

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Barbora Slunéčková

Vývoj DNA vakcíny proti rybímu orthoreoviru 3 (PRV3)

Development of DNA vaccine against fish orthoreovirus 3 (PRV3)

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Martin Fraiberk, Ph.D.

Praha, 2024

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 28. 7. 2024

Podpis

Poděkování

Chtěla bych upřímně poděkovat svému školiteli **Mgr. Martinu Fraiberkovi, Ph.D.** za jeho cenné rady, nabyté zkušenosti, trpělivost, nekončící ochotu pomoci a přátelství, které mi bylo oporou po celou dobu studia.

Dále bych chtěla poděkovat celé laboratoři Molekulární virologie, jmenovitě **RNDr. Lence Horníkové, Ph.D., Mgr. Vojtěchovi Šrollerovi, Ph.D., Ivaně Polívkové, Mgr. Borisi Ryabchenkovi, Ph.D., Mgr. Kateřině Bruščíkové, Ph.D., Mgr. Karolíně Anderové** a v neposlední řadě vedoucí laboratoře **Sandře Huerfano Meneses, Ph.D.** a zakladatelce laboratoře **doc. RNDr. Jitce Forstové, CSc.** za přátelské prostředí, přijetí do laboratorního kolektivu a pomoc při nabývání nových zkušeností a zpracování diplomové práce.

Nadále bych chtěla poděkovat pracovníkům firmy **Dyntec s.r.o.** za pomoc a možnost využití jejich zdrojů a prostorů.

Díky patří i **mým spolužákům**, magisterským studentům Virologie, s kterými jsem absolvovala studium v různém časové rozpětí a díky kterým byla práce na diplomové práci více než příjemným zážitkem.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat **své rodině**, která mi byla finanční a psychickou podporou po celou dobu studia a také **mým přátelům**, kteří mě motivovali a podporovali na mé studijní cestě.

Abstrakt

V současné době je jedním z nejvýznamnějších rizik pro rybářský průmysl a chov lososovitých ryb infekce rybím orthoreovirem (PRV). Nejvíce abundantní subtyp v Evropě je momentálně PRV-3, který napadá především pstruhy duhové (*Oncorhynchus mykiss*) a lososy obecné (*Salmo salar*) a způsobuje velké ekonomické i ekologické problémy. Tento virus vyvolává onemocnění podobné HSMI (heart and skeletal muscle inflammation), které způsobuje jeho příbuzný subtyp PRV-1. Jak název napovídá, onemocnění postihuje hlavně srdeční a kosterní svalovinu.

DNA vakcíny jsou, díky jejich poměrně nenáročným a rychlým přípravě, stále více oblíbenou variantou vakcinace ve veterinárním průmyslu. Proto jsme pomocí Gibsonova klonování zkonstruovali dohromady 20 vakcinačních plazmidů, které obsahují geny pro různé virové proteiny ($\sigma 1$, $\sigma 3$, $\mu 1$). Zároveň jsme geny zkombinovali s různými fúzními partnery a signálními sekvencemi pro zvýšení účinnosti vakcíny. Jednalo se o zajištění sekrece antigenu do mezibuněčného prostoru nebo kotvení antigenu na plazmatickou membránu transfekované buňky.

Následně jsme testovali a potvrdili produkci antigenů ($\sigma 1$, $\sigma 3$) v transfekované buněčné linii HEK 293T. Podařilo se nám také transfekovat rybí buněčnou linii RTGill-W1, u které nebyla do této doby zaznamenána žádná úspěšná transfekce. Dále jsme úspěšně identifikovali virový subtyp ve vzorku infikované krve, který jsme obdrželi z postižené oblasti v Norsku, jako PRV-1. Také jsme zavedli metodu RT-qPCR pro jeho kvantifikaci.

Tato diplomová práce vznikla za spolupráce s česko-dánskou firmou Dyntec spol. s.r.o. (Pražská 328, 411 55 Terezín), která se zaměřuje především na vývoj veterinárních vakcín a léčiv.

Klíčová slova: PRV3, DNA vakcína, pstruh duhový, losos obecný, imunita ryb

Abstract

Currently, one of the most significant risks to the fishing industry and salmonid fish farming is fish orthoreovirus (PRV) infection. In Europe, the most abundant subtype is currently PRV-3, which mainly attacks rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) and causes great economic and ecological issues. This virus causes a disease similar to HSMI (heart and skeletal muscle inflammation), which is triggered by its related subtype PRV-1. As the name suggests, the disease mainly affects the heart and skeletal muscles.

DNA vaccines are, thanks to their relatively undemanding and quick preparation, an increasingly popular variant of vaccination in the veterinary industry. Therefore, we used Gibson cloning to construct a total of 20 vaccine plasmids that contain genes for different viral proteins ($\sigma 1$, $\sigma 3$, $\mu 1$). At the same time, we combined these genes with different fusion partners and signal sequences to increase the effectiveness of the vaccine. This involved ensuring antigen secretion into the intercellular space or anchoring the antigen to the plasma membrane of the transfected cell.

Subsequently, we tested and confirmed the production of antigens ($\sigma 1$, $\sigma 3$) in the transfected HEK 293T cell line. We were also able to transfect the fish cell line RTGill-W1, in which no successful transfection has been reported so far. We were also able to identify the viral subtype in the infected blood sample we received from the affected area in Norway as PRV-1. We introduced an RT-qPCR method for its quantification as well.

This master's thesis was created in cooperation with the Czech-Danish company Dyntec spol. s.r.o. (Pražská 328, 411 55 Terezín), which focuses mainly on the development of veterinary vaccines and medicines.

Key words: PRV3, DNA vaccine, rainbow trout, Atlantic salmon, fish immunity

Obsah

1.	ÚVOD	1
2.	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
2.1.	CHARAKTERISTIKA PRV	3
2.1.1.	<i>Taxonomie a fylogeneze Orthoreovirů</i>	3
2.1.2.	<i>Organizace genomu</i>	4
2.1.3.	<i>Virové proteiny</i>	5
2.1.4.	<i>Replikační cyklus</i>	7
2.1.5.	<i>Patogeneze</i>	9
2.1.5.1.	HSMI (heart and skeletal muscle inflammation)	9
2.1.5.2.	EIBS (Erythrocytic inclusion body syndrome)	10
2.1.5.3.	Onemocnění PRV-3	10
2.1.5.4.	Další onemocnění	11
2.1.6.	<i>Epidemiologie</i>	11
2.1.6.1.	PRV-1	12
2.1.6.2.	PRV-2	13
2.1.6.3.	PRV-3	13
2.1.7.	<i>Způsoby přenosu</i>	14
2.2.	IMUNITNÍ SYSTÉM U LOSOSOVITÝCH RYB	16
2.2.1.	<i>Vrozená imunita</i>	17
2.2.2.	<i>Adaptivní imunita</i>	18
2.2.3.	<i>Imunitní odpověď na infekci PRV</i>	20
3.	CÍLE PRÁCE	22
4.	MATERIÁLY A METODY	23
4.1.	MATERIÁLY	23
4.1.1.	<i>Buněčné linie, bakteriální a virové kmeny</i>	23
4.1.2.	<i>Média, roztoky a antibiotika</i>	23
4.1.3.	<i>Plazmidy</i>	26
4.1.4.	<i>DNA primery</i>	27
4.1.5.	<i>Geny pro virové proteiny</i>	30
4.1.6.	<i>Markery molekulových hmotností</i>	31
4.1.7.	<i>Barviva</i>	32
4.1.8.	<i>Protilátky</i>	32
4.1.9.	<i>Enzymy a jejich směsi</i>	33
4.1.10.	<i>Komerční soupravy a transfekční činidla</i>	33
4.2.	METODY	34
4.2.1.	<i>Práce s bakteriálními kmeny</i>	34
4.2.1.1.	Příprava kompetentních buněk	34
4.2.1.2.	Transformace bakterií elektroporací	35
4.2.1.3.	Kultivace bakterií v tekutém médiu	35
4.2.1.4.	Kultivace bakterií na pevných médiích	35
4.2.1.5.	Skladování bakteriálních kultur	35
4.2.2.	<i>Práce s DNA</i>	36
4.2.2.1.	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	36
4.2.2.2.	Colony PCR	37
4.2.2.3.	Čištění DNA z PCR směsi	38
4.2.2.4.	Agarózová DNA elektroforéza	39
4.2.2.5.	Izolace DNA z agarózového gelu	39
4.2.2.6.	Izolace plazmidové DNA	40
4.2.2.7.	Gibsonovo klonování soupravou NEBuilder® HiFi DNA Assembly Cloning Kit	41
4.2.2.8.	Měření koncentrace nukleových kyselin	42
4.2.2.9.	Sekvenace DNA	42
4.2.3.	<i>Práce s RNA a cDNA</i>	43
4.2.3.1.	Izolace RNA	43
4.2.3.2.	Syntéza cDNA	43
4.2.3.3.	RT-PCR (PCR s reverzní transkriptázou)	44

4.2.3.4.	qPCR (Kvantitativní PCR).....	44
4.2.4.	<i>Práce s buněčnými kulturami</i>	45
4.2.4.1.	Pasážování buněčné linie HEK 293T	45
4.2.4.2.	Pasážování buněčné linie RTGill-W1.....	45
4.2.4.3.	Příprava buněčných konzerv	46
4.2.4.4.	Počítání koncentrace buněk	46
4.2.4.5.	Transfekce buněčných kultur pomocí transfekčních činidel.....	47
4.2.4.6.	Transfekce elektroporací pomocí přístroje Neon™ NxT.....	48
4.2.4.7.	Sklizeň transfekovaných buněčných kultur	49
4.2.5.	<i>Práce s proteiny</i>	49
4.2.5.1.	Příprava buněčného lyzátu pomocí RIPA pufru	49
4.2.5.2.	Izolace membránových proteinů pomocí komerční soupravy Mem-PER™ Plus Kit	50
4.2.5.3.	Příprava vzorků na SDS-PAGE	50
4.2.5.4.	Denaturační proteinová elektroforéza SDS-PAGE	50
4.2.5.5.	Western blot.....	51
4.2.5.6.	Dot blot.....	52
4.2.5.7.	Imunodetekce proteinů na nitrocelulóзовé membráně.....	52
5.	VÝSLEDKY	53
5.1.	KONSTRUKCE VAKCINAČNÍCH PLAZMIDŮ	53
5.1.1.	<i>Navržení vakcinačních plazmidů a specifických primerů pro klonování</i>	53
5.1.2.	<i>PCR vektorů a genových segmentů</i>	56
5.1.3.	<i>NEBuilder klonování</i>	58
5.1.4.	<i>Colony PCR a izolace vakcinačních plazmidů z bakteriálních kolonií</i>	58
5.2.	EXPRESE ANTIGENNÍCH PROTEINŮ V TRANSFEKOVANÉ BUNĚČNÉ LINII HEK 293T	60
5.3.	EXPRESE ANTIGENNÍCH PROTEINŮ V TRANSFEKOVANÉ BUNĚČNÉ LINII RTGILL-W1	62
5.4.	ÚČINNOST TRANSFEKCE BUNĚČNÉ LINIE RTGILL-W1 POMOCÍ ELEKTROPORAČNÍHO PŘÍSTROJE NEON™ NXT.....	63
5.5.	IDENTIFIKACE A KVANTIFIKACE RYBÍHO ORTHOREOVIRU VE VZORKU KRVE OBDRŽENÉHO FIRMOU DYNTEC	64
5.6.	POMNOŽENÍ VIRU INFEKČÍ PSTRUHŮ DUHOVÝCH.....	67
6.	DISKUZE	69
6.1.	NAVRŽENÍ VAKCINAČNÍCH PLAZMIDŮ	69
6.2.	PRODUKCE VIROVÝCH PROTEINŮ V BUNĚČNÝCH LINIÍCH	70
6.3.	POMNOŽENÍ VIRU A KVANTIFIKACE VIROVÉ INFEKCE.....	71
7.	SOUHRN	74
8.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	76

Seznam zkratek

Zkratka	Anglický název	Český název
ARV	avian orthoreovirus	ptačí orthoreovirus
BCRs	B-cell receptors	receptory B-buněk
BKD	bacterial kidney disease	bakteriální onemocnění ledvin
BSL	biosafety level	úroveň biologické bezpečnosti
cDNA	complementary DNA	komplementární DNA
CMS	cardiomyopathy syndrome	syndrom kardiomyopatie
CMV	cytomegalovirus	cytomegalovirus
CpG	deoxycytidine-phosphate-deoxyguanosine	deoxycytidin-fosfát-deoxyguanosin
C _t	cycle of threshold	cyklus prahu
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium	Dulbeccovo modifikované Eaglovo médium
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
dpi	days post infection	dny po infekci
dsDNA	double-strand deoxyribonucleic acid	dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina
dsRNA	double-strand ribonucleic acid	dvouvláknová ribonukleová kyselina
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	kyselina ethylendiamintetraoctová
EF-1 α	elongation factor 1 alpha	elongační faktor 1 alfa
(E)GFP	(enhanced) green fluorescent protein	(posílený) zelený fluorescenční protein
EIBS	erythrocytic inclusion body syndrome	syndrom erytrocytárních inkluzních tělísek
eIF2	eukaryotic initiation factor 2	eukaryotický iniciační faktor 2
FBS	fetal bovine serum	fetální hovězí sérum
FoxP3	forkhead box P3	
HRP	horseradish peroxidase	křenová peroxidasa
HSMI	heart and skeletal muscle inflammation	zánět srdeční a kosterní svaloviny

IFN- α/γ	interferon α/γ	interferon α/γ
IgM/D/T/Z	imunoglobulin M/D/T/Z	imunoglobulin M/D/T/Z
IHNV	infectious hematopoietic necrosis virus	virus infekční hematopoetické nekrózy
IL-2/10/12/15	interleukin-2/10/12/15	Interleukin-2/10/12/15
IPNV	infectious pancreatic necrosis virus	virus infekční nekrózy pankreatu
ISAV	infectious salmon anemia virus	infekční anémie lososů
ISVP	infectious subviral particle	Infekční subvirová částice
JAM-A	junctional adhesion molecule A	molekula A adhezních spojů
LB	lysogeny broth	lyzogenní vývar
LGP2	laboratory of genetics and physiology 2	
MAD5	melanoma differentiation-associated protein 5	protein asociovaný s diferenciací melanomu 5
MCS	multiple cloning site	vícenásobné klonovací místo
MHC I/II	major histocompatibility complex I/II	hlavní histokompatibilní komplex I/II
mRNA	messenger ribonucleic acid	mediátorová ribonukleová kyselina
MRV	mammalian orthoreovirus	savčí orthoreovirus
NK	natural killers	přirozený zabiják
OD	optical density	optická hustota
ORF	open reading frame	otevřený čtecí rámeček
PAA	polyacrylamide	polyakryamid
PAMP	pathogen associated molecular pattern	molekulární vzorec asociovaný s patogenem
bp	base pair	páry bazí
PBS	phosphate buffered saline	fosfátový pufr
PCR	polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce
PD	pancreas disease	onemocnění slinivky břišní
PKR	protein kinase R	proteinkináza R
PLAP	placental Alkaline Phosphatase	placentární alkalická fosfatáza

PMCV	piscine myocarditis virus	rybí virus myokarditidy
poly(I:C)	polyinosinic:polycytidylic acid	kyselina polyinosinidová:polycytidylová
pre-mRNA	precursor messenger ribonucleic acid	prekurzorová mediátorová ribonukleová kyselina
PRRs	pattern recognition receptors	receptory rozeznávající molekulární vzory
PRV	piscine orthoreovirus	rybí orthoreovirus
qPCR	quantitative polymerase chain reaction	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RdRp	RNA-dependent RNA polymerase	RNA-dependentní RNA polymeráza
RIG-I	retinoic acid-inducible gene	receptor indukovatelný kyselinou retinovou I
RIPA	radioimmunoprecipitation assay buffer	radioimunoprecipitační testovací pufr
RNA	ribonucleic acid	ribonukleová kyselina
RT	reverse transcriptase; RNA-dependent DNA polymerase	reverzní transkriptáza; RNA- dependentní DNA polymeráza
SAV	salmonid alphavirus	alfaviru lososovitých ryb
SDS	sodium dodecyl sulphate	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis	SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza
SOC	super optimal broth	super optimální vývar
SOCS1	suppressor of cytokine signaling 1	supresor cytokinové signalizace 1
SV40	Simian virus 40	Simian virus 40
TBE	tris-borate-EDTA buffer	tris-borát-EDTA pufr
TE	tris-EDTA buffer	tris-EDTA pufr
TEMED	tetramethylethyldiamin	tetramethylethyldiamin
Th1/2/17	T helper lymphocyte 1/2/17	pomocný T-lymfocyt 1/2/17
TLR3	toll-like receptor 3	receptor podobný genu <i>Toll</i> 3
TPN	total parental nutrition	celková parenterální výživa
2 - 5A	2'-5'-oligoadenylate	2'-5' - oligoadenylát

1. Úvod

S celosvětově rostoucím počtem populace roste i potřeba adekvátní nutriční výživy a živočišných proteinů. Akvakultura je jeden z nejrychleji rostoucích potravinářských průmyslů vůbec a v současnosti produkuje až 50 % světové nabídky rybích produktů na trhu (Food and Agriculture Organization of the United Nations 2016). V roce 2022 byla celková evropská produkce ryb akvakulturou odhadnuta na 2 865 072 tun, přičemž největším producentem s 58 % celkové produkce bylo Norsko. Dalšími významnými producenty jsou například Turecko, Spojené království Velké Británie a Severního Irska nebo Řecko. Hlavní zástupci produkovaných ryb jsou losos obecný (*Salmo salar*), pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*), mořan zlatý (*Sparus aurata*), morčák evropský (*Dicentrarchus labrax L.*) a kapr obecný (*Cyprinus carpio*). Dohromady tyto druhy dosahují 98 % veškeré evropské produkce ryb (Federation of European Aquaculture Producers 2023).

V moderních rybích farmách dochází k chovu velkého množství ryb ve velkých hustotách na omezeném prostoru (v nádržích, akváriích či rybnících) a dochází tak k mnohem bližším a častějším interakcím mezi jedinci, než je ve volné přírodě běžné. Tyto podmínky poté vyvíjejí tlak na infekční agens a dochází k vývoji více patogenních variant viru (Kennedy et al. 2016).

Rybí orthoreovirus (Piscine Orthoreovirus, PRV) je v současnosti jednou z hlavních příčin nově se vyskytujících onemocnění ryb v akvakultuře a rybářském průmyslu po celém světě. První případy související s rybím orthoreovirem byly zaznamenány již roku 1999, kdy na západním pobřeží Norska docházelo k podezřele velkým úhynům lososů obecných. Mortalita dosahovala až 20 %. Lososi z postižených oblastí měli charakteristické histopatologické léze v srdeční a kosterní svalovině. Podle těchto nálezů začalo být toto onemocnění nazýváno HSMI (heart and skeletal muscle inflammation), aniž by byl zatím znám původce onemocnění. (Kongtorp, Kjerstad et al. 2004).

Po opětovném nárůstu onemocnění v roce 2010, byl původce onemocnění sekvenován a identifikován jako rybí orthoreovirus (Palacios et al. 2010). Roku 2013 se opět náhle zvýšily počty úmrtí pstruhů duhových na západním pobřeží Norska, kde začalo docházet k úhynu až 12 000 jedinců týdně. Zde byl také poprvé diagnostikován genotyp PRV-3 rybiho orthoreoviru (Garseth et al. 2019; Olsen et al. 2015). Podobné případy následně hlásilo i Německo (Adamek et al. 2018), Skotsko (Ferguson et al. 2005), Itálie, Dánsko (Dhamotharan et al. 2018) a Česká republika (Pojezdal et al. 2020).

Od té doby se zvedl počet studií zabývajících se tímto virovým genotypem a došlo k řadě objevů týkajících se jeho přenosu, životního cyklu, taxonomie, patogeneze a dalších (Polinski et al. 2020). Stále se ale jedná o vcelku nový virus a mnoho otázek zůstává nezodpovězených či nejasných. Vzniklé ekologické a ekonomické ztráty, způsobené stále častějšími případy vypuknutí nákazy, volají po nutnosti zásahu v podobně efektivního léčiva nebo prevence proti šíření nemoci.

Jako jednou z nejmodernějších variant ochrany ve veterinárním průmyslu se v současné době jeví vakcíny založené na nukleových kyselinách. Podle typu nukleové kyseliny je můžeme rozdělit na DNA a mRNA vakcíny. Fungují na principu doručení genetické informace antigenu do buňky hostitele a následné tvorby antigenu přímo hostitelskou buňkou. Odpadá tím složitá příprava antigenů v laboratořích. Takto vytvořený antigen je nadále předán imunitnímu systému hostitele a dojde k vytvoření dlouhodobé imunity a potřebných protilátek obdobně jako u ostatních typů vakcín (Li a Petrovsky 2016; Zhang et al. 2019).

Přestože jsou DNA vakcíny v současnosti stále novinkou, několik z nich si již našlo uplatnění ve veterinárním průmyslu. Využívají se v boji proti řadě onemocnění u drůbeže, koní či ryb (Davis et al. 2001; Jiang et al. 2007; Thorarinsson et al. 2021).

2. Literární přehled

2.1. CHARAKTERISTIKA PRV

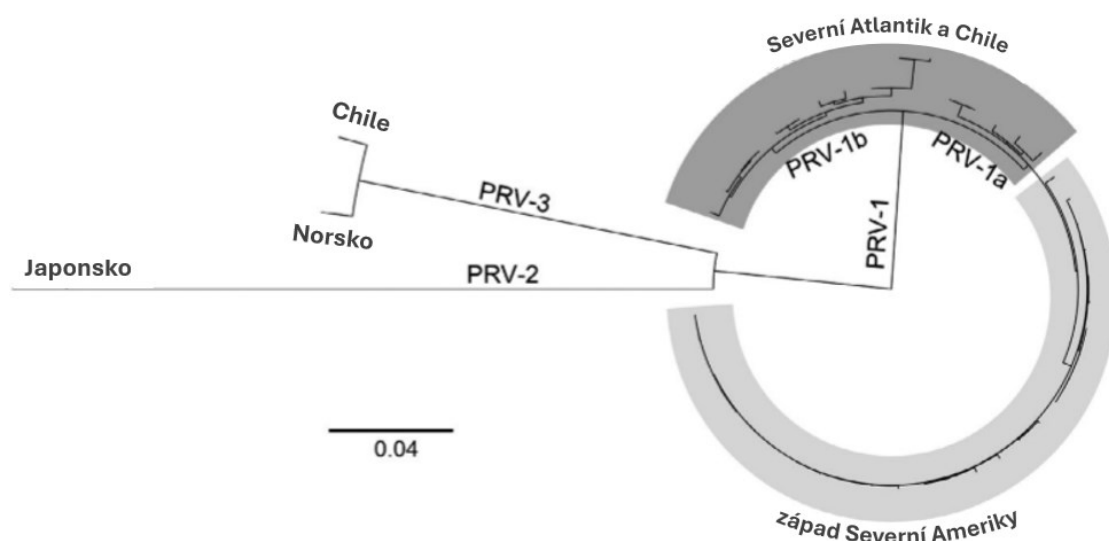
2.1.1. Taxonomie a fylogeneze Orthoreovirů

Rod Orthoreoviridae je jeden z patnácti rodů spadající do čeledi Reovirů, což je největší čeleď virů s dsRNA (double-stranded ribonucleic acid) genomem. Tuto čeleď nadále můžeme rozdělit do dvou podčeledí podle tvaru jejich kapsidy. Podčeleď Spinareovirinae obsahuje ve své kapsidě ven vyčnívající proteiny připomínající „věže“, a naopak podčeleď Sedoreovirinae tyto struktury neobsahuje (Steward et al. 2013).

Rod Orthoreoviridae spadá mezi Spinareovirinae, se kterými sdílí nejen tvar své kapsidy, ale i další společné znaky. Jedná se o neobalené ikosahedrony, které mají 50 až 100 nm v průměru. Uvnitř kapsidy se nachází segmentovaný dsRNA genom, který je rozdělen na 9 až 12 segmentů a dohromady může dosahovat až 33 000 bp (base pair, páry bazí). Tyto segmenty mohou být zabaleny až do tří koncentrických vrstev kapsidových proteinů (Steward et al. 2013).

Díky fylogenetickým analýzám celých genomů a genomových segmentů bylo možno vytvořit fylogenetický strom, který rozděluje rybí orthoreoviry na tři genoskupiny, které se liší jak preferovaným hostitelem, tak i geografickým výskytem. PRV-1 byl detekován u lososů obecných, lososů čavyča (*Oncorhynchus tshawytscha*) and lososů kisuč (*Oncorhynchus kisutch*) v Evropě a Americe. PRV-2 byl zachycen především u lososů kisuč v Japonsku (Takano et al. 2016) a PRV-3 má nejvíce hlášených případů z Evropy, kde napadá především pstruhy duhové. Dodatečné analýzy byly následně schopny rozdělit genotyp PRV-1 na dva subtypy, a to PRV-1a a PRV-1b (Polinski et al. 2020).

Fylogram vyznačující všechny výše zmíněné genoskupiny a jejich subtypy je znázorněn níže na obrázku 1.



Obrázek 1: Spojovací fylogram rybího orthoreoviru znázorňující jeho tři genoskupiny a subtypy (PRV-1A a PRV-1b) viru. Jsou zde vyznačeny i geografické oblasti, z kterých byly testované izoláty získány. Převzato a upraveno - (Polinski et al. 2020).

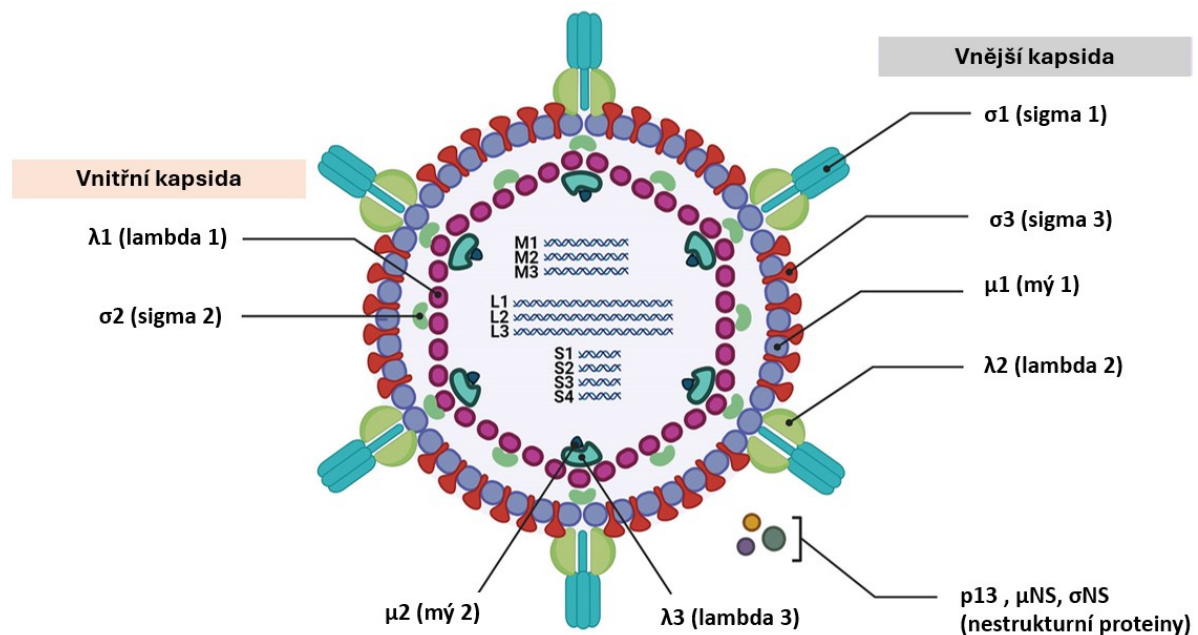
Podle novější studie lze dodatečně rozdělit i genotyp PRV-3 na dva subtypy, a to PRV-3a a PRV-3b. Do subtypu PRV-3a zapadají izoláty získané z Norska a do subtypu PRV-3b prozatím spadají izoláty z Chile a ostatních zemí Evropy (Sørensen et al. 2020).

Byly zaznamenány případy, kdy byly z jednoho hostitele izolovány dvě genoskupiny rybího orthoreoviru, a to především PRV-1 a PRV-3 (Cartagena et al. 2020). Tento fakt by spolu s častým průnikem oblastí výskytu těchto genoskupin potenciálně mohl vést k výměně jednoho či více genomových segmentů (tzv. reassortment) mezi těmito genoskupinami a k vytvoření nových variant viru (Vendramin et al. 2019).

2.1.2. Organizace genomu

Genom orthoreovirů se skládá z deseti segmentů, které můžeme na základě jejich velikosti rozdělit na 3 skupiny: 3 dlouhé segmenty (označované jako L1, L2 a L3), 3 středně dlouhé segmenty (označované jako M1, M2 a M3) a 4 krátké segmenty (označované jako S1, S2, S3 a S4). Virové proteiny jsou následně označovány řeckým písmenem, který odpovídá segmentu, na kterém je protein kódován (Strauss a Strauss 2008).

Níže na obrázku 2 je schematicky znázorněna struktura virionu rybího orthoreoviru s odpovídajícími genomovými segmenty a nestrukturními proteiny.



Obrázek 2: Struktura virionu rybího orthoreoviru. Převzato a upraveno - (Vallejos-Vidal et al. 2022).

Na 3' konci se nachází terminální sekvence (UCAUC-3'), která je konzervovaná pro orthoreoviry a aquareoviry zároveň. Aquareoviry jsou rodem, který také spadá do čeledi Reoviridae, a kvůli jejich příbuznosti s orthoreoviry byly do tohoto rodu nově objevené PRV zpočátku milně zařazovány. Na 5' konci segmentů (5'-GAUAAA/U) se naopak vyskytují terminální sekvence specifické pro jednotlivé druhy z rodu orthoreovirů (tzn. specificky pro

rybí (PRV, piscine orthoreovirus), savčí (MRV, mammalian orthoreovirus) a ptačí (ARV, avian orthoreovirus) orthoreovirus) (Dhamotharan et al. 2018; Markussen et al. 2013).

Většina segmentů je monocistronních, ale S1 a S2 jsou s velkou pravděpodobností bicistronní. Dohromady genom PRV obsahuje minimálně 10 možných ORF (open reading frame), které budou podrobněji probrány níže v kapitole 2.1.3.

2.1.3. Virové proteiny

Přestože se sekvence nukleotidů či aminokyselin u zástupců Orthoreoviridae neprokázala jako velmi konzervovaná, sekundární struktura jejich proteinů je naopak v rámci rodu konzervovaná silně. Sekundární struktura musí zajistit správnou funkci proteinu, a i malá změna se zdá být pro virus limitující. Z tohoto důvodu se jako vzor pro studii proteinů PRV často využívá MRV, který je již lépe prostudovaný (Markussen et al. 2013).

Proteiny translatované z L segmentů se podílejí na virové replikaci. Segment **L1** kóduje protein $\lambda 3$, což je virová RNA-dependentní RNA polymeráza (RdRp) zodpovědná za virovou transkripci a replikaci. PRV RdRp vykazuje jednu z nejvyšších podobností aminokyselinové sekvence spolu s ostatními zástupci orthoreovirů (tzn. MRV a ARV). Tato podobnost přesahuje 30 % a je často specifickým markerem pro zařazení viru do rodu Orthoreoviridae. Segment **L2** kóduje protein $\lambda 2$, jehož hlavní funkcí je vazba 5' čepičky na nově vzniklé virové mRNA. Přestože se aminokyselinové sekvence odlišují od odpovídajících proteinů MRV a ARV, sekvence v hlavních funkčních doménách je konzervovaná. Jedná se například o guanylyltransferázovou či metyltransferázovou doménu, které jsou nezbytné pro vytvoření čepičkové struktury typu 1. Segment **L3** kóduje protein $\lambda 1$, který je jeden z hlavních proteinů vnitřní kapsidy. Mimo funkci strukturního proteinu má také helicázovou, NTPázovou aktivitu a slouží také jako RNA trifosfatáza (Dhamotharan et al. 2018; Markussen et al. 2013).

