštěcími slinami do kůže, kde mohou být infikovány první buňky. Za tyto buňky, vhodné pro replikaci TBEV, jsou považovány dendritické buňky (Fialová a kol., 2010; Haglund a Günther, 2003). Mezi další potenciální cíle TBEV patří makrofágy (Dörrbecker a kol., 2010). Infikované makrofágy nebo dendritické buňky putují do lymfatických uzlin, z nichž se poté virus dostává do krve. V tomto stádiu je možné detekovat primární virémii (Růžek a kol., 2010). S krví se virus dostává do orgánů, jako jsou játra či slezina, kde se dále replikuje. Poté, co proběhlo dostatečné množství replikací viru v orgánech a další uvolnění do krve, může být detekována sekundární virémie. Virus poté prochází skrze hematoencefalickou bariéru do mozku, kde infikuje buňky centrální nervové soustavy, především neurony. V mozku se může rozvinout klíšťová meningo-encefalitida (TBE) (Pogodina VV., 1960; Růžek a kol. 2010). Patogeneze TBEV v hostiteli je shrnuta na Obrázku 3.



Obrázek 3: Patogeneze TBE (vytvořeno v programu BioRender.com).

1.1.4 Klíč'ová meningoencefalitida

První fáze onemocnění TBE probíhá s nespecifickými příznaky. Inkubační doba onemocnění při infekci stredoevropským typem TBEV je mezi 2 a 18 dní. Symptomy první fáze jsou podobné chřipce, tzn. bolest hlavy, bolest svalů, zvýšená teplota a trvají většinou 2-7 dní.

Poté přichází asymptomatická fáze, která může trvat 2-33 dní. V 65 % případů po asymptomatické fázi se již druhá fáze onemocnění nerozvine. Ve zbylých 35 % se rozvine sekundární fáze s vážnějšími příznaky (Mandl a Holbrook, 2011). Mezi příznaky patří nesnesitelná bolest hlavy, světloplachost, vysoká horečka, třes, závratě, poruchy spánku a další neurologické potíže plynoucí z rozvoje meningoencefalitidy. Pokud je nakažený nakažen dálnévýchodním nebo sibiřským podtypem, může onemocnění probíhat i bez asymptomatické fáze (Yoshii, 2019).

TBE může přejít i do chronické fáze. Do chronické podoby onemocnění přechází nejčastěji, pokud je nakažený infikován sibiřským podtypem (Gritsun a kol., 2003a).

Specifická léčba TBE zatím neexistuje, proto se uplatňuje léčba podpůrná, která pouze zmírňuje příznaky onemocnění (Riccardi a kol., 2019).

1.1.5 Očkování

Proti TBE existuje prevence, a tou je očkování. Na českém trhu jsou dostupné 2 vakcíny FSME-IMMUN a přípravek Encepur. Očkování se skládá ze 3 injekcí v aplikacích 0 dní, za 1-3 měsíce a za 5-12 měsíců. Po třetí injekci ochrana přetrvává nejméně po 3 roky, proto je nutné přeočkování za 3-5 let. V letních měsících se může použít zrychlené schéma FSME 0 dní, 14 dní a 5-12 měsíců od druhé dávky (Příbalová informace: FSME-IMMUN 0,5ml [online]. [cit. 2021-01-10]).

V Rakousku byla zaznamenána vysoká úmrtnost na TBE, proto se v roce 1981 rozjela masivní očkovací kampaň, díky níž bylo v roce 2001 proočkováno 86 % obyvatel (Kunz, 2003). V roce 2010 bylo v Rakousku zaznamenáno pouze 58 případů onemocnění, na rozdíl od České republiky, kde ve stejný rok bylo zaznamenáno desetkrát více případů, konkrétně 589 (TBE Cases by year: Number of TBE cases, regardless of the applied case definition, by year reported in 16 EU/EFTA countries, 2000–2010 (n= 29 381), 2012). Dle dostupných dat Státního zdravotního ústavu počty případů TBE na území České republiky každoročně stoupají. Za roky 2018, 2019 a 2020 bylo nahlášeno konkrétně 712, 774 a 854 případů TBE. Nejvíce případů v roce 2020 se vyskytovalo v Jihočeském kraji, a to přesně 137 potvrzených diagnóz a nejméně, 27 potvrzených diagnóz, v Karlovarském kraji (Infekce v ČR - ISIN (dříve EPIDAT), 2020).

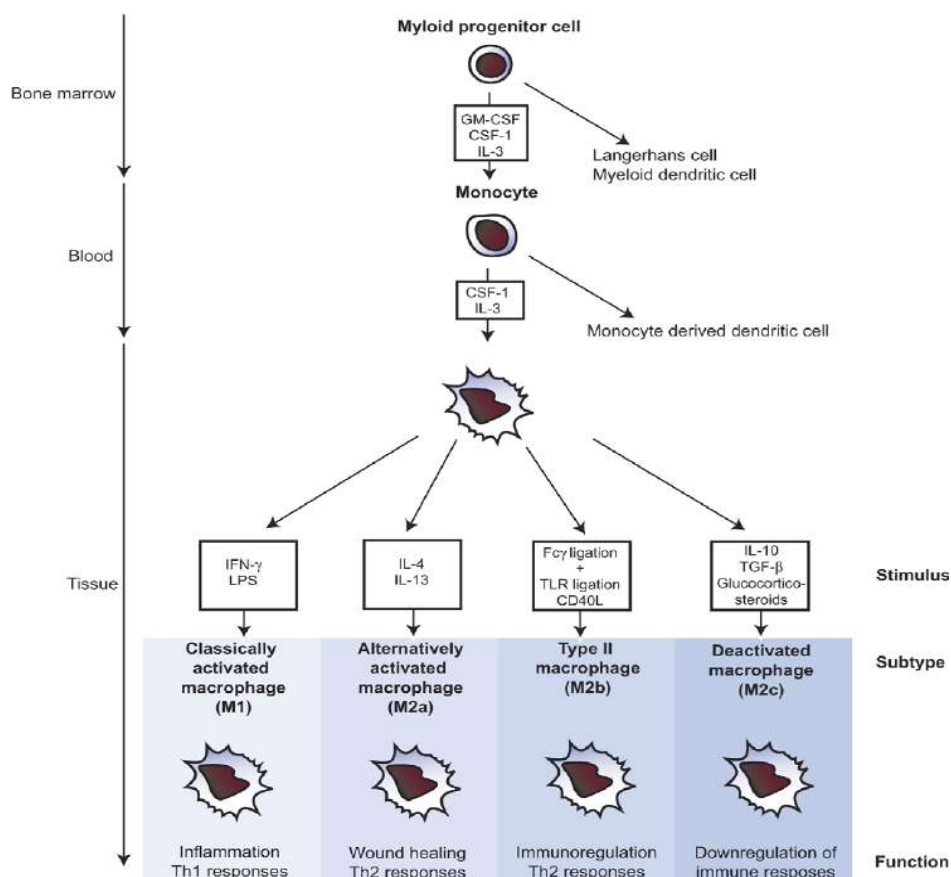
1.2 Imunitní buňky

Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, TBEV se dostává do těla přes kůži spolu s klíštěcími slinami v průběhu sání krve klíštětem. V kůži jako první reaguje vrozený imunitní systém, který má za úkol bojovat s patogeny a infekcí, tedy i s TBEV. Vrozený imunitní systém se skládá ze dvou složek, a to konkrétně z humorální a buněčné složky. Mezi buněčnou složku imunitního systému řadíme například neutrofilů, makrofágů, dendritické buňky a další buňky schopné prezentovat antigen. Imunitní buňky mají různé mechanismy účinku, některé fagocytují, jiné produkují cytokiny nebo rozpoznávají patogeny.

1.2.1 Makrofágy

Makrofágy byly poprvé popsány Élie Metchnikoffem v roce 1893 při pozorování fagocytózy v zanícené tkáni (Gordon, 2008). Roku 1968 Ralf van Furth, Zanvil Cohn a jejich kolegové zformulovali tzv. mononukleární-fagocytární systém, který vysvětluje původ makrofágů (van Furth a kol., 1972). Makrofágy patří mezi buňky myeloidní vývojové řady (Obrázek 4), kdy z pluripotentní kmenové buňky, pocházející z kostní dřeně, se vlivem cytokinů, nejčastěji M-CSF, GM-CSF a IL-3, stává monocyt (Stein a kol., 1992; Arango Duque a Descoteaux, 2014; Martinez a Gordon 2014). Monocyty můžeme nalézt v krvi, kostní dřeni a ve slezině. Na povrchu jsou monocyty opatřeny chemokinovými receptory a receptory schopnými rozpoznávat molekuly typické pro patogeny. Monocyty migrující do tkání mohou diferenciovat na zánětlivé dendritické buňky anebo na makrofágy (Geissmann a kol., 2010).

Makrofágy jsou buňky nespecifické imunity, které můžeme nalézt v lymfatických i nelymfatických tkáních. Řadíme je mezi bílé krvinky se schopností fagocytovat a prezentovat antigeny pro Th a B buňky (Huber a Stingl, 1981). Dále se podílejí na homeostáze, a to díky schopnosti pohlcovat apoptické buňky. Taktéž umí rozpoznávat specifické molekuly, které jsou typické pro patogeny, a tím indukovat produkci cytokinů (Geissmann a kol., 2010).



Obrázek 4.: Vývoj a diferenciace makrofágů (převzato od van der Bij a kol., 2005).

Aktivita makrofágů bývá iniciována cytokiny produkovanými Th buňkami, především interferonem γ . Makrofágy mají také schopnost chemotaxe neboli přitahování a přemísťování se za specifickými molekulami. Produkci cytokinů makrofágy spojují vrozenou a získanou imunitu (Arango Duque a Descoteaux, 2014). Hrají také roli při zánětu, kde mohou působit prozánětlivě, tak i protizánětlivě (Davies a Taylor, 2015). Díky schopnosti makrofágů produkovat oxid dusnatý, mohou makrofágy zabíjet mikroorganismy, čehož může být využito při obraně proti infekci (van der Bij a kol., 2005).

1.2.1.1 M1 a M2 makrofágy

Makrofágy můžeme rozlišit podle způsobu aktivace na klasicky a alternativně aktivované. Způsob aktivace určuje druhy cytokinů, které budou produkovány a tím i účinek buněk. M1 makrofágy jsou aktivovány klasicky za působení cytokinů Th1 buněk, konkrétně prozánětlivého interferonu γ . M1 makrofágy působí prozánětlivě a produkují např.: IL-1, IL-6, IL-12, IL-23 a TNF- α (Gordon a Martinez, 2010; Funes a kol., 2018). Naproti tomu, M2 makrofágy, které jsou aktivovány alternativně, vznikají za působení cytokinů Th2 buněk, které jsou protizánětlivé a napomáhají hojení a regeneraci. M2 makrofágy produkují

protizánětlivé cytokiny IL-10 a TGF- β (Hořejší, 2015). Typ makrofágů nacházející se ve tkáních, tedy i v kůži, patří mezi alternativně aktivované makrofágy (Davies a kol., 2013).

Alternativně aktivované makrofágy byly na základě pozorovaných rozdílů v aktivaci různými stimuly, dále rozděleny na M2a, M2b, M2c a M2d podtypy. M2a makrofágy umí fagocytovat, zapojují se v hojení ran a indukují odpověď Th2 buněk. U tohoto podtypu M2 makrofágů byla taktéž pozorována deaktivace T-buněk (Schebesch a kol., 1997; van der Bij a kol., 2005). M2b makrofágy jsou také nazývány regulační makrofágy, jelikož určují rozsah imunitní odpovědi a zánětlivé reakce (Mosser a Edwards, 2008; Wang a kol., 2019). V případě rakoviny a infekčních onemocnění M2b makrofágy napomáhaly onemocnění tím, že snižovaly imunitní a zánětlivou odpověď (Wang a kol., 2019). M2c makrofágy, jinak nazývané deaktivované, mohou fungovat v opravě tkání v raných stádiích hojení ran (Lurier a kol., 2017). M2d makrofágy jsou s nádorem asociované makrofágy, které umí poskytnout dobré prostředí pro rozvinutí nádorů a jeho progresy (Chanmee a kol., 2014).

1.2.1.2 Makrofágy a flaviviry

Pokud se zaměříme na studie zabývající se makrofágy a TBEV, publikováno je jich jen malé množství. Nicméně dle studií bylo prokázáno, že TBEV může být izolován z lidských leukocytů, během prvních dnů po přenosu, což indikuje, že se virus replikuje v krevních buňkách, tedy pravděpodobně i v makrofázích (Leonova a kol., 2003; Leonova, 1997; Krylova a kol., 2015). Dále dva rozdílné kmeny dálněvýchodního podtypu TBEV byly porovnávány mezi sebou, co se týče penetrace a replikace v makrofázích. Vysoce patogenní kmen Dal'negorsk rychle penetroval do buněk a aktivně se uvnitř množil, na rozdíl od druhého nepatogenního kmene Primorye-183, který byl v penetraci i množení pomalý. Vysoce patogenní kmen snižoval aktivitu monocytů, NK buněk a i T-lymfocytů, zatímco nepatogenní kmen aktivoval vrozenou imunitní odpověď, což způsobilo rychlou eliminaci viru z organismu (Krylova a kol., 2015).

I přes to, že není publikováno mnoho studií týkající se makrofágů a TBEV, existují studie, které se zabývaly makrofágy a viry z čeledi *Flaviviridae*. V jedné z nich byl pozorován efekt oxidu dusnatého na virus japonské encefalitidy a bylo zjištěno, že makrofágy aktivovaly enzym pro tvorbu oxidu dusnatého, čímž se zvýšila jeho produkce. Oxid dusnatý má inhibiční efekt na virové infekce, jelikož inhibuje replikaci RNA. Inhibice replikace viru japonské encefalitidy v myších makrofázích korelovala s množstvím produkovaného oxidu dusnatého. V návaznosti na tento fakt bylo dále prokázáno, že při zvýšené produkci oxidu dusnatého

docházelo k výrazné inhibici replikace viru japonské encefalitidy, akumulaci virových proteinů, ale taktéž uvolňování virionů z infekčních buněk bylo sníženo (Lin a kol., 1997).

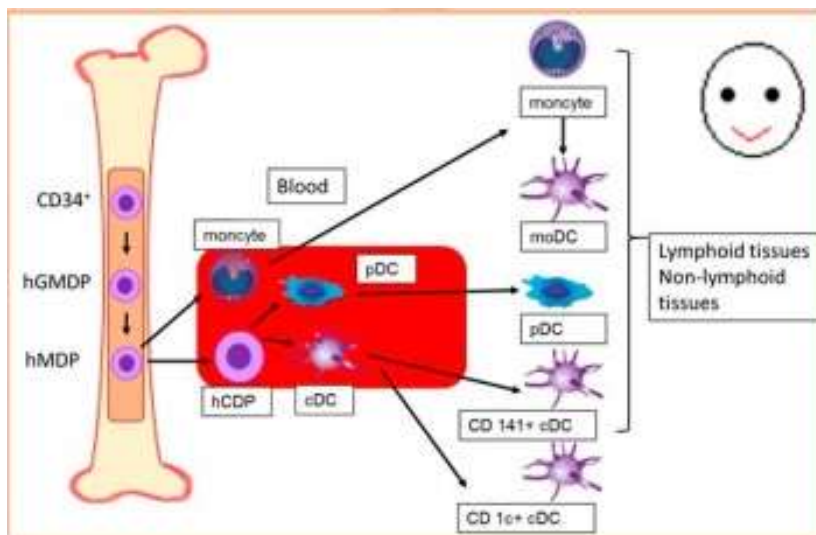
Při infekci způsobenou Dengue virem bylo zkoumáno, jestli se kožní makrofágy tímto virem infikují. Makrofágy byly jen málo proinfikované, ale pokud byly aktivované IL-4/GM-CSF, jejich permisivita k infekci byla zvýšená. Infikované makrofágy produkovaly vysoké hladiny TNF- α , který je považován za klíčový cytokin pro rozvoj horečky Dengue (Schaeffer a kol., 2015).

Dále byl zkoumán vliv viru západonilské horečky na makrofágy, a to tím způsobem, že makrofágy byly infikovány a poté inkubovány po dobu až 47 dnů. Pozoroval se vrchol ve virové produkci, který nastal mezi druhým a čtvrtým dnem po infekci. Také se pozorovalo, jak dlouho bude virus detekován po infekci, v tomto případě byl virus v médiu makrofágů detekován až 47 dní po infekci (Rios a kol., 2006).

1.2.2 Dendritické buňky

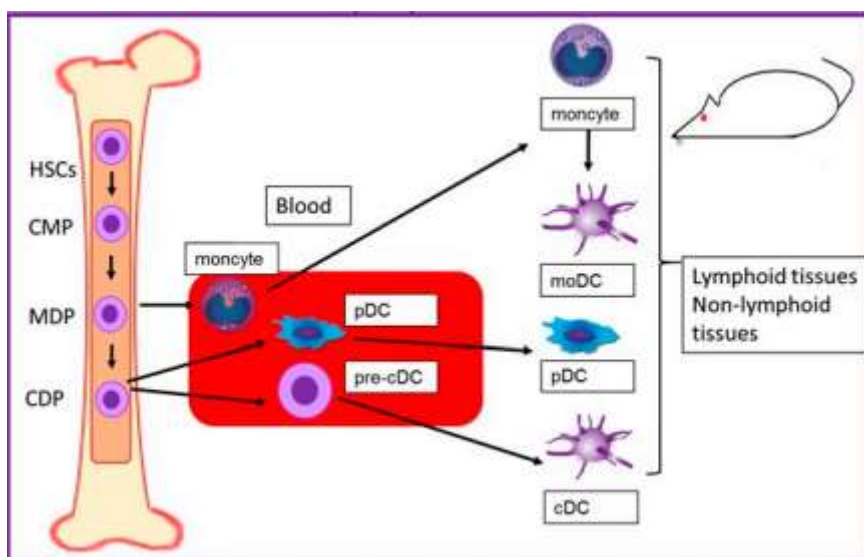
Dendritické buňky (DC) byly poprvé pozorovány v roce 1868 Paulem Langerhansem, ale až v roce 1973 Steinman a Cohn popsali jejich působení na imunitní systém, a to iniciovat a modulovat imunitní odpověď (Steinman a Cohn, 1973; Solano-Gálvez a kol., 2018). DC patří mezi leukocyty, které mohou být nalezeny ve všech lymfoidních i většině nelymfoidních tkání. Mezi jejich hlavní funkce patří schopnost fagocytovat, provádět receptorem zprostředkovanou endocytózu, udržovat homeostázu, aktivovat naivní T buňky anebo reaktivovat paměťové T buňky (Plantinga a kol., 2015, McLellan a kol., 1996, Dai a kol., 2019). DC je různorodá skupina buněk, ale všechny dokáží prezentovat antigen naivním T-buňkám, liší se však v místě nálezů a ostatních imunologických funkcích (Shortman a Naik, 2007).

Lidské DC vznikají z pluripotentní kmenové buňky CD34⁺ (Obrázek 5), pocházející z kostní dřeně. Z této kmenové buňky poté vzniká progenitor pro granulocyty, monocyty a DC (na Obrázku 5 označený jako hGMDP). Dále dochází k diferenciaci na společný progenitor pro makrofágy a DC (na Obrázku 5 označený jako hMDP), který dává vzniku monocytům a dalšímu progenitoru pro DC. Ontogeneze DC pokračuje v krvi, kde se dále diferencují na plazmacytoidní a myeloidní DC (Solano-Gálvez a kol., 2018; Lee a kol., 2015).



Obrázek 5.: Vznik a vývoj lidských DC. *hGMDP* - lidský progenitor pro granulocyty, monocyty a DC z anglického „human granulocyte-monocyte-DC progenitor“, *hMDP* - lidský progenitor pro monocyty a DC z anglického „human monocyte-dendritic progenitors“, *hCDP* - lidský společný progenitor pro DC z anglického „human common dendritic cell progenitor“, *cDC* - klasické/konvenční DC, *pDC* - plazmacytoidní DC, *moDC* – DC derivované z monocyty (převzato od Solano-Gálvez a kol., 2018).

Pokud se zaměříme na myší model, ontogeneze DC se od lidského lehce liší (Obrázek 6). Vývoj probíhá z kmenové buňky pocházející z kostní dřeně, která se derivuje na společný myeloidní progenitor (na Obrázku 6 označen jako CMPs). Z myeloidního progenitoru vznikají dva progenitory, jeden pro monocyty a druhý pro DC (Solano-Gálvez a kol., 2018).



Obrázek 6.: Vznik a vývoj myších DC. *HSCs* - hematopoetická kmenová buňka z anglického „hematopoietic stem cells“, *CMP* - společný myeloidní progenitor z anglického „common myeloid

progenitors“, *MDP - progenitor pro monocyty a DC z anglického „monocyte and dendritic cell progenitor*“, *CDP - společný progenitor pro DC z anglického „common dendritic cell progenitor*“, *pre-cDC - prekursor klasických/konvenčních DC z anglického „precursors of conventional DCs*“, *cDC - klasické/konvenční DC*, *pDC - plazmacytooidní DC*, *moDC – DC derivované z monocytů* (převzato od Solano-Gálvez a kol., 2018).

1.2.2.1 Plazmacytooidní DC

Plazmacytooidní DC (pDC) jsou buňky, jejichž jméno je odvozeno od podobné morfologie, jako mají plazmatické buňky. Za normálního stavu se pDC nevyskytují v nelymfatických tkáních, vyskytují se převážně v krvi a lymfoidních orgánech, ale během zánětu se rychle přesouvají do tkání a mohou produkovat interferony typu I. pDC jsou charakterizovány expresí molekul CD123, CD303 a CD304 a Toll-like receptory 7 a 9, na druhou stranu exprese molekul CD11c nebo CD141 je potlačena (Lipscomb a Masten, 2002; Solano-Gálvez a kol., 2018; Collin a kol., 2013; Liu, 2005; Dzionek a kol. 2000).

1.2.2.2 Myeloidní DC

Pro myeloidní DC (mDC) je typická exprese typických myeloidních povrchových molekul, a to CD11c, CD13, CD33 a CD11b, ale exprese CD14 a CD16 je potlačena. Z tohoto důvodu jsou také jinak nazývané jako konvenční/klasické makrofágy. Dále mohou být charakterizovány expresí Toll-like receptorů, jmenovitě TLR1-TLR8 a TLR10 (Collin a kol., 2013). mDC hrají klíčovou roli v aktivaci naivních T buněk, v iniciaci adaptivního imunitního systému a jsou to vysoce účinné antigen prezentující buňky (Lewis, 2004). mDC můžeme dále rozdělit na mDC lymfoidní a migrační. Migrační mDC mají schopnost migrovat z periferní tkáně do lymfoidních orgánů, nacházejí se v kůži, plicích, zažívacím traktu, játrech a ledvinách, zatímco lymfoidní DC málo migrují a nachází se spíše v lymfatických orgánech (Kushwah a Hu, 2011).

1.2.2.2.1 CD11c+ DC

Mezi mDC patří CD11c+ DC, se kterými se v praktické části této práce pracuje. CD11c+ DC buňky můžeme nalézt ve škáře a mohou stimulovat aktivitu T buněk. Myší kůže obsahuje přibližně jednu CD11c+ DC na pět makrofágů, zatímco v lidské kůži je koncentrací CD11c+ DC vyšší, a to až do poměru 1:1 (Zaba a kol., 2007). CD11c+ DC mají významnou roli v ochraně proti rakovině. Lidé, kteří byli na imunosupresi po transplantaci ledviny, měli vyšší riziko spinocelulárního karcinomu, jelikož bylo prokázáno, že díky imunosupresi měli snížené hodnoty CD11c+ DC (Sandvik a kol., 2014).

1.2.2.3 DC a flaviviry

Jak již bylo zmíněno, DC patří mezi první buňky, které mohou být infikovány TBEV. Bylo zjištěno, že replikace TBEV v DC byla významně podpořena slinami klíštěte, a také AKT signální dráha byla slinami podpořena. AKT signální dráha je známá pro svoje anti-apoptické účinky a pro tzv. „survival efekt“. Survival efekt je známý tím, že ovlivňuje apoptózu, a to tím způsobem, že apoptóza infikovaných buněk poklesne a buněčná viabilita se v přítomnosti slin zvýší. Celý tento proces může mít pozitivní důsledky pro replikaci a přenos TBEV (Lieskovská a kol., 2018).

Podobně jako u makrofágů, mnoho studií týkající se DC a TBEV není, ale vliv virů z čeledi *Flaviviridae* na DC byl pozorován, přesněji vliv na DC derivovaných z monocytů. Médium z DC infikovaných viry z čeledi *Flaviviridae* bylo odebráno 24 hpi a 48 hpi a byl pozorován titr viru. Vysoké titry byly pro DC infikované Wesselsborn virem, virem západonilské horečky a virem Usutu, zatímco nejnižší titr viru byl dosažen při použití viru Zika a viru horečky Dengue. V intervalu 48 hpi se titr viru z infikovaných DC oproti 24 hpi zvýšil jen u viru Zika a viru Wesselsborn. Dále se pozoroval vliv virů z čeledi *Flaviviridae* na viabilitu DC. V krátkém čase po infekci nebyl pozorován cytopatický efekt DC, jen u DC infikovaných virem Usutu byla zaznamenána větší míra úmrtnosti. Cytopatický efekt, a tedy i snížená viabilita, byly ve vyšší míře pozorovány v intervalu 48 hpi také u virů japonské encefalitidy a západonilské horečky. Studie se dále soustředila na DC a jejich sekreci interferonu- β , který se účastní v protivirové ochraně. Nejvyšší sekreci v čase 24 hpi indukoval virus Usutu, v čase 48 hpi kromě viru Usutu také viry japonské encefalitidy a západonilské horečky, zatímco virus Zika a Dengue virus neindukovaly sekreci interferonu β dendritickými buňkami vůbec (García-Nicolás a kol., 2019).

Při kultivaci DC ve dvou různých mediích (jedno obohaceno o IL-4) a jejich infekcí Dengue virem byly pozorovány titry viru. U buněk s přidaným IL-4 byl detekován v průměru dvojnásobně vyšší titr viru než u DC bez IL-4. Pro ověření vyššího titru byla dále detekována proinfikovanost buněk v těchto dvou mediích. Ve výsledku bylo prokázáno, že vyšší titr odpovídá proinfikovanosti buněk, jelikož DC s IL-4 byly proinfikovány z cca 70 %, zatímco DC bez IL-4 pouze z cca 30 % (Schaeffer a kol., 2015).

2 Cíle práce

- 1) Derivace makrofágů a DC z myši kostní dřeně
- 2) Infekce makrofágů a DC virem TBEV (kmeny Neudörfl a Hypr)
- 3) Určení vlivu infekce na viabilitu buněk
- 4) Detekce virové RNA v porovnání s kontrolní linií PMJ2-R
- 5) Určení titru viru ve vzorcích v porovnání s kontrolní linií PMJ2-R

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

3.1.1 Myši

Pro získání potřebných buněk z kostní dřeně byli použiti samci myšního kmene C57B1/6N (Velaz, s.r.o.) staří 12-19 týdnů. Myši byly chovány ve zvěřinci Katedry medicínské biologie v Českých Budějovicích za standardních podmínek.

3.1.2 Buněčné linie

V pokusech byly použity dvě různé buněčné linie, a to kontrolní linie PMJ2-R (ATCC[®] CRL-2458[™]) a linie A549 (ATCC[®] CCL-185[™]) pro plakovou titraci. Buněčná linie PMJ2-R pochází z myších peritoneálních makrofágů, které byly *in vivo* imortalizovány J2 retrovirem nesoucí v-raf a v-myc onkogeny (Adami a kol., 1993). Buněčná linie PMJ2-R byla kultivovaná při 37 °C v RPMI médiu (pojmenováno po místě vzniku Roswell Park Memorial Institute) s přídavkem 10% BOFES (Bovine fetal serum), 1% antibiotiky (penicilin G – 100 units/ml; streptomycin 100 µg/ml), 1% L-glutaminem a 50 µM 2-merkaptóetanolu (vše Biowest).

Buněčná linie A549 pochází z lidského plicního adenocarcinomu (Foster a kol., 1998). Tyto buňky byly kultivované při 37 °C v atmosféře s 5% CO₂ v DMEM médiu (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) s přídavkem 10% BOFES, 1% antibiotiky (penicilin G – 100 units/ml; streptomycin 100 µg/ml) a 1% L-glutaminem (vše Biowest).

3.1.3 Virus klíšťové encefalitidy

Pro infekci makrofágů a DC byly použity dva evropské kmeny TBEV, a to konkrétně Neudörfl v koncentraci zásobních alikvot $6,16 \cdot 10^7$ PFU/ml a Hypr v koncentraci zásobních alikvot $5 \cdot 10^8$ PFU/ml. Oba kmeny byly získány pomnožením na Vero E6 buňkách (ATCC[®] CRL-1586) a jedná se o první pasáž viru v těchto buňkách.

3.2 Metody

3.2.1 Derivace makrofágů a DC z buněk kostní dřeně

K získání makrofágů (BMM) a DC bylo zapotřebí vyseparovat kostní dřev ze stehenní a holenní kosti myši. K izolaci kostní dřev byl použit zavedený postup z Laboratoře molekulární imunologie KME PřF JU (Lieskovská a kol., 2015). Nejprve byla myš usmrcena zlomením vazů. Ze zadních nohou byla stažena kůže a zadní končetiny byly odděleny v pánevní od zbytku těla bez porušení potřebných kostí. Končetiny byly opláchnuty ve sterilním PBS (fosfátový pufr; složení 0,137 M NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH= 7,4) a z kostí byla odstraněna svalovina a šlachy. Poté byly kosti od sebe odděleny v kolenním kloubu, opláchnuty v isopropanolu a následně v MEM médiu (Eagle's minimal essential medium, Biowest). V dalším kroku byly hlavy kloubů odstříhány a pomocí 26 x G jehly naplněné MEM médiem byly kosti propláchnuty pro uvolnění kostní dřev do MEM média. Kostní dřev byla poté řádně rozsuspendována. Buněčná suspenze byla přefiltrována přes filtr pro buňky (tzv. cell strainer, Corning) a následně centrifugována (250 x g, 4 °C, 7 min 30 s). Následně byl odebrán supernatant a byla provedena lýza erytrocytů přidáním 1 ml 0,84% NH₄Cl ohřátého na 37 °C. Lýza byla zastavena po dvou minutách přidáním 10 ml MEM média. Buňky kostní dřev byly spočítány v Bürkerově komůrce, centrifugovány za stejných podmínek jako v předchozím kroku a rozsuspendovány v kompletním RPMI médiu.