Protein $\mu 2$ kódován segmentem **M1** váže RNA v jeho jednořetězcové i dvouřetězcové formě a pravděpodobně může sloužit jako kofaktor virové RNA polymerázy. Hlavní protein vnější kapsidy $\mu 1$ je kódován segmentem **M2**. Je také post-translačně autolyticky štěpen na dva fragmenty, menší N-terminální myristylovaný $\mu 1N$ a větší C-terminální $\mu 1C$, které jsou podstatné pro penetraci endozomální membrány a úniku virionu do cytoplazmy. Segment **M3** obsahuje sekvenci nestrukturního proteinu μNS , který se podílí na tvorbě virových továren (tzv. „viral factories“) v buněčné cytoplazmě. Jedná se o vnitrobuněčné kompartmenty, kde dochází ke skládání nových virových částic a jejich maturaci (Dhamotharan et al. 2018; Markussen et al. 2013; Nibert, Schiff a Fields 1991).

Jedním z dalších hlavních proteinů tvořící vnější kapsidu je $\sigma 3$. Je kódován na druhém nejmenším segmentu **S1**. Obsahuje motiv zinkových prstů, který je mezi zástupci orthoreovirů silně konzervovaný. Nové studie také potvrzují, že se protein $\sigma 3$ váže na dsRNA nezávisle na sekvenci obdobně jako protein $\sigma 3$ viru MRV a může tak stejným způsobem inhibovat časnou vrozenou imunitní odpověď (Wessel, Nyman et al. 2015). Segment S1 je jeden z mála, které jsou bicistronní. Mimo protein $\sigma 3$ segment obsahuje i menší ORF kódující protein p13. Jedná

se o integrální membránový protein s cytotoxickou aktivitou. Segment **S2** kóduje protein σ_2 , který spolu s proteinem λ_1 tvoří vnitřní kapsidu. Tento segment je největší z krátkých S segmentů a je také potencionálně bicistronní. Funkce možného proteinu p8 je ale stále neznámá. **S3** segment obsahuje sekvenci pro nestrukturní protein σ_{NS} . Při porovnání tohoto proteinu s jeho homologem u viru MRV byla předpovězena jeho schopnost vázat nukleové kyseliny a podílet se spolu s proteinem μ_{NS} na tvorbě virových továren. Posledním segmentem **S4** je kódován jeden z hlavních determinant virového tropismu. Jedná se o protein σ_1 , který zajišťuje vazbu na hostitelskou buňku při infekci (Dhamotharan et al. 2018; Markussen et al. 2013).

Souhrn virových proteinů, jejich funkcí a postavení ve virovém genomu je uveden v tabulce 1.

Segment	Protein	Funkce
L1	λ_3	RNA-dependentní RNA polymeráza
L2	λ_2	Guanylyltransferáza, metyltransferáza
L3	λ_1	Helikáza, NTPáza, RNA trifosfatáza
M1	μ_2	NTPáza, RNA trifosfatáza, vazba RNA
M2	μ_1	Vnější kapsidový protein, penetrace membrány
M3	μ_{NS}	Nestrukturní protein
S1	σ_3	Vnější kapsidový protein, metaloprotein obsahující zinek
	p13	Cytotoxicita, integrální membránový protein
S2	σ_2	Vnitřní kapsidový protein, vazba RNA
	p8	Neznámá
S3	σ_{NS}	Nestrukturní protein, tvorba virových inkluzí
S4	σ_1	Zachycení na buněčné membráně

Tabulka 1: Seznam genomových segmentů a jejich kódovaných proteinů spolu s jejich funkcemi. Převzato a upraveno - (Dhamotharan et al. 2018)

Strukturní virové proteiny PRV se skládají do tzv. dvojvrstevné schránky, která má 85 nm v průměru. Vnější kapsidová vrstva se skládá z proteinů σ_3 a μ_1 (600 kopií/virion každý). Její součástí je také protein σ_1 , který utváří trimery na každém z dvanácti vrcholů ikosahedronu.

Vnitřní kapsidová vrstva se skládá z proteinů σ_2 (240 kopií/virion) a λ_1 (120 kopií/virion). Proteiny λ_3 a μ_2 se nacházejí uvnitř virionu po jedné kopii v každém z dvanácti vrcholů ikosahedronu. Pentamery proteinu λ_2 tvoří bázi každého z dvanácti vrcholů (dohromady 60 kopií/virion) a tvoří kanál ven z virionu, kterým během transkripce vycházejí nově syntetizované molekuly mRNA (Strauss a Strauss 2008).

Stavba virové partikule je schématicky znázorněna výše na obrázku 2.

2.1.4. Replikační cyklus

Podobně jak je tomu u studií virových proteinů, i zde se prvotně vychází z informací známých o MRV, který slouží jako prototyp orthoreovirové replikace.

Orthoreovirové částice se vážou na povrch hostitelské buňky přes buněčné receptory, jako je JAM-A (Junctional adhesion molecule A, volný překlad jako molekula A adhezních spojů), pomocí virového proteinu $\sigma 1$. Vazbě na buňku napomáhají i koreceptory ve formě glykanů, které se ale na $\sigma 1$ váží s nižší afinitou (Barton et al. 2001; Sahin et al. 2013). Protein $\sigma 1$ PRV je také schopen, mimo receptor JAM-A, vázat na kyselinu sialovou na povrchu erytrocytů a způsobovat tak jejich hemaglutinaci (Dermody et al. 1990).

Po vazbě dochází k endocytóze virionu, snížení pH uvnitř endozomů, proteolýze proteinů vnější kapsidy ($\sigma 3$ a $\mu 1C$) a tvorbě tzv. ISVP (infectious subviral particle, infekční subvirová částice). Protein $\sigma 3$ je degradován, zatímco $\mu 1C$ je štěpen na δ a malý C-terminální ϕ (Strauss a Strauss 2008). Proteinový fragment $\mu 1N$ je uvolněn z virové partikule a penetruje membránu endozomů a vytváří tak velikostně selektivní póry, kterými virion uniká do cytoplazmy (Ivanovic et al. 2008).

ISVP mohou být také vytvořeny pomocí extracelulární proteolýzy vnější kapsidové vrstvy (např. částečným natrávením ve střevech) a mohou vstupovat do buňky rovnou pomocí penetrace hostitelské membrány (Borsa et al. 1979).

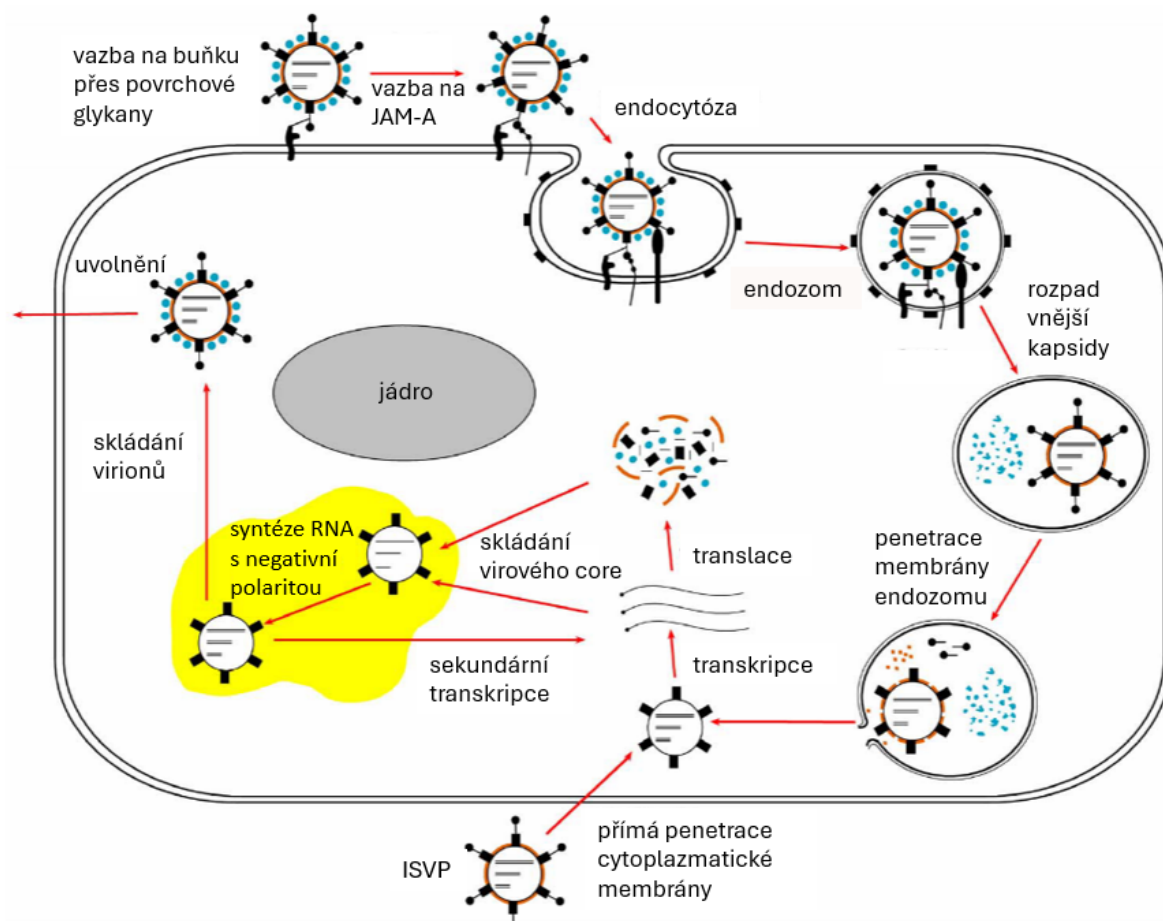
Vstupem virionu do cytoplazmy ztrácí δ , ϕ a $\sigma 1$, je tak vytvořeno virové jádro (tzv. „core“) a je započata primární transkripce. Z každého jednoho segmentu dsRNA vznikne jedna stejně dlouhá molekula mRNA, která obsahuje 5' čepičkovou (tzv. „cap“) strukturu, ale nemá 3' polyA sekvenci (Strauss a Strauss 2008).

Transkripce probíhá uvnitř core, kde se také nachází veškeré enzymy potřebné pro její průběh. Tím pádem je virová dsRNA po celou dobu chráněna uvnitř core a není vystavena buněčným receptorům, které by mohly dsRNA rozpoznat jako cizorodou a spustit antivirovou odpověď. Nově vzniklá mRNA je z core vypouštěna přes jeden z dvanácti vrcholů ikosahedronu, kde je také ukotven celý komplex enzymů zajišťující transkripci (Strauss a Strauss 2008).

Následně v cytoplazmě dojde k translaci virových proteinů a jejich skládání do virových partikulí. Oblastem, kde k tomuto skládání dochází a zároveň se zde shromažďuje virová RNA, se říká tzv. „viral factories“ (volně přeloženo do češtiny jako virové továrny nebo virové inkluze). Tyto oblasti nadále obsahují ve velké míře buněčné mikrotubuly a intermediální filamenta. Na jejich sestavování má hlavní podíl virový protein μNS (Haatveit et al. 2016). Zároveň zde dochází k syntéze RNA vlákna s negativní polaritou uvnitř nově sestaveného virového core, aby byla vznikající dsRNA opět chráněna před cytoplazmatickými senzory a enzymy které dsRNA váží. Mechanismy zabalování správných genových fragmentů do nově vznikajících virových partikulí jsou stále neznámé. Z takto nově sestavených virových partikulí může docházet k sekundární transkripci a zvýší se tak počet virových mRNA a proteinů v buňce. Po sestavení vnější kapsidy virionu dochází k uvolnění virové partikule z buňky a k infekci dalších okolních buněk (Strauss a Strauss 2008). Jakým způsobem nové virové

partikule infikovanou buňku opouští není dodnes přesně známo. Podle dostupných informací se ale tento proces nezdá být lytického charakteru (Polinski et al. 2020).

Schéma orthoreovirové infekce hostitelské buňky a jeho replikačního cyklu je znázorněno níže na obrázku 3.



Obrázek 3: Schéma replikačního cyklu orthoreovirů. Nejprve se virion váže pomocí proteinu $\sigma 1$ na povrch hostitelské buňky přes glykanové koreceptory a následně se váže s vyšší afinitou na receptor JAM-A. Následuje endocytóza virionu a za sníženého pH uvnitř endozomů dochází k degradaci vnější virové kapsidy. Pomocí proteinu $\mu 1N$ se v membráně endozomu vytvoří selektivní póry a virová partikule (nyní ve formě ISVP) uniká do buněčné cytoplazmy. Únikem ztrácí virion další virové proteiny (δ , φ a $\sigma 1$) a vzniká tzv. virové core. Uvnitř core dochází k transkripci a nově vzniklé mRNA jsou vypouštěny přes vrcholy ikosahedronu do cytoplazmy. V cytoplazmě následně dochází k transkripci a syntéze nových virových proteinů. Ty se poté skládají v nové virové partikule, do kterých je skládána i virová RNA. Uvnitř nově sbalených virionů dochází k syntéze RNA vláknů s negativní polaritou a může docházet i k sekundární transkripci. Nové sbalené viriony poté opouští buňku neinvazivním způsobem. Převzato a upraveno - (Sahin et al. 2013).

Jedním z hlavních překážek studií replikačního cyklu a patogeneze PRV je nemožnost kultivace viru *in vitro*. Jelikož virus cílí především erythrocyty, doposud bylo nutno virus kultivovat *in vivo* v krvi pokusných zvířat. Rybí erythrocyty oproti savčím obsahují jádro a ribozomy spolu s dalšími organelami a jsou tedy schopné zajistit virovou replikaci (Claver a Quaglia 2009). Roku 2015 se poprvé povedlo amplifikovat PRV *ex vivo* přenosem lyzátu infikované krve k naivním erythrocytům. Stále se ale jedná o časově náročnou techniku pro běžné laboratorní využití (Wessel, Olsen et al. 2015).

2.1.5. Patogeneze

Rybí orthoreovirus byl objeven roku 2010 po nárůstu úmrtí lososů obecných s charakteristickými příznaky onemocnění zvaném HSMI (Palacios et al. 2010). Od té doby byly objeveny další dva hlavní subtypy rybího orthoreoviru. Každý z nich napadá různé hostitele s jinou preferencí a dohromady způsobují celou řadu příznaků, které často nejsou specifické pouze pro jeden typ onemocnění. Z tohoto důvodu je diagnostika a charakteristika těchto onemocnění složitá a jednotlivé pojmy se často zaměňují či slučují.

Spojícím znakem všech onemocnění je, že buněčným cílem PRV pro virovou replikaci jsou především erythrocyty. V počátečních fázích virové infekce jsou virové titry z krve výrazně vyšší než titry z jiných orgánů a je infikováno až 50 % všech erythrocytů hostitele (Finstad et al. 2014).

2.1.5.1. HSMI (*heart and skeletal muscle inflammation*)

První zmínky o onemocnění způsobené virem PRV jsou zaznamenány již roku 1999, kdy se na západním pobřeží Norska vyšplhala mortalita lososů obecných ve zdejších farmách až na 20 %. Lososi z postižených oblastí měli charakteristické histopatologické léze v srdeční a kosterní svalovině, podle kterých bylo původně toto onemocnění pojmenováno – HSMI (heart and skeletal muscle inflammation) (Kongtorp, Kjerstad et al. 2004).

Hlavními charakteristikami onemocnění jsou epi-, endo- a myokarditida, nekróza myokardu, myositida a nekróza kosterní svaloviny. Podobné patologické nálezy mohou být pozorovány i u jiných infekčních onemocnění ryb, jako je syndrom kardiomyopatie (CMS) a onemocnění slinivky břišní (PD), s kterými může být HSMI často zaměňováno (Kongtorp, Taksdal a Lyngøy 2004).

Potvrzení kauzativního vztahu PRV-1 a HSMI bylo dokumentováno studií Wessela et al., kdy byly částice PRV-1 izolovány z krve infikovaných lososů obecných a injikovány naivním jedincům. Bylo pozorováno vypuknutí onemocnění nejen u injikovaných jedinců, ale i u naivních jedinců chovaných s infikovanými ve stejném prostoru. Nadále byla pozorována závislost na velikosti dávky viru a času dosažení maxima viru v krvi. Čím vyšší dávka viru byla podána, tím dříve se objevily histopatologické příznaky onemocnění. Závislost na velikosti dávky viru a závažnosti onemocnění nebyla potvrzena (Wessel et al. 2017).

Infekce rybím orthoreovirem způsobuje vrozenou antivirovou imunitní obranu v hostitelských erythrocytech, které jsou hlavním cílem PRV. Dochází zde ke zvýšení produkce interferonů, interferonem regulovaných antivirových genů a genů podílejících se na prezentaci antigenu na hlavním histokompatibilním komplexu I (major histocompatibility complex MHC I). Byla pozorována také aktivace negativních regulátorů imunity potlačující prozánětlivou odpověď, jako je např. supresor cytokinové signalizace 1 (SOCS1) nebo receptor pro IL-10. Exprese byla potlačena i u řady dalších genů. Jednalo se například o geny související s tvorbou cytoskeletu, metabolismem, iontovou výměnou, diferenciací, růstovými faktory a mezibuněčnými interakcemi. Virus PRV-1 tedy aktivuje vrozenou imunitní reakci v erythrocytech, ale zároveň dokáže potlačovat ostatní buněčné funkce (Dahle et al. 2015).

Zánětlivá imunitní reakce v srdeční svalovině koreluje s vyšší infiltrací CD8+ T-lymfocytů do tkáně pouze pár dní po vrcholu virové replikace. Toto pozorování by mohlo znamenat, že za léze ve svalovině charakteristické pro HSMI je především zodpovědná imunitní reakce hostitele v podobě cytotoxických CD8+ T-lymfocytů. Tuto teorii podporuje i pozorování zvýšených hodnot IFN- γ a granzymu A, kterým cytotoxické T-lymfocyty eliminují infikované buňky v místech zánětu (Mikalsen et al. 2012). Při zkoumání lézí v kosterní svalovině byl obdobně jako ve svalovině srdeční potvrzen vyšší výskyt cytotoxických CD8+ T-lymfocytů, granzymu A a MHC I pozitivních buněk (Malik, Bjørgen et al. 2021).

2.1.5.2. EIBS (*Erythrocytic inclusion body syndrome*)

EIBS neboli syndrom erytrocytárních inkluzních tělísek je onemocnění, které je charakteristické tvorbou inkluzních tělísek v hostitelských erytrocytech. Postihuje především lososy kisuč a lososy čavyča, u kterých následně způsobuje anémii v různých stupních závažnosti, od mírné až po velmi závažnou. U jedinců infikovaným tímto typem viru byly pozorovány rovněž léze v srdeční svalovině, podobně jak je tomu u HSMI (Takano et al. 2016).

Případy tohoto onemocnění jsou hlášeny převážně ze Spojených států amerických (USA) a Japonska (Meyers 2007; Takano et al. 2016).

Při pozorování inkluzních tělísek v erytrocytech byly nalezeny i virové partikule, které naznačovaly virový původ onemocnění (Michak, Smith, a Hopper 1992). Tato teorie byla později potvrzena, když po infekci lososů kisuč purifikovaným virem PRV-2 došlo k indukci onemocnění. Byla pozorována i závislost závažnosti anémie na stoupající koncentraci virové RNA v krvi (Takano et al. 2016).

2.1.5.3. Onemocnění PRV-3

Dříve bylo toto onemocnění nazýváno HSMI-like pro jeho podobnost s již dříve známým infekčním onemocněním lososů. Po podrobnějším prostudování tohoto nového patogenu však byl jako název nemoci ustanoven pojem „onemocnění PRV-3“.

Onemocnění bylo poprvé popsáno roku 2013 po vypuknutí nákazy ve třech sladkovodních rybích farmách v Norsku, kde docházelo k úmrtí až 12 000 jedinců týdně. Nakažení pstruzi duhová vykazovali příznaky podobající se již dříve popsanému onemocnění HSMI – byly pozorovány zánětlivé léze na srdci a kosterní svalovině. Infikovaní jedinci trpěli řadou dalších příznaků, jako je anémie, letargie nebo selhání oběhové soustavy. Byly také pozorovány bledé žábry a srdce, oteklé ledviny a slezina, nekróza jater a kožní krvácení na břišní straně těla, nebo také séro-hemoragický ascites (sérum a krev volně v břišní dutině) (Olsen et al. 2015).

Nejvíce byly vždy zasaženy srdce, játra a kosterní svalovina. Pankartitida (zánět všech vrstev srdce), často doprovázená hypercelularitou (nadměrné zmožení buněk), byla pozorována u téměř všech nakažených jedinců. U jedinců se závažněji postiženým srdcem byla výrazněji poškozena i kosterní svalovina. V případech silného postižení byly pozorovány známky

hypercelularity a začínající fibrózy (tj. náhrada funkčních buněk tkáně za vazivo) (Olsen et al. 2015).

Obdobně jako u předchozích subtypů byl PRV-3 potvrzen jakožto původce onemocnění experimentální infekcí pstruhů duhových purifikovanými částicemi PRV-3, kdy následně došlo k vypuknutí onemocnění (Hauge et al. 2017).

2.1.5.4. Další onemocnění

Syndrom žloutenky (Jaundice syndrom) byl pozorován u lososů čavyča nakažených virem PRV-1 v Britské Kolumbii, Norsku, Chile a Japonsku. Jedná se o akutní systematické onemocnění s nízkou mortalitou, které se vyznačuje především silnou anémií, žlutým zabarvením břišní oblasti a kolem očí, což je následek lyze infikovaných erytrocytů a následného hromadění bilirubinu v játrech (Cicco et al. 2018; Sakai et al. 1994).

Oproti nakaženým jedincům vykazujícím příznaky HSMI, byla u ryb se žloutenkovým syndromem pozorována například endokartitida (zánět vnitřní vrstvy srdce) s vysokými počty makrofágů v centrech degradace srdeční svaloviny. Téměř všechny hepatocyty vykazovaly různé fáze vakuolární degradace (tvořily tzv. „pěnovou cytoplazmu“). Dále byla pozorována nekróza ledvinových kanálků spolu s vysokou proliferací makrofágů, nebo překrvení sleziny (Cicco et al. 2018).

Přestože spolu případy propuknutí žloutenkového syndromu u lososů čavyča a jejich infekce PRV-1 korelují, experimentálně se zatím nepodařilo toto onemocnění vyvolat a jeho spojitost s rybím orthoreovirem tedy dosud nebyla vědecky potvrzena (Purcell et al. 2020).

Proliferativní syndrom tmavnutí (proliferative darkening syndrome, PDS) byl zaznamenán u divokých pstruhů obecných (*Salmo trutta fario*) nakažených virem PRV-3 v jižním Německu, Švýcarsku a Rakousku. Onemocnění se vyznačuje černou pigmentací na kůži a jeho mortalita dosahuje téměř 100 %. Onemocnění je doprovázené apatií a sníženou chutí k jídlu. Histopatologické změny je možné pozorovat na játrech, ledvinách a slezině v podobě krvácení a multifokálních nekrotických lézí (Kuehn et al. 2018).

Výsledky dosavadních studií zaměřující se na potvrzení patogenního agens tohoto onemocnění se ale výrazně liší, a proto dosud nebyl vztah rybího orthoreoviru a PDS vědecky potvrzen (Fux et al. 2019).

2.1.6. Epidemiologie

Pozorování a zaznamenávání výskytu onemocnění je složitý proces hned z několika důvodů. Detekce virové RNA ještě nemusí znamenat, že dojde či došlo k propuknutí onemocnění. Stejně tak zpozorování příznaků onemocnění, které byly popsány výše v kapitole 2.1.5., ještě nemusí znamenat infekci PRV. Příznaky jsou často nespecifické a mnohdy se kříží s příznaky jiných onemocnění ryb, jako je např. CMS nebo PD (Kongtorp, Taksdal et al. 2004).

PRV v současnosti není zařazeno mezi onemocnění, které by podléhaly povinnému hlášení, a proto neexistují lepší a ucelenější statistiky než ty na úrovních států, jejich oficiálních orgánů či dobrovolných dohlížecích programů.

2.1.6.1. PRV-1

Největší počty případů onemocnění se vyskytují především v Severním Atlantiku a v zemích v jeho okolí. V hromadné studii zahrnující zmíněné oblasti bylo dohromady testováno 1 130 divoce žijících lososovitých ryb v průběhu 9 let. PRV-1 byl detekován například v Dánsku, Švédsku, Irsku a na Faerských ostrovech. Nejvyšší prevalence byla zaznamenána právě na Faerských ostrovech roku 2011 u ryb navracejících se ke tření a dosahovala 43 % (Vendramin et al. 2019).

PRV-1 je v současnosti téměř všudypřítomný u chovaných lososů obecných v Norsku. Onemocnění bylo zachyceno až u 36 % testovaných strdlic (mladí lososi do přibližně 2. roku života) a virová zátěž se s přesunem do slané vody stupňovala (Løvoll et al. 2012). V roce 2023 bylo HSMI ohlášeno u chovaných lososů obecných na 184 místech, převážně právě během jejich životní fáze v moři. Tyto údaje jsou převzaty z diagnostik Norského veterinárního institutu (NVI) a dalších soukromých diagnostických laboratoří. Bylo nahlášeno i velké množství případů detekce PRV-1 bez klinických příznaků HSMI (Sommerset et al. 2024).

Případy onemocnění zaznamenalo i Skotsko, kde se onemocnění HSMI poprvé vyskytlo v červnu roku 2004 a jeho mortalita dosahovala až 9 % (Ferguson et al. 2005). Roku 2017 byl PRV-1 zaznamenán poprvé také v Německu ve dvou rybích farmách na pstruhy duhové a lososy obecné, kde mortalita dosahovala až 20 % (Adamek et al. 2018).

Mimo Evropu bylo PRV-1 zachyceno u chovaných i divoce žijících lososovitých ryb například na západě Kanady a USA. Tato pozorování zahrnovala především Aljašku, Britskou Kolumbii a stát Washington (Marty et al. 2015). Po rozsáhlém testování lososovitých ryb na infekční anémii lososů (infectious salmon anemia virus, ISAV) ve výše zmíněných oblastech, byly nahromaděné vzorky podrobeny ještě další řadě testování. Tentokrát se jednalo o diagnostiku RNA alfaviru lososovitých ryb (salmonid alphavirus, SAV), rybího viru myokarditidy (Piscine myocarditis virus, PMCV) a právě rybího orthoreoviru 1. Ze 121 testovaných chovů byl ve 25 z nich alespoň jeden jedinec infikovaný PRV-1. Prevalence se pohybovala od 2 % do 73 % (Purcell et al. 2018).

Co se Britské Kolumbie týče, byla na zdejší farmě provedena dlouhodobá studie pozorující celý produkční cyklus lososů obecných, jehož výsledky odpovídaly obdobné studii provedené v Norsku. Farma obsahovala v tuto dobu kolem 55 000 jedinců a vrchol onemocnění HSMI byl zaznamenán přibližně 7 měsíců od přesunu lososů do slané vody. Během studie došlo k pozorování korelace mezi výskytem a závažností onemocnění s přítomností stresových situací v podobně řasového květu nebo parazitických buchanek. Mezi stresové situace můžeme zařadit i následnou léčbu a eradikaci těchto komplikací (Di Cicco et al. 2017).

Jelikož se ale výskyt onemocnění HSMI nemusí povinně hlásit, případů vypuknutí onemocnění může být ve skutečnosti mnohem více.

2.1.6.2. PRV-2

Doposud nebyly vedeny žádné screeningové programy pro PRV-2, a proto můžeme čerpat pouze ze záznamů o případech vypuknutí onemocnění EIBS. V těchto případech ale není jistý jejich původce a může se tedy jednat i o onemocnění způsobené jiným patogenem.

První známky onemocnění EIBS byly zaznamenány roku 1982 u lososů čavyča ve Washingtonu, USA. V následujících letech bylo toto onemocnění pozorováno u lososů čavyča a lososů kisuč také v Oregonu, Kalifornii a Idaho. V roce 1990 byla zaznamenána první infekce lososů obecných v norských rybích farmách a na britských ostrovech. Mezi lety 2002 až 2004 byl také zaznamenán první výskyt onemocnění na Aljašce, kde byl navíc doprovázen obligátními i oportunními onemocněními, jako je vibrióza nebo bakteriální onemocnění ledvin (BKD, Bacterial kidney disease) (Meyers 2007).

Případy EIBS byly hlášeny také z Japonska, kdy mezi lety 1986 až 1989 docházelo ke značným úhynům lososů kisuč. Jednalo se přibližně o 2 500 tun ryb ročně a mortalita dosahovala až 20 % (Takahashi et al. 1992).

První studie, kdy byl původce tohoto onemocnění rozeznán jako PRV-2, proběhla v roce 2016, kdy bylo provedeno celogenomové sekvenování vzorků získaných z farem lososů kisuč (*Oncorhynchus kisutch*) v Japonsku. Po experimentální infekci naivní populace izolovaným virem došlo ke snížení jejich hematokritu (podíl objemu erytrocytů a celkového objemu krve) a lehké anémii (Takano et al. 2016).

2.1.6.3. PRV-3

Jedná se o nejnověji objevený subtyp rybího orthoreoviru napadající chované lososy a pstruhy. Poprvé byl pozorován roku 2013, kdy v rybích farmách v Norsku. Nakažení pstruzi duhové vykazovali známky onemocnění připomínající HSMI. Proto bylo onemocnění pracovně nazýváno jako HSMI-like (Olsen et al. 2015). V některých publikacích byl tento subtyp dříve nazýván také jako PRV-*Om* (Dhamotharan et al. 2018).

Tento nový patogen se brzy stal předmětem zájmu a od roku 2017 byly založeny screeningové programy, které silně napomohly budoucím výzkumům, a kterým se podařilo zachytit další ohniska nakažení. Jednalo se například o dvě rybí farmy v Německu na pstruhy duhové a lososy obecné, kde byly roku 2017 zaznamenány ohniska onemocnění připomínající HSMI. Mortalita zde dosahovala 10 až 20 %. Zatímco u lososů obecných byl potvrzen subtyp PRV-1, pstruzi duhové byli napadeni subtypem PRV-3. Po následné analýze získaných sekvencí se zjistilo, že je tento izolát příbuzný izolátu získaného z Chile než z Norska. Toto nečekané geografické rozšíření je pravděpodobně důsledek dnešního celosvětového obchodu (Adamek et al. 2018).

Výše zmíněné izoláty z Chile byly získány z pstruhů duhových, lososů obecných a lososů kisuč během let 2012 až 2015 z farem, kde bylo podezření na vypuknutí onemocnění připomínající HSMI. Jedná se o první případ zachycení PRV v Chile a také o infekci lososa kisuč rybím orthoreovirem. V této studii byl PRV-3 nazýván jako Genotyp II (Godoy et al. 2016).

PRV-3 byl detekován například ve Skotsku, Dánsku a Itálii, kde byly pozorovány klinické příznaky onemocnění u pstruhů duhových. Roku 2018 došlo k sekvenaci izolátů z postižených oblastí a jejich porovnání s izoláty získanými z lososů obecných trpících HSMI. Fylogenetické výsledky potvrdily významnou odlišnost virové varianty napadající lososy obecné od varianty napadající pstruhy duhové. Po vzoru názvosloví PRV-2, jakožto virového subtypu napadající lososy kisuč v Japonsku, byly tyto subtypy poprvé nazvány jako PRV-1 a PRV-3 (Dhamotharan et al. 2018).

Za spolupráce Dánské organizace pro akvakulturu (Dansk Akvakultur) a dobrovolných veterinářů byl roku 2017 založen program na dozor nad výskytem viru PRV-3 v Dánsku. Účastnilo se ho 53 rybích farem a program byl ukončen na jaře roku 2019. Celkově bylo provedeno 75 hromadných testování a bylo analyzováno 2 031 vzorků pomocí metody RT-qPCR. Celkem byl PRV-3 zaznamenán u 38 farem, což je cca 72 % testovaných. U farem, které využívaly recirkulační systém výměny vody s biofiltry se PRV-3 vyskytoval ve 100 % testovaných vzorků, což ukazuje za možný rizikový faktor výskytu. Příznaky onemocnění byly pozorovány pouze v 26 % pozitivních případech (Sørensen et al. 2020).

V roce 2020 došlo k velkému testování volně žijících pstruhů obecných z osmi českých řek na řadu virových a parazitických onemocnění. U ryb odchycených ze dvou řek, jmenovitě Oslava a Jihlava, byl detekován subtyp PRV-3, přestože ryby jinak nevykazovaly žádné zřetelné patologické známky onemocnění. Izoláty vykazovaly vysokou podobnost s izoláty získanými z Německa, Itálie, Dánska, a dokonce i Chile. Jedná se o první záchyt PRV v České republice (Pojezdal et al. 2020).

2.1.7. Způsoby přenosu

Horizontální přenos PRV-1 a PRV-3 byl již potvrzen za experimentálních podmínek při společném soužití naivních a infikovaných jedinců (Hauge et al. 2017; Wessel et al. 2017). U subtypu PRV-2 byl horizontální přenos zatím pozorován pouze bez přesně stanovených experimentálních podmínek na japonských farmách lososů kisuč, kdy docházelo ke zvýšení případů anemie spolu s vyššími detekovanými hodnotami virové RNA (Takano et al. 2016).

Bez ohledu na to, zda potomci pocházeli z chovů, kde se dříve HSMI vyskytlo, nebo ne, po přesunu do mořské vody se u všech zvedla virová nálož PRV-1. Naopak byl zaznamenán její pokles při jejich výlovu ke zpracování (cca 18 měsíců po přesunu do moře), kdy už pravděpodobně dochází k vypořádávání se s onemocněním. Tyto výsledky podporují teorii přenosu onemocnění hlavně horizontální cestou pomocí mořské vody od okolních infikovaných jedinců. Může se jednat o přenos onemocnění mezi divoce žijícími a chovanými jedinci. Zároveň výsledky odpovídají teorii, že za vypuknutí onemocnění HSMI mohou více

enviromentální podmínky (přesun do moře) než samotný status jedince (pozitivita na PRV, virová nálož atd.) (Løvoll et al. 2012).

Jakým způsobem dochází k přenosu mezi divoce žijícími a chovanými lososovitými rybami bylo testováno sekvenací izolátů získaných z Norských farem a řek. Pro vytvoření fylogenetických analýz byly sekvenovány segmenty S1, S2 a S4, kde segment S1 byl ze všech segmentů nejvíce variabilní. Byl potvrzen přenos onemocnění i na velmi velké vzdálenosti, ale podrobnější geografické souvislosti bohužel nebyly nalezeny. Je to pravděpodobně důsledek velmi rychlého a rozsáhlého šíření viru. Kde přesně a v jaké fázi životního cyklu se divoce žijící ryby nejčastěji nakazí, stále není přesně známo. Mezi divokými jedinci k přenosu může dojít během jejich společného krmení při migraci v moři. Mezi divoce žijícími a chovanými jedinci k přenosu může dojít při přesunu divoce žijících ryb z nebo do řek, kde dochází k jejich tření a následnému vývoji nových jedinců. Na těchto cestách mohou proplouvat právě kolem infikovaných farem a může dojít k jejich infekci a naopak. Tyto teorie jsou ale prozatím nepotvrzené (Garseth et al. 2013).

V Dánsku bylo pozorováno šíření viru PRV-3, které opět neodpovídalo přirozenému šíření. Jelikož je tento genotyp vázán na hostitele, jehož jedinci i jikry jsou předmětem obchodu, lze pozorovat spíše přenos onemocnění mezi jednotlivými farmami a dodavateli (Sørensen et al. 2020).

Právě kvůli možnému přenosu onemocnění i přes dodávané jikry, vyvstala nutnost testování i možného vertikálního přenosu z infikovaných jedinců na potomky (Løvoll et al. 2012; Sørensen et al. 2020). Jak přesně k tomu ale dochází je však stále předmětem výzkumu.

Pokud jsou dodrženy podmínky pro přípravu jiker pro komerční využití (tzn. dezinfekce roztokem Buffodine® po dobu 10 minut), oplodněné jikry od infikovaných jedinců jsou poté PRV negativní. Tímto byl tedy vyvrácen případný přenos na potomky přes samotné jikry. Jedná se spíše o přenos přes jejich povrch (Wiik-Nielsen et al. 2012).

Segment L1 viru PRV-2 byl detekován v ovariální tekutině u lososů kisuč v Japonsku, kteří dříve prodělali onemocnění EIBS. Injekcí infikované tekutiny do dutiny břišní naivních ryb byla vyvolána infekce u 37 % jedinců z celkového počtu testovaných ryb. Tímto byla potvrzena i infektivita detekovaného viru v tekutině. Přenos viru na potomky prostřednictvím pohlavních tekutin se tedy jeví jako jedna z možností přenosu (Kumagai et al. 2019).

S pomocí MRV, který často slouží jako vzor pro studie týkající se PRV, byl testován způsob přenosu fekálně-orální cestou. Výsledky získané po podání virového inokula rektální cestou byly obdobné infekci injekcí inokula do břišní dutiny. Virus byl v krvi detekovatelný po 4 dnech od infekce a vrchol virové nálože byl zaznamenán 42. den. Oproti tomu podání inokula orální cestou vykazovalo mnohem pomalejší kinetiku infekce a žádný z infikovaných jedinců na konci nevykazoval známky HSMI (Hauge et al. 2016).

Je zde také možnost vstupu viru do těla přes báze ploutví. Toto bylo pozorováno například u viru IHNV, kde byly použit jeho rekombinantní typ, který obsahoval gen pro luciferázu. Pomocí bioluminiscence byly zaznamenány vysoké hodnoty replikace viru právě v ploutvích a na jejich

bázích. Dalším potvrzením byla perzistence tohoto viru v ploutvích i 3 týdny po infekci (Harmache et al. 2006).

Lososovité ryby nakažené PRV jsou stále hlavním zdrojem infekce, ale jak dlouho a v jaké míře jsou tyto jedinci infekční, je stále předmětem výzkumu. Studie prokázali, že po 4–8 týdnech od nakažení PRV (kohabitace s infekčními jedinci) byli testovaní lososi obecní vysoce infekční (Garver et al. 2016). Po 15. týdnu od infekce testovaných lososů začala míra infektivit virových partikulí klesat. Po 37. týdnu již nebyla infekce možná vůbec, přestože byl virus v krvi infikovaných stále detekovatelný. Toto potvrzuje, že ne všichni pozitivní jedinci jsou stejně infekční. Přesné faktory, které ovlivňují míru šíření viru, a možnost opětovného šíření viru po fázi latence zatím nejsou známy (Garver et al. 2016; Polinski et al. 2019).

Přestože v současnosti neexistují žádné studie o stabilitě PRV mimo tělo hostitele, potvrzení horizontálního přenosu vodou poukazuje na alespoň minimální míru stability viru. PRV se řadí mezi neobalené viry, které obecně vykazují vyšší stabilitu v prostředí než obalené viry, které jsou na inaktivaci prostředím mnohem náchylnější. Pro porovnání, obalené vodní viry jako je např. IHNV vydrží v přirozeně slané vodě pouze několik hodin (Garver et al. 2013). Na druhé straně neobalený virus, jako je virus infekční nekrózy pankreatu (infectious pancreatic necrosis virus, IPNV) zůstává infekční ve slané vodě týdny až měsíce (Mortensen et al. 1998).

Při účelné inaktivaci viru PRV byl testován vliv tepla, pH, UV záření, jódu a dezinfekčního roztoku Virocid na stabilitu PRV. Bylo potvrzeno, že PRV je poměrně stabilní virus. K jeho inaktivaci došlo až při kultivaci při 85 °C po dobu 25 minut, vystavení pH 3 nebo 12, nebo při použití 1% roztoku Virocidu. Při inaktivaci pomocí UV záření bylo potřeba použít 50 mJ/cm². Při dezinfekcích v akvakulturách pomocí UV systémů je běžně používána dávka 25 mJ/cm², která je tedy pro inaktivaci PRV nedostatečná. Oproti tomu při použití jódu, který se běžně používá při dezinfekcích oplodněných jiker, stačila pro inaktivaci PRV pouze poloviční dávka (0,005 % po dobu 10 minut) (Wessel et al. 2020).

2.2. IMUNITNÍ SYSTÉM U LOSOSOVITÝCH RYB

Evoluce sofistikovanějších imunitních systémů spoléhajících se více na specifickou adaptivní imunitu často vykazují vyšší komplexitu a pokročilejší regulaci. Lososovité ryby patří mezi nižší obratlovce žijící ve velmi variabilních vnějších podmínkách, které silně ovlivňují vnitřní prostředí jedince a tím i jeho imunitu. Z tohoto důvodu se ryby spoléhají spíše na obecnější vrozenou imunitu. Jsou to ale první skupinou živočichů, která pro svoji obranu využívá i specifické protilátky. Tato skupina tedy představuje pomyslný zlom ve vývoji imunitních systémů obratlovců (Tort et al. 2004).

U chladnokrevných obratlovců je kinetika imunitní reakce silně závislá na podmínkách okolního prostředí. Jedná se např. o teplotu (Avtalion et al. 1973), salinitu, obsah kyslíku ve vodě nebo o celkovou kvalitu vody. Často se tyto podmínky spojují také s vlivem stresu, který změnou podmínek prostředí často vzniká. Mimo jiné může za zvýšený stres odchyt, přeprava nebo změna potravy. Stres z náhlého snížení teploty může také snižovat produkci specifických

protilátek důležitých pro boj proti patogenům. To může vést k pomalejšímu nástupu imunitní reakce a umožnit patogenu šířit se v těle jedince (Harper a Wolf 2009).

Obsáhnout veškeré důležité informace o tak komplexním a rozsáhlém tématu které imunita představuje, je téměř nemožné. Proto jsem se v tomto přehledu pokusila vybrat nejzásadnější rozdíly mezi savčí imunitou, která je obecně lépe a důkladněji prozkoumána, a imunitou rybí.

2.2.1. Vrozená imunita

Úplně v první řadě obrany před infekčními onemocněními jsou samostatné fyzické bariéry oddělující jedince od okolního prostředí. U lososovitých ryb se jedná hlavně o kůži, trávicí trakt a žábry. Jasná cesta infekce u jednotlivých virů lososovitých ryb není bohužel dodnes přesně známa (Collet 2014). Kromě jejich čistě fyzické obranné funkce můžeme na těchto površích nalézt antibakteriální aktivitu v podobě lysozymů. Tyto enzymy ničí bakterie cílením na jejich bakteriální obaly, kde hydrolyzují glykosidické vazby peptidoglykanu (Fernandes, Kemp a Smith 2004).

Vrozená imunita je hned po fyzických bariérách jako první, která jedince brání proti infekcím. Oproti savcům je obrana proti patogenům u lososovitých ryb silně závislá právě na vrozené imunitě a studie naznačují, že mají silně vyvinutý interferonový systém (Robertsen 2011).

U lososovitých ryb nalezneme obdobné složky a mechanismy imunitní reakce, které jsou známy u vyšších obratlovců. Jedná se například o buňky vrozené imunity, jako jsou např. makrofágy, neutrofilny, eozinofily, NK buňky (natural killers, přirození zabijáci) a dendritické buňky. Dalšími složkami jsou např. interferony, interferonem indukované geny, komplement a další. Stále existuje mnoho oblastí, které nejsou dostatečně prozkoumány a mají potenciál být budoucím předmětem výzkumu (Collet 2014).

Hlavním rysem vrozené imunity je její nespecifické rozeznávání pomocí tzv. PRRs, (pattern recognition receptors, volně přeloženo jako receptory rozeznávající molekulární vzory). Tyto receptory nejsou antigen-specifické, ale jsou specializované na rozeznávání obecných molekulárních vzorů společných pro široké spektrum mikroorganismů (např. lipopolysacharid pro gram-negativní bakterie, peptidoglykan pro gram-pozitivní bakterie), které se během evoluce staly silně konzervovanými (Medzhitov a Janeway 2000).

Mezi tyto receptory u ryb patří například na membránu vázané toll-like receptory (TLR) a cytoplazmatické NOD-like receptory (NLR). Oproti lidem, kde je známo 10 receptorů TLR, u ryb bylo identifikováno přes 20 typů TLR. Například virovou a bakteriální RNA u ryb rozpoznávají TLR3, TLR9, TLR13 a TLR22. Ne u všech TLR je však jejich přesná funkce dodnes objasněna (Sahoo 2020).

Jelikož se ryby spoléhají v případě obrany proti patogenům především na svou vrozenou imunitu, podařilo se rybám oproti savcům určité složky vrozené imunity vylepšit. Jedná se například o komplement, který je poté důležitých faktorem pro aktivaci buněk schopných fagocytózy, lýzy infikované buňky nebo její opsonizaci (Tort et al. 2004). Na rozdíl od savců,

kteří mají pouze jednu izoformu molekuly C3, která je klíčovým hráčem pro aktivaci komplementového systému alternativní cestou, kostnaté ryby mají izoformou víc. Například u pstruha byly nalezeny izoformy tři (C3-1, C3-3 a C3-4), kdy každá z nich vykazovala rozdílnou afinitu k různým povrchům. Zatímco varianty C3-3 a C3-4 se váží s větší afinitou například k povrchům erytrocytů a *E. coli*, C3-1 se váže s větší afinitou k zymosanu (beta-glukan nacházející se např. na povrchu kvasinek a silný aktivátor komplementového systému alternativní cestou) (Sunyer et al. 1996). Větší počet izoform představuje širší rozpětí rozeznávaných povrchů, vyšší počet vznikajících anafylatoxinů (prozánětlivé glykoproteiny, jako je např. C3a, C4a nebo C5a) a zvyšuje tak efektivitu komplementu v boji proti patogenům. Díky těmto uvolněným anafylatoxinům byla pozorována významně vyšší míra fagocytózy. To nadále znamená i větší příjem a prezentace antigenů na MHC komplexech a následně i silnější protilátkovou odpověď (Li et al. 2004).

Jak již bylo výše zmíněno, u ryb nalezneme poměrně dobře vyvinutý interferonový systém. Jedná se o jednu z hlavních složek imunity bojující právě proti virovým infekcím. Interferony patří mezi cytokiny, které jsou produkovány různými typy infikovaných buněk jako odpověď na virovou infekci. Jejich působení dokáže připravit a ochránit okolní buňky před blížící se infekcí. Produkce interferonů je velmi rychlá. U infekce pstruha duhového byla zaznamenána jejich produkce už do dvou dnů od setkání s antigenem. Pomocí interferonů poté dochází k produkci buněčných proteinů, které následně inhibují syntézu nových virových molekul mRNA a potlačují tak syntézu virových proteinů (Ellis 2001).

Mezi hostitelské proteiny, které inhibují syntézu nových mRNA molekul, patří např. 2' - 5' - oligoadenylát syntetáza (2 - 5A syntetáza), protein kináza R (PKR) a Mx proteiny. 2 - 5A syntetáza zajišťuje přes aktivaci RNázy L štěpení molekul RNA. PKR fosforyluje alfa podjednotku eukaryotického iniciačního faktoru 2 (eIF2) a rychle inhibuje translaci. Proteiny Mx jsou GTPázy, které jejich interakcí s virovou polymerázou inhibují virovou transkripci (Stark et al. 1998). U pstruha duhového i u lososa obecného byly nalezeny 3 typy Mx proteinu. Vrchol jejich exprese v makrofázích izolovaných z lososa obecného po stimulaci infekce pomocí poly(I:C) (Polyinosinic:polycytidylic acid, volný překlad jako kyselina polyinosinidová:polycytidylová) byla zaznamenána po 48 hodinách (Nygaard et al. 2000).

2.2.2. Adaptivní imunita

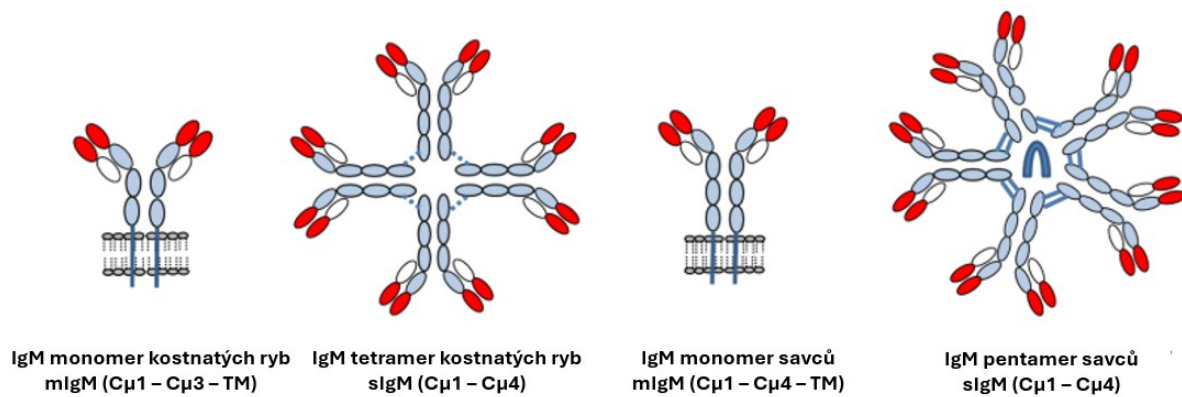
Jak již bylo výše zmíněno, přestože je adaptivní imunita ryb spíše ve zjednodušené a primitivní formě, ryby jsou první skupinou, která vůbec adaptivní imunitu a specifické protilátky využívá. Ryby využívají všechny buňky adaptivní imunity potřebné k vytvoření adaptivní imunitní reakce a následně imunologické paměti (Tort et al. 2004).

Imunglobuliny jsou glykoproteiny produkované B-lymfocyty a mohou být buď vázány na jejich povrchu, kde slouží jako receptory (BCRs), nebo mohou být sekretovány do okolí jako protilátky. Protilátky vznikají u kostnatých ryb obdobným způsobem, jako je tomu u vyšších obratlovců – pomocí V(D)J rekombinace. Do současnosti u nich byly objeveny tři třídy

imunoglobulinů – IgM, IgD a IgT. Do jaké třídy bude protilátka spadat, záleží na složení a počtu konstantních domén těžkých řetězců. Oproti tomu N-terminální variabilní domény těžkých i lehkých řetězců jsou zodpovědné za samostatné rozeznání antigenu a zajišťují specifitu protilátky. Lehké řetězce jsou s těžkými spojeny pomocí disulfidických můstků a stejně tak je to i mezi dvěma těžkými řetězci. Tyto můstky se však u různých druhů liší jako počtem, tak umístěním (Bilal et al. 2021). Protilátky u ryb nepodstupují rekombinaci v podobě izotypového přesmyku, ale za to dokáží zvyšovat svoji specifitu pomocí somatické hypermutace (Flajnik 2002).

IgM je hlavní třídou protilátek u kostnatých ryb s nejvyšší koncentrací v séru. Podílí se na systémové i slizniční imunitě. Je to první izotyp protilátek, který je produkován během ontogeneze. U embryí pstruha duhového byly první lymfocyty nesoucí navázaný IgM detekovány již 12 dní před líhnutím (Castillo et al. 1993).

Těžké řetězce obsahují 4 konstantní domény kódovány exosomy $\mu 1 - \mu 4$. U membránově vázaného imunoglobulinu se transmembránová doména napojí pomocí specifického sestřihu (tzv. splicing) prekurzorové mRNA (pre-mRNA) na $C\mu 3$ doménu místo $C\mu 4$. Tím pádem získáme kratší těžký řetězec, než je tomu u sekretované formy (Wilson et al. 1990). Přestože je IgM přítomný v séru nejčastěji ve formě tetramerů, můžeme nalézt i monomery, dimery a trimery. Zároveň rybí IgM neobsahují J řetězec, který se nachází u savčích IgM a pomáhá stabilizovat jejich pentamerní strukturu (Su et al. 2019). Schéma struktur IgM kostnatých ryb a savců je zobrazen níže na obrázku 4.



Obrázek 4: Schématické znázornění struktury a uspořádání protilátek třídy IgM kostnatých ryb a savců v jejich na membránu vázané nebo sekretované formě. Červeně jsou zvýrazněny variabilní oblasti jak lehkého, tak těžkého řetězce. Konstantní domény lehkého řetězce jsou vyznačeny bíle a konstantní domény těžkého řetězce modře. Obrácené modré U znázorňuje spojující J řetězec. TM – transmembránová doména. Převzato a upraveno - (Bilal et al. 2021).

Třída imunoglobulinů **IgD** je spolu s IgM jednou z nejstarších tříd, která byla až na výjimky objevena u všech čelistnatých obratlovců. U pstruhů duhových nalezneme dvě vysoce glykosilované varianty sekretovaného IgD ve formě monomerů, které vznikají opět specifickým sestřihem pre-mRNA (Ramirez-Gomez et al. 2012).

Poslední třídou imunoglobulinů je **IgT**. Poprvé byl tento typ nalezen u dávného pruhočela (*Danio rerio*) a byl pojmenován jako IgZ (Danilova et al. 2005). Krátce na to byl ale objeven i jeho ortholog u pstruhů duhových, kde byl pojmenován IgT (Hansen, Landis a Phillips 2005).

Přestože se s pojmenováním této skupiny jako IgZ stále můžeme setkat, častěji se do praxe zažil pojem IgT (T od slova „teleost“, neboli kostnatí). U pstruhů duhových je jeho koncentrace téměř dvojnásobná na povrchu sliznic trávicího traktu než v séru. Tento fakt poukazuje na jeho možnou roli především ve slizniční imunitě, obdobně jako izotyp IgA u savců (Zhang et al. 2010).

T-lymfocyty u lososovitých odpovídají T-lymfocytům u savců – dají se rozdělit na pomocné CD4+ a cytotoxické CD8α+ T-lymfocyty, vyvíjejí se v brzlíku a rozeznávají odpovídající MHC komplexy (Toda et al. 2009, 2011).

CD4+ pomocné T-lymfocyty, které pomáhají B-lymfocytům maturovat a produkovat specifické protilátky, stále nejsou u kostnatých ryb důkladně probádány. Přestože jsou u ryb k nalezení cytokiny často související s výskytem Th1 imunitní odpovědi, pro jasné potvrzení přítomnosti Th1 lymfocytů stále chybí znaky pro jejich jednoznačnou identifikaci. Obdobně je to tak i s Th2 a Th17 imunitní odpovědí (Wang a Secombes 2013).

Co se regulačních CD4+ T-lymfocytů (Treg) týče, u čtverzubce zeleného (*Tetraodon nigroviridis*) byly objeveny T-lymfocyty produkující gen FoxP3 (forkhead box P3), který slouží jako transkripční regulátor a také je to jeden z hlavních znaků Treg buněčné linie. U těchto buněk byla ale zatím potvrzena pouze jejich schopnost tlumit buněčnou imunitní reakci *in vitro* (Wen et al. 2011).

2.2.3. Imunitní odpověď na infekci PRV

Protože virus PRV cílí především na erytrocyty, velké množství výzkumů zabývajících se interakcí viru s rybí imunitou se zaměřuje především na mechanismy probíhající právě v těchto buňkách.

Studie ukazují, že samotné erytrocyty mohou mít při virové infekci imunitní funkci. Po simulaci infekce pomocí poly(I:C) v erytrocytech byla zaznamenána exprese PRRs, interferonu α (IFN-α) nebo chemokinu CCL4, který přitahuje ostatní buňky imunitního systému (Morera et al. 2011).

Genomem orthoreovirů je dsRNA, která se v hostitelských buňkách za normálních podmínek nevyskytuje. Z tohoto důvodu je její přítomnost v buňce brána jako jasný signál virové infekce neboli PAMP (molekulární vzorec asociovaný s patogenem, pathogen associated molecular pattern) a jeho odhalením se tedy aktivuje vrozená imunitní odpověď v podobě interferonů typu 1 (Alexopoulou et al. 2001; Jacobs a Langland 1996).

Jeden z hlavních typů receptorů dsRNA v cytoplasmě je PKR, která vazbou na dsRNA inhibuje translaci virových mRNA, a tím je jednou z hlavních složek buněčné protivirové ochrany. (Strong et al. 1998). Dalšími receptory rozeznávajícími virovou dsRNA jsou například endozomálně lokalizované TLR3 (Alexopoulou et al. 2001), cytoplazmatické helikázy RIG-I (receptor indukovatelný kyselinou retinovou I, retinoic acid-inducible gene I) (Yoneyama et al. 2004), MAD5 (protein asociovaný s diferenciací melanomu 5, melanoma differentiation-

associated protein 5) a LGP2 (laboratory of genetics and physiology 2, nebo jiným názvem DHX58) (Chang et al. 2011).

Po aktivaci těchto receptorů dochází k přenosu informace o infekci signální kaskádou a k aktivaci genů potřebných pro vrozenou buněčnou imunitní odpověď, která zahrnuje interferony a faktory regulující jejich transkripci (interferon regulatory factors, IRFs) (Dahle et al. 2015). Tyto složky následně indukují produkci efektorových složek imunity, jako jsou například Mx proteiny nebo viperin. Po šesti týdnech od infekce pstruhů duhových subtypem PRV-3 byly detekovány až 40tinásobné hodnoty exprese proteinů Mx a 130tinásobné hodnoty exprese viperinu. Tato maxima navíc korelovala s vrcholem virové replikace. Oproti tomu lososi obecní byli infikováni subtypem PRV-3 s menší úspěšností (pstruhů bylo testováno jako pozitivních až 90 %, zatímco lososů méně než 50 %) a navíc reagovali na infekci PRV-3 mnohem menším nárůstem exprese antivirových genů (Hauge et al. 2017).

Aby se zamezilo aktivaci této imunitní dráhy, genom orthoreovirů ve formě dsRNA je celou dobu chráněn uvnitř virové kapsidy, kde genetická informace není buněčným receptorům přístupná (Strauss a Strauss 2008). Dalším způsobem zamezení rozeznání dsRNA hostitelskou imunitou a aktivaci interferonové imunity může být u PRV vazba virového proteinu $\sigma 3$ na nukleovou kyselinu (Wessel, Nyman et al. 2015).

Při testování genové exprese u pstruhů duhových po infekci PRV bylo detekováno navýšení solubilních i membránově vázaných variant IgM v ledvinách a v srdci (Johansen et al. 2016). Pro detekci specifických sérových IgM protilátek proti PRV byl vytvořen multiplexní imunotest založený na kuličkách (multiplex bead based immunoassay), který vyniká svojí citlivostí a možností detekce několika protilátek i v malém vzorku plazmy nebo séra. Navázáním rekombinantních virových proteinů na kuličky bylo možné detekovat specifické protilátky proti $\mu 1$ a μNS (Teige et al. 2017).

Co se cytotoxické imunity zprostředkované CD8+ T-lymfocyty týče, jak bylo již výše zmíněno, ta pravděpodobně může za jeden z hlavních příznaků onemocnění HSMI – léze v srdeční svalovině. U infikovaných lososů obecných byl zaznamenán vysoký nárůst infiltrace CD8+ T-lymfocytů do postižených oblastí (Mikalsen et al. 2012). Obdobně u infikovaných pstruhů duhových byla zaznamenána aktivita CD8+ cytotoxických T-lymfocytů v podobě granzymu A v ledvinách, srdci a ve slezině (Johansen et al. 2016).

3. Cíle práce

Roku 2018 byla publikována studie, ve které se autoři pokusili o vývoj DNA vakcíny proti v současnosti problémovému patogenu PRV. Využívali a testovali různé kombinace exprese nestrukturních a strukturních proteinů PRV a vakcinační plazmidy dosáhly mírné ochrany před onemocněním v podobě snížení míry PRV RNA v krvi a histopatologického skóre. Bohužel ale výsledky zatím nedosahovaly dostatečných výsledků nutných pro masovou produkci a nastala nutnost pro vhodnou optimalizaci. Vakcinační plazmidy působily především na vrozenou a buněčnou imunitní odpověď v podobě prezentace antigenu přes MHCI a následné aktivace cytotoxických CD8+ T-lymfocytů (Haatveit et al. 2018).

Cílem mé diplomové práce byla konstrukce vakcinační plazmidů takovým způsobem, aby došlo k vylepšení jejich vakcinační schopnosti a tvorbě specifických protilátek. Jednalo se především o usnadnění přístupu antigenu imunitnímu systému hostitele, jeho prezentaci přes HMCII a omezení jeho hromadění v cytoplazmě. Způsobů, kterými toho lze docílit, je jistě více. My jsme se ale rozhodli vydat cestou změny lokalizace antigenu, a to rovnou dvěma způsoby: sekrecí antigenu do okolí a jeho ukotvení na cytoplazmatické membráně buňky. Pro ukotvení antigenu na membránu byl navíc využit antigenní display za využití již známých glykoproteinů.

- Hlavní cíl:
 - Konstrukce DNA vakcinačních plazmidů založených na strukturních proteinech PRV3 a dodatečných vlastností zajišťující lepší imunogenicitu vakcíny
 - Využitím vakcíny dosáhnout protektivní imunitní odpovědi u hospodářsky významného zástupce lososovitých ryb – pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) a lososa obecného (*Salmo salar*)

- Dílčí cíle:
 - Testování úspěšné exprese antigenu, jeho sekrece či ukotvení na membráně transfekovaných buněk
 - Transfekce rybí linie RTGill-W1
 - Tato linie doposud nebyla úspěšně transfekována a její využití by mohlo významně pomoci dalším výzkumům rybích orthoreovirů
 - Identifikace a kvantifikace viru ve vzorku infikované krve obdržené firmou Dyntec, který pochází z oblasti postižené onemocněním HSMI

4. Materiály a metody

4.1. MATERIÁLY

4.1.1. Buněčné linie, bakteriální a virové kmeny

Buněčné linie

- **HEK 293T**
 - lidská buněčná linie, izolovaná z embryonálních ledvin, která exprimuje velký T antigen Simian viru 40 (SV40)
 - kultivována v kompletním médiu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma-Aldrich) (viz kapitola 4.2.4.1.)

- **RTGill-W1**
 - buněčná linie epitelu izolovaná z žaber pstruha duhového
 - kultivována v kompletním L-15 médiu (viz kapitola 4.2.4.2.)