Následná derivace buněk byla provedena s modifikacemi oproti zavedenému protokolu (Assouviea kol., 2018). Pro derivaci BMM bylo potřebné množství buněk kostní dřev naředěno na koncentraci 2,5*10⁶ buněk na Petriho misku v celkovém množství 10 ml kompletního RPMI média obohaceného o 30 % LCCM média (médiu z fibroblastů L929 produkujících růstový faktor M-CSF). Třetí den derivace bylo k buňkám přidáno 10 ml čerstvého kompletního RPMI média obohaceného o 30 % LCCM médiu. Sedmý den byly adherované BMM šetrně opláchnuty sterilním PBS, uvolněny pomocí trypsinu, spočítány a 2*10⁶ buněk ve 2 ml na jamku bylo nasazeno na 6-jamkové panely. BMM byly poté inkubovány při 37 °C v atmosféře s 5 % CO₂ do druhého dne, kdy byly infikovány TBEV.

Derivace DC byla opět provedena s mírnými modifikacemi oproti zavedenému protokolu (Lieskovská a kol., 2015). Pro derivaci DC bylo potřebné množství buněk kostní dřev naředěno na koncentraci 2,5*10⁵ b/ml a nasazeno po 3 ml na 6-jamkový panel v kompletním RPMI médiu obohaceném růstovým faktorem GM-CSF (20 ng/ml, Peprotech)

pro derivaci DC. Třetí den bylo obohacené médium vyměněno za 4 ml čerstvého média opět s přídavkem GM-CSF. Sedmý den od izolace byly buňky připraveny pro magnetickou separaci CD11c⁺ buněk.

3.2.2 Magnetická separace CD11c⁺ buněk

Sedmý den po izolaci z kostní dřeně byly odebrány neadherované DC. Buňky byly spočítány, centrifugovány při 250 x g, 10 minut a 4 °C, supernatant byl odebrán a pelet byl rozsuspendován ve 400 µl MACS pufru (250 ml PBS, 1mM EDTA, 2% BOFES). K buňkám bylo přidáno 100 µl anti-CD11c magnetických kuliček (Miltenyi Biotec) a buňky byly inkubovány 15 minut na ledu ve tmě. Po 15 minutách byl přidán MACS pufr do celkového objemu 10 ml a buňky byly centrifugovány při 250 x g, 4 °C a 7 min 30 s. Po centrifugaci byl odebrán supernatant a pelet byl rozsuspendován v 500 µl MACS pufru. Na magnet byla umístěna LS kolonka (Miltenyi Biotec), jež byla promyta 3 ml MACS pufru. Buněčná suspenze byla aplikována na LS kolonku. Následně byla kolonka promyta 3 x 3 ml MACS pufru k odplavení nespecificky se vázajících buněk. Po promytí byla kolonka vyjmuta z magnetu a separované CD11c⁺ DC byly dvakrát eluovány 5 ml elučního roztoku (kompletní RPMI médium). Získané CD11c⁺ DC byly nasazeny na pokus v koncentraci 3,2*10⁵ buněk/jamku v 1 ml na 24-jamkový panel a inkubovány do druhého dne, kdy byly infikovány TBEV.

3.2.3 Nasazení PMJ2-R buněk

Jako pozitivní kontrolní linie byla vybrána makrofágová buněčná linie PMJ2-R. PMJ2-R byly nasazeny na pokus ve stejných koncentracích jako BMM a DC, konkrétně tedy v sadě odpovídající koncentraci BMM – 2*10⁶ buněk/jamku na 6-jamkové panely a v sadě odpovídající koncentraci DC – 3,2*10⁵ buněk/jamku na 24-jamkový panel.

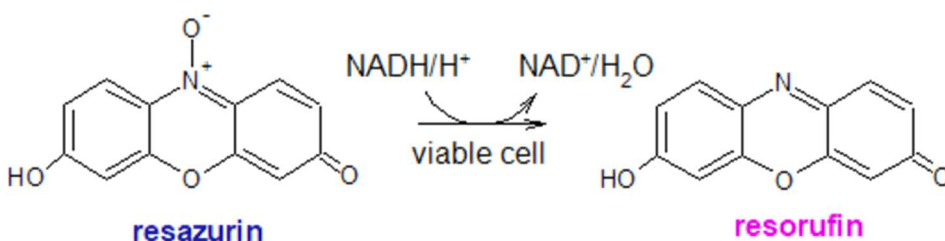
3.2.4 Infekce BMM, DC a PMJ2-R virem klíšťové encefalidity

Na ledu byl ponechán virus šetrně rozmraznout a následně z něj byly připraveny virové suspenze pro oba kmeny TBEV, aby výsledná koncentrace TBEV po přidání k buňkám odpovídala 5 MOI (multiplicity of infection, neboli 5 virionů na 1 buňku). Pro buňky, které sloužily jako negativní kontrola (NK), bylo vytvořeno kontrolní médium ředěním média odebraného z Vero E6 buněk ve stejném poměru jako virová suspenze.

Médium z jamek bylo odebráno a do 6-jamkového panelu byl přidán 1 ml virové suspenze nebo kontrolního média, do 24-jamkového panelu bylo přidáno 200 μ l virové suspenze nebo kontrolního média. Takto připravené vzorky byly dvě hodiny inkubovány při 37 °C v atmosféře s 5 % CO₂. Po uplynutí této doby byla virová suspenze a kontrolní médium odebráno, jamky byly promyty sterilním PBS a bylo přidáno čerstvé RPMI médium do původního objemu před infekcí. Buňky byly inkubované při 37 °C, v atmosféře s 5 % CO₂ až do určených hodin odběru, tedy 24 hpi a 48 hpi. V obou časových intervalech byla část média z buněk odebrána do sterilních zkumavek a uchována pro pozdější použití pro plakovou titraci (kapitola 3.2.9), následně byl proveden test viability buněk (kapitola 3.2.5). Poté byl zbytek média odstraněn a jamky byly promyty sterilním PBS a bylo přidáno RNA Blue (Top-Bio) pro izolaci RNA (kapitola 3.2.6). Vzorky byly uchovány ve sterilních zkumavkách při -80 °C. Celkově byly připraveny tři sady biologických opakování. Každá sada obsahovala tři technická opakování daných vzorků.

3.2.5 Měření viability buněk

K měření relativní viability byl použit test pomocí Alamar BlueTM (Thermo Fisher Scientific). Během reakce dochází vlivem redukčního prostředí metabolicky aktivní buňky k přeměně modrého resazurinu na růžový resorufin (Obrázek 7). K buňkám byl v příslušný den odběru přidán Alamar BlueTM ředěný s kompletním RPMI médiem v poměru 1:10. Buňky byly s Alamar BlueTM inkubovány dvě hodiny při 37 °C, v atmosféře s 5 % CO₂. Po dvou hodinách bylo z každé jamky odebráno v triplicátech 100 μ l a změřena fluorescence jednotlivých vzorků (vlnové délky excitace 550 nm, emise 590 nm) na Synergy H1 microplate reader (Biotek). Naměřená fluorescence jednotlivých infikovaných vzorků byla porovnána s NK pomocí Microsoft Office Excel 365, čímž byla určena relativní viabilita infikovaných buněk. Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu STATISTICA 12.



Obrázek 7: Reakce při průběhu Alamar BlueTM testu (vytvořeno v programu ChemSketch).

Jelikož bylo předpokládáno, že vyšší naměřená fluorescence odpovídá vyšší koncentraci buněk, čímž bude pravděpodobně vyizolováno i vyšší množství buněčné i virové RNA (viz data závislosti fluorescence na koncentraci buněk v Příloze 1), byly hodnoty relativní viability použity pro kalkulace vstupních množství vyizolované RNA zbavené genomové DNA do qRT-PCR reakce (kapitola 3.2.7).

3.2.6 Izolace RNA pomocí RNA Blue

K homogenizaci buněk byl použit 1 ml RNA Blue (Top-Bio). Homogenizované vzorky byly po rozmrazení inkubovány při pokojové teplotě 5 minut a následně bylo přidáno 200 μ l chloroformu (Lach-ner), vzorek byl silně protřepán a inkubován 5 min při pokojové teplotě. Poté byl vzorek centrifugován 10 minut při 12 000 x g a 4 °C. Po centrifugaci byl vzorek rozdělen na tři fáze: horní bezbarvou fázi, interfázi a modrou organickou fázi. RNA se nachází v horní bezbarvé vodné fázi, jež byla přenesena do nové zkumavky. K vodné fázi bylo přidáno 500 μ l isopropanolu (VWR) a vzorek byl umístěn nejméně na hodinu do mrazáku při -20 °C k vysrážení RNA. Poté byl vzorek centrifugován 30 minut při 12 000 x g a 4 °C. Supernatant byl odstraněn, ke vzorku byl přidán 1 ml 75% etanolu (Lach-ner) k promytí RNA a vzorek byl dále centrifugován 10 minut při 12000 x g a 4 °C. Supernatant byl odstraněn a RNA byla ponechána k vysušení. K rozpuštění RNA bylo použito 20 μ l ultračisté vody. Koncentrace RNA byla změřena na přístroji NanoPhotometr (Implen) a RNA byla uchována při -80 °C pro další použití.

3.2.7 Odstranění DNA ze vzorků

Vzorky RNA bylo nutné před provedením qRT-PCR zbavit případné kontaminující genomové DNA pomocí DNázy I (Thermo Fisher Scientific). Případná kontaminace vzorku by totiž mohla ovlivnit výsledky qRT-PCR reakce. Reakční směs jednotlivých vzorků obsahovala 1 μ l DNázy I (Thermo Fisher Scientific) a 1 μ l 10 x DNase Buffer s MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific). Dále bylo přidáno množství PCR vody a RNA v odpovídajícím objemu dle viability (výpočet viz. kapitola 4.3) do celkového objemu 10 μ l reakční směsi. Samotná reakce proběhla v cycleru GeneAmp[®] PCR System (Applied Biosystems) při programu 30 minut při 37 °C a 5 minut při 53 °C. Ke vzorkům bylo poté přidáno 90 μ l PCR vody, čímž byla RNA naředěna na vstupní množství do qRT-PCR reakce na 20 ng/ μ l pro NK a u ostatních vzorků v odpovídající množství dle viability. Vzorky byly poté skladovány při -80 °C pro qRT-PCR reakci.

3.2.8 qRT-PCR

K detekci virové RNA byla použita jednokroková qRT-PCR (Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) pomocí degenerovaných primerů a specifické próby (Achazi a kol., 2011). K reakci byl použit kit KAPA PROBE FAST One-Step Master mix (Kapa Biosystems), který umožňuje reverzní transkripci a qRT-PCR v jedné reakci. K amplifikaci virové RNA (části genu pro NS1 protein) byly použity dva primery, NS1 F (TGGAYTTYAGACAGGAAYCAACACA) a NS1 R (TCCAGAGACTYTGRTCDGTGTGGA). K detekci byla použita próba, která byla značena reportérovým fluoroforem FAM na 5' konci a nefluorescenčním zhášecem (quencher) MGB-NFQ (minor groove binder) na 3'konci (FAM-CCCATCACTCCWGTGTCAC-MGB-NFQ). Množství jednotlivých komponentů v 15 μ l reakci je uvedeno v Tabulce I.

Tabulka I: Složení reakční směsi pro 15 μ l qRT-PCR reakci.

<i>složka</i>	<i>objem [μl]</i>
2x Kapa master mix	7,5
qPCR H ₂ O	1,1
primer NS1 forward 20 μ M	0,9
primer NS1 reverse 20 μ M	0,9
próba 20 μ M	0,3
50x KAPA RT Mix	0,3
templátová RNA	4

Do 96-jamkových qPCR destiček bylo napipetováno 11 μ l mastermixu a byly přidány 4 μ l templátové RNA naředěné na vstupní koncentraci dle viability, vzhledem k zahrnutí faktoru možnosti vyizolování menšího množství virové RNA při snížené viabilitě buněk, a zbavené genomové RNA dle předchozí kapitoly. Všechny reakce byly provedeny v triplicátech. Pro negativní kontrolu qRT-PCR reakce byla použita PCR voda místo templátové RNA. Pro kontrolu efektivního zbavení se genomové DNA byla pro každý vzorek taktéž připravena reakce bez 50x KAPA RT Mix (tzv. NRT- kontrola), ve kterých tedy neproběhla reverzní transkripce vzorků. qRT-PCR byla provedena za pomoci cycleru CFX96 Touch Real-Time PCR System (Bio-Rad). Program byl nastaven na parametry uvedené v Tabulce II.

Tabulka II: Nastavené parametry qRT-PCR.

<i>krok</i>	<i>teplota</i>	<i>trvání</i>	<i>počet cyklů</i>
reverzní transkripce	42 ° C	10 min	
inaktivace enzymů	95 ° C	5 min	
denaturace	95 ° C	5 s	45
nasednutí primerů	60 ° C	34 s	45

Po skončení reakce byly odečteny hodnoty C_t (threshold cycle), které určují, v jakém cyklu fluorescence překročila detekční práh, pomocí CFX Maestro softwaru verze 2.0 (Bio-Rad). Exportovaná data byla následně vyhodnocena za pomoci Microsoft Office Excel 365 a statistické vyhodnocení bylo provedeno v programu STATISTICA 12.

3.2.9 Plaková titrace

Plaková titrace je metoda, která stanovuje koncentraci virových částic v jednotkách PFU/ml (plaque forming unit/ml) (Baer a Kehn-Hall, 2014). Do jamek 24-jamkového panelu bylo napipetováno 180 μ l kompletního DMEM média. Vzorky médií (20 μ l) odebrané v 24/48 hpi (kapitola 3.2.4) byly přidány do první jamky a naředěny v dalších jamkách desítkovou ředící řadou do maximálního ředění 10^6 . K takto připraveným vzorkům bylo přidáno 300 μ l buněčné suspenze A549 o koncentraci $5 \cdot 10^5$ buněk/ml a vzorky byly inkubovány 4 hodiny při 37 °C, v atmosféře s 5 % CO_2 . Po 4 hodinách bylo přidáno 400 μ l pokrývky skládající se z 3% roztoku karboxymetyl celulózy (Sigma-Aldrich) a 2x koncentrovaného DMEM média (2x DMEM médium + 20% BOFES + 2% ATB + 2% GLU) v poměru 1:1. Vzorky byly inkubované 5 dní při 37 °C, v atmosféře s 5 % CO_2 .

Po uplynutí doby byly vzorky promyty 0,9% roztokem NaCl a následně byly plaky vizualizovány barvením buněk 40 minut roztokem naftalenové černi (1 g naftalenové černi, 62,5 ml 100% ledové kyseliny octové, 13,6 g octanu sodného doplněné do 1 litru vody a následně přefiltrované). Po obarvení byly jamky promyty vodou, osušeny, následně byly spočítány plaky při konkrétním ředění a poté byla vypočítána koncentrace viru ve vzorcích. Data byla následně vyhodnocena pomocí programu Microsoft Office Excel 365 a statistické vyhodnocení bylo provedeno v programu STATISTICA 12.

4 Výsledky

Jak již je patrné z kapitoly Metody, nejprve bylo zapotřebí derivovat primární buňky z myší kostní dřeně a připravit infikované a kontrolní vzorky pro všechny následující experimenty, konkrétně tedy vzorky pro měření viability, pro izolaci RNA a pro plakovou titraci. Vždy byly pro derivaci použity obě stehenní a holenní kosti z 3 myších samců kmene C57Bl/6N. Po derivaci byly BMM nasazeny na pokus a infikovány dvěma kmeny TBEV Neudörfl (N) a Hypr (H) v koncentraci 5 MOI. Zároveň byla vytvořena negativní kontrola (NK) pro BMM. CD11c⁺ DC byly nejprve magneticky purifikovány a poté infikovány/ošetřeny (NK) stejným způsobem jako BMM.