Bakteriální kmen

- **NEB® 5-alpha Competent *E. coli* (High Efficiency)** (New England Biolabs)
 - Bakteriální kmen odvozen od HD5α kmene
 - Genotyp: fhuA2Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17

Virový kmen

- **Vzorek infikované krve od firmy Dyntec**
 - získáno z oblasti postižené onemocněním odpovídající HSMI (Norsko)

4.1.2. Média, roztoky a antibiotika

Média pro kultivaci bakterií

- **LB (lysogeny broth) médium s nízkým obsahem soli** (Sigma-Aldrich)
 - 10 g/l peptonu, 5 g/l kvasničného autolyzátu, 5 g/l chloridu sodného, pH 7,5

- **LB médium s nízkým obsahem soli a přidaným agarem** (Sigma-Aldrich)
 - 10 g/l peptonu, 5 g/l kvasničného autolyzátu, 5 g/l chloridu sodného, 15 g/l agaru, pH 7,5

- **TPN (Total parental nutrition) médium**
 - 0,5 % (w/v) NaCl, 0,5 % (w/v) kvasničný autolyzát, 2 % (w/v) pepton

- **SOC médium** (Super Optimal Broth)
 - 20 g/l peptonu, 5 g/l kvasničného autolyzátu, 10 mM chlorid sodný; 2,5 mM chlorid draselný, 20 mM glukóza, 10 mM síran hořečnatý, 10 mM chlorid hořečnatý, pH 7,5

Média pro kultivaci buněčných kultur

- **Médium bez séra**
 - DMEM médium (Sigma-Aldrich)
 - Médium L-15 (Leibovitz) s L-glutaminem (Sigma-Aldrich)

- **Kompletní DMEM médium**
 - pro kultivaci buněčné kultury 293T
 - DMEM médium (Sigma-Aldrich)
 - 10 % FBS (v/v; fetal bovine serum; Sigma-Aldrich)
 - 1 % směs antibiotik pro tkáňové kultury (v/v; Sigma-Aldrich)

- **Kompletní L-15 médium**
 - Pro kultivaci buněčné kultury RTGill-W1
 - L-15 médium (Leibovitz) s L-glutaminem (Sigma-Aldrich)
 - 10 % FBS (v/v; Sigma-Aldrich)
 - 1 % směs antibiotik pro tkáňové kultury (v/v; Sigma-Aldrich)

- **CryoStor® cell cryopreservation médium** (Sigma-aldrich)
 - Médium pro přípravu buněčných konzerv
 - 10 % DMSO (w/w), 1% sacharóza (w/w), 0,6% hydroxid sodný, 0,168% hydroxid draselný

Antibiotika

- **Zeocin** (Duchefa Biochemie)
 - výsledná koncentrace 50 µg/ml pro pevná i tekutá média

- **Směs antibiotik a antimykotik pro tkáňové kultury** (Sigma-Aldrich)
 - 100x koncentrovaný roztok
 - Výsledná koncentrace 10 000 U/ml penicilin, 10 mg/ml streptomycin, 25 µg/ml amphotericin B

Nejčastěji používané roztoky

- **PBS 10x** (Phosphate Buffered Saline)
 - 140 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,7 mM KH₂PO₄, pH 7,4
- **Roztok EDTA**
 - 0,02 % (w/v) EDTA v PBS
- **Roztok trypsinu**
 - 0,25 % (v/v) trypsinu v PBS
- **Roztok trypsinu II**
 - 0,01 % (w/v) EDTA a 0,2 % (v/v) trypsinu v PBS
 - pro sklízení buněčné kultury RTGill-W1
- **TBE pufr**
 - 45 mM Tris, 45 mM kyselina boritá, 1 mM EDTA, pH 8
- **TE pufr**
 - 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0

Roztoky pro práci s proteiny

- **Blokační roztok pro Wester blot**
 - 5 % (w/v) roztok odtučněného mléka v PBS pufru
- **Chemiluminiscenční roztok A**
 - dH₂O, 1M Tris-HCl (pH 8,5), 250 mM luminol, 90 mM p-kumarová kyselina
- **Chemiluminiscenční roztok B**
 - dH₂O, 1M Tris-HCl (pH 8,5), 30 % H₂O₂
- **Running pufr 10x** (pH 8,3)
 - 25mM Tris, 192mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS, dH₂O
- **Blotovací pufr 10x** (pH 8,3)
 - 192 mM glycin, 25 mM Tris, 20 % (v/v) metanol, dH₂O
- **Laemliho pufr** (5x; pH 6,8)
 - 50 mM Tris-HCl, 50 % (v/v) glycerol, 5 % (w/v) SDS, 25 % (v/v) 2-merkaptoethanol 0,01 % (w/v) bromfenolová modř, dH₂O
- **RIPA pufr**
 - 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,05 % (v/v) NP-40, 1 % (v/v) deoxycholát sodný, 1 % (v/v) Triton X-100, 0,1 % (v/v) SDS, dH₂O, inhibitory proteáz

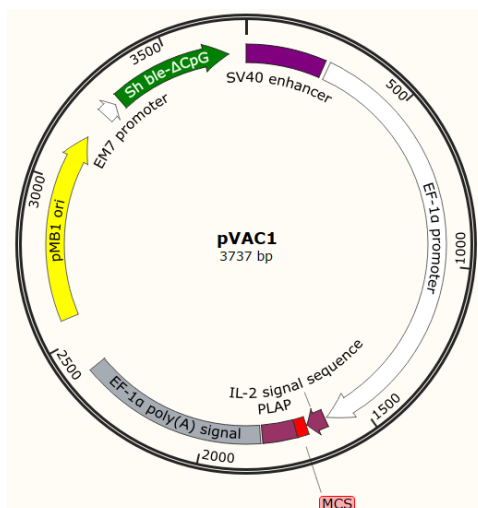
- **Akrylamidový roztok pro přípravu gelů pro SDS-PAGE**

- 30 % akrylamid, 1 % bis-akrylamid, dH₂O

4.1.3. Plazmidy

- **pVAC1-mcs (InvivoGen)**

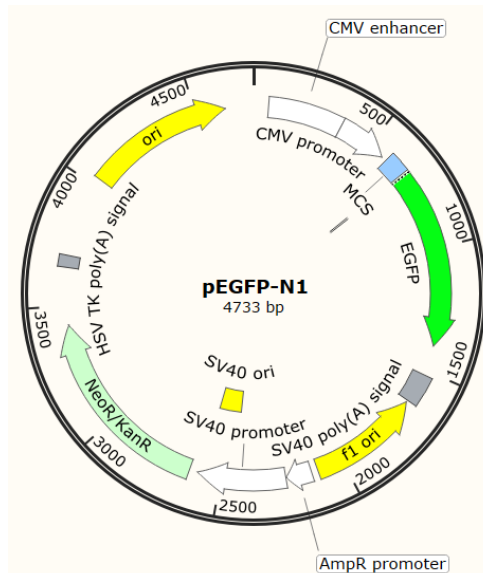
- speciálně navržený plazmid pro přípravu DNA vakcín
- stimuluje humorální imunitní odpověď po intramuskulárním (tzn. do svalu) podání
- obsahuje:
 - SV40 enhancer - zesiluje expresi genu v široké škále hostitelů
 - promotor EF-1α (elongation factor 1 alpha) - zajišťuje expresi zaklonovaného antigenu
 - signální sekvence IL-2 - zajišťuje sekreci exprimovaného antigenu
 - MCS (multiple cloning site) - místo obsahující štěpná místa (BamHI, EcoRV, BglIII a EcoR)
 - kotvící sekvence PLAP
 - hydrofóbní C-terminální sekvence
 - po jejím odštěpení dochází k vazbě glykosylfosfatidylinositolové kotvy a vazby exprimovaného antigenu na membránu
 - EF-1α signální sekvence polyadenylace
 - pMB1 ori - minimální počátek replikace *E.coli*
 - promotor EM7 – zajišťuje konstitutivní expresi antibiotikové rezistence
 - Sh ble-ΔCpG
 - gen *Sh ble* zajišťující rezistenci proti antibiotiku zeocin
 - byly odstraněny všechny CpG motivy pro docílení nižší imunogenicity plazmidu



Obrázek 5: Schéma plazmidu pVAC1-mcs vytvořené v programu SnapGene Viewer.

- **pmaxGFP™** (Lonza)
 - kontrolní plazmid dodávaný v komerční soupravě Amaxa® Cell Line Nucleofector™ Kit V (Lonza)
 - sekvence plazmidu je licencovaná firmou Evrogen a není volně dostupná
 - obsahuje zelený fluorescenční protein (GFP) a gen pro rezistenci proti antibiotiku kanamycin pro bakteriální selekci

- **pEGFP-N1** (Clontech)
 - obsahuje mimo jiné posílený zelený fluorescenční protein (EGFP), cytomegalovirový (CMV) promotor a gen pro rezistenci proti antibiotiku kanamycin a neomycin
 - plazmid byl použit jako zdroj genu pro EGFP pro následnou konstrukci plazmidů pro kontrolu exprese



Obrázek 6: Schéma plazmidu pEGFP-N1 vytvořené v programu SnapGene Viewer.

4.1.4. DNA primery

Veškeré primery byly navrženy pomocí programu NEBuilder Assembly Tool dostupného online na stránkách <https://nebuilder.neb.com/#/>.

- *genové*

Navržené primery obsahují přesahující 5' oblast, která je komplementární se sekvencí plazmidu, do kterého byl následně gen klonován.

Název	Sekvence (5'-3')
pVAC1 G_IHNV FW	AACTACCCCTAAAAGCCATCGCCACCATGGACACCATG
pVAC1 G_IHNV REV	GTATTAGGGATAATGCTAGCTTAGGACCGTTTGCCAG
pVAC1 gp64 gen FW	AACTACCCCTAAAAGCCATCGCCACCATGGTGTCCGCTATCGTGCTG
pVAC1 gp64 gen REV	GTATTAGGGATAATGCTAGCTTAGTACTGGCGGTTACGGTTACG
pVAC1 S1 -IL-2 -PLAP gen FW	AACTACCCCTAAAAGCCATCGCCACCATGCATCACCATC
pVAC1 S1 -IL-2 -PLAP gen REV	GTATTAGGGATAATGCTAGCTAGCGAGTGATCACGAAG
pVAC1 S3 -IL-2 -PLAP gen FW	AACTACCCCTAAAAGCCATCGCCACCATGCATCACCATC
pVAC1 S3 -IL-2 -PLAP gen REV	GTATTAGGGATAATGCTAGCTCAGCCGATGACCACTTG
pVAC1 M1 -IL-2 -PLAP FW	AACTACCCCTAAAAGCCATCGCCACCATGCATCACCATC
pVAC1 M1 -IL-2 -PLAP REV	GTATTAGGGATAATGCTAGCTATTTTTGGCCTCGACGTG
pVAC1 EGFP -IL-2 -PLAP FW	AACTACCCCTAAAAGCCATCGCCACCATGGTGAGCAAG
pVAC1 EGFP -IL-2 -PLAP REV	GTATTAGGGATAATGCTAGCTTACTTGTACAGCTCGTCCATG
pVAC1 S1 +IL-2 -PLAP gen FW	TGGCACTGGTCACTAACTCTGCCACCATGCATCACCATC
pVAC1 S1 +IL-2 -PLAP gen REV	GTATTAGGGATAATGCTAGCTAGCGAGTGATCACGAAG
pVAC1 S3 +IL-2 -PLAP gen FW	TGGCACTGGTCACTAACTCTGCCACCATGCATCACCATC
pVAC1 S3 +IL-2 -PLAP gen REV	GTATTAGGGATAATGCTAGCTCAGCCGATGACCACTTG
pVAC1 M1 +IL-2 -PLAP FW	TGGCACTGGTCACTAACTCTCATCACCATCACCATCAC
pVAC1 M1 +IL-2 -PLAP REV	GTATTAGGGATAATGCTAGCTATTTTTGGCCTCGACG
pVAC1 EGFP +IL-2 -PLAP FW	TGGCACTGGTCACTAACTCTGCCACCATGGTGAGCAAG
pVAC1 EGFP +IL-2 -PLAP REV	GTATTAGGGATAATGCTAGCTTACTTGTACAGCTCGTCCATG
pVAC1 S1 -IL-2 +PLAP gen FW	AACTACCCCTAAAAGCCATCGCCACCATGCATCACCATC
pVAC1 S1 -IL-2 +PLAP gen REV	GGATGGGCAGCATCAGTGGTGGGAGTGATCACGAAGTC
pVAC1 S3 -IL-2 +PLAP gen FW	AACTACCCCTAAAAGCCATCGCCACCATGCATCACCATC
pVAC1 S3 -IL-2 +PLAP gen REV	GGATGGGCAGCATCAGTGGTGGGAGTGATCACGAAGTC
pVAC1 M1 -IL-2 +PLAP FW	AACTACCCCTAAAAGCCATCGCCACCATGCATCACCATC
pVAC1 M1 -IL-2 +PLAP REV	GGATGGGCAGCATCAGTGGTTTTTTGGCCTCGACGTGAG
pVAC1 EGFP -IL-2 +PLAP FW	AACTACCCCTAAAAGCCATCGCCACCATGGTGAGCAAG
pVAC1 EGFP -IL-2 +PLAP REV	GGATGGGCAGCATCAGTGGTCTTGTACAGCTCGTCCATG

- *plazmidové*

Primery byly navrženy tak, aby výsledný PCR produkt obsahoval pouze požadované oblasti plazmidu pVAC1-mcs.

Název	Sekvence (5'-3')
pVAC1 -IL2 -PLAP FW	GCTAGCATTATCCCTAATAC
pVAC1 -IL2 -PLAP REV	GATGGCTTTTAGGGGTAG
pVAC1 +IL-2 -PLAP FW	GCTAGCATTATCCCTAATAC
pVAC1 +IL-2 -PLAP REV	AGAGTTAGTGACCAGTGC
pVAC1 -IL-2 +PLAP FW	ACCACTGATGCTGCCATC
pVAC1 -IL-2 +PLAP REV	GATGGCTTTTAGGGGTAGTTTTC

- *IHNV display*

Primery pro vytvoření vakcinačních plazmidů obsahující virový antigen spojený s G proteinem viru IHNV, který zajistí jejich kotvení v membráně.

Název	Sekvence (5´-3´)
pVAC1 plazmid IHNV display FW	GACACCGCAAGCGAATCAG
pVAC1 plazmid IHNV display REV	GGGTTTGACGGTTTGGCTG
pVAC1 S1 IHNV display gen FW	ACAGCCAAACCGTCAAACCCGCCACCATGCATCACCATC
pVAC1 S1 IHNV display gen REV	TCTGATTCGCTTGCGGTGTCTTAGCGAGTGATCACGAAG
pVAC1 S3 IHNV display gen FW	ACAGCCAAACCGTCAAACCCGCCACCATGCATCACCATC
pVAC1 S3 IHNV display gen REV	TCTGATTCGCTTGCGGTGTCTCACGCCGATGACCACTTG
pVAC1 M1 IHNV display gen FW	ACAGCCAAACCGTCAAACCCCATCACCATCACCATCACG
pVAC1 M1 IHNV display gen REV	TCTGATTCGCTTGCGGTGTCTTTTGGCCTCGACGTGAG
pVAC1 EGFP IHNV display FW	ACAGCCAAACCGTCAAACCCGTGAGCAAGGGCGAGGAG
pVAC1 EGFP IHNV display REV	TCTGATTCGCTTGCGGTGTCTTGTACAGCTCGTCCATGC

- *gp64 display*

Primery pro vytvoření vakcinačních plazmidů obsahující virový antigen spojený s glykoproteinem gp64 bakuloviru, který zajistí jejich kotvení v cytoplazmatické membráně.

Název	Sekvence (5´-3´)
pVAC1 plazmid gp64 display FW	GCTCAGATGAAGACCGGTC
pVAC1 plazmid gp64 display REV	GTTGCAGTGTTACAGCAGC
pVAC1 S1 gp64 display gen FW	TCGCTGCTGAACACTGCAACGCCACCATGCATCACCATC
pVAC1 S1 gp64 display gen REV	GGACCGGTCTTCATCTGAGCCTAGCGAGTGATCACGAAG
pVAC1 S3 gp64 display gen FW	TCGCTGCTGAACACTGCAACGCCACCATGCATCACCATC
pVAC1 S3 gp64 display gen REV	GGACCGGTCTTCATCTGAGCTCACGCCGATGACCACTTG
pVAC1 M1 gp64 display gen FW	TCGCTGCTGAACACTGCAACCATCACCATCACCATCACG
pVAC1 M1 gp64 display gen REV	GGACCGGTCTTCATCTGAGCTTTTGGCCTCGACGTGAG
pVAC1 EGFP gp64 display FW	TCGCTGCTGAACACTGCAACGTGAGCAAGGGCGAGGAG
pVAC1 EGFP gp64 display REV	GGACCGGTCTTCATCTGAGCTTGTACAGCTCGTCCATGC

- *sekvenace*

Pro sekvenaci všech typů vakcinačních plazmidů byly navrženy následující primery:

Název	Sekvence (5'-3')
pVAC1 seq FW	GCTTCAGACAGTGGTTCAAAG
pVAC1 seq REV	GAGACCGTTCTTCCACCAC
pVAC1 IHNV display seq REV	AGATAGGCAAAGTCATCCAAGT
pVAC1 gp64 display seq REV	CTTGGATGTGCATCAGGTCG
pVAC1 IHNV display seq REV 2	GAGGTCGTTTCCGACTGAC
pVAC1 gp64 display seq REV 2	GACGGATGGACCACATCAG
pVAC1 M1 seq FW	GAAACTGAACCTTTTCG
pVAC1 M1 seq FW 2	GTTCAAGCGTCCAAGGAGC

- *RT-PCR a qPCR*

Primery byly převzaty z předchozí studie (Adamek et al. 2018) pro identifikaci, detekci a kvantifikaci viru ve vzorku krve dodaného firmou Dyntec.

Název	Sekvence (5'-3')	Nasedání
PRV_Sybr_gF	AATTGAAGACCTCCCATCC	PRV-1, segment L3, λ1
PRV_Sybr_qR	GGTAAATCATCGCCAACCTC	
PRV_Om_Sybr_gF2	CGGGCATAGGATTGGTCTGT	PRV-3, segment 1, σ3
PRV_Om_Sybr_qR2	GGTAGGCGTCGGTGTTTG	

4.1.5. Geny pro virové proteiny

Veškeré geny pro virové proteiny byly syntetizovány firmou Thermo Fisher Scientific a byly vloženy do standardního vektoru pMX. Jedná se o vektor odvozený od plazmidu pUC19 a obsahuje také gen pro rezistenci proti antibiotiku kanamycin.

- **DKPRV317_HISsigma_1**
 - vektor obsahuje syntetizovaný gen pro virový protein σ1
 - GeneBank: MW012865.1
 - před samotný gen byla vložena sekvence Kozakové (GCCACC) následovaná sekvencí pro značku His-tag skládající se z šesti histidinů (CATCACCATCACCATCAC)
- **DKPRV317_HISsigma_3**
 - vektor obsahuje syntetizovaný gen pro virový protein σ3
 - GeneBank: MW012868.1
 - Před samotný gen byla vložena sekvence Kozakové (GCCACC) následovaná sekvencí pro značku His-tag skládající se z šesti histidinů (CATCACCATCACCATCAC)

- **DKPRV317_HISmu_1**
 - vektor obsahuje syntetizovaný gen pro virový protein μ 1
 - GeneBank: MW012870.1
 - před samotný gen byla vložena sekvence Kozakové (GCCACC) následovaná sekvencí pro značku His-tag skládající se z šesti histidinů (CATCACCAT CACCATCAC)

- **IHNV_HISGprot**
 - vektor obsahuje syntetizovaný gen pro virový glykoprotein G viru IHNV (GeneBank: KP216199.1)
 - před samotný gen byla vložena sekvence Kozakové (GCC ACC) následovaná sekvencí pro značku His-tag skládající se z šesti histidinů (CAT CAC CAT CAC CAT CAC)

- **bacE2_HISgp64**
 - vektor obsahuje syntetizovaný gen pro virový glykoprotein gp64 bakuloviru (GeneBank: KM667940.1)
 - před samotný gen byla vložena sekvence Kozakové (GCC ACC) následovaná sekvencí pro značku His-tag skládající se z šesti histidinů (CAT CAC CAT CAC CAT CAC)

- **PRV1_NOR-2018_NL-V4105_L3**
 - vektor obsahuje syntetizovaný gen pro virový protein λ 1 (GeneBank: MW260147.1)
 - tento gen byl použit pro sestavení křivky standardu při měření virové kvantifikace metodou RT-qPCR

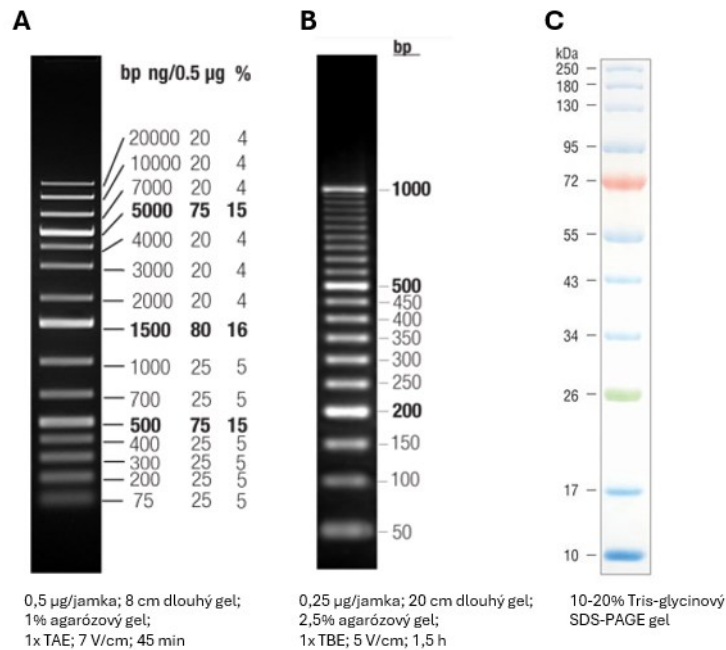
4.1.6. Markery molekulových hmotností

- **GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder** (Thermo Fisher Scientific)
 - marker molekulových hmotností používaný pro určení délky fragmentů DNA při agarózové DNA elektroforéze
 - umožňuje odhadnutí délky DNA segmentů od 75 do 20 000 bp

- **O'RangeRuler 50 bp DNA Ladder, ready-to-use** (Thermo Fisher Scientific)
 - marker molekulových hmotností používaný pro určení délky fragmentů DNA při agarózové DNA elektroforéze
 - umožňuje odhadnutí délky DNA segmentů od 50 – 1000 bp

- **Color Prestained Protein Standard, Broad Range (New England Biolabs)**
 - marker molekulových hmotností používaný pro určení délky proteinů při SDS-PAGE elektroforéze
 - vysoce purifikované, rekombinantní proteiny kovalentně napojené na oranžový, zelený nebo modrý chromofor
 - umožňuje odhadnutí molekulové hmotnosti od 10 – 250 kDa

Rozpětí markerů je k vidění na obrázku 7.



Obrázek 7: Markery molekulových hmotností. (A) GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific); (B) O'RangeRuler 50 bp DNA Ladder, ready-to-use (Thermo Fisher Scientific); (C) Color Prestained Protein Standard, Broad Range (New England Biolab)

4.1.7. Barviva

- **Midori Green Advance DNA Stain (Nippon Genetics)**
 - barvivo pro značení DNA při agarózové DNA elektroforéze
 - použito v agarózovém gelu v poměru 1:25 000
- **10x Loading Buffer (Takara Bio)**
 - Nanášecí barvivo pro DNA elektroforézu

4.1.8. Protilátky

- **Primární protilátky**
 - **PentaHis Tag Monoclonal Antibody (Thermo Fisher Scientific)**
 - myší monoklonální protilátka proti značce His-tag
 - použito v ředění 1:500

- **RbαGFP** (Abcam)
 - králičí monoklonální protilátka proti GFP
 - použito v ředění 1:1000
- *Sekundární protilátky*
 - **GαM IgG - HRP** (Bio-Rad)
 - kozí monoklonální protilátka proti myším imunoglobulinům IgG konjugovaná s křenovou peroxidázou (HRP)
 - použito v ředění 1:1000
 - **GαR IgG - HRP** (Bio-Rad)
 - kozí monoklonální protilátka proti králičím imunoglobulinům IgG konjugovaná s HRP
 - použito v ředění 1:1000

4.1.9. Enzymy a jejich směsi

- **Q5® High-Fidelity DNA polymeráza** (New England Biolabs): 2 U/μl
- **Platinum™ SuperFi™ DNA polymeráza** (Thermo Fisher Scientific): 2 U/μl
- **OneTaq® DNA polymeráza** (New England Biolabs): 5 U/μl
- **gb SG PCR Master Mix** (Generi Biotech): obsahuje hot-start Taq DNA polymerázu, reakční pufr, dNTP, MgCl₂ a barvivo Sybr green

4.1.10. Komerční soupravy a transfekční činidla

- *Kity pro izolaci a purifikaci nukleových kyselin*
 - **GeneJET PCR Purification Kit** (Thermo Fisher Scientific): pro přečištění DNA po PCR reakci
 - **GeneJET Gel Extraction Kit** (Thermo Fisher Scientific): pro izolaci DNA z agarózového gelu
 - **GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit** (Sigma-Aldrich): izolace DNA pro sekvenace
 - **NucleoBond® Xtra Midi** (Macherey-Nagel): izolace plazmidové DNA pro následnou transfekci savčích a rybích buněk
 - **NucleoSpin® Virus** (Macherey-Nagel): izolace virové DNA a RNA
- *Kit pro klonování*
 - **NEBuilder® HiFi DNA Assembly Cloning Kit** (New England Biolabs)

- *Kit pro izolaci buněčných membrán*
 - **Mem-PER™ Plus Kit** (Thermo Fisher Scientific)
- *Kit pro syntézu cDNA*
 - **LunaScript® RT SuperMix kit** (New England Biolabs)
- *Transfekční činidla*
 - **Turbofect Transfection Reagent** (Thermo Fisher Scientific)
 - **ViaFect™ Transfection Reagent** (Promega)
 - **GeneJet™ Reagent (II)** (SigmaGen® Laboratories)
 - **Lyovect™** (InvivoGen)
- *Kit pro elektroporaci*
 - **Neon™ NxT Electroporation System 10-µL Kit** (Thermo Fisher Scientific)

4.2. METODY

4.2.1. Práce s bakteriálními kmeny

4.2.1.1. Příprava kompetentních buněk

Bakteriální kolonie NEB® 5–alpha *E. coli* byla kultivována přes noc v 20 ml TPN média v orbitálním inkubátoru při 200 rpm a 37 °C. Odpovídající objem narostlé bakteriální kultury byl druhý den přenesen do 600 ml předeřátého TNP média tak, aby bylo dosaženo optické denzity (OD) při vlnové délce 600 nm v hodnotě 0,1. Bakteriální kultura byla opět kultivována v orbitálním inkubátoru při 200 rpm a 37 °C a každým 20 minut byla měřena její optická denzita. Po dosažení $OD_{600} = 0,5 - 0,7$ byla bakteriální kultura rozdělena do 12 x 50 ml zkumavek a rychle přenesena na led. Zde se ponechala zchladit 15–20 minut. Od této doby bylo po zbytek přípravy kompetentní bakteriální kultury podstatné, aby teplota směsi při žádné z manipulací nepřesáhla 4 °C.

Bakterie byly centrifugovány při 3000 × g po dobu 12 minut při 4 °C. Supernatant byl odstraněn a bakterie byly resuspendovány na ledu v 600 ml vychlazené ddH₂O (tj. 12 x 50 ml). Bakterie byly opět centrifugovány za stejných podmínek, supernatant byl odstaněn a pelet byl resuspendován na ledu v 300 ml vychlazené ddH₂O. Pro lepší manipulaci byla bakteriální suspence rozdělena do 6 x 50 ml zkumavek. Bakterie byly opět centrifugovány za stejných podmínek, supernatant byl odstraněn a pelet byl tentokrát resuspendován na ledu v 25 ml vychlazeného 10 % (v/v) glycerolu. Bakterie byly opět centrifugovány za stejných podmínek, supernatant byl odstraněn a pelet byl resuspendován na ledu v 10 ml vychlazeného 10 % (v/v) glycerolu. Poslední kolo centrifugace bylo provedeno opět za stejných podmínek, supernatant byl odstraněn a získaný pelet byl resuspendován na ledu v 1,2 ml vychlazeného 10 % (v/v) glycerolu.

Bakteriální suspenze byla rozdělena do sterilních vychlazených 1,5 ml mikrozkušavek po 50 µl. Vzniklé aliquoty byly rychle zamraženy vhozením do tekutého dusíku a byly uchovány při -80 °C.

4.2.1.2. Transformace bakterií elektroporací

Konzerva kompetentní bakteriální kultury *E.coli* (NEB® 5-alpha Competent *E. coli* High Efficiency, New England Biolabs) byla rozmražena na ledu. Do nové vychlazené mikrozkušavky bylo přeneseno 50 µl suspenze a byly přidány 2 µl assembly směsi (připraveno podle postupu v kapitole 4.2.2.7.). Celý objem směsi byl přenesen do předem vychlazené elektroporační kyvety s mezerou 2 mm mezi elektrodami. Kyveta byla pečlivě osušena a vložena do elektroporátoru (Gene Pulser; Bio-Rad). Následně byl aplikován elektrický pulz (2,5 kV, 25 µF, 200 Ω) trvající 4,5 – 5 ms. Po vyjmutí kyvety z elektroporátoru byl k bakteriální směsi co nejrychleji přidán 1 ml SOC média a celý objem byl přenesen do 15 ml zkumavky. Směs se nechala inkubovat 1 hodinu v orbitálním inkubátoru při 200 rpm a 37 °C. Následně bylo vyseto po 100 µl bakteriální kultury na agarové Petriho misky obsahující selekční antibiotikum zeocin a Petriho misky byly ponechány 24 hodin v termálním inkubátoru při 37 °C.

4.2.1.3. Kultivace bakterií v tekutém médiu

Do Erlenmeyerovy baňky obsahující 100 ml kultivačního LB low salt média s přidaným antibiotikem zeocin bylo vhozeno sterilní párátka s odebranou bakteriální kulturou (získané z bakteriální konzervy nebo z Petriho misky). Bakterie byly kultivovány 16–20 h v orbitálním inkubátoru při 200 rpm a 37 °C.

4.2.1.4. Kultivace bakterií na pevných médiích

Pro kultivaci a selekci bakteriálních kultur bylo použito Low salt LB médium s přidavkem agaru (Sigma-Aldrich) a antibiotika zeocinu. Příslušná bakteriální kultura byla nakapána do středu agarové plotny a rozetřena opálenou bakteriální kličkou po celé ploše plotny. Pro lepší izolaci bakteriálních kultur mohou být pomocí sterilního párátka vybrané monokolonie přeneseny na novou agarovou Petriho misku. Bakterie na agarových Petriho miskách byly inkubovány v termostatu dnem vzhůru 16–20 hodin při 37 °C.

4.2.1.5. Skladování bakteriálních kultur

Bakteriální kultury kultivované přes noc v tekutém LB médiu při 37 °C, 200 rpm byly pro dlouhodobé skladování uchovávány v 1,5 ml mikrozkušavkách s 40 % glycerolem (v/v) v poměru 1:1. Bakteriální konzervy byly uchovávány při -80 °C.

4.2.2. Práce s DNA

4.2.2.1. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pro amplifikaci DNA segmentů byla použita Q5® High-Fidelity DNA polymeráza s přidáním GC enhanceru. Primery pro amplifikaci byly navrženy tak, aby výsledné segmenty obsahovaly navzájem komplementární přesahy nutné pro bezesové klonování pomocí NEBuilder® HiFi DNA Assembly Cloning kitu. Seznam primerů je k nahlédnutí v kapitole 4.1.4.

PCR směs o objemu 50 μ l obsahovala následující složky:

Složka směsi	Objem (μ l)
Templát (5 ng/ μ l)	2
Forward primer (10 μ M)	1,5
Reverse primer (10 μ M)	1,5
5X Q5 High GC Enhancer	10
PCR H ₂ O	10
Q5 High-Fidelity 2X Master Mix	25

Tabulka 2: Složení PCR reakce s použitím Q5® High Fidelity polymerázy a GC enhanceru na 50 μ l.

PCR reakce probíhala podle následujícího programu:

Krok	Počet opakování	Teplota (°C)	Čas
Počáteční denaturace	1	98	30 s
Denaturace	30	98	10 s
Nasedání primerů		50–72	30 s
Elongace		72	30 s/kb
Finální elongace	1	72	2 min

Tabulka 3: Program pro PCR reakci s použitím Q5® High-Fidelity DNA polymerázy.

Jelikož jsme při amplifikaci plazmidových fragmentů získávali nízké výtěžky, byla později pro jejich amplifikaci využita DNA polymeráza Platinum™ SuperFi™ II. Tato polymeráza dokáže amplifikovat dlouhé a těžce amplifikovatelné sekvence obsahující četné GC oblasti. SuperFi™ II pufr navíc obsahuje stabilizační molekuly, které zajišťují pevné a přesné nasedání primerů na templát a odstraňují tak nutnost optimalizace teploty nasedání pro každý primerový pár. Oproti Q5® High-Fidelity DNA polymeráze se vyznačuje až pětinasobnou přesností syntézy.

PCR směs o objemu 50 μ l obsahovala následující složky:

Složka směsi	Objem (μ l)
Templát (5 ng/ μ l)	1
Forward primer (10 μ M)	2,5
Reverse primer (10 μ M)	2,5
5X SuperFi™ II pufr	10
Platinum™ SuperFi™ II DNA polymeráza	1
dNTPs (10 mM)	1
PCR H ₂ O	32

Tabulka 4: Složení PCR reakce s použitím Platinum™ SuperFi™ II DNA polymerázy na 50 μ l.

PCR reakce probíhala podle následujícího programu:

Krok	Počet opakování	Teplota (°C)	Čas
Počáteční denaturace	1	98	30 s
Denaturace	30	98	10 s
Nasedání primerů		60	10 s
Elongace		72	30 s/kb
Finální elongace	1	72	5 min

Tabulka 5: Program pro PCR reakci s použitím Platinum™ SuperFi™ II DNA polymerázy.

Velikost PCR produktů byla potvrzena pomocí agarózové DNA elektroforézy.

4.2.2.2. Colony PCR

Pro potvrzení správného vložení inzertu do plazmidu byla použita metoda Colony PCR. Templát byl získán setřením části bakteriální kolonie z pevného média sterilním párátkem a přenesením do 100 μ l PCR H₂O. Bakterie byly ve vodě resuspendovány a vloženy na 5 minut do termobloku na 96 °C. Bakteriální suspenze byla následně stočena na stolní centrifuze při 14 000 x g po dobu 5 minut. Získaný supernatant byl použit jako templát pro následující PCR reakci zprostředkovanou OneTaq® DNA polymerázou.

PCR směs o objemu 20 μ l obsahovala následující složky:

Složka reakce	Objem (μ l)
Templát	2,5
Forward primer (10 μ M)	0,6
Reverse primer (10 μ M)	0,6
dNTPs (10 mM)	0,4
5X OneTaq® pufr	2
OneTaq® DNA polymeráza	0,2
Triton X-100	2
PCR H ₂ O	11,7

Tabulka 6: Složení směsi pro colony PCR s použitím OneTaq® DNA polymerázy na 20 μ l.

PCR reakce probíhala podle následujícího programu:

Krok	Počet opakování	Teplota (°C)	Čas
Počáteční denaturace	1	94	30 s
Denaturace	30	94	30 s
Nasedání primerů		45–68	30 s
Elongace		68	1 min/kb
Finální extenze	1	68	5 min

Tabulka 7: Program pro colony PCR s použitím OneTaq® DNA polymerázy.

Velikost PCR produktů byla potvrzena pomocí agarózní DNA elektroforézy (popsáno v kapitole 4.2.2.4.).

4.2.2.3. Čištění DNA z PCR směsi

Čištění PCR produktů od ostatních složek PCR směsi bylo provedeno pomocí kitu GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific).

K PCR směsi bylo přidáno odpovídající množství vazebného pufru (Binding Buffer) v poměru 1:1 (tzn. k 50 μ l PCR směsi přidám 50 μ l pufru). Směs byla promíchána pipetou a přenesena do GeneJET afinitní kolony, která již byla sestavená se sběrnou tubou. Kolona byla centrifugována 1 minutu při 14 000 x g a roztok, který protekl kolonou, byl odstraněn. Do kolony bylo přidáno 700 μ l promývacího pufru (Wash Buffer) a kolona byla opět centrifugována za stejných podmínek. Proteklý pufr byl odstraněn a kolona byla opět centrifugována za stejných podmínek, aby se docílilo úplného odstranění pufru. Kolona byla přemístěna do nové sterilní 1,5 ml mikrozkušavky a bylo na ní nanášeno 50 μ l elučního pufru (Elution Buffer). Kolona byla opět centrifugována za stejných podmínek. Mikrozkušavka obsahující přečištěnou DNA byla uchována při -20 °C.

4.2.2.4. Agarózová DNA elektroforéza

Pro kontrolu délky DNA segmentů získaných z PCR reakcí a kontrolu integrity izolované DNA a plazmidů byl použit 1 % agarózový gel (w/v). Pro separaci DNA segmentů o velikosti menší 200 bp, které byly získány RT-PCR reakcí (více v kapitole 4.2.3.3.) byl použit 1,5 % agarózový gel (w/v).

Odpovídající množství agarózy bylo rozpuštěno v 0,5 X TBE pufru a rozeřháto v mikrovlnné troubě. Gel byl následně schlazen pod tekoucí vodou na 50–60 °C. Pro vizualizaci DNA po UV světlem bylo do gelu přidáno interkalační barvivo Midori Green Advance DNA Stain (Nippon Genetics) v množství 1 µl/25 ml gelu. Gel byl nalit do formy a byl do něj vložen hřeben pro vytvoření jamek. Gel se ponechal vychladnout a ztuhnout přibližně 30 minut. Následně byl z gelu hřeben vyjmut, byly odstraněny boční gumové záložky a gel byl přenesen do elektroforetické vany. Gel byl zalit 0,5 X TBE pufrům a do vhodné jamky/jamek byl nanesen marker molekulových hmotností (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder nebo O'RangeRuler 50 bp DNA Ladder, viz kapitola 4.1.6.). Vzorky byly nanášeny do jamek smíchané s nanášecí barvou 10 X Loading Buffer (Takara Bio).

DNA elektroforéza probíhala při napětí 5 V/cm (tj. 70–100 V) po dobu odvíjející se od velikosti separovaných segmentů. Nanášecí barva nepřesáhla 0,5 cm od konce agarózového gelu. DNA bylo následně vizualizováno pod UV světlem v transluminátoru InGenius 3 (Syngene).

4.2.2.5. Izolace DNA z agarózového gelu

Po agarózové DNA elektroforéze mohla být separovaná DNA z gelu zpět izolována pomocí soupravy GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific). Nejprve byl žiletkou opatrně vyříznut úsek agarózového gelu, který obsahoval námi požadovanou DNA. Gel byl zvážen v předem zvážené 1,5 ml mikrozkušavce a byla vypočítána jeho hmotnost. Do mikrozkušavky byl přidán 1:1 (hmotnost:objem) objemu vazebního pufru (Binding Buffer), tj. na 100 mg gelu bylo přidáno 100 µl pufru. Směs byla inkubována při 55 °C 10 minut a byla příležitostně promíchána, aby došlo k úplnému rozpuštění gelu. Následně byla směs krátce vortexována a nanášena na kolonu vloženou do sběrné zkumavky. Směs byla centrifugována 1 minutu při 14 000 x g a proteklý roztok byl ze sběrné zkumavky odstraněn. Na kolonu bylo nanášeno 100 µl vazebního pufru (Binding Buffer) a kolona byla centrifugována za stejných podmínek. Proteklý roztok byl odstraněn. Poté bylo na kolonu nanášeno 700 µl promývacího pufru (Wash Buffer), kolona byla opět centrifugována za stejných podmínek a proteklý roztok byl odstraněn. Kolona byla následně centrifugována za stejných podmínek, aby došlo k úplnému odstranění pufru. Kolona byla následně vložena do nové sterilní 1,5 ml mikrozkušavky a bylo na ní nanášeno 50 µl elučního pufru (Elution Buffer). Kolona byla opět centrifugována za stejných podmínek a eluovaná DNA byla uskladněna při -20 °C.

4.2.2.6. Izolace plazmidové DNA

Bakterie, do kterých byl elektroporován požadovaný plazmid, byly inkubovány v požadovaném množství tekutého média při 37 °C a 200 rpm v orbitálním inkubátoru po dobu 16–20 hodin. Následně byly bakterie peletovány v centrifuze 10 minut na 6000 x g při 4 °C a po odstranění supernatantu mohly být takto zmrazeny na -20 °C pro dlouhodobé skladování. Takto připravené bakterie poté byly zpracovány podle protokolů komerčních souprav GenElute HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) nebo Nucleobond Xtra Midi (Macherey-Nagel) v závislosti na požadované čistotě a následném použití.

- **Izolace plazmidové DNA komerční soupravou NucleoBond Xtra Midi**

Přes noc narostlá bakteriální kultura (100 ml) byla peletována a následně resuspendována v 8 ml resuspendačního pufru (RES) obohaceném o RNázu A. Následně bylo přidáno 8 ml lyzačního pufru (LYS) a směs byla promíchána pomalým překlápěním zkumavky, aby nedošlo k uvolnění genomové DNA. Směs byla inkubována při pokojové teplotě 5 minut a poté byla neutralizována přidáním 8 ml neutralizačního pufru (NEU). Opatrně bylo zkumavkou opět překlápěno, dokud se modrá směs úplně neodbarvila a nedošlo tak k neutralizaci celé směsi.

Mezitím byla připravena izolační kolona pipetováním 12 ml ekvalibračního pufru (EQU) na okraj již vloženého filtru. Před nanesením buněčné směsi na filtr byla směs ještě jednou promíchána překlopením zkumavky. Směs se nechala gravitací protéct filtrem a kolonou a aparatura byla následně promyta 5 ml ekvilibračního pufru (EQU). Filtr byl poté odstraněn a kolona byla promyta 8 ml promývacího pufru (WASH). Zachycená DNA na koloně byla eluována 5 ml elučního pufru (ELU) do nové 50 ml falkony. K eluované DNA bylo přidáno 3,5 ml izopropanolu, směs byla důkladně vortexována a centrifugována 30 minut při 15 000 x g a 4 °C.

Supernatant byl opatrně odstraněn a byly přidány 2 ml 70 % etanolu pokojové teploty. Směs byla centrifugována 5 minut na 15 000 x g při pokojové teplotě a supernatant byl opět odstraněn. Zbýlý etanol se nechal volně odpařit po dobu maximálně 15 minut, aby nedošlo k přílišnému vysušení peletu. DNA byla následně rozpuštěna ve 300 µl TE pufru a uskladněna při -20 °C.

Koncentrace DNA byla změřena spektrofotometricky podle postupu v kapitole 4.2.2.8. Takto čištěná DNA byla později použita pro transfekci buněčných kultur.

- **Izolace plazmidové DNA komerční soupravou GenElute HP Plasmid Miniprep Kit**

Přes noc narostlá bakteriální kultura (3 ml) byla peletována a resuspendována v 200 µl resuspendačního roztoku obohaceného o RNázu A. Poté bylo přidáno 200 µl lyzačního pufru a zkumavka byla promíchána jejím opatrným přetočením. Po inkubaci po dobu 5 minut byla směs neutralizována přidáním 350 µl neutralizačního pufru. Směs byla opět opatrně promíchána přetočením zkumavky a centrifugována při 14 000 x g po dobu 10 minut. Následně byla připravena kolona jejím vložením do 1,5 ml mikrozukavky a pipetováním 500 µl

ekvilibračního pufru. Kolona byla centrifugována při 14 000 x g 1 minutu a proteklý pufr byl odstraněn. Supernatant z buněčné směsi byl nanesen na připravenou kolonu a byl centrifugován při 14 000 x g 1 minutu. Následně bylo na kolonu nanesen 500 µl promývacího pufru 1 a opět byla kolona centrifugována při stejných podmínkách jako v předchozím kroku. Na kolonu bylo poté nanesen 750 µl promývacího pufru 2 a byla opět centrifugována při stejných podmínkách. Po odstranění proteklého pufru byla kolona centrifugována ještě jednou, aby došlo k úplnému odstranění promývacích pufrů. Kolona byla poté přenesena do nové sterilní 1,5 ml mikrozkušavky a izolovaná DNA byla eluována nanesením 100 µl elučního pufru. Kolona s mikrozkušavkou byla opět centrifugována při 14 000 x g 1 minutu. Izolovaná DNA byla skladována při -20 °C.

Koncentrace DNA byla změřena spektrofotometricky podle postupu v kapitole 4.2.2.8. Takto čištěná DNA byla později použita pro sekvenační reakce a klonování dalších variant plazmidů.

4.2.2.7. Gibsonovo klonování soupravou NEBuilder® HiFi DNA Assembly Cloning Kit

Klonování vakcinačních plazmidů bylo provedeno pomocí komerční soupravy NEBuilder® HiFi DNA Assembly Cloning Kit (New England Biolabs), která funguje na principu Gibsonova klonování. Jde o způsob „bezešvého“ klonování, kdy vkládaný segment čistě navazuje na vektor bez přidání sekvencí neboli švů.

Nejprve jsou požadované DNA segmenty amplifikovány pomocí PCR s použitím primerů, které jsou navrženy tak, aby konce segmentů byly vzájemně komplementární. Veškeré primery byly navrženy pomocí programu NEBuilder Assembly Tool dostupného online na stránkách <https://nebuilder.neb.com/#/>.

Primery pro amplifikaci a linearizaci vektorů z plazmidu pVAC1-mcs byly kratší (cca 20 bp) a jejich pozice na plazmidu zajistila, aby ve výsledném vektoru byly pouze požadované sekvence. Primery pro vkládané genové sekvence byly delší (cca 40 bp) a obsahovaly 3' komplementární a 5' nekomplementární část. Tato 5' nekomplementární část ale byla komplementární ke koncovým sekvencím vektorů a sloužila tedy ke spojení obou segmentů dohromady (viz obrázek 8).

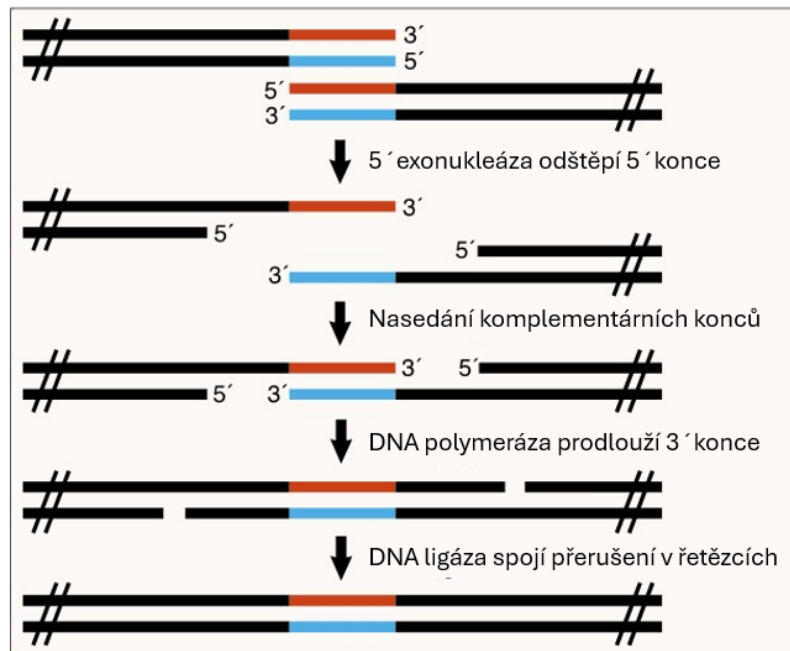
Po amplifikaci DNA segmentů pomocí PCR a jejich pročištění (viz kapitola 4.2.2.3.) byla připravena samotná reakční směs o objemu 20 µl podle tabulky 8.

Složka reakce	Množství
NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix	10 µl
vektor	100 ng
insert	vektor:insert = 1:2
ddH ₂ O	20 – X* µl

* X – objem klonovací reakce bez přidané ddH₂O

Tabulka 8: Složení klonovací směsi za použití komerční soupravy NEBuilder® HiFi DNA Assembly Cloning Kit.

Reakční směs byla poté inkubována v termobloku o teplotě 50 °C po dobu 15 minut. Během této doby došlo ve směsi k několika reakcím. Nejprve 5' exonukleáza odštěpila 5' konec DNA segmentů a vytvořila tím přesahující 3' konce. Tyto odhalené konce byly k sobě navzájem komplementární díky speciálně navrženým primerům použitým pro jejich předchozí PCR amplifikaci. DNA polymeráza následně prodloužila 3' konce a vyplnila tak mezeru, která zde zůstala po štěpení 5' exonukleázou. Nakonec DNA ligáza spojila vlákna DNA dohromady a vytvořila tím bezešvý konstrukt obsahující oba DNA fragmenty. Schéma všech po sobě jdoucích reakcí je znázorněno na obrázku 8.



Obrázek 8: Schéma klonovací reakce za použití NEBuilder® HiFi DNA Assembly Cloning Kit (Převzato a upraveno z <https://www.neb-online.de/en/cloning-synthetic-biology/dna-assembly/nebuilder-dna-assembly/>).

Hotová reakční směs byla nadále použita pro transformaci kompetentních bakterií *E.coli* (viz kapitola 4.2.1.2.).

4.2.2.8. Měření koncentrace nukleových kyselin

Měření koncentrace všech DNA vzorků a kontrola jejich případného znečištění organickými či anorganickými látkami byly provedeny na přístroji NanoDrop® 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) dle návodu výrobce.

4.2.2.9. Sekvence DNA

Ze vzorků určených pro sekvenaci byly připraveny sekvenační směsi. Směs se skládala z 1 µl 5µM roztoku sekvenačního primeru a 150 ng plazmidové DNA. Směs byla poté doplněna vodou na objem 8 µl. Připravené sekvenační směsi byly odevzdány Laboratoři Sekvence DNA, Průmyslová 595, Vestec.

V případě problémových vzorků, u kterých sekvenace neproběhla tímto standardním způsobem, jsme přistoupili na sekvenaci pomocí Hairpin protokolu. Tento protokol byl proveden samotnou sekvenační laboratoří po dodání zásobních roztoků primerů a plazmidů.

4.2.3. Práce s RNA a cDNA

4.2.3.1. Izolace RNA

Virová RNA ze vzorku infikované krve lososa dodaného firmou Dyntec byla izolována pomocí komerční soupravy NucleoSpin® Virus (Macherey-Nagel).

Do sterilní 1,5 ml mikrozkušavky bylo napipetováno 5 μ l proteinkinázy K, bylo přidáno 200 μ l vzorku a směs byla krátce vortexována. Do směsi bylo přidáno 200 μ l lyzačního pufru VL a směs byla opět vortexována. Do směsi bylo přidáno 5,6 μ l roztoku nosičové RNA, směs byla opět vortexována a ponechána inkubovat při pokojové teplotě po dobu 3 minut. Po uplynutí inkubační doby bylo do směsi přidáno 200 μ l etanolu, směs byla vortexována a inkubována 5 minut při pokojové teplotě. Po uplynutí inkubační doby byla sestavena aparatura složená z izolační kolony a sběrné mikrozkušavky a směs byla přenesena na membránu. Směs byla centrifugována při 4 000 x g po dobu 3 minut a sběrná zkumavka byla vyměněna za novou. Poté bylo na kolonu nanášeno 400 μ l promývacího pufru VW1 a kolona byla centrifugována při 11 000 x g po dobu 30 s. Sběrná zkumavka byla vyměněna za novou, na kolonu bylo nanášeno 400 μ l promývacího pufru VW2 a kolona byla opět centrifugována za stejných podmínek. Sběrná zkumavka byla vyměněna za novou, na kolonu bylo nanášeno 200 μ l promývacího pufru VW2 a kolona byla opět centrifugována při 20 000 x g po dobu 5 minut. Sběrná zkumavka byla vyměněna za novou a celá aparatura se nechala s otevřeným víčkem vyschnout při 56 °C v termobloku po dobu 5 minut. Poté bylo na kolonu nanášeno 30 μ l ddH₂O zbavené RNáz předehřáté na 70 °C a kolona byla inkubována při pokojové teplotě po dobu 3 minut. Pro eluci RNA byla kolona následně centrifugována při 20 000 x g po dobu 3 minut. Koncentrace izolované RNA byla spektrofotometricky změřena podle postupu v kapitole 4.2.2.8. a poté byla uchována při -20 °C pro další použití.

4.2.3.2. Syntéza cDNA

Pro syntézu cDNA (komplementární DNA) z izolované RNA byla použita komerční souprava LunaScript® RT SuperMix kit (New England Biolabs). Podle návodu výrobce byla připravena směs o objemu 20 μ l obsahující následující složky:

Složka reakce	Objem (μ l)
RNA (150-200 ng/ μ l)	1
LunaScript® RT SuperMix (5X)	4
Nuclease-free H ₂ O	15

Tabulka 9: Složení směsi pro syntézu cDNA za použití komerčního kitu LunaScript® RT SuperMix.

Směs byla vložena do termocycleru a byl spuštěn následující program:

Krok	Teplota (°C)	Čas
Nasedání primerů	25	2 min
Syntéza cDNA	55	10 min
Teplotní inaktivace	95	1 min

Tabulka 10: Program pro syntézu cDNA za použití komerčního kitu LunaScript® RT SuperMix.

Po skončení reakce byla směs skladována při -20 °C pro další použití.

4.2.3.3. RT-PCR (PCR s reverzní transkriptázou)

Jedná se o PCR využívající směs cDNA vytvořenou reverzní transkripcí z RNA (popsáno výše v kapitole 4.2.3.2.) jako templát. PCR směs o objemu 20 µl byla namíchána za použití OneTaq® DNA polymerázy. Výsledná směs měla následující složení:

Složka reakce	Objem (µl)
Templát (cDNA)	1
Forward primer (10 µM)	0,4
Reverse primer (10 µM)	0,4
dNTPs (10 mM)	0,4
5X OneTaq® pufr	4
OneTaq® DNA polymeráza	0,1
PCR H ₂ O	13,7

Tabulka 11: Složení směsi pro RT-PCR s použitím OneTaq® DNA polymerázy na celkový objem reakce 20µl.

PCR reakce probíhala podle programu pro OneTaq® DNA polymerázu popsany výše (tabulka 7).

4.2.3.4. qPCR (Kvantitativní PCR)

Jedná se o typ PCR, který umožňuje určit množství specifické RNA ve vzorku pomocí vizualizace a zaznamenání míry signálu mezi jednotlivými cykly PCR v reálném čase. Pro namíchání reakčních směsí byl použit gb SG PCR Master Mix (Generi Biotech) a každá z reakcí proběhla vždy v triplikátech. Vizualizace kopií DNA proběhla díky barvivu SybrGreen obsaženém v master mixu, které se preferenčně váže na dsDNA, která vzniká právě na konci PCR cyklu.

Metoda qPCR je založena na konceptu C_t hodnoty (Cycle of threshold, cyklus prahu), která vyjadřuje číslo amplifikačního cyklu PCR, při kterém dojde k překročení prahu detekce fluorescenčního signálu nad pozadí. Jinými slovy se jedná o cyklus PCR, ve kterém je vzorek možno poprvé detekovat. C_t je tedy nepřímo úměrná množství mRNA ve vzorku. Pro určení hodnoty C_t testovaného vzorku musela být nejprve sestavena tzv. křivka standardu, vůči které

byl následně testovaný vzorek porovnán. Jedná se o DNA o předem známé koncentraci, ze které se nejprve vytvoří ředící řada a z výsledných hodnot C_t se vytvoří křivka standardu.

Podle návodu výrobce byly připraveny reakční směsi o objemu 18 μ l obsahující následující složky:

Složka reakce	Objem (μ l)
gb SG PCR Master Mix	10
Forward primer (10 μ M)	0,4
Reverse primer (10 μ M)	0,4
PCR H ₂ O	7,2
Templát (cDNA nebo ředící řada standardu)	2

Tabulka 12: Složení směsi pro qPCR s použitím gb SG PCR Master Mixu (Generi Biotech) na celkový objem reakce 18 μ l.

Jednotlivé reakce byly naneseny na 96-jamkovou qPCR destičku, která byla následně vložena do přístroje StepOnePlus™ Instrument (Thermo Fisher Scientific). Veškeré qPCR reakce probíhaly podle následujícího programu:

Krok	Počet opakování	Teplota (°C)	Čas
Počáteční denaturace	1	95	5 min
Denaturace	40	95	15 s
Nasedání primerů		63	45 s
Elongace		72	1 min/kb
Finální elongace	1	72	5 min

Tabulka 13: Program pro qPCR reakci s použitím gb SG PCR Master Mixu (Generi Biotech).

4.2.4. Práce s buněčnými kulturami

4.2.4.1. Pasážování buněčné linie HEK 293T

Buněčná linie HEK 293T byla kultivována v termostatu při 37 °C a atmosféře CO₂ udržované na 5 %. Linie byla udržována na 60 mm Petriho miskách a byla pasážována 2x týdně v poměru 1:25 nebo 1:30 podle dosažené konfluency. Nejprve bylo odsáto médium z misky a buňky byly opatrně opláchnuty 5 ml roztoku EDTA. Roztok byl poté odsán, na buňky bylo pipetováno 300 μ l roztoku trypsinu a buňky se inkubovaly přibližně 2 minuty v termostatu. Po úplném uvolnění buněk z povrchu misky byl trypsin inaktivován resuspendováním buněk v předehřátém kompletním DMEM médiu. Buňky byly rozděleny do nových 60 mm Petriho misek podle požadovaného poměru a objem média byl doplněn na 6 ml. Misky s buňkami byly vloženy zpět do termostatu.

4.2.4.2. Pasážování buněčné linie RTGill-W1

Buněčná linie RTGill-W1 byla kultivována v chladové místnosti v inkubátoru při 19 °C v 100 % vzduchu. Linie byla udržována na 60 mm Petriho miskách a pasážována 1x týdně

v poměru 1:4 nebo 1:3 podle dosažené konfluence. Navíc bylo buňkám vyměňováno médium 2x týdně. Kultivační médium bylo odstraněno z misky a buňky byly opláchnuty 5 ml roztoku EDTA. Pro uvolnění buněk z povrchu misky bylo na buňky pipetováno 300 µl roztoku trypsinu II a buňky byly inkubovány 5–10 minut při pokojové teplotě. Složení roztoku trypsinu pro tuto buněčnou linii bylo upraveno od klasického roztoku z důvodu dlouhé inkubace buněk, kdy bylo potřeba zajistit šetrnost roztoku k buňkám a jejich přežití. S buňkami bylo během inkubace zacházeno opatrně, bez výrazného naklánění a promíchávání poklepáním na misku, jelikož by buňky poté tvořily pevné, těžce resuspendovatelné shluky. Po úplném uvolnění buněk z povrchu misky byl trypsin inaktivován přidáním kompletního L-15 média, odpovídající objem buněk byl přenesen do nových 60 mm Petriho misek a doplněn médiem na 6 ml. Misky s buňkami byly vloženy zpět do orbitálního inkubátoru a jejich médium bylo vyměněno za nové přibližně po čtyřech dnech růstu.

4.2.4.3. Příprava buněčných konzerv

Buňky narostlé do konfluence 80–90 % byly sklizeny a resuspendovány v odpovídajícím kompletním médiu (podle kapitoly 4.2.4.1. a 4.2.4.2.). Buňky byly přeneseny do 15 ml falkony, peletovány při 200 x g po dobu 10 minut a resuspendovány v kryoprezervačním CryoStor® médiu (na pelet z jedné 60 mm Petriho misky bylo použito 1 ml média). Buněčná suspenze byla rozdělena po 1 ml do kryozkumavek, uloženy do zamrazovací nádoby s izopropanolem (NALGENE™ Cryo 1 °C Freezing Container) a uloženy před noc do -80°C. Druhý den byly kryozkumavky přeneseny do tekutého dusíku, kde byly skladovány do dalšího použití.

4.2.4.4. Počítání koncentrace buněk

Výpočet koncentrace buněk v suspenzi byl proveden pomocí Bürkerovy komůrky (Marienfeld) a světelného mikroskopu (Olympus CK40). Pod krycí sklíčko bylo pipetováno 10 µl suspenze a buňky byly pozorovány světelným mikroskopem. Nejprve je spočten počet buněk ve čtvercích postavených v obou úhlopříčkách mřížky (2 x 12). Schéma mřížky Bürkerovy komůrky je možno vidět na obrázku 9.

Při počítání se dodržuje „pravidlo L“, tzn. pokud se buňky nacházejí na okrajích čtverce, započítávají se pouze buňky dotýkající se jeho levé a spodní strany (L). Průměrný počet buněk na čtverec získáme vydělením výsledného počtu buněk počtem čtverců (tj. 24). Průměr vynásobíme $2,5 \times 10^5$, což je koeficient pro výpočet počtu buněk na 1 ml.

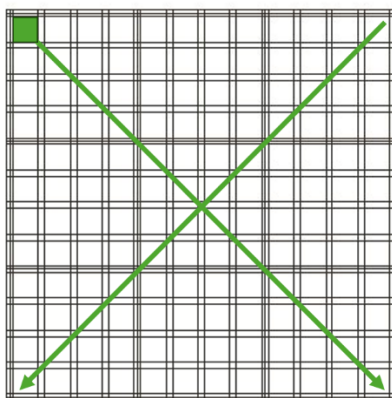
Výsledné vzorce pro výpočet počtu buněk v suspenzi:

$$n = a / 24 \quad N = n \times 2,5 \times 10^5$$

N ... počet buněk na 1 ml suspenze

a ... součet buněk ve čtvercích ležících diagonálně v počítací mřížce

n ... průměrný počet buněk na čtverec



Obrázek 9: Schéma Bürkerovy komůrky. Zeleně je vyznačen počítací čtvereček, zelené šipky vyznačují směr diagonál počítací mřížky.

4.2.4.5. Transfekce buněčných kultur pomocí transfekčních činidel

- Transfekce pomocí transfekčního činidla Turbofect

Buněčná linie byla den před transfekcí nasazena na 24-jamkovou destičku tak, aby v den transfekce dosáhla konfluence cca 70 % (tj. pro linii HEK 293T v koncentraci 2×10^5 buněk/jamka, pro linii RTGill-W1 v koncentraci 1×10^5 buněk/jamka). Pro jednu transfekční reakci (tj. jedna jamka) bylo rozpuštěno 500 ng plazmidové DNA v 100 μ l bezsérového média odpovídající použité buněčné linii (DMEM pro HEK293T, L-15 pro RTGill-W1). Transfekční činidlo bylo krátce vortexováno a následně byly přidány 2 μ l činidla do rozpuštěné DNA. Celá směs byla krátce vortexována a inkubována při pokojové teplotě po dobu 15–20 minut.

Po uplynutí inkubace bylo 100 μ l směsi nakapáno do odpovídající jamky obsahující narostlé buňky. Destička byla opatrně naklápěna pro rovnoměrné rozprostření transfekční směsi v médiu a buňky byly inkubovány v odpovídajících podmínkách (kapitola 4.2.4.1. a 4.2.4.2.) po dobu 24 až 48 hodin.

V případě transfekce buněk na 60 mm Petriho misce byly objemy použitých roztoků, médií a počet buněk upraven podle návodu výrobce.

- Transfekce pomocí transfekčního činidla ViaFect™

Pro transfekci buněčné linie RTGill-W1 bylo nadále použito i transfekční činidlo ViaFect™. Den před transfekcí byly nasazeny buňky na 24-jamkovou destičku v koncentraci 1×10^5 buněk/jamka, aby v den transfekce dosáhla konfluence cca 70 %.

Následující postup odpovídá jedné transfekční reakci (tj. jedna jamka). Do 50 μ l bezsérového L-15 média bylo rozpuštěno 500 ng plazmidové DNA a 1,5 μ l transfekčního činidla. Směs byla okamžitě promíchána a ponechala se inkubovat 5–20 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci bylo na odpovídající jamku obsahující narostlou buněčnou linii nakapáno 50 μ l transfekční

směsi. Naklápěním destičky bylo médium s transfekční směsí promícháno a buňky se nechaly inkubovat v 19 °C ve 100 % vzduchu po dobu 24 až 48 hodin.

- **Transfekce pomocí transfekčního činidla GeneJet™**

Pro transfekci buněčné linie RTGill-W1 bylo nadále použito i transfekční činidlo GeneJet™. Den před transfekcí byly nasazeny buňky na 24-jamkovou destičku v koncentraci 1×10^5 buněk/jamka, aby v den transfekce dosáhla konfluence cca 70 %. Hodinu před transfekcí bylo staré kultivační médium odstraněno a nahrazeno novým.

Následující postup obsahuje hodnoty pro jednu transfekční reakci na 24-jamkové desce. Do dvou sterilních 1,5 ml mikrozkušavek bylo pipetováno po 50 μ l bezsérového L-15 média. V prvním objemu média bylo rozpuštěno 1000 ng plazmidové DNA a k druhému objemu média byly přidány 3 μ l transfekčního činidla. Směsi byly krátce vortexovány. Směs média a transfekčního činidla byla přidána do naředěné DNA a vše bylo promícháno 3–4 nátahy pipetou. Směs byla inkubována po dobu 15 minut při pokojové teplotě a byla poté nakapána na odpovídající jamku obsahující narostlou buněčnou linii. Naklápěním destičky byla transfekční směs promíchána s médiem a buňky se vložily zpět do inkubátoru. Pět hodin po přidání transfekční směsi bylo médium z buněk odstraněno a nahrazeno novým. Buňky byly inkubovány po dobu 24–48 hodin při 19 °C a 100 % vzduchu.

- **Transfekce pomocí transfekčního činidla Lyovec™**

Pro transfekci buněčné linie RTGill-W1 bylo nadále použito i transfekční činidlo Lyovec™. Den před transfekcí byly nasazeny buňky na 24-jamkovou destičku o koncentraci 1×10^5 buněk/jamka, aby v den transfekce dosáhla konfluence cca 70 %.

Na jednu jamku bylo ve sterilní 1,5 ml mikrozkušavce smícháno 25 μ l transfekčního činidla s 250 ng plazmidové DNA. Směs se nechala inkubovat po dobu 15–60 minut při pokojové teplotě. Následně bylo na jamku nakapáno 25 μ l směsi a naklápěním destičky bylo docíleno rovnoměrného rozmístění transfekčního činidla v médiu. Buňky byly inkubovány v 19 °C ve 100 % vzduchu po dobu 24–48 hodin.

4.2.4.6. Transfekce elektroporací pomocí přístroje Neon™ NxT

Pomocí přístroje Neon™ NxT od firmy Thermo Fisher Scientific jsme se pokusili o transfekci buněčné linie RTGill-W1 také tímto novým způsobem. Jedná se o elektroporaci inovativním způsobem, který omezuje ztráty buněk a snižuje množství spotřebovaného materiálu na jednu elektroporační reakci. Jelikož pro tuto buněčnou linii není dosud ověřený elektroporační program, použili jsme sérii optimalizačních programů pro určení nejlepších podmínek elektroporace. Jednalo se o 23 programů určených na 24-jamkovou destičku.