Původním záměrem bylo nasazení buněk ve stejné koncentraci (tedy $2 \cdot 10^6$ buněk/jamku 6-jamkového panelu), ale vzhledem k nižší výtěžnosti CD11c⁺ DC po magnetické separaci, kdy z původní směsice DC bylo separováno pouze cca 5,3 % buněk jako CD11c⁺ DC, muselo dojít k úpravě koncentrace pro DC ($3,2 \cdot 10^5$ buněk/jamku 24-jamkového panelu), a tudíž i k vytvoření adekvátní pozitivní infikované kontroly (PK) a NK v podobě PMJ2-R buněčné linie ve stejné koncentraci. PK byly tedy po nasazení infikovány a NK ošetřeny jako primární buňky.

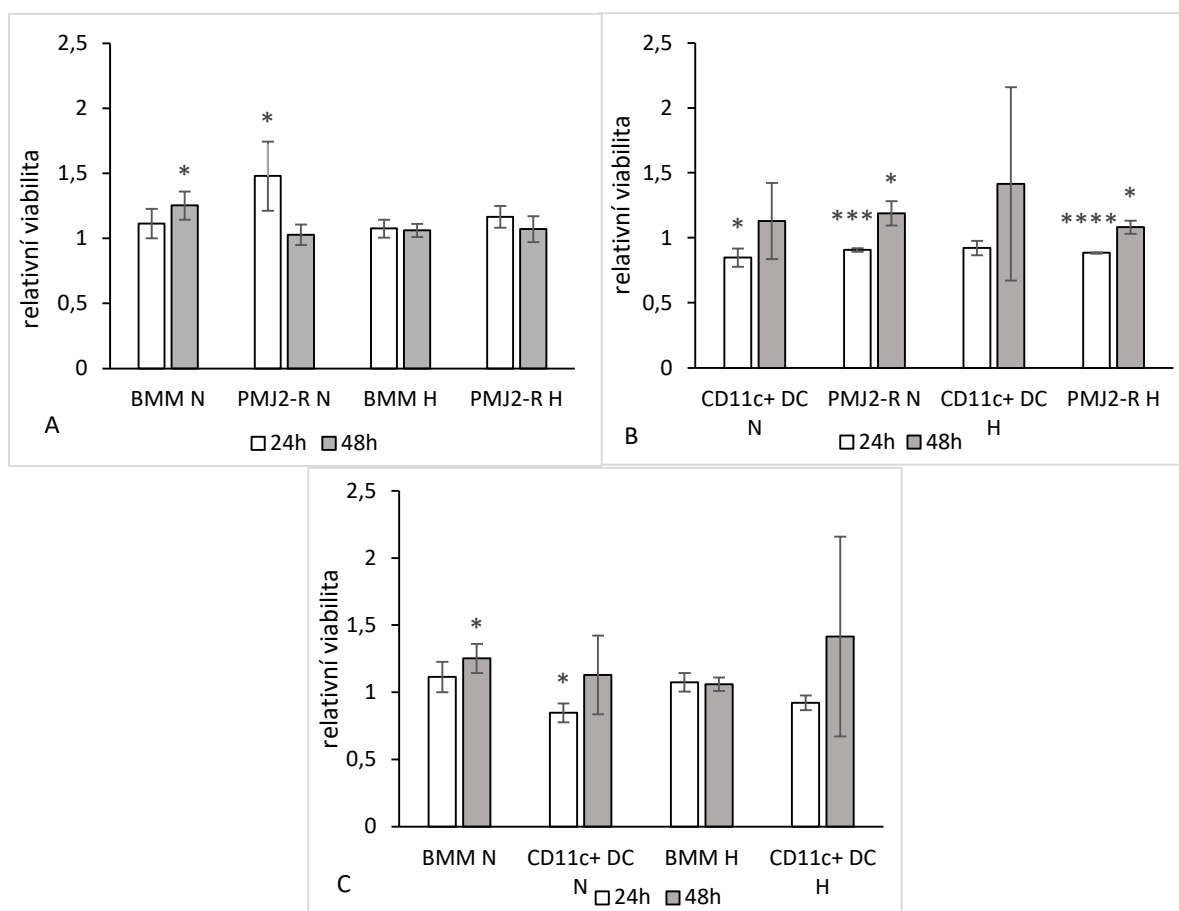
Celkem byly připraveny technické i biologické triplikáty pro každý kmen TBEV i NK, vždy tedy celkem 18 vzorků pro každý typ buněk (technické opakování). Celkem bylo připraveno 54 vzorků pro každý typ buněk při součtu technických i biologických opakování (BMM, CD11c⁺ DC, PMJ2-R pro BMM, PMJ2-R pro CD11c⁺ DC).

4.1 Vliv TBEV na přežívání buněk

Nejprve bylo potřebné zjistit, zda nejsou jednotlivé typy infikovaných buněk v daných intervalech výrazně ovlivněné infekcí, tedy jestli nedochází k jejich výraznému úbytku a snížení viability. Pokud by k výraznému úbytku oproti NK docházelo, mohly by být ovlivněny navazující experimenty, především izolace RNA a následná qRT-PCR. Z dřívějšího experimentu bylo totiž zjištěno, že s vzrůstajícím počtem buněk vzrůstá i hodnota naměřené fluorescence (viz. Příloha 1).

K měření relativní viability byl zvolen Alamar BlueTM test, při němž byla u jednotlivých vzorků změřena fluorescence produktu buněčného metabolismu. Naměřené hodnoty fluorescence ve vzorcích z intervalů 24 hpi a 48 hpi byly použity pro výpočet relativní

viability buněk. Od naměřených hodnot byl nejprve odečten nulový vzorek. Následně byly hodnoty u infikovaných vzorků porovnávány s negativní kontrolou, které odpovídá na Obrázku 8 hodnota relativní viability 1. Relativní viability byly vypočteny nejprve pro každý experiment zvlášť (viz. Příloha 2), a to vzhledem k potřebě výpočtu vstupního množství RNA pro další experimenty. Následně byly vytvořeny souhrnné grafy relativních viabilit jednotlivých buněk ze třech experimentů (Obrázek 8), aby byl patrný efekt jednotlivých kmenů TBEV na relativní viabilitu buněk. Hladiny signifikance výsledků byly vypočteny pomocí dvouvýběrového nepárového Studentova t-testu v programu STATISTICA 12.



Obrázek 8: Relativní viabilita buněk. A) Porovnání relativních viabilit BMM a PMJ2-R B) Porovnání relativních viabilit CD11c+ DC a příslušná PK (PMJ2-R), C) Porovnání relativních viabilit BMM a CD11c+ DC; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ hladina signifikance k NK, Studentův t-test.

Z Obrázku 8 je patrné, že u většiny BMM a CD11c+ DC nedocházelo ke statisticky významným rozdílům v relativní viabilitě oproti NK. Mezi výjimky patřily CD11c+ DC ve 24 hpi infikované kmenem Neudörfl, které vykazovaly signifikantně nižší relativní

viabilitu než NK, konkrétně hodnotu 0,85. Další výjimkou byly BMM ve 48 hpi infikované kmenem Neudörfl, u kterých se relativní viabilita oproti NK statisticky významně zvýšila, a to až na 1,25. Tento nárůst může být způsoben tím, že NK nemají potřebný stimul k tomu, aby zůstaly aktivní. PMJ2-R buňky nasazené jako PK k BMM vykazovaly jedinou signifikantní změnu oproti NK, a to v intervalu 24 hpi infikované kmenem Neudörfl, kdy se viabilita statisticky významně zvýšila. U PMJ2-R nasazených jako PK k CD11c+ DC se viabilita v čase 24 hpi signifikantně snížila oproti NK, zatímco ve 48 hpi se viabilita oproti NK statisticky významně zvýšila.

Při porovnání primárních buněk s PK nebyla detekována statisticky významná změna v relativní viabilitě u většiny vzorků. Jedinou výjimkou byly BMM infikované kmenem Neudörfl, které v čase 48 hpi vykazovaly statisticky průkazný nárůst relativní viability ($p < 0,04$) oproti kontrolní linii PMJ2-R (Obrázek 8A).

Pokud se zaměříme pouze na primární buňky, tak při porovnávání relativních viabilit CD11c+ DC s BMM (Obrázek 8C) ve 24 hpi docházelo k významnému rozdílu relativních viabilit. BMM infikované kmeny Neudörfl i Hypr měly signifikantně vyšší relativní viabilitu než CD11c+ DC, konkrétně $p < 0,03$ pro Neudörfl a $p < 0,04$ pro Hypr. Ve 48 hpi již nedocházelo k signifikantnímu zvýšení, ale ani snížení relativních viabilit. Pouze nepatrně vyšší relativní viabilitu ve 48 hpi prokazovaly CD11c+ DC, a to v průměru o 10,4 % vyšší než BMM.

Z výsledků je patrné, že na relativní viabilitu buněk nemá kmen viru, kterým jsou buňky infikovány, statisticky významný vliv. Nicméně je zřejmé, že u kontrolní linie PMJ2-R byla relativní viabilita vyšší u buněk infikovaných kmenem Neudörfl, a to průměrně o 9,6 % nežli u buněk infikovaných kmenem Hypr.

I přes zjištění, že z celkového pohledu viabilita infikovaných buněk v čase nemá letální průběh (hodnoty relativní viability neklesly pod 0,85), bylo rozhodnuto zohlednit i tyto nepatrné změny při určení vstupního množství RNA do reakce, jelikož mohlo při snížené viabilitě dojít k izolaci nižšího množství RNA, tedy i té virové, a výsledky qRT-PCR by byly ovlivněny tímto faktorem (kapitola 4.3).

4.2 Izolace RNA

Před dalšími kroky bylo nutné vyizolovat celkovou RNA z homogenizovaných buněk. RNA byla dle postupu vyizolována, byla změřena její koncentrace a také poměr absorbancí A_{260}/A_{230} a A_{260}/A_{280} . Vzhledem k velkému množství vzorků jsou v Tabulce III uvedeny pouze příklady koncentrací vyizolované RNA a také její čistota.

Tabulka III: Koncentrace vyizolované RNA a poměry absorbancí A_{260}/A_{230} a A_{260}/A_{280} .

<i>vzorek</i>	<i>c</i> [ng/μl]	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	<i>vzorek</i>	<i>c</i> [ng/μl]	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
BMM N	459	1,551	1,245	PMJ2-R N	1939	1,851	1,346
BMM N	519	1,474	0,859	PMJ2-R N	1839	1,887	1,549
BMM N	722	1,452	1,165	PMJ2-R N	1296	1,835	1,651
BMM H	714	1,414	0,952	PMJ2-R H	2292	1,695	1,654
BMM H	586	1,354	0,925	PMJ2-R H	1419	1,502	1,353
BMM H	986	1,456	1,256	PMJ2-R H	1798	1,666	0,896
BMM NK	682	1,562	1,365	PMJ2-R NK	1241	1,558	0,805
BMM NK	682	1,236	0,896	PMJ2-R NK	1122	1,486	1,244
BMM NK	577	1,486	0,923	PMJ2-R NK	1288	1,566	1,652
CD11c+ DC N	361	1,423	1,236	DC-PMJ2-R N	718	1,725	1,365
CD11c+ DC N	267	1,582	1,359	DC-PMJ2-R N	757	1,525	1,462
CD11c+ DC N	298	1,356	1,329	DC-PMJ2-R N	767	1,582	0,956
CD11c+ DC H	394	1,532	0,896	DC-PMJ2-R H	684	1,568	0,962
CD11c+ DC H	351	1,452	1,345	DC-PMJ2-R H	618	1,652	1,384
CD11c+ DC H	222	1,387	0,972	DC-PMJ2-R H	718	1,524	1,623
CD11c+ DC NK	276	1,458	1,136	DC-PMJ2-R NK	790	1,439	1,238
CD11c+ DC NK	306	1,528	1,239	DC-PMJ2-R NK	686	1,662	1,384
CD11c+ DC NK	504	1,357	0,876	DC-PMJ2-R NK	765	1,542	0,893

Z Tabulky III je patrné, že z buněk, které byly nasazeny ve vyšších koncentracích buněk na pokus, bylo vyizolováno více RNA. Čistota získané RNA není ideální, a proto bylo rozhodnuto, že než bude zhotovena qRT-PCR, budou z vyizolované RNA odstraněny zbytky genomové DNA.

4.3 Odstranění genomové DNA

Před qRT-PCR bylo nutné z RNA odstranit zbytky kontaminující genomové DNA. Nejdříve bylo potřeba spočítat ředění vzorků NK, které dle viability představují hodnotu 1, na koncentraci 2000 ng/10 μl reakce s DNázou I. U infikovaných vzorků byla provedena normalizace na NK dle příslušné viability. Předpokládalo se, že čím větší má infikovaný vzorek

viabilitu oproti NK, tím menší bude potřebné množství RNA. Vypočtené množství RNA pro NK do reakce tedy bylo vynásobeno viabilitou vzorků, čímž byl získán potřebný objem RNA do reakce pro infikované vzorky.

Po proběhnutí reakce s DNázou I bylo ke vzorkům přidáno 90 μ l PCR vody, čímž byla získána požadovaná vstupní koncentrace RNA pro qRT-PCR 20 ng/ μ l pro NK a ostatní vzorky měly vstupní koncentraci vztahenou na viabilitu. Příklady výpočtu potřebného množství pro odstranění genomové DNA jsou uvedeny v Tabulce IV.

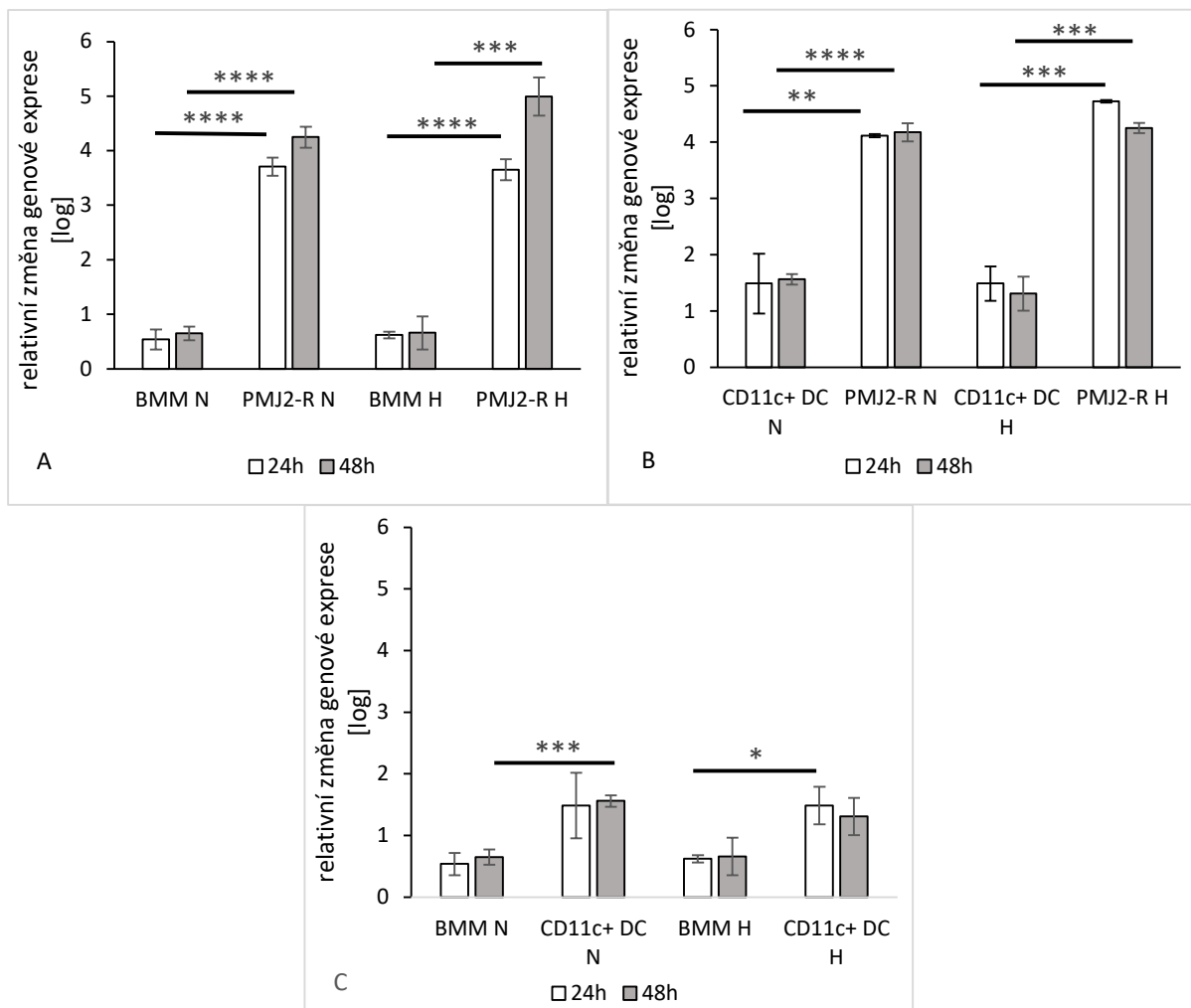
Tabulka IV. Příklady potřebných množství jednotlivých složek pro odstranění zbytkové genomové DNA.

<i>vzorek</i>	<i>RNA [ng/μl]</i>	<i>fluorescence [a.u.]</i>	<i>relativní viabilita</i>	<i>RNA [μl]</i>	<i>qPCR H₂O [μl]</i>	<i>DNáza I [μl]</i>	<i>Buffer [μl]</i>	<i>qPCR H₂O přidaná po reakci [μl]</i>
1.BMM H	714	39987	1,1	2,8	5,2	1	1	90
1.BMM NK	682	37578	1,0	2,9	5,1	1	1	90
1.CD11c+ DC N	408	18582	1,6	4,8	3,2	1	1	90
1.CD11c+ DC NK	306	13656	1,0	6,5	1,5	1	1	90

4.4 Stanovení virové RNA ve vzorcích

Pro detekci a kvantifikaci virové RNA v infikovaných buňkách byla použita metoda qRT-PCR. Z qRT-PCR byly získány hodnoty cyklu (C_t), ve kterém určitý vzorek překonal fluorescenční práh pozadí. Ze vzorků jsme určili hranici, za kterou se vzorek považoval negativní, tato hranice byla určena na 34. cyklus. Z takto získaných hodnot byl proveden ΔC_t výpočet. Při tomto výpočtu se hodnota pro virovou RNA vztahovala ke 34. cyklu tedy k hranici negativity. Pokus byl proveden v technických triplikátech, které byly zprůměrovány a zlogaritmovány, poté byly i biologické triplikáty zprůměrovány a výsledné hodnoty jsou

zobrazeny na Obrázku 9. Hladiny signifikance výsledků byly vypočteny pomocí dvouvýběrového nepárového Studentova t-testu v programu STATISTICA 12.



Obrázek 9: Relativní kvantifikace virové RNA. A) Porovnání množství virové RNA mezi BMM a PMJ2-R, B) Porovnání množství virové RNA mezi CD11c+ DC a jejich PK, C) Porovnání množství virové RNA mezi BMM a CD11c+ DC, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ hladina signifikance, Studentův t-test.

Z výsledků je patrné, že BMM (Obrázek 9A) a CD11c+ DC (Obrázek 9B) obsahují signifikantně méně virové RNA než kontrolní linie PMJ2-R. Pokud se zaměříme na CD11c+ DC v porovnání s PK, tak v obou časových intervalech a nezávisle na kmenu TBEV bylo u CD11c+ DC detekováno signifikantně nižší relativní množství virové genomové RNA. Největší rozdíl u CD11c+ DC byl pozorován ve 24 hpi u buněk infikovaných kmenem Hypr, konkrétně hodnota relativní kvantifikace byla 30,2 a u PK byla $5,2 \cdot 10^4$. U BMM také docházelo v obou intervalech a nezávisle na kmenu TBEV k signifikantnímu snížení množství

virové RNA, největší rozdíl byl pozorován ve 48 hpi u BMM infikovaných kmenem Hypr, kdy u BMM byla hodnota relativní kvantifikace 4,6 a u PK $9,8 \cdot 10^4$.

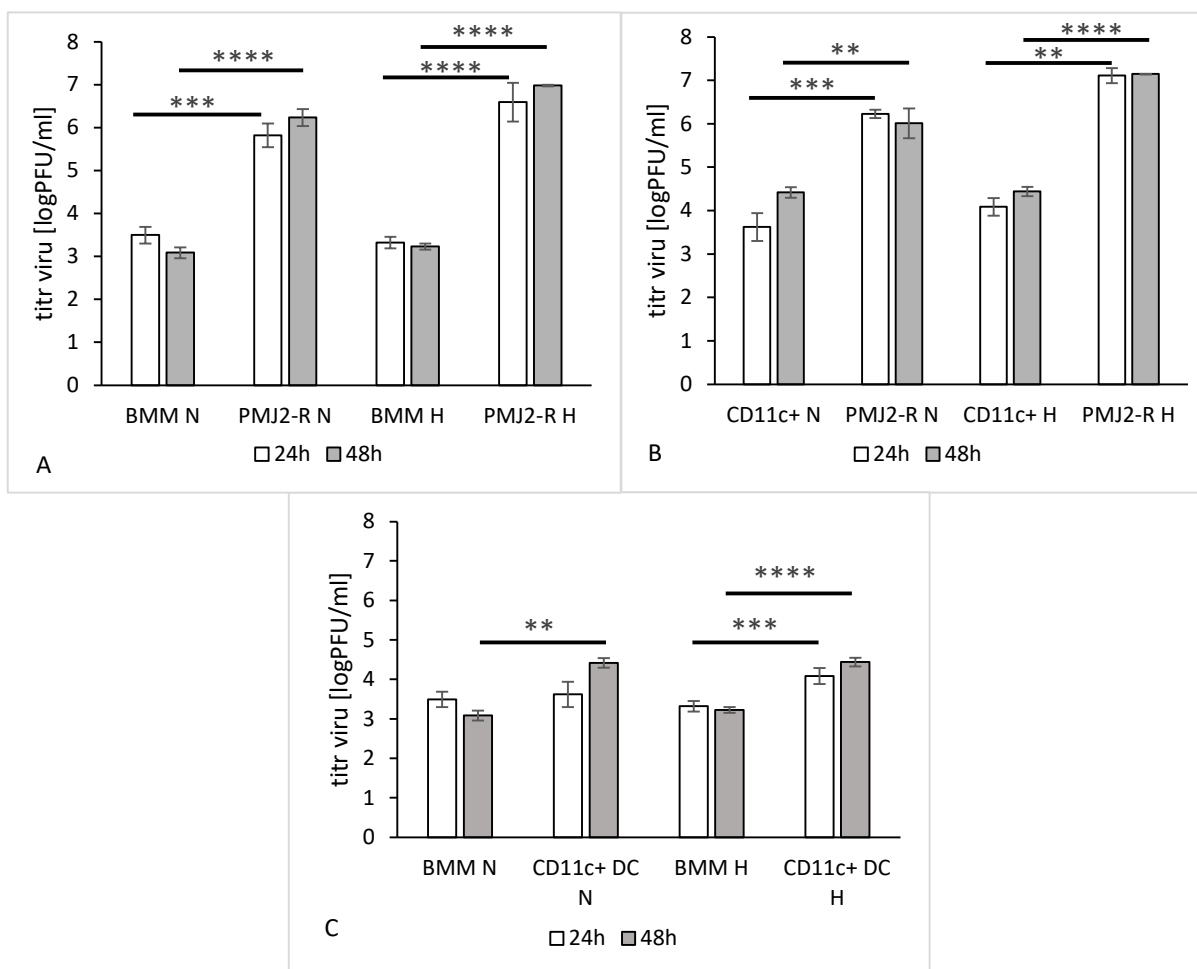
Při porovnávání BMM s CD11c+ DC (Obrázek 9C) je patrné, že v čase 24 hpi dochází k sedminásobnému signifikantnímu nárůstu relativního množství virové RNA u CD11c+ DC (v jednotkách logaritmu je rozdíl o 0,865) pokud jsou buňky infikované kmenem Hypr. K druhému signifikantnímu rozdílu dochází ve 48 hpi v případě, že jsou buňky infikované kmenem Neudörfl. U CD11c+ DC dochází k signifikantnímu nárůstu relativního množství virové RNA oproti BMM, a to více jak osminásobně.

Při dokazování vlivu časových intervalů na relativní změnu produkce virové RNA nebyl zjištěn žádný signifikantní nárůst ani pokles v čase až na jednu výjimku. U PK k BMM (Obrázek 9A) bylo pozorováno signifikantní navýšení relativního množství virové RNA v čase u buněk infikovaných oběma kmeny, konkrétně při kmenu Neudörfl (48 hpi) 3x vyšší relativní množství ($p < 0,05$) a 21x u kmene Hypr ($p < 0,01$).

Dále byl sledován rozdíl v produkci virové RNA v infikovaných BMM a DC mezi kmeny TBEV. Bylo zjištěno, že na relativní množství virové RNA nemá kmen TBEV statisticky významný vliv ve většině případů. Jediný případ, kdy docházelo k signifikantnímu nárůstu relativního množství virové RNA bylo u PK k CD11c+ DC 24 hpi. V tomto případě obsahovaly buňky infikované kmenem Hypr 4x vyšší relativní množství virové RNA ($p < 0,0001$) než buňky infikované kmenem Neudörfl.

4.5 Stanovení titru viru ve vzorcích

Hlavním úkolem bylo zjistit množství virionů uvolňovaných z buněk do média v jednotkách PFU/ml a porovnat mezi sebou vliv intervalů a typů buněk na velikost titru viru. Ve dvou časových intervalech 24 hpi a 48 hpi bylo odebráno médium z buněk, které bylo následně použito pro plakovou titraci. Počty plaků pro jednotlivé vzorky byly spočítány, hodnoty přepočítány na PFU/ml a výsledky zlogaritmovány. Pokus byl proveden v technických triplikátech, které byly zprůměrovány, poté byly i biologické triplikáty zprůměrovány a výsledné titry viru jsou zobrazeny na Obrázku 10. Hladiny signifikance výsledků byly vypočteny pomocí dvouvýběrového nepárového Studentova t-testu v programu STATISTICA 12.



Obrázek 10: Koncentrace virových částic v médiu. **A)** Titr viru pro BMM a PMJ2-R, **B)** Titr viru DC a PMJ2-R, **C)** Titr viru pro BMM a DC; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ hladina signifikance, Studentův t-test.

Z výsledků na Obrázku 10 je patrné, že v porovnání s PK (PMJ2-R) je titr viru u BMM a CD11c+ DC signifikantně nižší. U BMM (Obrázek 10A) dosahuje titr viru 200x nižších hodnot než PK při infekci kmenem Neudörfl ve 24 hpi a 1400x nižší titr ve 48 hpi. Co se týče kmenu Hypr a BMM, titry viru byly 1800x nižší ve 24 hpi a 5700x nižší ve 48 hpi než PK. Pokud se zaměříme na infekci kmenem Neudörfl, CD11c+ DC v intervalu 24 hpi (Obrázek 10B) mají více než 400x nižší titr viru než PK a v intervalu 48 hpi 38x nižší titr než PK. CD11c+ DC infikované kmenem Hypr dosahují v intervalu 24 hpi více než 600x nižší titr viru než PK a v intervalu 48 hpi 500x nižší.

U BMM a DC11c+ DC infikovaných kmeny Neudörfl a Hypr nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly ve titru viru v porovnání těchto kmenů TBEV. U kontrolní linie PMJ2-R je rozdíl v koncentraci titru viru mezi porovnávanými kmeny signifikantní v obou časových intervalech, kmen Hypr dosahuje v průměru 5x vyššího titru viru než Neudörfl.

Při zaměření na PK pro oba typy primárních buněk je patrné, že i přes rozdílnou koncentraci buněk, dosahují titry viru podobných hodnot. Tím pádem lze porovnat alespoň ilustrativně i titry viru BMM a CD11c+ DC. Z grafu (Obrázek 10C) je viditelné, že CD11c+ DC vyprodukovaly i přes nižší počet buněk více virionů než BMM. V porovnání BMM s CD11c+ DC infikovaných kmenem Neudörfl, nedocházelo v intervalu 24 hpi k signifikantnímu rozdílu v titru viru. Nicméně pokud byly buňky infikované kmenem Neudörfl, v čase 48 hpi již docházelo ke statisticky významnému zvýšení titru viru CD11c+ DC oproti BMM. V tomto případě byl určen titr viru pro CD11c+ DC $2,6 \cdot 10^4$ PFU/ml, zatímco u BMM to bylo $1,2 \cdot 10^3$ PFU/ml. Z toho vyplývá, že CD11c+ DC i přes 6,25x nižší koncentraci buněk vyprodukovaly více než 20x více PFU/ml. Pokud byly porovnávány CD11c+ DC a BMM infikované kmenem Hypr, v obou časových intervalech docházelo k signifikantnímu nárůstu titru viru u CD11c+ DC oproti BMM, a to konkrétně ve 24 hpi byl titr 5x vyšší a v časovém intervalu 48 hpi 16x vyšší.

Při dokazování vlivu časových intervalů na titr viru u primárních buněk bylo zjištěno, že dochází k významnému zvýšení titru viru ve 48 hpi oproti 24 hpi u CD11c+ DC ($p < 0,02$), ale naopak ke snížení u BMM ($p < 0,04$) infikovaných virovým kmenem Neudörfl. Největší rozdíl byl zjištěn u CD11c+ DC N, které vykazují nárůst titru viru v čase o $2,2 \cdot 10^4$ PFU/ml, tedy 5x vyšší. U CD11c+ DC a BMM infikovaných kmenem Hypr nedochází k signifikantnímu rozdílu v množství titru viru v časových intervalech.

5 Diskuze

Virus klíšťové encefalitidy patří do čeledi *Flaviviridae* a je řazen mezi arboviry, které jsou přenášeny klíšťaty rodu *Ixodes*. TBE je onemocnění, které může být způsobené třemi podtypy TBEV, a to středoevropským, dálnévýchodním a sibiřským podtypem. Podtypy se liší v aminokyselinových sekvencích, závažnosti onemocnění a také mírou mortality. V této práci byly použity dva kmeny evropského podtypu TBEV, méně virulentní kmen Neudörfl, který obsahuje dlouhý polyadenylový řetězec v nekódující oblasti, a více virulentní kmen Hypr, kterému značná část polyadenylového řetězce chybí (Wallner a kol., 1995). TBEV se do těla dostává se slinami sajícího klíštěte, a tedy mezi první buňky, které se setkají s TBEV, řadíme buňky přítomné v kůži, včetně buněk imunitních (Labuda a kol., 1996).

Tato práce byla zaměřená na časnou fázi infekce TBEV v organismu a množení TBEV po proniknutí do organismu, a proto byly vybrány dva typy imunitních buněk přítomných v kůži, konkrétně makrofágy a CD11c+ dendritické buňky, které jsou považovány za první cíle pro replikaci TBEV v těle (Haglund a Günther, 2003; Dörrbecker a kol., 2010). BMM a CD 11c+ DC byly získány derivací z kostní dřeně pomocí specifických růstových faktorů s mírnými modifikacemi oproti zavedeným protokolům (Lieskovská a kol., 2015; Assouvie a kol., 2018). Jako pozitivní kontrolní linie byla zvolena makrofágová linie PMJ2-R, která je *in vivo* imortalizována J2 retrovirem nesoucí v-raf a v-myc onkogeny (Adami a kol., 1993). PMJ2-R slouží jako kontrolní linie i v jiných publikacích, a to nejen k infekci TBEV, ale i infekci jinými patogeny (Jelinek a kol., 2007; Beránková, 2017).