Nejprve byly buňky sklizeny (kapitola 4.2.4.2.) a byla spočítána jejich koncentrace (kapitola 4.2.4.4.). Odpovídající objem buněčné suspenze (celkem 2×10^6 buněk) byl přemístěn do 15 ml falkony a byl centrifugován při $200 \times g$ 10 minut. Vzniklý supernatant byl odstraněn a buněčný pelet byl resuspendován v 259,2 μ l resuspendačního pufru R (Neon™ NxT Resuspension R Buffer). Do suspenze bylo přidáno 28,8 μ l plazmidu o koncentraci 0,5 – 1 μ g/ μ l. Do elektroporační špičky bylo nasáto 10 μ l buněčné směsi, pipeta byla vložena do dokovací stanice obsahující kyvetu s elektroporačním pufrem pro 10 μ l reakce (Neon™ NxT Electrolytic E10 Buffer). Na hlavním panelu přístroje byl zvolen požadovaný program a byla spuštěna elektroporace. Následně byla pipeta s elektroporovanými buňkami vyjmuta z dokovací stanice a obsah špičky byl vypuštěn do předpřipraveného média v 24-jamkové desce. Celý proces byl opakován, dokud nebyly provedeny všechny optimalizační programy. Aby došlo k rovnoměrnému rozprostření buněk na dně jamky, bylo deskou lehce nakláněno. Buňky se nechaly inkubovat v 19 °C ve 100 % vzduchu po dobu 24 hodin.

4.2.4.7. Sklizeň transfekovaných buněčných kultur

Z transfekované buněčné kultury bylo nejprve odebráno 500 μ l média do sterilní 1,5 ml mikrozumavky a bylo centrifugováno při $200 \times g$ po dobu 10 minut, aby byly z média odstraněny zbylé buňky. Supernatant by přepipetován po 150 μ l do 3 sterilních 1,5 ml mikrozumavek, které poté byly uskladněny do -20 °C. Médium bylo později použito pro ověření sekrece virových proteinů metodou Western blot (kapitola 4.2.5.5.). Zbývající médium bylo z buněčné kultury odsáto, buňky byly opláchnuty roztokem EDTA, který byl následně odsán. Na buňky byl pipetován roztok trypsinu a buňky se ponechaly v termálním inkubátoru do jejich úplného uvolnění z povrchu misky (přibližně 2 minuty). Buňky byly následně resuspendovány v kompletním DMEM médiu, směs byla rozdělena stejným dílem do dvou sterilních 1,5 ml mikrozumavek a byla centrifugována při $200 \times g$ 10 minut. Supernatant byl odstraněn a buněčný pelet byl uskladněn při -20 °C.

4.2.5. Práce s proteiny

4.2.5.1. Příprava buněčného lyzátu pomocí RIPA pufru

Z narostlé buněčné kultury (HEK 293T na 60 mm Petriho miskách) bylo nejprve odstraněno médium a buňky byly opláchnuty roztokem EDTA. Následně byly buňky sklizeny pomocí roztoku trypsinu, resuspendovány ve vhodném objemu kompletního DMEM média a přeneseny do sterilní 1,5 ml mikrozumavky. Buňky byly centrifugovány při $200 \times g$ 10 minut a výsledný supernatant byl odstraněn. Následně byly buňky resuspendovány ve vychlazeném RIPA pufre s přidanými 25x koncentrovanými inhibitory proteáz (cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail, Roche) a směs se nechala inkubovat 30 minut na ledu. Po inkubaci byla směs centrifugována při $20\,000 \times g$ při 4 °C, po dobu 20 minut a získaný supernatant byl přenesen do čisté mikrozumavky. Lyzát byl skladován při -20 °C pro další účely.

4.2.5.2. Izolace membránových proteinů pomocí komerční soupravy Mem-PER™ Plus Kit

Buněčné pelety získané sklizením transfekovaných kultur z 60 mm Petriho misky (kapitola 4.2.4.7.) byly resuspendovány v 3 ml promývacího pufru (Cell Wash Solution) komerční soupravy Mem-PER™ Plus Kit a byly peletovány při 300 x g po dobu 10 minut. Supernatant byl odstraněn, buňky byly opět resuspendovány v 1,5 ml promývacího pufru a přeneseny do sterilní 2 ml mikrozkušavky. Buňky byly peletovány za stejných podmínek a supernatant byl opět odstraněn. K buněčnému peletu bylo přidáno 750 µl permeabilizačního pufru (Permeabilization Buffer) s přidávanými inhibitory proteáz (25x koncentrované, cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail, Roche) a směs byla důkladně vortexována. Buněčná suspenze se ponechala inkubovat 10 minut na ledu za konstantního míchání. Permeabilizované buňky byly centrifugovány 15 minut při 16 000 x g. Supernatant obsahující cytosolické proteiny byl opatrně přenesen do nové sterilní 1,5 ml mikrozkušavky, rozdělen do 4 alikvót po 180 µl (frakce „C“) a uchován na ledu. K peletu bylo přidáno 500 µl solubilizačního pufru (Solubilization Buffer) s přidávanými inhibitory proteáz, směs byla co nejdůkladněji promíchána pipetováním a ponechala se inkubovat 30 minut při 4 °C za stálého míchání. Směs byla centrifugována 15 minut při 16 000 x g při teplotě 4 °C. Supernatant, který nyní obsahoval rozpuštěné buněčné membrány a membránově vázané proteiny, byl přenesen do sterilní 1,5 ml mikrozkušavky a byl následně rozdělen do 4 alikvót po 120 µl (frakce „M“). Alikvóty získaných frakcí spolu s peletem obsahující nerozpustné proteiny (frakce „N“) byly skladovány při -80 °C pro další použití.

4.2.5.3. Příprava vzorků na SDS-PAGE

Tekuté vzorky získané podle postupu v kapitolách 4.2.4.7. a 4.2.5.2. byly smíchány s Laemmliho pufrem 5x v poměru 1:4. Buněčné pelety byly nejprve resuspendovány v 60 µl Laemmliho pufru 1x a nerozpustné frakce „Non“ byly resuspendovány v 500 µl Laemmliho pufru 1x. Směs byla následně inkubovaná v termobloku při 100 °C po dobu 10 minut. Následovala centrifugace při 14 000 x g 5 minut a supernatant byl přenesen do nové sterilní 1,5 ml mikrozkušavky. Vzorky byly buď ihned použity na proteinovou SDS-PAGE elektroforézu nebo byly uskladněny do -20 °C pro pozdější použití.

4.2.5.4. Denaturační proteinová elektroforéza SDS-PAGE

Rozdělení proteinů podle jejich molekulových hmotností proběhlo pomocí metody SDS-PAGE denaturační proteinové elektroforézy na zaostřovacím (5 %) a separačním (10 %) akrylamidovém gelu. Nejprve byla sestavena aparatura pro vytvoření polyakrylamidových (PAA) gelů (PAGE vertical apparatus Hoefer Mighty Small II, Hoefer) a její těsnost byla ověřena nalitím destilované vody mezi skla. Po odstranění vody a vysušení aparatury byl namíchán separační 10 % PAA gel podle tabulky 14. Amonium persulfát a TEMED byly přidány do směsi

jako poslední, směs byla promíchána otáčením zkumavky a gel byl urychleně nanesen mezi skla aparatury tak, aby jeho hladina dosahovala cca 0,5 cm od spodní hrany hřebenu. Pro zamezení vysychání gelu během jeho polymerace bylo na hladinu každého gelu nanášeno 500 μ l isobutanolu syčeného vodou. Gel se ponechal 30–40 minut polymerovat. Poté byl isobutanol slit a jeho zbytky byly opatrně odstraněny filtračním papírem. Byl namíchán zaostřovací 5 % PAA gel, amonium persulfát a TEMED byly opět přidány jako poslední, směs byla promíchána otáčením zkumavky a gel byl urychleně nanesen až po okraj skel. Do gelu byl následně vložen hřeben tvořící jamky pro nanášení vzorků a gel se ponechal 30–40 minut polymerovat.

Po úplném zatuhnutí gelů byl hřeben z gelu vyndán a skla obsahující vytvořené gely byla vložena do elektroforetické aparatury. Elektroforetická vana a zadní strana gelů byla zalita Running pufrem (viz kapitola 4.1.2.).

Hamiltonovou stříkačkou byly do jamek nanášeny požadované vzorky (viz kapitola 4.2.5.3.) po 5–25 μ l a do jedné jamky byly nanášeny 4 μ l markeru molekulových hmotností (Color Prestained Protein Standard, Broad Range). Aparatura byla uzavřena a připojena do zdroje stejnosměrného napětí. Separace proteinů probíhala 30 minut při napětí 80 V a poté přibližně 1 hodinu při napětí 140 V.

Složka	Separáčn1 10 % gel (12 ml)	Zaostřovací 5 % gel (6 ml)
30 % akrylamid	4 ml	1 ml
1M Tris-HCl (pH = 8,8)	4,5 ml	-----
1M Tris-HCl (pH = 6,8)	-----	750 μ l
10 % SDS	120 μ l	60 μ l
ddH ₂ O	3,25 ml	4,22 ml
1% amonium persulfát	40 μ l	40 μ l
TEMED	8,5 μ l	10 μ l

Tabulka 14: Složení akrylamidových gelů pro denaturační proteinovou elektroforézu SDS-PAGE (objem pro 2 gely).

4.2.5.5. Western blot

Transfer proteinů z PAA gelu na nitrocelulózovou membránu (Amersham™ Protran™ 0,45 μ m NC Nitrocellulose Blotting Membrane, Cytiva) byl proveden metodou „semi-dry“ blotu. PAA gel a byl opatrně vyjmut z elektroforetické aparatury a zaostřovací gel byl odstraněn. Gel, membrána sestřižená na velikost PAA gelu (tj. 7x 9 cm) a dva 8 mm silné filtrační papíry (Extra Thick Blot Filter Paper, Bio-Rad) byly namočeny do blotovacího pufru (viz kapitola 4.1.2.) vychlazeného na 4 °C na 10 minut.

Na dně transferové kazety (Trans Blot Turbo Transfer Systém, Bio-Rad) byl sestaven blotovací „sendvič“, kdy na sebe byly postupně navrstveny následující položky: filtrační papír, nitrocelulózová membrána, PAA gel, filtrační papír. Případné vzduchové bubliny, které by mohly vadit správnému přenosu, byly ze „sendviče“ odstraněny přejetím válečkem. Kazeta byla

uzavřena a vložena do přístroje (Trans Blot Turbo Transfer Systém, Bio-Rad). Transfer byl proveden podle přednastaveného programu (Standard SD, 2x mini or 1x midi gel) při napětí 25 V po dobu 30 minut. Po dokončení programu byla kazeta vyjmuta a otevřena, filtrační papíry a gel byly opatrně odstraněny a membrána byla přenesena do roztoku PBS 1x, kde se nechala promývat po dobu 10 minut. Následovala imunodetekce proteinů pomocí chemiluminiscence popsané níže v kapitole 4.2.5.7.

4.2.5.6. Dot blot

Na nitrocelulózovozu membránu byly nanесeny vzorky o objemu 5 μ l a nechali se uschnout volně na vzduchu. Následně byla prokázána přítomnost proteinů ve vzorku pomocí imunodetekce (viz kapitola 4.2.5.7.)

4.2.5.7. Imunodetekce proteinů na nitrocelulózové membráně

Nitrocelulózová membrána s nakapanými vzorky na dot blot nebo nitrocelulózová membrána s přenesenými vzorky z SS-PAGE byla nejprve inkubována v blokačním roztoku 5 % (w/v) odtučněného mléka v PBS 1x po dobu 1 hodiny na kývačce. Následně byla inkubována v roztoku 5 % (w/v) odtučněného mléka v PBS 1x s naředěnou primární protilátkou ve správném poměru (viz kapitola 4.1.8.) opět po dobu 1 hodiny. Poté byla membrána třikrát propláchnuta roztokem PBS 1x pokaždé po dobu 10 minut a následně inkubována v roztoku 5 % (w/v) odtučněného mléka v PBS 1x obsahující naředěnou sekundární protilátku ve správném poměru (viz kapitola 4.1.8.) po dobu 30 minut. Po inkubaci byla membrána opět opláchnuta třikrát v roztoku PBS 1x pokaždé po dobu 10 minut.

Chemiluminiscenční roztoky A a B (složení viz kapitola 4.1.2.) byly smíchány v poměru 1:1 těsně před vyvoláním a byly pečlivě promíchány. Dohromady tvořily vyvolávací roztok o objemu 40 ml, do kterého byla membrána krátce ponořena (přibližně 30 sekund). Následně byla membrána vyjmuta, opatrně osušena a vložena a vyvolána pomocí přístroje Amersham™ Imager 600 RGB (GE Healthcare Life Sciences). Získaný detekovaný signál byl zdokumentován.

5. Výsledky

5.1. Konstrukce vakcinačních plazmidů

5.1.1. Navržení vakcinačních plazmidů a specifických primerů pro klonování

Pro úspěšné klonování vakcinačních plazmidů bylo nejprve potřeba vytvořit odpovídající soubory schémat plazmidů v programu SnapGene Viewer. Schémata všech plazmidů jsou k vidění v příloze 1.

Celkově bylo navrženo 22 plazmidů – 20 vakcinačních plazmidů a 2 plazmidy sloužící jako mezistupeň pro přípravu vakcinačních plazmidů pro antigenní display. Plazmidy obsahovaly různé kombinace vlastností, které jsou podrobněji popsány níže.

- **pVAC1 IHNV - -**
 - plazmid odvozený od plazmidu pVAC1-mcs
 - postrádá MCS, sekreční sekvenci **IL-2** (Interleukin-2) a kotvící sekvenci **PLAP** (Placental Alkaline Phosphatase)
 - obsahuje zaklonovaný gen pro **G protein viru IHNV** (infectious hematopoietic necrosis virus)
- **pVAC1 gp64 - -**
 - plazmid odvozený od plazmidu pVAC1-mcs
 - postrádá MCS, sekreční sekvenci pro **IL-2** a kotvící sekvenci pro **PLAP**
 - obsahuje zaklonovaný gen pro **glykoprotein gp64 bakuloviru**
- **pVAC1 EGFP - -**
 - plazmid odvozený od plazmidu pVAC1-mcs
 - postrádá MCS, sekreční sekvenci pro **IL-2** a kotvící sekvenci pro **PLAP**
 - obsahuje zaklonovaný gen pro **EGFP**
- **pVAC1 EGFP - +**
 - plazmid odvozený od plazmidu pVAC1-mcs
 - postrádá MCS a sekreční sekvenci pro **IL-2**
 - obsahuje zaklonovaný gen pro **EGFP**
- **pVAC1 EGFP + -**
 - plazmid odvozený od plazmidu pVAC1-mcs
 - postrádá MCS a kotvící sekvenci pro **PLAP**
 - obsahuje zaklonovaný gen pro **EGFP**
- **pVAC1 EGFP IHNV**
 - plazmid odvozený od plazmidu pVAC1 IHNV -IL-2 -PLAP
 - postrádá MCS, sekreční sekvenci pro **IL-2** a kotvící sekvenci pro **PLAP**
 - obsahuje zaklonovaný gen pro **G protein viru IHNV**, za jehož kotvící sekvenci byl následně vložen gen pro **EGFP**
 - byl tak vytvořen rekombinantní protein kotvící se v membráně

- **pVAC1 EGFP gp64**
 - plazmid odvozený od plazmidu pVAC1 gp64 -IL-2 -PLAP
 - postrádá MCS, sekreční sekvenci pro **IL-2** a kotvící sekvenci pro **PLAP**
 - obsahuje zaklonovaný gen pro **glykoprotein gp64 bakuloviru**, za jehož kotvící sekvenci byl následně vložen gen pro **EGFP**
 - byl tak vytvořen rekombinantní protein kotvící se v membráně
- **pVAC1 S1 - -**
 - plazmid odvozený od plazmidu pVAC1-mcs
 - postrádá MCS, sekreční sekvenci pro **IL-2** a kotvící sekvenci pro **PLAP**
 - obsahuje zaklonovaný gen pro protein **σ 1 PRV3**
- **pVAC1 S1 - +**
 - plazmid odvozený od plazmidu pVAC1-mcs
 - postrádá MCS a sekreční sekvenci pro **IL-2**
 - obsahuje zaklonovaný gen pro protein **σ 1 PRV3**
- **pVAC1 S1 + -**
 - plazmid odvozený od plazmidu pVAC1-mcs
 - postrádá MCS a kotvící sekvenci pro **PLAP**
 - obsahuje zaklonovaný gen pro protein **σ 1 PRV3**
- **pVAC1 S1 IHNV**
 - plazmid odvozený od plazmidu pVAC1 IHNV -IL-2 -PLAP
 - postrádá MCS, sekreční sekvenci pro **IL-2** a kotvící sekvenci pro **PLAP**
 - obsahuje zaklonovaný gen pro **G protein viru IHNV**, za jehož kotvící sekvenci byl následně vložen gen pro protein **σ 1 PRV3**
 - byl tak vytvořen rekombinantní protein kotvící se v membráně
- **pVAC1 S1 gp64**
 - plazmid odvozený od plazmidu pVAC1 gp64 -IL-2 -PLAP
 - postrádá MCS, sekreční sekvenci pro **IL-2** a kotvící sekvenci pro **PLAP**
 - obsahuje zaklonovaný gen pro **glykoprotein gp64 bakuloviru**, za jehož kotvící sekvenci byl následně vložen gen pro protein **σ 1 PRV3**
 - byl tak vytvořen rekombinantní protein kotvící se v membráně
- **pVAC1 S3 - -**
 - plazmid odvozený od plazmidu pVAC1-mcs
 - postrádá MCS, sekreční sekvenci pro **IL-2** a kotvící sekvenci pro **PLAP**
 - obsahuje zaklonovaný gen pro protein **σ 3 PRV3**
- **pVAC1 S3 - +**
 - plazmid odvozený od plazmidu pVAC1-mcs
 - postrádá MCS a sekreční sekvenci pro **IL-2**
 - obsahuje zaklonovaný gen pro protein **σ 3 PRV3**

- **pVAC1 S3 + -**
 - plazmid odvozený od plazmidu pVAC1-mcs
 - postrádá MCS a kotvící sekvenci pro **PLAP**
 - obsahuje zaklonovaný gen pro protein **$\sigma 3$ PRV3**
- **pVAC1 S3 IHNV**
 - plazmid odvozený od plazmidu pVAC1 IHNV -IL-2 -PLAP
 - postrádá MCS, sekreční sekvenci pro **IL-2** a kotvící sekvenci pro **PLAP**
 - obsahuje zaklonovaný gen pro **G protein viru IHNV**, za jehož kotvící sekvenci byl následně vložen gen pro protein **$\sigma 3$ PRV3**
 - byl tak vytvořen rekombinantní protein kotvící se v membráně
- **pVAC1 S3 gp64**
 - plazmid odvozený od plazmidu pVAC1 gp64 -IL-2 -PLAP
 - postrádá MCS, sekreční sekvenci pro **IL-2** a kotvící sekvenci pro **PLAP**
 - obsahuje zaklonovaný gen pro **glykoprotein gp64 bakuloviru**, za jehož kotvící sekvenci byl následně vložen gen pro protein **$\sigma 3$ PRV3**
 - byl tak vytvořen rekombinantní protein kotvící se v membráně
- **pVAC1 M1 - -**
 - plazmid odvozený od plazmidu pVAC1-mcs
 - postrádá MCS, sekreční sekvenci pro **IL-2** a kotvící sekvenci pro **PLAP**
 - obsahuje zaklonovaný gen pro protein **$\mu 1$ PRV3**
- **pVAC1 M1 - +**
 - plazmid odvozený od plazmidu pVAC1-mcs
 - postrádá MCS a sekreční sekvenci pro **IL-2**
 - obsahuje zaklonovaný gen pro protein **$\mu 1$ PRV3**
- **pVAC1 M1 + -**
 - plazmid odvozený od plazmidu pVAC1-mcs
 - postrádá MCS a kotvící sekvenci pro **PLAP**
 - obsahuje zaklonovaný gen pro protein **$\mu 1$ PRV3**
- **pVAC1 M1 IHNV**
 - plazmid odvozený od plazmidu pVAC1 IHNV -IL-2 -PLAP
 - postrádá MCS, sekreční sekvenci pro **IL-2** a kotvící sekvenci pro **PLAP**
 - obsahuje zaklonovaný gen pro **G protein viru IHNV**, za jehož kotvící sekvenci byl následně vložen gen pro protein **$\mu 1$ PRV3**
 - byl tak vytvořen rekombinantní protein kotvící se v membráně
- **pVAC1 M1 gp64**
 - plazmid odvozený od plazmidu pVAC1 gp64 -IL-2 -PLAP
 - postrádá MCS, sekreční sekvenci pro **IL-2** a kotvící sekvenci pro **PLAP**
 - obsahuje zaklonovaný gen pro **glykoprotein gp64 bakuloviru**, za jehož kotvící sekvenci byl následně vložen gen pro protein **$\mu 1$ PRV3**
 - byl tak vytvořen rekombinantní protein kotvící se v membráně

Pro lepší přehled byla vytvořena tabulka 15, ve které jsou výše zmíněné plazmidy rozděleny do pěti skupin podle jejich klíčových vlastností.

	Vektor	Gen
Kontrolní skupina	pVAC1 --	σ 1
		σ 3
		μ 1
Sekrece	pVAC1 +-	σ 1
		σ 3
		μ 1
Kotvení v membráně	pVAC1 - +	σ 1
		σ 3
		μ 1
Fluorescence	pVAC1 --	EGFP
	pVAC1 +-	
	pVAC1 - +	
	pVAC1 IHNV	
	pVAC1 gp64	
Antigenní display	pVAC1 --	IHNV
		gp64
	pVAC1 IHNV	σ 1
		σ 3
		μ 1
	pVAC1 gp64	σ 1
		σ 3
		μ 1

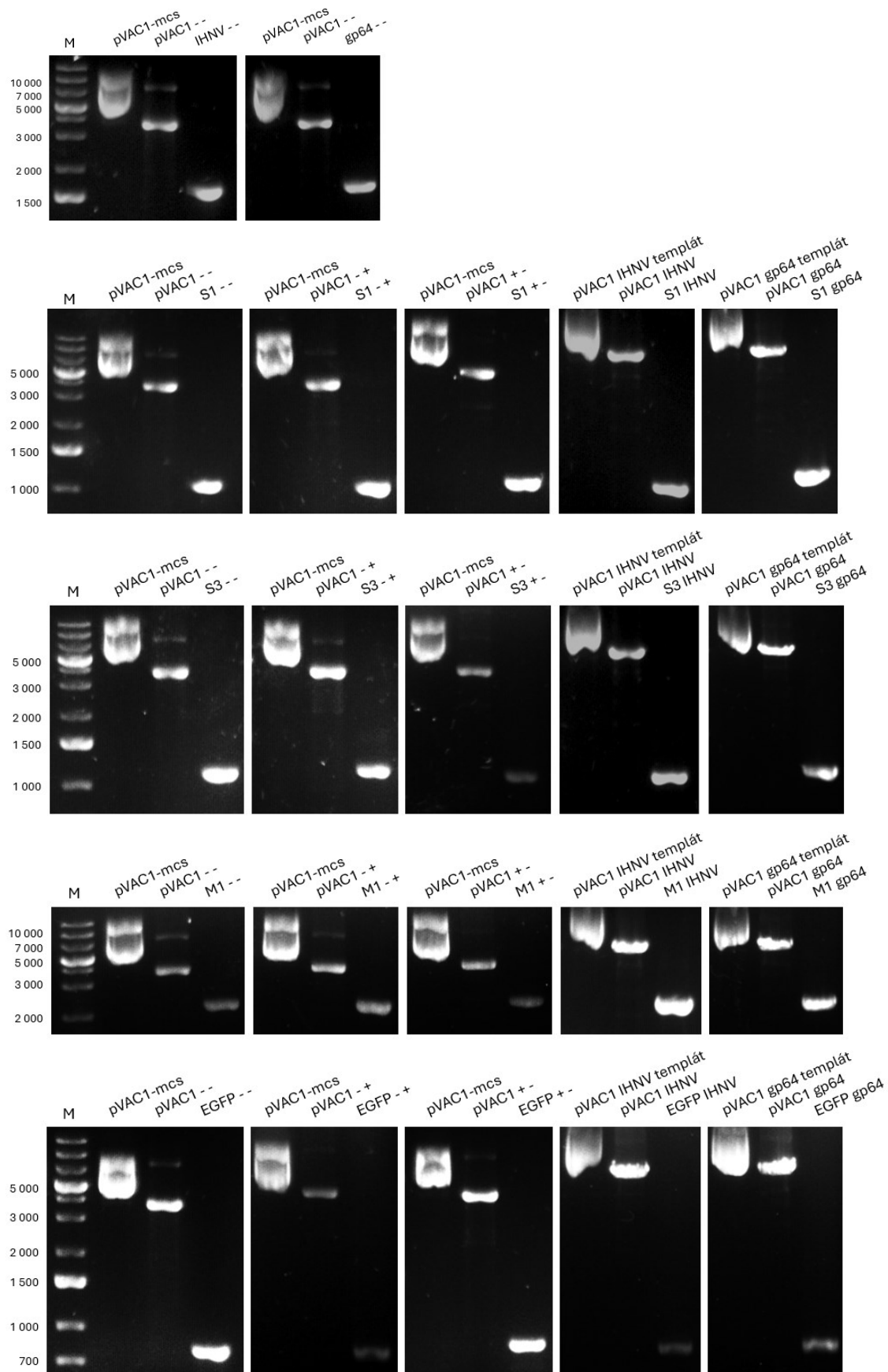
Tabulka 15: Přehled všech navržených vakcinačních plazmidů rozdělených do pěti skupin podle jejich klíčových vlastností.

Pomocí vytvořených schémat plazmidů a online programu NEBuilder Assembly Tool dostupného online na stránkách <https://nebuilder.neb.com/#!/> byly navrženy primery potřebné pro PCR DNA segmentů a následné bezešvé klonování komerčním soupravou NEBuilder® HiFi DNA Assembly Cloning Kit. Přehled všech použitých primerů je v tabulce v kapitole 4.1.4.

5.1.2. PCR vektorů a genových segmentů

Jednotlivé vektory a genové segmenty byly namnoženy metodou PCR (kapitola 4.2.2.1.) pomocí odpovídajících specifických primerů. Přibližné velikosti PCR fragmentů byly následně zkontrolovány na 1 % agarózovém gelu s markerem molekulových hmotností GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder. PCR produkty byly poté pročištěny soupravou GeneJET PCR Purification Kit (kapitola 4.2.2.3.) a jejich koncentrace byla změřena na přístroji NanoDrop® 2000 Spectrophotometer (kapitola 4.2.2.8.).

Elektroforetogramy jednotlivých PCR produktů jsou vyobrazeny na obrázku 10.



Obrázek 10: Elektroforetogramy, na kterých jsou vždy viditelné v pořadí zleva templáty, PCR produkty vektorů a PCR produkty genových segmentů; M – marker molekulových hmotností (bp)

5.1.3. NEBuilder klonování

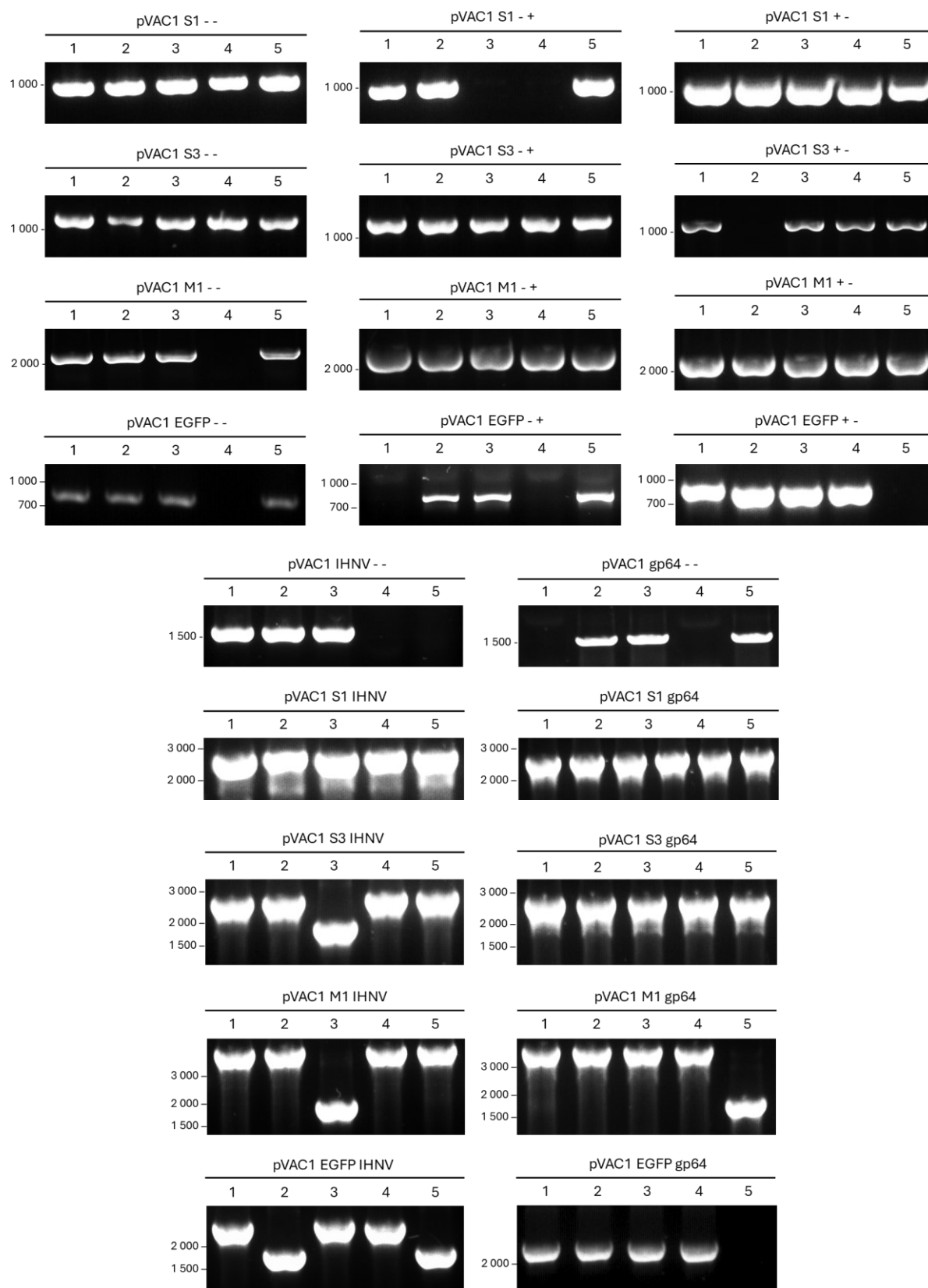
Z vyčištěných PCR produktů byly připraveny klonovací směsi podle předpisu popsaným v kapitole 4.2.2.7. V případě klonování virového proteinu $\mu 1$ byl použit poměr vektor:insert 1:1 kvůli jeho větší délce. Do kompetentních bakterií byly elektroporovány 2 μ l klonovací směsi. Bakterie byly následně 1 hodinu kultivovány v SOC médiu a následně byly vysety na agarové misky obsahující selekční antibiotikum zeocin.

5.1.4. Colony PCR a izolace vakcinačních plazmidů z bakteriálních kolonií

Vysetím elektroporovaných bakterií na tuhé médium obsahující antibiotikum zeocin (kapitola 4.2.1.4.) jsme zajistili selekci bakterií, u kterých došlo k úspěšnému přijetí vakcinačního plazmidu. Veškeré plazmidy obsahovaly také rezistenci proti zeocinu, a tím pádem ty bakterie, které na médiu do druhého dne přežily a vytvořily kolonie, tento plazmid obsahovaly.

Bohužel nám tato selekce nezajistila potvrzení úspěšného klonování genového segmentu do vektoru. Pro tento účel jsme použili metodu Colony PCR (podrobněji popsáno v kapitole 4.2.2.2.). Náhodně vybrané monokolonie byly sterilním párátkem přeneseny na novou agarovou misku obsahující antibiotikum zeocin a byly ponechány přes noc narůst. Z takto narostlých monokolonií byl následně vytvořen templát pro colony PCR. Postup této přípravy je více popsán výše v kapitole 4.2.2.2. Jako primery byly pro colony PCR použity primery navržené pro sekvenaci (pVAC1 seq FW; pVAC1 seq REV), které ohraničují oblast vkládání genových segmentů. Tímto způsobem můžeme lehce rozeznat úspěšnost vložení genu. Pokud k vložení genového segmentu nedošlo, nezískáme žádný PCR produkt.