Během první fáze bylo důležité zjistit, zda nejsou jednotlivé typy infikovaných buněk výrazně ovlivněny infekcí TBEV, přesněji jestli nedochází k výraznému úbytku buněk a snížení jejich metabolické aktivity. K tomuto ověření byl použit test pomocí AlamarBlueTM reagensie s následným výpočtem relativní viability. Principem testu je přeměna modrého resazurinu na růžový rezorufin a detekce jeho fluorescence. Tato metoda je hojně využívána nejen pro detekci viability infikovaných buněk, ale také k detekci cytotoxických efektů potenciálních antivirových látek či hostitelských peptidů pro buňky (Selinger a kol., 2019; Pulanco a kol., 2017; Smea a kol., 2017). Buňky byly infikovány TBEV v koncentraci 5 MOI, a po 24 hpi a 48 hpi byla změřena fluorescence vzorků, jež byla porovnána s fluorescencí NK, čímž byla detekována jejich relativní viabilita. V porovnání buněk s NK bylo zjištěno, že primární buňky nejsou letálně ovlivněny infekcí TBEV (viabilita neklesla pod 85 %), a to u obou zvolených kmenů. Viabilita však byla oproti NK lehce snížena ve 24 hpi u CD11c+

DC, zatímco u BMM nikdy nebyla oproti NK snížena. Tyto výsledky potvrzuje i publikace, v níž byl zkoumán vlivu viru Usutu, který patří také do čeledi *Flaviviridae*, na viabilitu DC. Podobně jako při námi zvolené infekci TBEV byla relativní viabilita DC infikovaných virem Usutu signifikantně snížena v intervalu 24 hpi (García-Nicolás a kol., 2019). V jiné publikaci, zabývající se viabilitou BMM, při infekci viru západonilské horečky taktéž nedocházelo ke snížení viability a efektu viru na BMM, stejně jako v našem případě (Pantelic a kol., 2005). Pokud porovnáme výsledky relativních viabilit primárních buněk mezi sebou, dojdeme k závěru, že infikované BMM měly v intervalu 24 hpi oproti CD11c+ DC signifikantně vyšší relativní viabilitu. Tento výsledek nasvědčuje tomu, že CD11c+ DC jsou podle všeho permissivnější k infekci TBEV a pravděpodobně některé buňky provedou apoptózu, podobně jako bylo dokázáno v jiných publikacích, ale taktéž byl tento fakt potvrzen i vyšší mírou produkce virionů v této práci (Olagnier a kol., 2014; Ho a kol., 2001).

Při zaměření na vliv kmenů evropského podtypu TBEV Neudörfl a Hypr na viabilitu buněk bylo zjištěno, že virový kmen Hypr způsobuje u kontrolní buněčné linie PMJ2R nižší relativní viabilitu buněk než kmen Neudörfl. Toto zjištění se shoduje s publikací zaměřenou na DC, kdy se zkoumal vliv kmenů Neudörfl a Hypr na apoptózu DC. Bylo zjištěno, že kmen Hypr výrazně více indukoval apoptózu než Neudörfl (Fialová a kol., 2010). Kmen Hypr je považován za vysoce virulentní (Wallner a kol., 1995), a proto tyto výsledky odpovídají pozorováním u dálněvýchodního subtypu, kdy vysoce patogenní kmen Dal'negorsk rychleji penetroval do buněk a aktivně se uvnitř množil, tudíž probíhala zvýšená apoptóza, v porovnání s nepatogenním kmenem Primorye-183, podobně jako u méně virulentního kmene Neudörfl (Krylova a kol., 2015).

Ke stanovení virové RNA byla použita metoda qRT-PCR. Z výsledků byla provedena relativní kvantifikace virové RNA tak, že byl proveden ΔC_t výpočet. Tento výpočet vztahuje hodnotu fluorescence virové RNA k hranici negativity, která byla určena na 34. cyklus. K amplifikaci byly použity NS1 R a NS1F primery a k detekci byla použita próba značená na 5' konci fluoroforem FAM a nefluorescenčním zhášecem MGB-NFQ na 3' konci (Achazi a kol., 2011).

Pomocí qRT-PCR bylo zjištěno, že PMJ2-R, které slouží jako PK k primárním buňkám, měli signifikantně vyšší relativní kvantifikaci než BMM a CD11c+ DC. Toto zjištění se shoduje s pozorováním, že kontrolní linie PMJ2-R obsahuje až 98,7 % infikovaných buněk, zatímco BMM obsahují pouze 1,7 % (Beránková, 2017).

Při porovnávání relativního množství virové RNA mezi infikovanými CD11c+ DC a BMM bylo zjištěno, že CD11c+ DC dosahují vyššího množství virové RNA než BMM v obou časových intervalech a nehledě na kmen TBEV, kterým byly primární buňky infikovány. Ve dvou případech CD11c+ DC obsahovaly signifikantně více relativního množství virové RNA než BMM, a to ve 24 hpi pokud buňky byly infikovány kmenem Hypr a ve 48 hpi v případě, že byly infikovány kmenem Neudörfl. Toto zjištění se shoduje s článkem, ve kterém se zkoumal vliv viru horečky Dengue na makrofágy a DC, kde bylo zjištěno, že makrofágy jsou méně proinfikované než DC (Schaeffer a kol., 2015).

Při pozorování závislosti relativního množství virové RNA na kmenu TBEV, kterým byly primární buňky infikované, nebyl zjištěn signifikantní pokles a ani nárůst relativního množství virové RNA. Zatímco u PMJ2-R které sloužily jako PK k BMM byl zjištěn signifikantní nárůst relativní kvantifikace u buněk infikovaných kmenem Hypr oproti kmenu Neudörfl v obou časových intervalech. Tato zjištění můžeme porovnat s článkem, ve kterém byl porovnáván vliv kmene viru Neudörfl a Hypr na procentuální zastoupení infikovaných DC. V tomto článku byl zjištěn rozdíl mezi kmeny TBEV, a to takový, že DC infikované kmenem Hypr dosahovaly vyšší proinfikovanosti než při použití kmenu Neudörfl (Fialová a kol., 2010). I přes to, že se v naší práci vliv kmene viru u primárních buněk neprokázal, u PMJ2-R které sloužily jako PK k BMM se výsledek shodoval s porovnávaným článkem.

Nakonec byl stanoven titr viru ve vzorcích pomocí plakové titrace na A549 buňkách (Baer a Kehn-Hall, 2014). Bylo zjištěno, že buněčná linie A549 je vhodná pro plakovou titraci TBEV (Brzuska a kol., 2020). Plaková titrace umožňuje detekovat množství virionů, které se uvolňují z buněk do média. Pokud se zaměříme na porovnání primárních buněk a kontrolní linie PMJ2-R, ve všech intervalech a bez ohledu na kmen viru měla PK signifikantně vyšší titr viru než primární buňky. Tento výsledek koreluje s předchozím výsledkem, že i PK dosahuje vyššího relativního množství virové RNA než primární buňky, z čehož vyplývá, že buněčná linie PMJ2-R je výrazně permissivnější k infekci TBEV oproti primárním buňkám. Toto zjištění se shoduje s již výše zmíněnou diplomovou prací, ve které byl detekován podobný titr viru u PMJ2-R i BMM jako v této bakalářské práci. U BMM se titr viru pohyboval ve 24 hpi okolo 10^3 PFU/ml a 10^4 PFU/ml ve 48 hpi. Stejně tak u PMJ2-R titr viru dosahoval signifikantně vyšších hodnot ve 24 hpi, a to cca 10^6 PFU/ml, a cca 10^7 PFU/ml ve 48 hpi (Beránková, 2017).

Vhledem ke zjištění, že PMJ2-R pro BMM a PMJ2-R pro CD11c+ DC i přes rozdílné vstupní množství buněk dosahovaly podobných virových titrů, mohly být BMM i CD11c+ DC mezi sebou alespoň ilustrativně porovnány. Při porovnávání virových titrů mezi primárními buňkami nedocházelo k signifikantnímu rozdílu titru viru v porovnání BMM a CD11c+ DC, které byly infikované kmenem Neudörfl ve 24 hpi. V ostatních případech byl zaznamenán signifikantně vyšší titr viru u CD11c+ DC. V jiné publikaci při pozorování míry proinfikovanosti DC a jejich titru viru, bylo u viru horečky Dengue zjištěno, že vyšší titr odpovídá vyšší proinfikovanosti buněk (Schaeffer a kol., 2015). Z tohoto faktu může být z našich výsledků usouzeno, že CD11c+ DC byly více proinfikované než BMM, jelikož dosahovali vyššího titru viru i přes nižší množství nasazených buněk.

Při porovnávání titru viru u PK docházelo k významnému rozdílu mezi množstvím uvolňovaných virionů do média z buněk mezi jednotlivými kmeny TBEV. Vysoce virulentní kmen Hypr měl signifikantně vyšší titr viru než Neudörfl v obou časových intervalech. Toto zjištění může být porovnáno s jinými viry z čeledi *Flaviviridae*, u kterých se porovnávalo množství titru viru s náchylností DC k infekci. Vysoká virulence byla zjištěna u viru Usutu, který také vykazoval vysoké titry viru, zatímco virus horečky Dengue vykazoval nízkou citlivost buněk k infekci a také nízké titry viru. Z tohoto zjištění můžeme odvodit, že čím vyšší míra citlivosti buněk k infekci tím vyšší titry viru (García-Nicolás a kol. 2019). Toto tvrzení koresponduje s naším zjištěním, že více virulentní kmen TBEV Hypr dosahuje vyšších titrů viru.

Pokud byly porovnávány dva časové intervaly 24 hpi a 48 hpi a jejich vliv na množství titru viru, bylo zjištěno, že pokud jsou BMM infikovány kmenem Neudörfl, titr viru se ve 48 hpi snížil oproti 24 hpi. S tímto zjištěním nekoreluje článek, ve kterém se pozoroval vliv viru západonilské horečky na titr viru, který se s přibývajícím časem od infekce zvyšoval (Rios a kol., 2006). Pozorované snížení titru viru u BMM může být způsobeno tím, že makrofágy bojují s virem nejprve svépomocí, a to takovým způsobem, že vytváří tzv. „phagosome-like“ vezikuly (Plekhova a kol., 2017). Naopak CD11c+ DC infikované kmenem Neudörfl vykazovaly ve 48 hpi vyšší titr viru než ve 24 hpi. Pokud byly primární buňky infikovány kmenem Hypr, tak se titr viru signifikantně v čase nelišil. Toto zjištění koreluje s článkem, ve kterém byl zkoumán vliv kmene Hypr na DC, v tomto případě se titr viru v čase také výrazně neměnil (Lieskovská a kol., 2018).

6 Závěr

- Nebyl prokázán letální vliv infekce TBEV na viabilitu primárních makrofágů a CD11c+ dendritických buněk, u CD11c+ DC byl prokázán pouze mírný pokles viability oproti BMM.
- U PK byl prokázán efekt více virulentního kmene TBEV (Hypr), a to snížením relativní viability buněk oproti buňkám infikovaným kmenem Neudörfl.
- U PMJ2-R, které sloužily jako PK k BMM, byl zjištěn rozdíl v relativní kvantifikaci virové RNA mezi buňkami infikovanými kmeny Neudörfl a Hypr. Buňky infikované kmenem Hypr dosahovaly vyšší relativní kvantifikace virové RNA než buňky infikované kmenem Neudörfl.
- CD11c+ DC dosahovaly signifikantně vyšší relativní změny genové exprese TBEV oproti BMM.
- PK dosahovala vyššího titru viru než primární buňky nezávisle na intervalu a kmenu TBEV, kterým byly buňky infikovány.
- Infikované CD11c+ DC v porovnání s BMM dosahovaly vyššího titru viru.
- Bylo dokázáno, že CD11c+ DC jsou více permissivní k infekci TBEV, a tím jsou i vhodnějším *in vitro* modelem pro infekci TBEV než BMM.

7 Použitá literatura

ACHAZI, K., A.NITSCHKE, P. PATEL, A. RADONIĆ, O. DONOSO MANTKE a M. NIEDRIG, 2011. Detection and differentiation of tick-borne encephalitis virus subtypes by a reverse transcription quantitative real-time PCR and pyrosequencing. *Journal of Virological Methods* [online]. **171**(1). ISSN 01660934. Dostupné z: doi:10.1016/j.jviromet.2010.09.026

ADAMI, C., M. J. BRUNDA a A. V. PALLERONI, 1993. *In vivo* immortalization of murine peritoneal macrophages: a new rapid and efficient method for obtaining macrophage cell lines. *Journal of Leukocyte Biology* [online]. **53**(4). ISSN 07415400. Dostupné z: doi:10.1002/jlb.53.4.475

ALLISON, S. L. J. SCHALICH, K. STIASNY, C. W. MANDL, C. KUNZ a F. X. HEINZ, 1995. Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH. *Journal of virology* [online]. **69**(2). ISSN 0022-538X. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.69.2.695-700.1995

ALONSO-PALOMARES, L. A., M. MORENO-GARCÍA, H. LANZ-MENDOZA a M. I. SALAZAR, 2019. Molecular basis for arbovirus transmission by *Aedes aegypti* mosquito. *Intervirology* [online]. 2019. ISSN 14230100. Dostupné z: doi:10.1159/000499128

ARANGO DUQUE, G. a A. DESCOTEAUX, 2014. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Frontiers in Immunology* [online]. **5**. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2014.00491

ASGHAR, N., Y. P. LEE, E. NILSSON, R. LINDQVIST, W. MELIK, A. KRÖGER, A. K. ÖVERBY a M. JOHANSSON, 2016. The role of the poly(A) tract in the replication and virulence of tick-borne encephalitis virus. *Scientific Reports* [online]. **6**. ISSN 20452322. Dostupné z: doi:10.1038/srep39265

ASSOUVIE A., DALEY-BAUER L. P. a ROUSSELET G., 2018. Growing murine bone marrow-derived macrophages. *Germain ROUSSELET* [online]. New York, NY: Springer New York. ISBN 978-1-4939-7836-6. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-7837-3

BAER, A. a K. KEHN-HALL, 2014. Viral concentration determination through plaque

assays: using traditional and novel overlay systems. *Journal of Visualized Experiments* [online]. (93). ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:10.3791/52065

BARROWS, N. J., R. K. CAMPOS, K. C. LIAO, K. R. PRASANTH, R. SOTO-ACOSTA, S. C. YEH, G. SCHOTT-LERNER, J. POMPON, O. M. SESSIONS, S. S. BRADRICK a M. A. GARCIA-BLANCO, 2018. Biochemistry and molecular biology of flaviviruses. *Chemical Reviews* [online]. **118**(8). ISSN 15206890. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrev.7b00719

BERÁNKOVÁ, Z., 2017. Vliv klíčících slin na replikaci viru klíšťové encefalidity v myších makrofázích. Úloha interferonu- β a oxidu dusnatého. Faculty of Science, University of South Bohemia.

BLITVICH, B. J. a A. E. FIRTH, 2017. A review of flaviviruses that have no known arthropod vector. *Viruses* [online]. 2017. ISSN 19994915. Dostupné z: doi:10.3390/v9060154

BOGOVIC, P., 2015. Tick-borne encephalitis: A review of epidemiology, clinical characteristics, and management. *World Journal of Clinical Cases* [online]. **3**(5). ISSN 2307-8960. Dostupné z: doi:10.12998/wjcc.v3.i5.430

BRZUSKA, G., G. PASTUCH-GAWOLEK, M. KRAWCZYK, B. SZEWCZYK a E. KROL, 2020. Anti-tick-borne encephalitis virus activity of novel uridine glycoconjugates containing amide or/and 1,2,3-triazole moiety in the linker structure. *Pharmaceuticals* [online]. **13**(12). ISSN 1424-8247. Dostupné z: doi:10.3390/ph13120460

CHANMEE, T., P. ONTONG, K. KONNO a N. ITANO, 2014. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers* [online]. **6**(3). ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers6031670

COLLIN, M., N. MCGOVERN a M. HANIFFA, 2013. Human dendritic cell subsets. *Immunology* [online]. **140**(1). ISSN 0019-2805. Dostupné z: doi:10.1111/imm.12117

BALTIMORE, D., 1971. Expression of animal virus genomes. *Bacteriological Reviews*. 235–241.

DAI, H., A. W. THOMSON a N. M. ROGERS, 2019. Dendritic cells as sensors, mediators, and regulators of ischemic injury. *Frontiers in Immunology* [online]. **10**. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2019.02418

DANIELOVA, V., J.HOLUBOVA, M. PEJCOCH a M. DANIEL, 2002. Potential

significance of transovarial transmission in the circulation of tick-borne encephalitis virus. *Folia Parasitologica* [online]. **49**(4). ISSN 00155683. Dostupné z: doi:10.14411/fp.2002.060

DAVIES, L. C. a P. R. TAYLOR, 2015. Tissue-resident macrophages: then and now. *Immunology* [online]. **144**(4). ISSN 13652567. Dostupné z: doi:10.1111/imm.12451

DAVIES, L. C., S. J. JENKINS, J. E. ALLEN a P. R. TAYLOR, 2013. Tissue-resident macrophages. *Nature Immunology* [online]. **14**(10). ISSN 1529-2908. Dostupné z: doi:10.1038/ni.2705

DE GRAAF, J. A., J. H. J. REIMERINK, G. P. VOORN, E. A. BIJ DE VAATE, A. DE VRIES, B. ROCKX, A. SCHUITEMAKER a V. HIRA, 2016. First human case of tick-borne encephalitis virus infection acquired in the Netherlands, July 2016. *Eurosurveillance* [online]. **21**(33). ISSN 1560-7917. Dostupné z: doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.33.30318

DE LA FUENTE, J., S. ANTUNES, S. BONNET, A. CABEZAS-CRUZ, A. G. DOMINGOS, A. ESTRADA-PEÑA, N. JOHNSON, K. M. KOCAN, K. L. MANSFIELD, A. M. NIJHOF, A. PAPA, N. RUDENKO, M. VILLAR, P. ALBERDI, A. TORINA, N. AYLLÓN, M. VANCOVA, M. GOLOVCHENKO, L. GRUBHOFFER, S. CARACAPPA, A. R. FOOKS, C. GORTAZAR a R. O.M. REGO, 2017. Tick-Pathogen interactions and vector competence: identification of molecular drivers for Tick-Borne diseases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. 2017. ISSN 22352988. Dostupné z: doi:10.3389/fcimb.2017.00114

DOMNICH, A., D. PANATTO, E. KLEMENTIEVNA ARBUZOVA, A. SIGNORI, U. AVIO, R. GASPARINI a D. AMICIZIA, 2014. Immunogenicity against Far Eastern and Siberian subtypes of tick-borne encephalitis (TBE) virus elicited by the currently available vaccines based on the European subtype: systematic review and meta-analysis. *Human Vaccines and Immunotherapeutics* [online]. **10**(10). ISSN 2164554X. Dostupné z: doi:10.4161/hv.29984

DÖRRBECKER, B., G. DOBLER, M. SPIEGEL a F. T. HUFERT, 2010. Tick-borne encephalitis virus and the immune response of the mammalian host. *Travel Medicine and Infectious Disease* [online]. **8**(4). ISSN 14778939. Dostupné z: doi:10.1016/j.tmaid.2010.05.010

DZIOŃEK, A., A. FUCHS, P. SCHMIDT, S. CREMER, M. ZYSK, S. MILTENYI, D. W. BUCK a J. SCHMITZ, 2000. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: Three markers for

distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *The Journal of Immunology* [online]. **165**(11). ISSN 0022-1767. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.165.11.6037

FIALOVÁ, A., Z.CIMBUREK, G. IEZZI aj. KOPECKÝ, 2010. *Ixodes ricinus* tick saliva modulates tick-borne encephalitis virus infection of dendritic cells. *Microbes and Infection* [online]. **12**(7). ISSN 12864579. Dostupné z: doi:10.1016/j.micinf.2010.03.015

FOSTER, K. A., C. G. OSTER, M. M. MAYER, M. L. AVERY a K. L. AUDUS, 1998. Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. *Experimental Cell Research* [online]. **243**(2). ISSN 00144827. Dostupné z: doi:10.1006/excr.1998.4172

FUNES, S. C., M. RIOS, J. ESCOBAR-VERA a A. M. KALERGIS, 2018. Implications of macrophage polarization in autoimmunity. *Immunology* [online]. **154**(2). ISSN 00192805. Dostupné z: doi:10.1111/imm.12910

GARCÍA-NICOLÁS, O., M. LEWANDOWSKA, M. E. RICKLIN a A. SUMMERFIELD, 2019. Monocyte-derived dendritic cells as model to evaluate species tropism of mosquito-borne flaviviruses. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. **9**. ISSN 2235-2988. Dostupné z: doi:10.3389/fcimb.2019.00005

GEISSMANN, F., M. G. MANZ, S. JUNG, M. H. SIEWEKE, M. MERAD a K. LEY, 2010. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* [online]. **327**(5966). ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1178331

GO, Y. Y., U. B. R. BALASURIYA a C. LEE, 2014. Zoonotic encephalitides caused by arboviruses: transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses. *Clinical and Experimental Vaccine Research* [online]. **3**(1). ISSN 2287-3651. Dostupné z: doi:10.7774/cevr.2014.3.1.58

GORDON, S., 2008. Elie Metchnikoff: father of natural immunity. *European Journal of Immunology* [online]. **38**(12). ISSN 00142980. Dostupné z: doi:10.1002/eji.200838855

GORDON, S. a F. O. MARTINEZ, 2010. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* [online]. **32**(5). ISSN 10747613. Dostupné z: doi:10.1016/j.immuni.2010.05.007

GRITSUN, T. S., T. V. FROLOVA, A. I. ZHANKOV, M. ARMESTO, S. L. TURNER, M. P. FROLOVA, V. V. POGODINA, V. A. LASHKEVICH a E. A. GOULD,

2003a. Characterization of a Siberian virus isolated from a patient with progressive chronic tick-borne encephalitis. *Journal of Virology* [online]. **77**(1). ISSN 0022-538X. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.77.1.25-36.2003

GRITSUN, T. S. , V. A. LASHKEVICH a E. A. GOULD, 2003b. Tick-borne encephalitis. *Antiviral Research* [online]. **57**(1–2). ISSN 01663542. Dostupné z: doi:10.1016/S0166-3542(02)00206-1

HAGLUND, M. a G. GÜNTHER, 2003. Tick-borne encephalitis—pathogenesis, clinical course and long-term follow-up. *Vaccine* [online]. **21**. ISSN 0264410X. Dostupné z: doi:10.1016/S0264-410X(02)00811-3

HO, L.-J., J.-J. WANG, M.-F. SHAI, C.-L. KAO, D.-M. CHANG, S.-W. HAN a J.-H. LAI, 2001. Infection of human dendritic cells by dengue virus causes cell maturation and cytokine production. *The Journal of Immunology* [online]. **166**(3). ISSN 0022-1767. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.166.3.1499

HOLBROOK, M., 2017. Historical perspectives on Flavivirus research. *Viruses* [online]. **9**(5). ISSN 1999-4915. Dostupné z: doi:10.3390/v9050097

HOŘEJŠÍ V., 2015. Makrofágy jako pomocníci nádorů. *Vesmír*.

HUBÁLEK, Z., I. RUDOLF a N. NOWOTNY, 2014. Arboviruses pathogenic for domestic and wild animals. *Advances in Virus Research Volume* [online]. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-800172-1.00005-7

HUBER, C. a G. STINGL, 1981. Macrophages in the regulation of immunity. *Haematology and Blood Transfusion* [online]. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-81696-3_4

JELINEK, J., J. SALAT, B. SAK a J. KOPECKY, 2007. Effects of interferon gamma and specific polyclonal antibody on the infection of murine peritoneal macrophages and murine macrophage cell line PMJ2-R with Encephalitozoon cuniculi. *Folia Parasitologica* [online]. **54**(3). ISSN 00155683. Dostupné z: doi:10.14411/fp.2007.024

JONES, L., C. DAVIES, G. STEELE a P. NUTTALL, 1987. A novel mode of arbovirus transmission involving a nonviremic host. *Science* [online]. **237**(4816). ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.3616608

KRYLOVA, N. V., T. P. SMOLINA a G. N. LEONOVA, 2015. Molecular mechanisms of interaction between human immune cells and far eastern tick-borne

encephalitis virus strains. *Viral Immunology* [online]. **28**(5). ISSN 0882-8245. Dostupné z: doi:10.1089/vim.2014.0083

KUNZ, C., 2003. TBE vaccination and the Austrian experience. *Vaccine* [online]. **21**. ISSN 0264410X. Dostupné z: doi:10.1016/S0264-410X(02)00813-7

KUSHWAH, R. a J. HU, 2011. Complexity of dendritic cell subsets and their function in the host immune system. *Immunology* [online]. **133**(4). ISSN 00192805. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2567.2011.03457.x

LABUDA, M., J. M. AUSTYN, E. ZUFFOVA, O. KOZUCH, N. FUCHSBERGER, J. LYSY a P. A. NUTTALL, 1996. Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission. *Virology* [online]. **219**(2). ISSN 00426822. Dostupné z: doi:10.1006/viro.1996.0261

LABUDA, M., O. KOZUCH, E. ZUFFOVÁ, E. ELECKOVÁ, R. S. HAILS a P. A. NUTTALL, 1997. Tick-borne encephalitis virus transmission between ticks cofeeding on specific immune natural rodent hosts. *Virology* [online]. **235**(1). ISSN 00426822. Dostupné z: doi:10.1006/viro.1997.8622

LEE, J., G. BRETON, T. Y. K. OLIVEIRA, Y. J. ZHOU, A. ALJOUFI, S. PUHR, M. J. CAMERON, R.-P. SÉKALY, M. C. NUSSENZWEIG a K. LIU, 2015. Restricted dendritic cell and monocyte progenitors in human cord blood and bone marrow. *Journal of Experimental Medicine* [online]. **212**(3). ISSN 1540-9538. Dostupné z: doi:10.1084/jem.20141442

LEONOVA, G. N., Tickborne encephalitis in Primorsky district. Vladivostok: Dalnauka, 1997.

LEONOVA, G. N. , V. G. BORISEVICH a G. F. GAGACH. A way of express diagnostics of tick-borne encephalitis. Patent No. 2217758 C2, Russian Federation, 2003.

LEWIS, D. B., 2004. Host defense mechanisms against viruses. In: *Fetal and Neonatal Physiology* [online]. B.m.: Elsevier. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-7216-9654-6.50156-9

LIESKOVSKÁ, J., J. PÁLENÍKOVÁ, J. ŠIRMAROVÁ, J. ELSTEROVÁ, M. KOTSYFAKIS, A. CAMPOS CHAGAS, E. CALVO, D. RŮŽEK a J. KOPECKÝ, 2015. Tick salivary cystatin sialostatin L2 suppresses IFN responses in mouse dendritic cells. *Parasite*

Immunology [online]. **37**(2). ISSN 01419838. Dostupné z: doi:10.1111/pim.12162

LIESKOVSKÁ, J., J. PÁLENÍKOVÁ, H. LANGHANSOVÁ, J. CHMELAŘ a J. KOPECKÝ, 2018. Saliva of *Ixodes ricinus* enhances TBE virus replication in dendritic cells by modulation of pro-survival Akt pathway. *Virology* [online]. **514**. ISSN 00426822. Dostupné z: doi:10.1016/j.virol.2017.11.008

LIN, Y. L., Y. L. HUANG, S. H. MA, C. T. YEH, S. Y. CHIOU, L. K. CHEN a C. L. LIAO, 1997. Inhibition of Japanese encephalitis virus infection by nitric oxide: antiviral effect of nitric oxide on RNA virus replication. *Journal of virology* [online]. **71**(7). ISSN 0022-538X. Dostupné z: doi:10.1128/jvi.71.7.5227-5235.1997

LINDQUIST, L. a O. VAPALAHTI, 2008. Tick-borne encephalitis. *The Lancet* [online]. **371**(9627). ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(08)60800-4

LIPSCOMB, M. F. a B. J. MASTEN, 2002. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiological Reviews* [online]. **82**(1). ISSN 0031-9333. Dostupné z: doi:10.1152/physrev.00023.2001

LIU, Y.-J., 2005. IPC: Professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annual Review of Immunology* [online]. **23**(1). ISSN 0732-0582. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115633

LURIER, E. B., D.DALTON, W. DAMPIER, P. RAMAN, S. NASSIRI, N. M. FERRARO, R. RAJAGOPALAN, M. SARMADY a K. L. SPILLER, 2017. Transcriptome analysis of IL-10-stimulated (M2c) macrophages by next-generation sequencing. *Immunobiology* [online]. **222**(7). ISSN 01712985. Dostupné z: doi:10.1016/j.imbio.2017.02.006

MANDL, C. W. a M. R. HOLBROOK, 2011. Tick-borne encephalitis and Omsk hemorrhagic fever. In: *Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens and Practice* [online]. B.m.: Elsevier. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-7020-3935-5.00077-X

MANSFIELD, K. L., N. JOHNSON, L. P. PHIPPS, J. R. STEPHENSON, A. R. FOOKS a T. SOLOMON, 2009. Tick-borne encephalitis virus – a review of an emerging zoonosis. *Journal of General Virology* [online]. **90**(8). ISSN 0022-1317. Dostupné z: doi:10.1099/vir.0.011437-0

MANSFIELD, K. L., L. JIZHOU, L. P. PHIPPS a N. JOHNSON, 2017. Emerging

tick-borne viruses in the twenty-first century. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. 2017. ISSN 22352988. Dostupné z: doi:10.3389/fcimb.2017.00298

MARTINEZ, F. O. a S. GORDON, 2014. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Reports* [online]. **6**. ISSN 20517599. Dostupné z: doi:10.12703/P6-13

MCLELLAN, A. D., R. V. SORG, L. A. WILLIAMS a D. N. J. HART, 1996. Human dendritic cells activate T lymphocytes via a CD40: CD40 ligand-dependent pathway. *European Journal of Immunology* [online]. **26**(6). ISSN 00142980. Dostupné z: doi:10.1002/eji.1830260603

MOSSER, D. M. a J. P. EDWARDS, 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology* [online]. **8**(12). ISSN 1474-1733. Dostupné z: doi:10.1038/nri2448

NAMBALA, P. a W. C. SU, 2018. Role of Zika virus prM protein in viral pathogenicity and use in vaccine development. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2018. ISSN 1664302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2018.01797

OLAGNIER, D., S. PERI, C. STEEL, N. VAN MONTFOORT, C. CHIANG, V. BELJANSKI, M. SLIFKER, Z. HE, C. N. NICHOLS, R. LIN, S. BALACHANDRAN a J. HISCOTT, 2014. Cellular oxidative stress response controls the antiviral and apoptotic programs in Dengue virus-infected dendritic cells. *PLoS Pathogens* [online]. **10**(12). ISSN 1553-7374. Dostupné z: doi:10.1371/journal.ppat.1004566

PANTELIC, L., H. SIVAKUMARAN a N. UROSEVIC, 2005. Differential induction of antiviral effects against west nile virus in primary mouse macrophages derived from flavivirus-susceptible and congenic resistant mice by Alpha/Beta interferon and poly(I-C). *Journal of Virology* [online]. **79**(3). ISSN 0022-538X. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.79.3.1753-1764.2005

PLANTINGA, M., C. DE HAAR a S. NIERKENS, 2015. Dendritic Cells. In: *The Impact of Food Bioactives on Health* [online]. Cham: Springer International Publishing. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-16104-4_17

POGODINA V. V., 1960. Experimental studies on the pathogenesis of tickborne encephalitis after alimentary infection. Report I. Distribution of virus in white mouse body. *Vopr Virusol.*

POGODINA V V, KARAN L S a KOLIASNIKOVA K N, 2007. Evolution of tick-borne encephalitis and a problem of evolution of its causative agent. *Vopr Virusol*.