Velikosti výsledných PCR produktů byly ověřeny DNA elektroforézou na 1 % agarózovém gelu a jejich výsledky jsou zobrazeny níže na obrázku 11.



Obrázek 11: Elektroforetogramy PCR produktů získaných metodou colony PCR. Analýza úspěšného klonování genového segmentu do vektoru. Každý elektroforetogram obsahuje 5 testovaných bakteriálních kolonií určitého typu vakcinačního plazmidu.

U elektroforetogramů plazmidů pVAC1 S3 IHNV, pVAC1 M1 IHNV, pVAC1 M1 gp64 a pVAC1 EGFP IHNV lze pozorovat i PCR produkty dosahující menších velikostí, než bylo u úspěšného vložení genů předpokládáno. Získané PCR produkty mají velikosti přibližně 1 500 bp, což by odpovídalo glykoproteinům bakuloviru a IHNV, které již byly do vektoru zaklonovány předtím. Jedná se tedy o neúspěšné vložení genů PVR-3 do již vytvořených plazmidů.

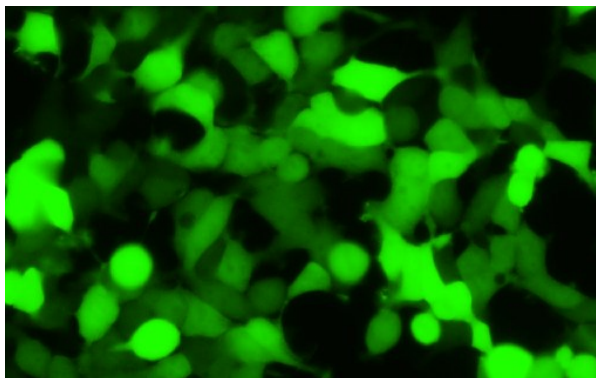
Od každého typu vakcinačního plazmidu byla vybrána jedna kolonie s úspěšně zaklonovaným plazmidem (první v pořadí), byla kultivována přes noc v tekutém médiu a provedla se izolace plazmidové DNA pomocí komerčního kitu NucleoBond Xtra Midi (kapitola 4.2.2.6.). Výsledná koncentrace plazmidové DNA byla změřena na přístroji NanoDrop® 2000 Spectrophotometer (kapitola 4.2.2.8.). Takto izolovaná DNA byla poté použita pro přípravu sekvenačních reakcí pro ověření správnosti syntézy genových segmentů při PCR.

Po ověření kvality vakcinačních plazmidů byly vybrané kolonie opět kultivovány v tekutém médiu přes noc a byla z nich izolována plazmidová DNA tentokrát pomocí komerční soupravy GenElute HP Plasmid Miniprep Kit. Tento kit zajistil vyšší čistotu plazmidové DNA, která je potřebná pro následnou transfekci buněčných linií. Před samotnou transfekcí byla ještě kvalita plazmidů zkontrolována pomocí sekvenace (kapitola 4.2.2.9.), aby se předešlo případným mutacím a nepřesnostem, které mohly vzniknout během syntézy PCR segmentů, klonování nebo replikace v bakteriích *E. coli*.

Zároveň byly od každého typu plazmidu vybrány tři kolonie (první tři úspěšné v pořadí), které se ponechaly přes noc kultivovat v tekutém médiu (kapitola 4.2.1.3.) a z každé z nich byly vytvořeny dvě bakteriální konzervy (kapitola 4.2.1.5.) pro dlouhodobé uchování.

5.2. Expresí antigenních proteinů v transfekované buněčné linii HEK 293T

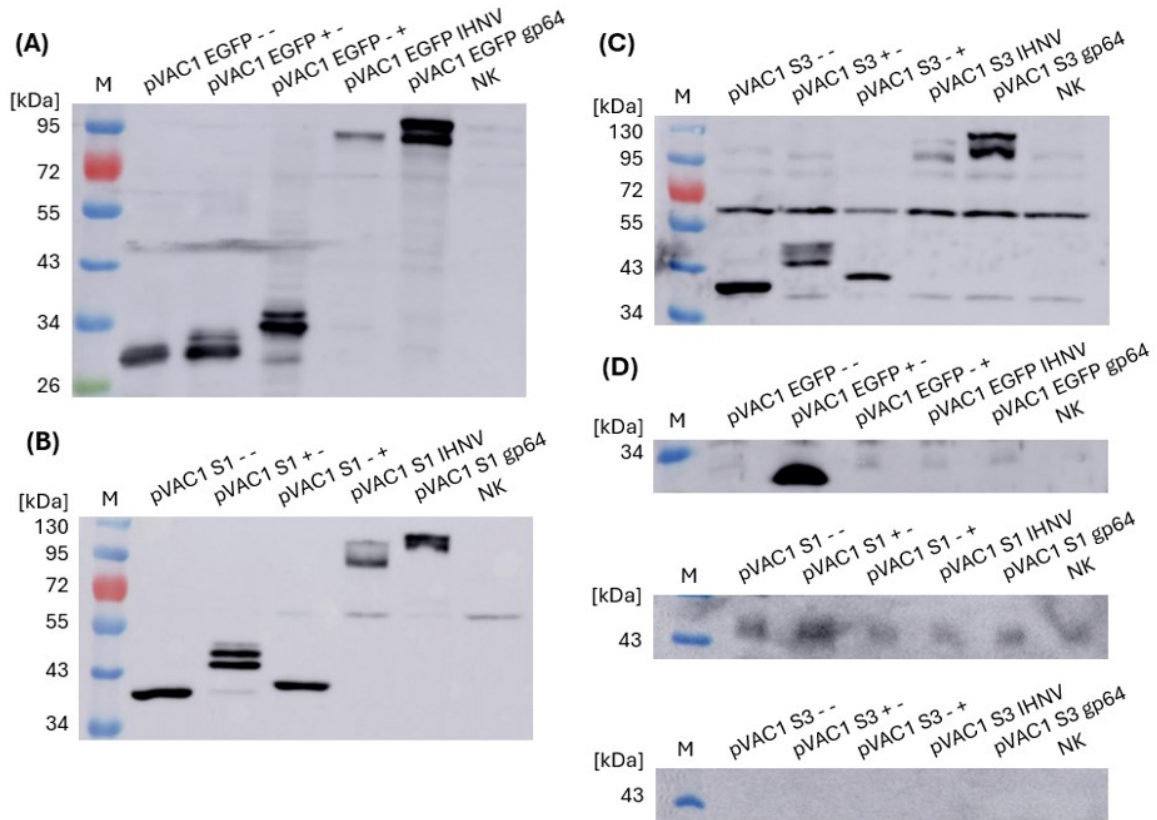
Pro veškeré transfekce buněčných linií bylo použito transfekční činidlo Turbofect, jehož použití je podrobněji popsáno výše v kapitole 4.2.4.5. Jako první byly použity vakcinační plazmidy obsahující fluorescenční protein EGFP, jelikož jejich úspěšná transfekce mohla být jednoduše pozorovaná pod fluorescenčním mikroskopem Olympus IX71 (Olympus).



Obrázek 12: Ověření transfekce buněčná linie HEK 293T plazmidem pVAC1 EGFP - - pod UV světlem. Snímek byl pořízen na fluorescenčním mikroskopu Olympus IX71 (Olympus) 24 hodin po transfekci při zvětšení 400x.

Produkce proteinu byla následně ověřena také metodami SDS-PAGE a Western blot. Použitím vzorků připravených z odebraného média mohla být rovnou potvrzena úspěšná sekrece produkovaného proteinu u vakcinačních plazmidů obsahující signální sekvenci pro sekreci.

Z plazmidů obsahující sekreční signální sekvenci pro IL-2 byla sekrece úspěšně detekovaná pouze u plazmidu pVAC1 EGFP + -. U ostatních sekrečních plazmidů bylo u vzorků připravených z transfekovaných buněk k vidění více proužků, než bylo předpokládáno (viz obrázek 13).

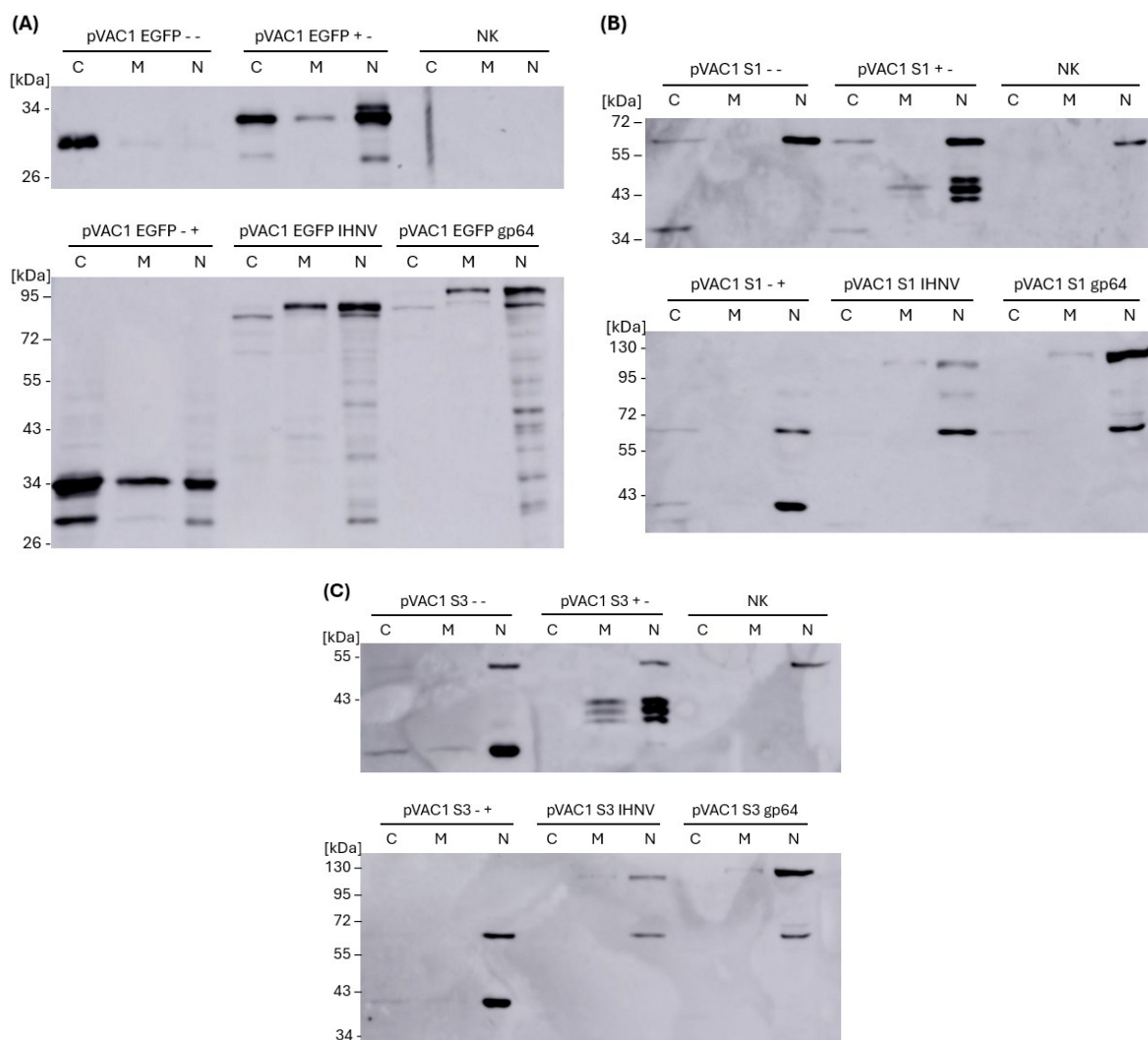


Obrázek 13: Detekce exprimovaných proteinů ve vzorcích transfekovaných buněk HEK 293T a jejich kultivačního média. (A) Vzorky transfekovaných buněk plazmidy se zaklonovaným genem pro EGFP; (B) Vzorky transfekovaných buněk plazmidy se zaklonovaným genem pro $\sigma 1$; (C) Vzorky transfekovaných buněk plazmidy se zaklonovaným genem pro $\sigma 3$; (D) Vzorky kultivačních médií od transfekovaných buněk; M – marker molekulových hmotností (kDa); NK – negativní kontrola

Bohužel ani u jednoho z testovaných plazmidů obsahující gen pro protein $\mu 1$ se nepodařilo docílit jeho produkce. Z tohoto důvodu byly tyto typy vakcinačních plazmidů z dalších experimentů vyloučeny.

Po potvrzení produkce proteinu u ostatních typů plazmidů byla potřeba ověřit úspěšného kotvení proteinu na membránách. Membrány byly izolovány z transfekovaných buněk komerčním kitem Mem-PER™ Plus Kit, jehož použití je popsáno v kapitole 4.2.5.2.

Proteiny ze získaných frakcí byly opět podrobeny separací metodou SDS-PAGE, přeneseny na membránu metodou Western blot a vizualizovány.



Obrázek 14: Detekce exprimovaných proteinů ve frakcích získaných izolací buněčných membrán transfekovaných buněk. (A) Vzorky frakcí z buněk transfekovaných vakcinačními plazmidy obsahující gen pro EGFP; (B) Vzorky frakcí z buněk transfekovaných vakcinačními plazmidy obsahující gen pro σ_1 ; (C) Vzorky frakcí z buněk transfekovaných vakcinačními plazmidy obsahující gen pro σ_3 ; C – cytoplasmatická frakce; M – membránová frakce; N – nerozpustná frakce

Pro identifikaci virových proteinů byla použita protilátka PentaHis Tag Monoclonal Antibody, která se váže specificky na histidinovou značku, kterou jsme vložili na začátek genu. Jedná se o šest po sobě jdoucích histidinů. Z důvodu možného přirozeného vyskytování tohoto motivu v buňkách byla očekávána větší míra nespecifity, která vskutku mohla být často pozorována. Překvapením pro nás však byl zisk četných „žebříčků“ (tzn. detekce četných proteinových variant po celé délce akrylamidového gelu) u plazmidů obsahující gen pro EGFP.

U plazmidů obsahující geny pro σ_1 a σ_3 bylo možno pozorovat nespecifický proužek o velikosti mezi 55 a 72 bp.

5.3. Expresse antigenních proteinů v transfekované buněčné linii RTGill-W1

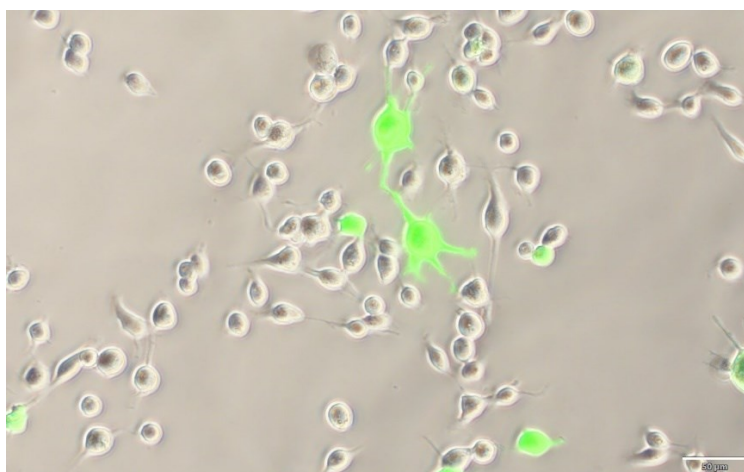
Pomocí transfekčního činidla Turbofect byl proveden pokus také o transfekci buněčné linie RTGill-W1, ale bohužel bez úspěchu. Tato linie nebyla doposud nikým úspěšně transfekována.

Pokusili jsme se tedy o transfekci za použití tří dalších transfekčních činidel (ViaFect™, GeneJet™ Reagent (II), Lyovec™). Byly použity různé poměry plazmidové DNA a transfekčních činidel podle doporučení výrobců. Žádný z pokusů a optimalizací však neprokázal úspěšnou transfekci.

5.4. Účinnost transfekce buněčné linie RTGill-W1 pomocí elektroporačního přístroje Neon™ NxT

Pomocí přístroje Neon™ NxT od firmy Thermo Fisher Scientific jsme se pokusili o transfekci buněčné linie RTGill-W1 také novým inovativním způsobem elektroporace. Byl použit přednastavený optimalizační program pro nalezení vhodných podmínek transfekce nových buněčných linií. Jednalo se o sérii 23 programů určených na 24-jamkovou destičku. Pro zajištění větších šancí úspěšnosti transfekce byl použit plazmid pmaxGFP™ od firmy Lonza, který je dodáván jako kontrolní plazmid v komerční soupravě Amaxa® Cell Line Nucleofector™ Kit V.

U všech programů došlo úspěšné expresi fluorescenčního proteinu GFP a jednalo se tak o první úspěšnou transfekci této buněčné linie vůbec.



Obrázek 15: Ověření transfekce buněčné linie RTGill-W1 optimalizačním program č.16. Foceno 24 hodin po transfekci fluorescenčním mikroskopem Olympus IX71 (Olympus) při zvětšení 200x. Zeleně je vidět produkce proteinu GFP u úspěšně transfeokovaných buněk. Spojení snímku procházejícího světla (brightfield) a emisí pod UV.

Každý z programů dosahoval velmi rozdílné míry transfekce. Jako nejvíce úspěšné se jevíly programy č. 16, 17 a 18, jejichž podmínky elektroporace jsou vypsány níže v tabulce 16.

Program	Napětí (V)	Délka (ms)	Počet pulzů
16	850	30	2
17	950	30	2
18	1050	30	2

Tabulka 16: Hodnoty podmínek vybraných elektroporačních programů 16, 17 a 18 elektroporačního přístroje Neon™ NxT.

U výše zmíněných neúspěšnějších optimalizačních programů byla následně vypočtena jejich účinnost transfekce. Hodnoty a výpočty jsou k nahlédnutí níže v tabulce 17.

<i>Program</i>	16				
<i>Snímek</i>	1	2	3	4	5
<i>Celkem buněk</i>	201	366	766	425	434
<i>Transfekované buňky</i>	26	55	136	62	62
<i>Procento transfekovaných buněk</i>	12,9 %	15,0 %	17,8 %	14,6 %	14,3 %
<i>Průměr</i>	14,9 %				

<i>Program</i>	17				
<i>Snímek</i>	1	2	3	4	5
<i>Celkem buněk</i>	263	666	630	486	548
<i>Transfekované buňky</i>	47	140	137	88	118
<i>Procento transfekovaných buněk</i>	17,9 %	21,0 %	21,7 %	18,1 %	21,5 %
<i>Průměr</i>	20,1 %				

<i>Program</i>	18				
<i>Snímek</i>	1	2	3	4	5
<i>Celkem buněk</i>	252	490	137	88	133
<i>Transfekované buňky</i>	81	195	35	43	51
<i>Procento transfekovaných buněk</i>	32,1 %	39,8 %	25,5 %	48,9 %	38,3 %
<i>Průměr</i>	36,9 %				

Tabulka 17: Hodnoty transfekovaných a netransfekovaných buněk vybraných elektroporačních programů 16, 17 a 18 elektroporačního přístroje Neon™ NxT s vypočítanými účinnostmi transfekce.

Jako program s nevyšší účinností transfekce vyšel program č. 18, kde účinnost dosahovala téměř 37 %.

Jelikož byl elektroporační přístroj Neon™ NxT zapůjčen pouze na omezenou dobu, pokus byl proveden pouze v jednom provedení. Pro budoucí účely by bylo nutno ověřit kredibilitu výsledků opakovaním pokusu.

5.5. Identifikace a kvantifikace rybího orthoreoviru ve vzorku krve obdrženého firmou Dyntec

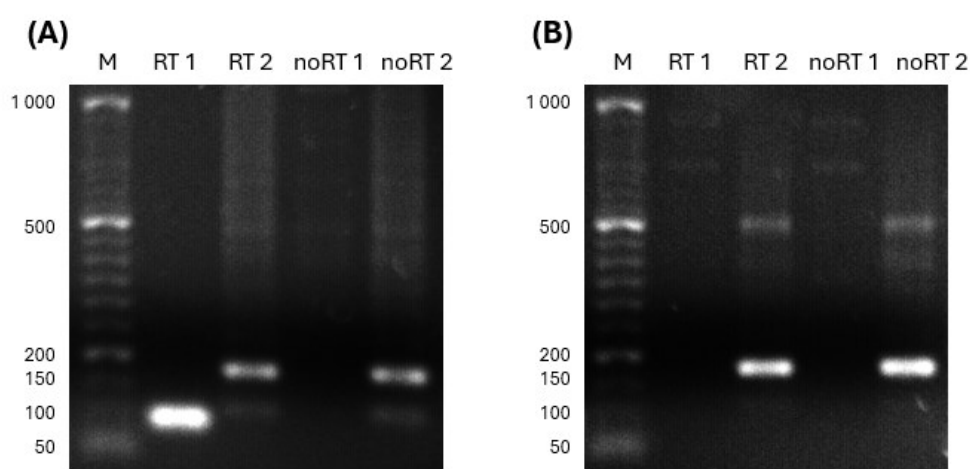
Vzorek krve lososa obecného, který byl obdržen od firmy Dyntec, pocházel z oblasti postižené infekcí PRV. Pomocí specifických primerů získaných z předešlé studie (Adamek et al. 2018) bylo možno dosáhnout identifikace virového subtypu.

Nejprve byla z krve izolována veškerá RNA pomocí komerčního kitu NucleoSpin® Virus a její koncentrace byla změřena na přístroji NanoDrop® 2000 Spectrophotometer (obě metody popsány v kapitolách 4.2.3.1. a 4.2.2.8.). Následně byla syntetizována z RNA cDNA komerčním kitem LunaScript® RT SuperMix (kapitola 4.2.3.2.). Z vytvořené cDNA byly následně provedeny

PCR reakce pokaždé s jinými DNA primery specifickými pro jednotlivé subtypy (kapitola 4.1.4.). Pro PCR byla použita Platinum™ SuperFi™ II DNA polymeráza s odpovídajícím programem (kapitola 4.2.2.1.).

Byly také provedeny dvě kontroly. Jedna za použití mastermixu pro syntézu cDNA neobsahující reverzní transkriptázu („noRT“). Tímto způsobem mohlo být vyloučeno případné znečištění genomovou DNA, ke kterému mohlo dojít během izolace RNA. V druhé kontrole byla jako templát pro PCR použita cDNA syntetizována z izolované RNA neinfikovaného pstruha.

Jelikož výsledné PCR produkty měly dosahovat kolem 75 a 170 bp, byl pro následnou agarózovou elektroforézu použit marker O'RangeRuler 50 bp DNA Ladder. Výsledky jsou k vidění na obrázku 16.



Obrázek 16: Elektroforetogramy identifikace virového subtypu ze vzorku infikované krve. Separace probíhala na 1,5 % agarózovém gelu. (A) Templát pro PCR reakce pocházel ze vzorku infikované krve dodané firmou Dyntec; (B) Templát pro PCR reakce pocházel z krve neinfikovaného pstruha; M – marker molekulových hmotností (bp); RT – mastermix pro syntézu cDNA obsahoval RT; noRT – mastermix pro syntézu cDNA neobsahoval RT; 1 – primery pro identifikaci PRV-1; 2 – primery pro identifikaci PRV-3

Při použití primerů 1 identifikující virový subtyp PRV-1 jsme získali jasný fragment o velikosti kolem 75 bp, který odpovídal našim očekáváním. Potvrdili jsme tím, že náš vzorek byl infikován subtypem rybího orthoreoviru PRV-1.

Při použití primerů 2 pro identifikaci subtypu PRV-3 lze vidět jasně fragmenty o velikosti přibližně 170 bp, což by na první pohled odpovídalo očekávaným fragmentům pro infekci tímto subtypem. Jelikož jsou ale viditelné i při použití mastermixu neobsahující RT, nemůže se jednat o virovou DNA, protože ta by v tomto případě nebyla vůbec převedena na cDNA a primery 2 by neměli kam nasedat. Stejné fragmenty byly detekovatelné i u PCR za použití primerů 2 a cDNA vytvořené z krve neinfikovaného pstruha. Jedná se tedy pravděpodobně o DNA kontaminaci v primerech 2 a mohlo by se jednat o jeden z námi připravovaných vakcinačních plazmidů obsahující gen pro protein σ_3 , který tyto primery právě detekují.

Pro efektivnější identifikaci infekce virem PRV-1 a určení virové nálože pro případné rutinní testování byla zavedena metoda qPCR (kapitola 4.2.3.4.). Pilotní experiment pro kvantifikaci PRV-1 byl proveden ve firmě Dyntec sídlící v Terezíně (Dyntec spol. s.r.o., Pražská 328, 411 55

Terezín). Reakční směsi byly namíchaný pomocí gb SG PCR Master Mixu (Generi Biotech) a každá z reakcí proběhla v triplikátech.

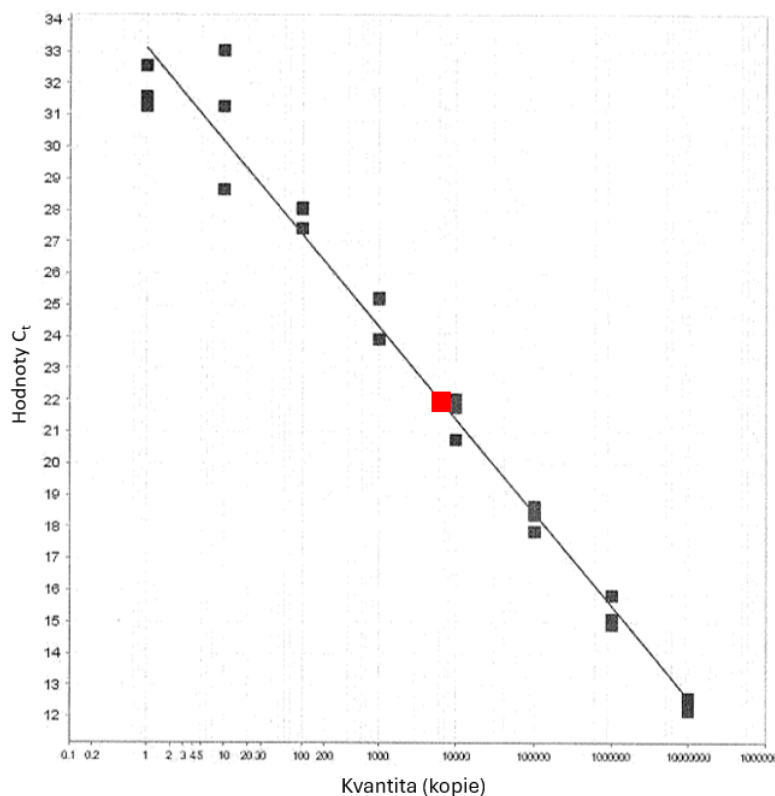
Nejprve musel být připraven templát pro PCR v podobě cDNA syntetizované z RNA izolované ze vzorku. Pro jeho přípravu se postupovalo podle postupu v kapitole 4.2.3.2. Byla připravena také ředící řada standardu a jednalo se o zakoupený synteticky připravený DNA segment obsahující gen pro virový protein $\lambda 1$ o velikosti 3911 bp. Ze zásobního roztoku o koncentraci 50 ng/ μ l byl nejprve připraven roztok obsahující 10^7 kopií genového segmentu na 1 μ l, ze kterého byla následně vytvořena ředící řada v pořadí 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 a 10^0 kopií.

Pro veškeré reakce byly použity primery vyzkoušené z předchozího experimentu pro identifikaci virového subtypu PRV-1.

C_t vzorku infikované krve dosahovala hodnoty 21,97. Ve 2 μ l cDNA vytvořené z virové RNA izolované z 200 μ l vzorku krve bylo zjištěno 2 319,69 kopií odpovídající virovému segmentu L3.

Za ideálních podmínek by se mělo množství cDNA během každého cyklu zdvojit. Tato situace by odpovídala 100 % účinnosti amplifikace (Efficiency, E), podle které jde poté vypočítat ideální sklon křivky standardu (Slope: -3,322). Z ředící řady nám vyšla E: 119,336 % a Slope: -2,932. Určuje se také koeficient determinace (R^2), který nám říká, s jakou přesností koreluje náš vzorek s křivkou standardu. Čím více se hodnota blíží 1, tím lépe vzorek odpovídá křivce standardu. Koeficient determinace našeho vzorku dosahoval R^2 : 0,979. Teoretický limit detekce (Y-intercept), který vyjadřuje hodnotu C_t , při kterém je možno detekovat minimální možný počet kopií cílového segmentu, byl vypočítán jako 33,114.

Povedlo se nám tak ukázat, že použité primery lze použít pro kvantifikaci viru PRV-1 ve vzorku lososí krve. Křivka standardu spolu s vyznačeným testovaným vzorkem krve je možno vidět na obrázku 17.



Obrázek 17: Křivka standardu – genu pro virový protein $\lambda 3$. Ředící řada standardu je znázorněna šedě. Vzorek infikované krve je znázorněn červeně.

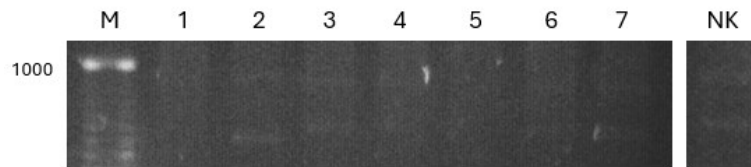
5.6. Pomnožení viru infekcí pstruhů duhových

Jelikož hlavní cíl replikace PRV jsou erythrocyty, donedávna nebylo možno množit virus *in vitro*, pouze v krvi hostitele *in vivo*. S nejnovější metodou, jak kultivovat virus v laboratoři *ex vivo*, přišel Wessel a jeho skupina. Z infikované krve byly zhotoveny lyzáty, které následně sloužily jako PRV inokulum pro infekci naivních erythrocytů, které byly izolovány z krve a resuspendovány v kompletním kultivačním L-15 médiu. Takto infikované erythrocyty byly následně kultivovány při 15 °C v rotačním inkubátoru až po dobu 21 dní (Wessel, Olsen, et al. 2015). Tato metoda je ale stále technicky a časově náročná, a proto jsme přistoupili ke klasické metodě amplifikace viru *in vivo* v hostitelích.

Díky spolupráci s firmou Dyntec se nám podařilo zajistit sádku mladých pstruhů duhových, které jsme mohli za kontrolovaných podmínek v prostorách spadajících do kategorie BSL-2 (biosafety level 2) a za dohledu veterinářů infikovat již dříve obdrženým vzorkem nakažené krve. Infikovaná krev jim byla injikována do dutiny břišní. Mladí pstruzi (staří 4 týdny) byli 3 týdny před infekcí drženi v aklimatizaci při 12 °C za hlídání hladiny kyslíku a dusíku.

Jednalo se o 7 pstruhů, kterým byla postupně odebírána krev ve třech po sobě jdoucích dnech. Dva dny po infekci (dpi, days post infection) byla odebrána krev pstruhům č. 1 a 2. Pstruhům č. 3 a 4 byla krev odebrána 3 dpi a pstruhům č. 5, 6 a 7 byla krev odebrána 4 dpi.

Z odebrané krve byla izolována veškerá RNA a byla podle ní syntetizována cDNA, ze které byly následně zhotoveny PCR reakce za použití již ověřených primerů 1 pro identifikaci subtypu PRV-1. Velikost PCR produktů byla ověřena pomocí agarózové DNA elektroforézy, jejíž výsledky jsou k vidění na obrázku 18.



Obrázek 18: Elektroforetogram kontroly úspěšnosti infekce 7 pstruhů duhových vzorkem krve infikované PRV-1; M – marker molekulových hmotností (bp); čísla označují jednotlivé pstruhy v sádce; NK – negativní kontrola, neinfikovaný pstruh

Výsledkem byly velmi slabé žebříčky nespecifických fragmentů neodpovídající očekávané velikosti. Infekce a namnožení viru tedy bylo neúspěšné. Přestože vzorek krve obsahoval subtyp viru PRV-1, virus byl pravděpodobně neaktivní a nemohl tedy naivní pstruhy infikovat. S největší pravděpodobností došlo k inaktivaci viru během přepravy vzorku z Norska.