PULANCO, M. C., J. COSMAN, M.-M. HO, J. HUYNH, K. FING, J. TURCU a D. A. FRASER, 2017. Complement protein C1q enhances macrophage foam cell survival and efferocytosis. *The Journal of Immunology* [online]. **198**(1). ISSN 0022-1767. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.1601445

PULKKINEN, L., S. BUTCHER a M. ANASTASINA, 2018. Tick-borne encephalitis virus: a structural view. *Viruses* [online]. **10**(7). ISSN 1999-4915. Dostupné z: doi:10.3390/v10070350

RICCARDI, N., R. M. ANTONELLO, R. LUZZATI, J. ZAJKOWSKA, S. DI BELLA a D. R. GIACOBBE, 2019. Tick-borne encephalitis in Europe: a brief update on epidemiology, diagnosis, prevention, and treatment. *European Journal of Internal Medicine* [online]. **62**. ISSN 09536205. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejim.2019.01.004

RIOS, M., M. J. ZHANG, A. GRINEV, K. SRINIVASAN, S. DANIEL, O. WOOD, I. K. HEWLETT a A. I. DAYTON, 2006. Monocytes-macrophages are a potential target in human infection with West Nile virus through blood transfusion. *Transfusion* [online]. **46**(4). ISSN 0041-1132. Dostupné z: doi:10.1111/j.1537-2995.2006.00769.x

RŮŽEK, D., G. DOBLER a O. D. MANTKE, 2010. Tick-borne encephalitis: pathogenesis and clinical implications. *Travel Medicine and Infectious Disease* [online]. **8**(4). ISSN 14778939. Dostupné z: doi:10.1016/j.tmaid.2010.06.004

SANDVIK, L., K. SKARSTEIN, L. SVILAND, E. SVARSTAD, A. NILSEN, T. LEIVESTAD, R. JONSSON a S. APPEL, 2014. CD11c+ Dendritic cells rather than Langerhans cells are reduced in normal skin of immunosuppressed renal transplant recipients. *Acta Dermato Venereologica* [online]. **94**(2). ISSN 0001-5555. Dostupné z: doi:10.2340/00015555-1679

SCHAEFFER, E., V. FLACHER, V. PAPAGEORGIOU, M. DECOSSAS, J.-D. FAUNY, M. KRÄMER a C. G. MUELLER, 2015. Dermal CD14 + Dendritic cell and macrophage infection by dengue virus is stimulated by interleukin-4. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. **135**(7). ISSN 0022202X. Dostupné z: doi:10.1038/jid.2014.525

SCHEBESCH, C., V. KODELJA, C. MÜLLER, N. HAKIJ, S. BISSON, C. E. ORFANOS a S. GOERDT, 1997. Alternatively activated macrophages actively inhibit

proliferation of peripheral blood lymphocytes and CD4 + T cells *in vitro*. *Immunology* [online]. **92**(4). ISSN 0019-2805. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2567.1997.00371.x

SELINGER, M., H. TYKALOVÁ, J. ŠTĚRBA, P. VĚCHTOVÁ, Z. VAVRUŠKOVÁ, J. LIESKOVSKÁ, A. KOHL, E. SCHNETTLER a L. GRUBHOFFER, 2019. Tick-borne encephalitis virus inhibits rRNA synthesis and host protein production in human cells of neural origin. *PLOS Neglected Tropical Diseases* [online]. **13**(9). ISSN 1935-2735. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pntd.0007745

SHI, J., Z. HU, F. DENG a S. SHEN, 2018. Tick-borne viruses. *Virologica Sinica* [online]. **33**(1). ISSN 1674-0769. Dostupné z: doi:10.1007/s12250-018-0019-0

SHORTMAN, K. a S. H. NAIK, 2007. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nature Reviews Immunology* [online]. **7**(1). ISSN 1474-1733. Dostupné z: doi:10.1038/nri1996

SMEE, D. F., B. L. HURST, W. J. EVANS, N. CLYDE, S. WRIGHT, C. PETERSON, K.-H. JUNG a C. W. DAY, 2017. Evaluation of cell viability dyes in antiviral assays with RNA viruses that exhibit different cytopathogenic properties. *Journal of Virological Methods* [online]. **246**. ISSN 01660934. Dostupné z: doi:10.1016/j.jviromet.2017.03.012

SOLANO-GÁLVEZ, S., S. TOVAR-TORRES, M. TRON-GÓMEZ, A. WEISER-SMEKE, D. ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ, G. FRANYUTI-KELLY, M. TAPIA-MORENO, A. IBARRA, L. GUTIÉRREZ-KOBEH a R. VÁZQUEZ-LÓPEZ, 2018. Human dendritic cells: ontogeny and their subsets in health and disease. *Medical Sciences* [online]. **6**(4). ISSN 2076-3271. Dostupné z: doi:10.3390/medsci6040088

STADLER, K., S. L. ALLISON, J. SCHALICH a F. X. HEINZ, 1997. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *Journal of Virology* [online]. **71**(11). ISSN 0022-538X. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.71.11.8475-8481.1997

STEIN, M., S. KESHAV, N. HARRIS a S. GORDON, 1992. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *Journal of Experimental Medicine* [online]. **176**(1). ISSN 0022-1007. Dostupné z: doi:10.1084/jem.176.1.287

STEINMAN, R. M. a Z. A. COHN, 1973. Identification of novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. *Journal of Experimental Medicine* [online]. **137**(5). ISSN 1540-9538. Dostupné z: doi:10.1084/jem.137.5.1142

SÜSS, J., 2008. Tick-borne encephalitis in Europe and beyond--the epidemiological situation as of 2007. *Euro Surveill* [online]. 2008. ISSN 15607917. Dostupné z: doi:10.2807/ese.13.26.18916-en

VAN DER BIJ, G. J., S. J. OOSTERLING, S. MEIJER, R. H. J. BEELEN a M. VAN EGMOND, 2005. The role of macrophages in tumor development. *Analytical Cellular Pathology* [online]. **27**(4). ISSN 2210-7177. Dostupné z: doi:10.1155/2005/719412

VAN FURTH R., COHN Z. A., HIRSCH J. G., HUMPHREY J. H., SPECTOR W. G. a LANGEVOORT H. L., 1972. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull World Health Organ*. 845–852.

WALLNER, G., C. W. MANDL, C. KUNZ a F. X. HEINZ, 1995. The Flavivirus 3'-noncoding region: Extensive size heterogeneity independent of evolutionary relationships among strains of tick-borne encephalitis virus. *Virology* [online]. **213**(1). ISSN 00426822. Dostupné z: doi:10.1006/viro.1995.1557

WANG, L., S. ZHANG, H. WU, X. RONG aj. GUO, 2019. M2b macrophage polarization and its roles in diseases. *Journal of Leukocyte Biology* [online]. **106**(2). ISSN 0741-5400. Dostupné z: doi:10.1002/JLB.3RU1018-378RR

WU, Y., Qi. LIU, J. ZHOU, W. XIE, C. CHEN, Z. WANG, H. YANG a J. CUI, 2017. Zika virus evades interferon-mediated antiviral response through the co-operation of multiple nonstructural proteins in vitro. *Cell Discovery* [online]. **3**. ISSN 20565968. Dostupné z: doi:10.1038/celldisc.2017.6

YOSHII, K., 2019. Epidemiology and pathological mechanisms of tick-borne encephalitis. *Journal of Veterinary Medical Science* [online]. **81**(3). ISSN 0916-7250. Dostupné z: doi:10.1292/jvms.18-0373

YOSHII, K., N. YANAGIHARA, M. ISHIZUKA, M. SAKAI a H. KARIWA, 2013. N-linked glycan in tick-borne encephalitis virus envelope protein affects viral secretion in mammalian cells, but not in tick cells. *Journal of General Virology* [online]. **94**(10). ISSN 0022-1317. Dostupné z: doi:10.1099/vir.0.055269-0

YU, I.-M., W. ZHANG, H. A. HOLDAWAY, L. LI, V. A. KOSTYUCHENKO, P. R. CHIPMAN, R. J. KUHN, M. G. ROSSMANN a J. CHEN, 2008. Structure of the immature Dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science* [online]. **319**(5871). ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1153264

ZABA, L. C., J. FUENTES-DUCULAN, R. M. STEINMAN, J. G. KRUEGER a M. A. LOWES, 2007. Normal human dermis contains distinct populations of CD11c+BDCA-1+ dendritic cells and CD163+FXIIIa+ macrophages. *Journal of Clinical Investigation* [online]. **117**(9). ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI32282

ZHANG, Z., L. RONG a Y.-P. LI, 2019. *Flaviviridae* viruses and oxidative stress: implications for viral pathogenesis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online]. **2019**. ISSN 1942-0900. Dostupné z: doi:10.1155/2019/1409582

7.1 Elektronické zdroje

Infekce v ČR - ISIN (dříve EPIDAT) [online], 2020. Česká republika: SZÚ [cit. 2021-02-01]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/publikace/data/infekce-v-cr>

Příbalová informace: FSME-IMMUN 0,5ml [online]. [cit. 2021-01-10]. Dostupné z: https://www.pfizer.cz/sites/pfizer.cz/files/g10033421/f/201606/FSME-IMMUN_05_ML_PIL.pdf

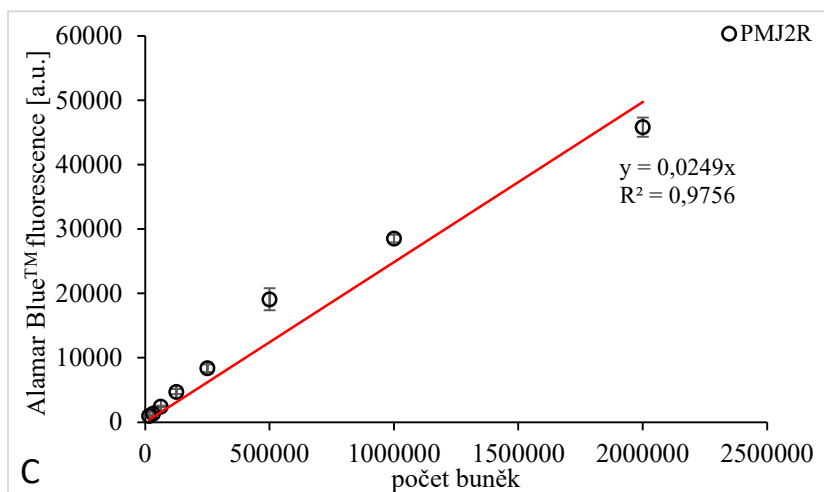
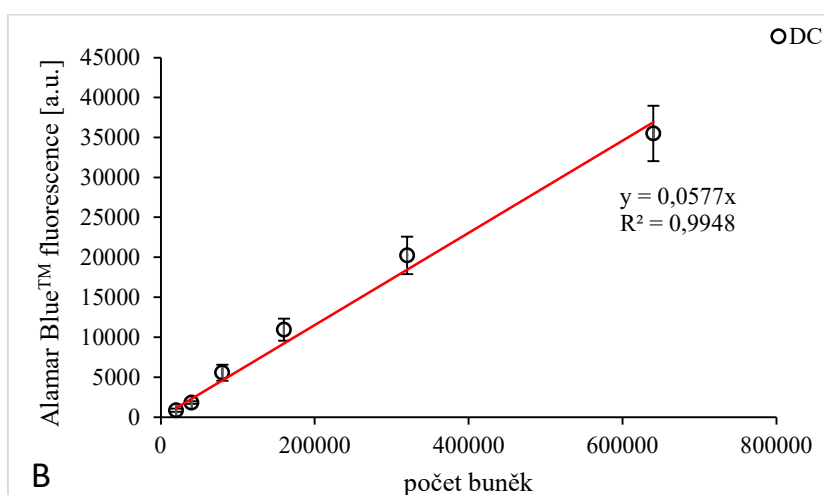
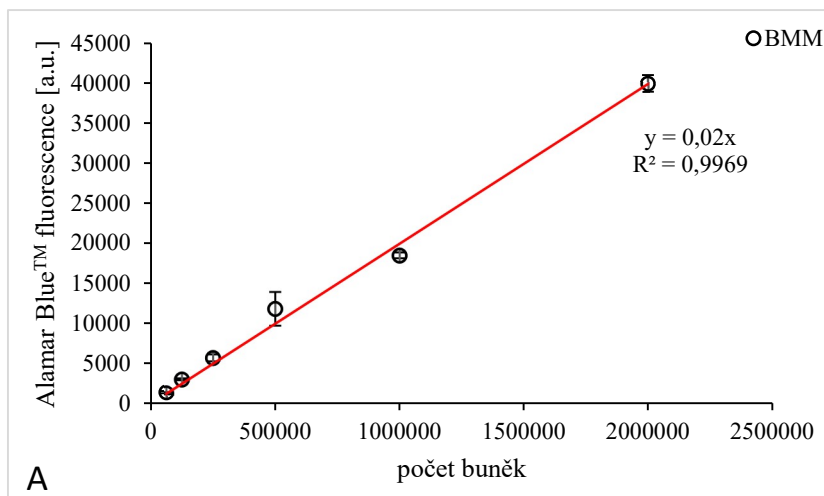
TBE Cases by year: Number of TBE cases, regardless of the applied case definition, by year reported in 16 EU/EFTA countries, 2000–2010 (n= 29 381), 2012. European Centre for Disease Prevention and Control: An agency of the European Union [online]. Sweden: ECDC [cit. 2021-02-01]. Dostupné z: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/tbe-cases-year-number-tbe-cases-regardless-applied-case-definition-year-reported>

8 Seznam příloh

Příloha 1: Závislost fluorescence na počtu buněk.

Příloha 2: Relativní viability jednotlivých experimentů.

Příloha 1: Závislost fluorescence na počtu buněk. A) Závislost fluorescence na počtu BMM, B) Závislost fluorescence na počtu DC, C) Závislost fluorescence na počtu PMJ2-R.



Příloha 2: Relativní viability jednotlivých experimentů. A) Relativní viabilita BMM a PMJ2-R 1. pokus, B) Relativní viabilita BMM a PMJ2-R 2. pokus, C) Relativní viabilita BMM a PMJ2-R 3. pokus, D) Relativní viabilita CD11c+ DC a PMJ2R 1. pokus, E) Relativní viabilita CD11c+ DC a PMJ2R 2. pokus, F) Relativní viabilita CD11c+ DC a PMJ2R 3. pokus.