6. Diskuze

Přestože jsou DNA vakcíny stále považovány za novinku v oblasti vakcinací, v současné době se stávají stále žádanější formou vakcinace především ve veterinárním průmyslu. Infekce virem PRV-3 představuje v posledních letech stále akutnější problém v rybářském průmyslu, kde způsobuje vysoké ekologické i ekonomické ztráty. Vystala tedy nutnost protekce před tímto onemocněním.

6.1. Navržení vakcinačních plazmidů

Jako cílové virové proteiny pro konstrukci vakcinačních plazmidů byly vybrány proteiny $\sigma 1$, $\sigma 3$ a $\mu 1$. Jeden z hlavních důvodů jejich volby byl fakt, že jsou tyto proteiny součástí vnější kapsidy viru PRV, a tedy mají nejvyšší šanci být účinným a přístupným cílem pro neutralizující protilátky, které by po vakcinaci plazmidem obsahující příslušné geny vznikly. U viru MRV bylo potvrzeno, že tyto protilátky zamezují nasednutí viru na membránu buňky, uvolnění viru z endozomu nebo degradaci vrchní vrstvy virové kapsidy (Tyler et al. 1993).

Ve studii Haatveita et al. 2018, kde se snažili otestovat možnou DNA vakcínu pro lososy obecné proti PRV-1, byly vakcinační plazmidy konstruovány pomocí genů pro proteiny μNS a $\sigma 1$. Při podání plazmidu obsahující kombinaci obou genů, bylo dosaženo zvýšené exprese markerů pro lymfocyty ve slezině (Haatveit et al. 2018). Protein μNS se podílí především na tvorbě viral factories (tzv. virové továrny) v buněčné cytoplazmě, kde dochází ke skládání nových virových částic a jejich maturaci. Přestože se tedy tento protein může zdát jako ne příliš vhodnou volbou pro cíl specifických protilátek, u reovirů byla potvrzena role nestrukturních proteinů jakožto cíl cytotoxických CD8+ T-lymfocytů (Jones et al. 1996).

Naším cílem ale bylo zaměřit se především na prezentaci antigenů přes komplexy MHCII a tvorbu specifických protilátek, a ne na imunitu buněčnou. U ostatních rybích onemocnění, jako jsou např. ISAV nebo IPN, byla pozorována závislost ochrany proti vypuknutí onemocnění na míře neutralizačních protilátek (Lauscher et al. 2011; Munang'andu et al. 2013). Toto potvrzuje důležitost aktivace protilátkové imunitní odpovědi u ryb při vývoji vakcín. Z tohoto důvodu nebyl protein μNS do námi testovaných virových proteinů zařazen.

U studie Haatveita et al. (2018) byla navíc pozorována aktivace vrozené protivirové imunity (RIG-I, Mx, PKR, Viperin a IFN- γ) bez závislosti na zaklonovaném genu. Toto tedy poukazuje na důležitost samotného plazmidu v aktivaci a posílení adekvátní imunitní reakce (Haatveit et al. 2018).

Jednou z možností úpravy imunogenicity vakcinačních plazmidů je navíc vložení genů pro posílení aktivace imunitní reakce a docílení lepší efektivity vakcinace. Mohou se využít například CpG motivy, což jsou sekvence sekvence cytosinu a guaninu, které jsou málo nebo vůbec metylované. Tato nízká míra metylace je oproti obratlovcům běžná u většiny skupin virů a bakterií a slouží tedy jako PAMP. Dále se do plazmidu mohou zaklonovat geny pro různé

cytokiny (např. IL-2, IFN- γ , IL-12 nebo IL-15), jejichž produkce poté modulují vzniklou imunitní odpověď (Hølvold, Myhr a Dalmo 2014).

Plazmid pVAC1 je speciálně připraven pro vývoj DNA vakcín, který po intramuskulárním podání (tzn. do svalu) stimuluje humorální imunitní odpověď. Navíc tento plazmid obsahuje sekvence pro modifikaci exprese proteinu (signální sekreční sekvence IL-2 a kotvící sekvence PLAP), což korelovalo s našimi cíli pro vývoj vakcinačních plazmidů se zaměřením na humorální imunitu.

Přestože se plazmid pVAC1 svými vlastnosti zdál jako ideální volba, při přípravě vakcinačních vektorů PCR reakcemi jsme dosahovali malých koncentrací (až 20 ng/ul), které mnohdy nemohly být dále použity např. pro přípravu klonovacích směsí. S podobným problémem jsme se setkali i u sekvenací již zkonstruovaných a izolovaných vakcinačních plazmidů. Sekvenční reakce za běžných podmínek neproběhly a po konzultaci s Laboratoří sekvenace DNA v BIOCEVu (Průmyslová 595, Vestec) jsme museli přistoupit k sekvenaci přes Hairpin protokol.

Za těmito neúspěchy je možné zamotání vakcinačního plazmidu ve formě negativních nadobrátek, které mohly vzniknout během jejich replikace v bakteriích. Plazmid v této podobě následně nedovoluje ideální nasedání primerů na jejich komplementární místo jak při PCR, tak při sekvenčních reakcích.

6.2. Produkce virových proteinů v buněčných liniích

Expese antigenů po transfekci buněčné linie HEK 293T byla potvrzena u 15 vakcinačních plazmidů. U plazmidů obsahující gen pro virový protein μ 1 bohužel nedošlo k produkci proteinů ani po opakování experimentů. Jeden z důvodů neúspěchu mohl být fakt, že se jedná o dlouhý gen (2088 bp), což ztěžuje jeho expresi. Problém s produkcí proteinu by mohl souviset i s faktem, že je protein μ 1 post-translačně autolyticky štěpen na dva fragmenty, menší N-terminální μ 1N a větší C-terminální μ 1C. Toto štěpení je za normálních okolností důležité pro penetraci endozomální membrány a úniku virionu do cytoplazmy (Ivanovic et al. 2008). Jelikož byla značka pro jeho detekci (His-tag) připojena na jeho N-konec, vzniklý fragment μ 1N (4 kDa) (Nibert et al. 1991) byl příliš malý na to, aby mohl být detekován při separaci na 10 % PAA gel metodou SDS-PAGE a za použití markeru molekulových hmotností Color Prestained Protein Standard, Broad Range (New England Biolabs), podle kterého lze odhadnout velikost proteinů větších než 10 kDa.

Pro detekci takto malého proteinu by tedy musely být učiněny adekvátní optimalizace v podobě zvýšení koncentrace PAA gelu a použití jiného markeru, který by byl uzpůsoben na odhadnutí velikostí menších proteinů.

U sekrečních vakcinačních plazmidů jsme vždy po separaci proteinů detekovali více velikostí antigenu, než jsme předpokládali. Získali jsme vždy 2–3 nesespecifické proužky. Jednou z možností tohoto úkazu může být případná post-translační modifikace proteinu, ke které mohlo dojít během sekreční dráhy proteinu v endoplazmatickém retikulu a Golgiho aparátu.

V naší laboratoři molekulární virologie se běžně používá buněčná linie HEK 293T, na které byly také exprese antigenu testovány. Jedná se ale o lidskou buněčnou linii. Abychom se tedy při testování produkce virových antigenů v transfekovaných buňkách mohli co nejvíce přiblížit situaci, kdy se bude antigen produkovat v hostiteli po vakcinaci, byla pořízena rybí buněčná linie RTGill-W1. Jedná se o linii izolovanou z žaber pstruha duhového, které by potenciálně mohli být bránou pro vstup viru do těla hostitele (Collet 2014).

Po vakcinaci DNA plazmidem obsahující glykoprotein G viru IHNV byly v žábrách pstruhů duhových detekovány zvýšené hodnoty genů souvisejících s aktivací interferonů typu 1. Toto zjištění posiluje teorii významnosti žaber při virových infekcích u ryb (Purcell et al. 2006).

Tato buněčná linie navíc nepotřebuje kromě nízké teploty (19 °C) při její kultivaci žádné další speciální podmínky. Oproti ostatním dostupným kulturám izolovaným ze pstruha, které potřebují navíc upravenou atmosféru na 5 % CO₂, tato buněčná linie se kultivuje při běžné atmosféře, což bylo v naší laboratoři možné zajistit.

Přestože tato buněčná linie nebyla doposud úspěšně transfekována, bylo nám na tuto linii od firmy Promega doporučeno transfekční činidlo ViaFect™. Tato transfekce bohužel ale nebyla úspěšná. Ani žádné další z námi testovaných transfekčních činidel nevedlo ke zdárnému výsledku.

Pomocí přístroje Neon™ NxT od firmy Thermo Fisher Scientific jsme se pokusili o transfekci buněčné linie RTGill-W1 také novým inovativním způsobem elektroporace. Provedli jsme sérii optimalizačních programů pro identifikaci nejvhodnějších podmínek pro transfekci nové buněčné linie. Jelikož byl přístroj pouze zapůjčený, stihl se udělat pokus pouze v jednom provedení a pouze s kontrolním plazmidem z komerční soupravy Amaxa® Cell Line Nucleofector™ Kit V.

Do budoucna by bylo nutno pokus s tímto přístrojem opakovat, aby mohl být s jasnou průkazností vybrán nejvhodnější program a podmínky transfekce. Následně by bylo také záhodno otestovat produkci antigenů vakcinačních plazmidů i v této buněčné linii.

6.3. Pomnožení viru a kvantifikace virové infekce

Jako další potřebný krok pro testování účinnosti vakcinačních plazmidů a případné klinické studie na pstruzích, bylo potřeba zajistit dostatek infekčního viru. Jelikož se virus nelze kultivovat v buněčných kulturách, a jediný dodnes známý způsob amplifikace viru v erythrocytech *ex vivo* (Wessel, Olsen et al. 2015) je pro naši laboratoř technicky náročný, přistoupili jsme ke způsobu amplifikace viru infekcí živých pstruhů duhových.

Od firmy Dyntec jsme obdrželi vzorek infikované krve z oblasti s podezřením na infekci PRV-3. Po identifikaci virového subtypu, za použití specifických primerů dříve zveřejněných ve studii Adamka et al. 2018, jsme však zjistili, že se jedná o subtyp PRV-1.

Přestože byly naše vakcinační plazmidy vytvořeny proti subtypu PRV-3, v dřívější studii byla porovnávána míra protekce proti subtypu PRV-1, kterou vytvořila podaná inaktivovaná

vakcína proti PRV-1 a dřívější infekce subtypy PRV-3 a PRV-2 zvláště. Po infekci PRV-3 byly vskutku pozorovány protilátky, které následně reagovali proti proteinu $\sigma 1$ PRV-1 a chránili tak lososy před infekcí. Předchozí infekce PRV-2 pouze redukovala závažnost příznaků onemocnění HSMI. U subtypů PRV-1 a PRV-3 tedy pravděpodobně dochází ke zkřížené reakci protilátek (cross-reactivity) (Malik, Teige et al. 2021). Z tohoto důvodu jsme se nakonec rozhodli k amplifikaci viru PRV-1 přistoupit.

Infekce pstruhů duhových proběhla injekcí infikované krve do dutiny břišní v prostorách spadajících do kategorie BSL-2 a za dohledu veterinářů ve firmě Dyntec sídlící v Terezíně. Úspěšná infekce ale bohužel neproběhla ani při opakování experimentu. S nejvyšší pravděpodobností byl tedy virus v obdrženém vzorku krve již neinfekční. Virus PRV je poměrně stabilní při vysokých teplotách, pH i na UV světle. Přestože byla většina experimentů prováděna na purifikovaných partikulích, inaktivace teplem byla testována i na infikované krvi. Byl tím testován případný protektivní vliv erytrocytů proti teplotní inaktivaci virových partikulí. Výsledky se však od purifikovaných virionů nijak významně nelišily (Wessel et al. 2020).

Za jakých podmínek byl námi obdržený vzorek krve odebrán a následně skladován před doručením nemůžeme s jistotou potvrdit. Během cesty z Norska mohlo dojít k jeho opakovanému rozmražení a zmražení, které mohlo virus poničit a snížit tak jeho titr. Podobný vliv byl pozorován např. u viru IPNV, kde se titr viru snižoval především při rozmražení a následném zamražení na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Mortensen et al. 1998).

Pro úspěšnou amplifikaci by tedy bylo potřeba pokusy opakovat s novým vzorkem krve s infekčním virem. Dodávka nového infekčního materiálu je již domluvena a následné infekce budou probíhat na lososech obecných, u kterých byla úspěšná infekce již potvrzena.

Pro případ úspěšné infekce pstruhů duhových nebo lososů obecných byla již předpřipravena metoda RT-qPCR pro kvantifikaci viru v pstruzích a hodnocení virové infekce. Přestože se nám nepodařilo virus amplifikovat, rozhodli jsme se metodu vyzkoušet alespoň na vzorku infikované krve. Jednalo se tedy pouze o pilotní pokus a zavedení metody pro případné následné testování virové infekce.

Hodnoty účinnosti amplifikace byly vyšší, než by mělo být na ideálního stavu možné ($E: 119,336\%$), tzn. cDNA ve vzorku by se musela během jednoho cyklu amplifikovat více než dvakrát. Nejpravděpodobnějším důvodem tohoto fenoménu je nepřesné pipetování při přípravě roztoků ředící řady. Mohlo také dojít k inhibici polymerázy v podobě kontaminací templátem, či jinými roztoky, které byly použity při přípravě cDNA. To má poté za následek posunutí hodnot C_t a sklonu křivky standardu (<https://biosistemika.com/blog/qpcr-efficiency-over-100/>). Co se koeficientu determinace týče, za přijatelné se považuje $R^2 > 0,980$. Náš výsledek $R^2: 0,979$ je tedy hraniční.

Pro případné rutinní testování by ale bylo potřeba pokus ještě opakovat a provést jeho optimalizaci. Kredibilita metody by také mohla být navýšena kvantifikací transkriptů některého z referenčních genů. Nejčastěji se využívají tzv. provozní neboli housekeeping geny, jejichž exprese by měla být ve všech vzorcích stejná a pomohly by nám tím pádem odhalit

případné odchylky či chyby. Bylo by nutné také zajistit standardní podmínky při izolaci RNA, reverzní transkripci a qPCR.

Součástí budoucího testování účinnosti vakcinačních plazmidů a jejich schopnosti vytvořit specifické protilátky by mohl být multiplexní imunotest založený na kuličkách, který byl navržen na detekci specifických IgM a byl popsán v předchozí studii (Teige et al. 2017). Tato metoda dosahuje vysoké citlivosti a je schopna detekovat několik protilátek i v malém vzorku plazmy nebo séra.

7. Souhrn

Výsledky diplomové práce se dají shrnout do následujících bodů:

1. Byl proveden průzkum a naplánování přesného postupu přípravy vakcinačních plazmidů a všech materiálů nutných k jejich konstrukci
 - a. Byly vybrány nejvhodnější cílové virové proteiny a byly navrženy typy vakcinačních plazmidů obsahující různou kombinací vlastností.
 - b. Byla vytvořena schémata všech typů vakcinačních plazmidů v programu SnapGene Viewer a byly navrženy veškeré potřebné primery pro konstrukci vakcinačních plazmidů.
2. Byla provedena úspěšná konstrukce všech 22 navržených vakcinačních plazmidů.
 - a. Průběh konstrukce plazmidů byl doprovázen kontrolou PCR segmentů pomocí DNA elektroforézy. Úspěšnost klonování byla zkontrolována metodou Colony PCR a následnou sekvenací, aby byla potvrzena přesná podoba vakcinačních plazmidů a mohly být odhaleny případné mutace či nesrovnalosti, které by mohly ovlivnit kvalitu plazmidů.
3. Byla testována produkce virových proteinů v buněčné linii HEK 293T.
 - a. Byly provedeny transfekce pomocí transfekčního činidla Turbofect všech 20 vakcinačních plazmidů.
 - b. Produkce virových proteinů byla úspěšně potvrzena u 15 vakcinačních plazmidů. U plazmidů obsahujících gen pro virový protein $\mu 1$ se ani po optimalizacích nepodařilo dokázat expresi proteinu.
4. Byla zakoupena rybí buněčná linie RTGill-W1 pro zajištění lepší představy o produkci proteinů a fungování DNA vakcinačních plazmidů v konečném recipientovi.
 - a. Byl proveden pokus o transfekci buněčné linie RTGill-W1 celkem čtyřmi transfekčními činidly. Žádný z pokusů však nebyl úspěšný.
 - b. Za použití zapůjčeného nového typu elektroporačního přístroje Neon™ NxT se nám podařilo dosáhnout produkce fluorescenčního proteinu a úspěšné transfekce této doteď nefrasfekovatelné buněčné linie.
5. Virový subtyp ve vzorku infikované krve, který byl obdržen firmou Dyntec, byl pomocí metody PCR a specifických primerů identifikován jako PRV-1.
6. Pro identifikaci a kvantifikaci viru PRV-1 v infikovaných jedincích byla zavedena metoda RT-qPCR a byl proveden pilotní pokus se vzorkem infikované krve obdrženým firmou Dyntec.

7. Byl proveden pokus o namnožení viru PRV-1 obdrženy jako vzorek infikované krve v sedmi pstruzích duhových. Krev infikovaných pstruhů byla odebrána v různých časových intervalech po infekci, ale ani u jednoho z nich nebylo zaznamenáno namnožení viru.

8. Seznam použité literatury

Shrnující články (review) označeny *

- Adamek, Mikolaj, John Hellmann, Agnes Flamm, Felix Teitge, Niccolò Vendramin, Daniel Fey, Karin Riße, Franziska Blakey, Espen Rimstad, a Dieter Steinhagen. 2018. „Detection of piscine orthoreoviruses (PRV-1 and PRV-3) in Atlantic salmon and rainbow trout farmed in Germany". *Transboundary and Emerging Diseases* 66(1):14–21. doi: 10.1111/tbed.13018.
- Alexopoulou, Lena, Agnieszka Czopik Holt, Ruslan Medzhitov, a Richard A. Flavell. 2001. „Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3". *Nature* 413:732–38. doi: 10.1038/35099560.
- Avtalion, R. R., A. Wojdani, Z. Malik, R. Shahrabani, a M. Duczyniner. 1973. *Influence of Environmental Temperature on the Immune Response in Fish*. doi: 10.1007/978-3-642-65531-9_1.
- Barton, Erik S., J. Craig Forrest, Jodi L. Connolly, James D. Chappell, Yuan Liu, Frederick J. Schnell, a Asma Nusrat. 2001. „Junction Adhesion Molecule Is a Receptor for Reovirus". *Cell* 104:441–51. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00231-8.
- *Bilal, Sumaira, Angela Etayo, a Ivar Hordvik. 2021. *Immunoglobulins in teleosts*. Roč. 73. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. doi: 10.1007/s00251-020-01195-1.
- Borsa, By J., B. D. Morash, M. D. Sargent, T. P. Copps, P. A. Lievaart, a J. G. Szekely. 1979. „Two Modes of Entry of Reovirus Particles into L Cells". *Journal of General Virology* 45:161–78. doi: 10.1099/0022-1317-45-1-161.
- Cartagena, Julio, Catalina Jiménez, a Eugenio Spencer. 2020. „Detection of Piscine orthoreoviruses (PRV-1b and PRV-3a) in farmed Coho salmon with jaundice syndrome from Chile". *Aquaculture* 528. doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.735480.
- Castillo, Ana, Carmen Sánchez, Javier Dominguez, Stephen L. Kaattari, a Alberto J. Villena. 1993. „Ontogeny of IgM and IgM-bearing Cells in Rainbow Trout". *Developmental and Comparative Immunology* 17:419–24. doi: 10.1016/0145-305x(93)90033-m.
- Cicco, Emiliano Di, Hugh W. Ferguson, Karia H. Kaukinen, Angela D. Schulze, Shaorong Li, Amy Tabata, Oliver P. Günther, Gideon Mordecai, Curtis A. Suttle, a Kristina M. Miller. 2018. „The same strain of Piscine orthoreovirus (PRV-1) is involved in the development of different, but related, diseases in Atlantic and Pacific Salmon in British Columbia". *Facets* 3(1):599–641. doi: 10.1139/facets-2018-0008.
- Di Cicco, Emiliano, Hugh W. Ferguson, Angela D. Schulze, Karia H. Kaukinen, Shaorong Li, Raphaël Vanderstichel, Øystein Wessel, Espen Rimstad, Ian A. Gardner, K. Larry Hammell, a Kristina M. Miller. 2017. „Heart and skeletal muscle inflammation (HSMI) disease diagnosed on a British Columbia salmon farm through a longitudinal farm study". *PLoS ONE* 12(2). doi: 10.1371/journal.pone.0171471.
- Claver, Juan A., a Agustin I. E. Quaglia. 2009. „Comparative Morphology, Development, and Function of Blood Cells in Nonmammalian Vertebrates". *Journal of Exotic Pet Medicine* 18(2):87–97. doi: 10.1053/j.jepm.2009.04.006.
- *Collet, Bertrand. 2014. „Innate immune responses of salmonid fish to viral infections". *Developmental and Comparative Immunology* 43(2):160–73. doi: 10.1016/j.dci.2013.08.017.
- Dahle, Maria Krudtaa, Øystein Wessel, Gerrit Timmerhaus, Ingvild Berg Nyman, Sven Martin Jørgensen, Espen Rimstad, a Aleksei Krasnov. 2015. „Transcriptome analyses of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)

- erythrocytes infected with piscine orthoreovirus (PRV)". *Fish and Shellfish Immunology* 45(2):780–90. doi: 10.1016/j.fsi.2015.05.049.
- Danilova, Nadia, Jeroen Bussmann, Kerstin Jekosch, a Lisa A. Steiner. 2005. „The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: Identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z". *Nature Immunology* 6(3):295–302. doi: 10.1038/ni1166.
- Davis, Brent S., Gwong-Jen J. Chang, Bruce Cropp, John T. Roehrig, Denise A. Martin, Carl J. Mitchell, Richard Bowen, a Michel L. Bunning. 2001. „West Nile Virus Recombinant DNA Vaccine Protects Mouse and Horse from Virus Challenge and Expresses In Vitro a Noninfectious Recombinant Antigen That Can Be Used in Enzyme-Linked Immunosorbent Assays". *Journal of Virology* 75(9):4040–47. doi: 10.1128/jvi.75.9.4040-4047.2001.
- Dermody, Terence S., Max L. Nibert, Rhonda Bassel-Duby, a Bernard N. Fields. 1990. „A Sigma 1 Region Important for Hemagglutination by Serotype 3 Reovirus Strains". *Journal of Virology* 64(10):5173–76. doi: 10.1128/jvi.64.10.5173-5176.1990.
- Dhamotharan, Kannimuthu, Niccolò Vendramin, Turhan Markussen, Øystein Wessel, Argelia Cuenca, Ingvild B. Nyman, Anne Berit Olsen, Torstein Tengs, Maria Krudtaa Dahle, a Espen Rimstad. 2018. „Molecular and antigenic characterization of piscine orthoreovirus (PRV) from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)". *Viruses* 10(4). doi: 10.3390/v10040170.
- *Ellis, A. E. 2001. „Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria". *Developmental and Comparative Immunology* 25:827–39. doi: 10.1016/s0145-305x(01)00038-6.
- Federation of European Aquaculture Producers. 2023. *European Aquaculture Production Report 2016-2022 (V1.1)*. (<https://feap.info/wp-content/uploads/2024/01/2024-01-19-production-report-2023-v1.pdf>)
- Ferguson, H. W., R. T. Kongtorp, T. Taksdal, D. Graham, a K. Falk. 2005. „An outbreak of disease resembling heart and skeletal muscle inflammation in Scottish farmed salmon, *Salmo salar* L., with observations on myocardial regeneration". *Journal of Fish Diseases* 28(2):119–23. doi: 10.1111/j.1365-2761.2004.00602.x.
- Fernandes, J. M. O., G. D. Kemp, a V. J. Smith. 2004. „Two novel muramidases from skin mucosa of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)". *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology* 138(1):53–64. doi: 10.1016/j.cbpc.2004.02.004.
- Finstad, Øystein Wessel, Maria Krudtaa Dahle, Tone Hæg Lindholm, Ingvild Berg Nyman, Marie Løvoll, Christian Wallace, Christel Moræus Olsen, Anne K. Storset, a Espen Rimstad. 2014. „Piscine orthoreovirus (PRV) infects Atlantic salmon erythrocytes". *Veterinary Research* 45(1). doi: 10.1186/1297-9716-45-35.
- *Flajnik, Martin F. 2002. „Comparative analyses of immunoglobulin genes: Surprises and portents". *Nature Reviews Immunology* 2(9):688–98. doi: 10.1038/nri889.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2016. *The state of world fisheries and aquaculture 2016: contributing to food security and nutrition for all*. Rome. (<https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/20e618b3-93a1-488a-9697-798f6b6c6b35/content>)
- Fux, Robert, Daniela Arndt, Martin C. Langenmayer, Julia Schwaiger, Hermann Ferling, Nicole Fischer, Daniela Indenbirken, Adam Grundhoff, Lars Dölken, Mikolaj Adamek, Dieter Steinhagen, a Gerd Sutter. 2019. „Piscine orthoreovirus 3 is not the causative pathogen of Proliferative Darkening Syndrome (PDS) of brown trout (*Salmo trutta fario*)". *Viruses* 11(2). doi: 10.3390/v11020112.

- Garseth, Åse Helen, Torbjørn Ekrem, a Eirik Biering. 2013. „Phylogenetic evidence of long distance dispersal and transmission of piscine reovirus (PRV) between farmed and wild atlantic salmon". *PLoS ONE* 8(12). doi: 10.1371/journal.pone.0082202.
- Garseth, Åse Helen, Torfinn Moldal, Siri Kristine Gåsnes, Monika Jankowska Hjortaas, Vegard Pedersen Sollien, a Anne Gerd Gjevre. 2019. „Piscine orthoreovirus-3 is prevalent in wild sea trout (*Salmo trutta* L.) in Norway". *Journal of Fish Diseases* 42(3):391–96. doi: 10.1111/jfd.12943.
- Garver, Kyle A., Stewart C. Johnson, Mark P. Polinski, Julia C. Bradshaw, Gary D. Marty, Heindrich N. Snyman, Diane B. Morrison, a Jon Richard. 2016. „Piscine orthoreovirus from western North America is transmissible to atlantic salmon and sockeye salmon but fails to cause heart and skeletal muscle inflammation". *PLoS ONE* 11(1). doi: 10.1371/journal.pone.0146229.
- Garver, Kyle A., Amelia A. M. Mahony, Dario Stucchi, Jon Richard, Cecile Van Woensel, a Mike Foreman. 2013. „Estimation of parameters influencing waterborne transmission of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in atlantic salmon (*Salmo salar*)". *PLoS ONE* 8(12). doi: 10.1371/journal.pone.0082296.
- Godoy, Marcos G., Molly J. T. Kibenge, Yingwei Wang, Rudy Suarez, Camila Leiva, Francisco Vallejos, a Frederick S. B. Kibenge. 2016. „First description of clinical presentation of piscine orthoreovirus (PRV) infections in salmonid aquaculture in Chile and identification of a second genotype (Genotype II) of PRV". *Virology Journal* 13(1). doi: 10.1186/s12985-016-0554-y.
- Haatveit, Hanne M., Kjartan Hodneland, Stine Braaen, Elisabeth F. Hansen, Ingvild B. Nyman, Maria K. Dahle, Petter Frost, a Espen Rimstad. 2018. „DNA vaccine expressing the non-structural proteins of Piscine orthoreovirus delay the kinetics of PRV infection and induces moderate protection against heart -and skeletal muscle inflammation in Atlantic salmon (*Salmo salar*)". *Vaccine* 36(50):7599–7608. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.10.094.
- Haatveit, Hanne Merethe, Ingvild B. Nyman, Turhan Markussen, Øystein Wessel, Maria Krudtaa Dahle, a Espen Rimstad. 2016. „The non-structural protein μ S of piscine orthoreovirus (PRV) forms viral factory-like structures". *Veterinary Research* 47(1). doi: 10.1186/s13567-015-0302-0.
- Hansen, John D., Eric D. Landis, a Ruth B. Phillips. 2005. „Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish". *Proceedings of the National Academy of Sciences*. doi: 10.1073/pnas.0500027102.
- Harmache, Abdallah, Monique LeBerre, Stéphanie Droineau, Marco Giovannini, a Michel Brémont. 2006. „Bioluminescence Imaging of Live Infected Salmonids Reveals that the Fin Bases Are the Major Portal of Entry for Novirhabdovirus ". *Journal of Virology* 80(7):3655–59. doi: 10.1128/jvi.80.7.3655-3659.2006.
- *Harper, Claudia, a Jeffrey C. Wolf. 2009. „Morphologic Effects of the Stress Response in Fish". *Journal of the Institute for Laboratory Animal Research* 50(4). doi: 10.1093/ilar.50.4.387.
- Hauge, Helena, Maria Dahle, Torfnn Moldal, Even Thoen, Anne Gerd Gjevre, Simon Weli, Marta Alarcón, a Søren Grove. 2016. „Piscine orthoreovirus can infect and shed through the intestine in experimentally challenged Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)". *Veterinary Research* 47(1). doi: 10.1186/s13567-016-0343-z.
- Hauge, Helena, Niccolo Vendramin, Torunn Taksdal, Anne Berit Olsen, Øystein Wessel, Susie Sommer Mikkelsen, Anna Luiza Farias Alencar, Niels Jørgen Olesen, a Maria Krudtaa Dahle. 2017. „Infection experiments with novel Piscine orthoreovirus from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in salmonids". *PLoS ONE* 12(7). doi: 10.1371/journal.pone.0180293.
- *Hølvold, Linn B., Anne I. Myhr, a Roy A. Dalmo. 2014. „Strategies and hurdles using DNA vaccines to fish". *Veterinary Research* 45(1):1–11. doi: 10.1186/1297-9716-45-21.

- Chang, Mingxian, Bertrand Collet, Pin Nie, Katherine Lester, Scott Campbell, Christopher J. Secombes, a Jun Zou. 2011. „Expression and Functional Characterization of the RIG-I-Like Receptors MDA5 and LGP2 in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)". *Journal of Virology* 85(16):8403–12. doi: 10.1128/jvi.00445-10.
- Ivanovic, Tijana, Melina A. Agosto, Lan Zhang, Kartik Chandran, Stephen C. Harrison, a Max L. Nibert. 2008. „Peptides released from reovirus outer capsid form membrane pores that recruit virus particles". *EMBO Journal* 27(8):1289–98. doi: 10.1038/emboj.2008.60.
- *Jacobs, Bertram L., a Jeffrey O. Langland. 1996. „When Two Strands Are Better Than One: The Mediators and Modulators of the Cellular Responses to Double-Stranded RNA". *Virology* 219:339–49. doi: 10.1006/viro.1996.0259.
- Jiang, Yongping, Kangzhen Yu, Hongbo Zhang, Pingjing Zhang, Chenjun Li, Guobin Tian, Yanbing Li, Xijun Wang, Jinying Ge, Zhigao Bu, a Hualan Chen. 2007. „Enhanced protective efficacy of H5 subtype avian influenza DNA vaccine with codon optimized HA gene in a pCAGGS plasmid vector". *Antiviral Research* 75(3):234–41. doi: 10.1016/j.antiviral.2007.03.009.
- Johansen, Lill Heidi, Maria Krudtaa Dahle, Øystein Wessel, Gerrit Timmerhaus, Marie Løvoll, Magnus Røsæg, Sven Martin Jørgensen, Espen Rimstad, a Aleksei Krasnov. 2016. „Differences in gene expression in Atlantic salmon parr and smolt after challenge with Piscine orthoreovirus (PRV)". *Molecular Immunology* 73:138–50. doi: 10.1016/j.molimm.2016.04.007.
- Jones, Linda D., Takehisa Chuma, Rosie Hails, Trevor Williams, a Polly Roy. 1996. „The non-structural proteins of bluetongue virus are a dominant source of cytotoxic T cell peptide determinants". *Journal of General Virology* 77:997–1003. doi: 10.1099/0022-1317-77-5-997.
- *Kennedy, David A., Gael Kurath, Ilana L. Brito, Maureen K. Purcell, Andrew F. Read, James R. Winton, a Andrew R. Wargo. 2016. „Potential drivers of virulence evolution in aquaculture". *Evolutionary Applications* 9(2):344–54. doi: 10.1111/eva.12342.
- Kongtorp, R. T., A. Kjerstad, T. Taksdal, A. Guttvik, a K. Falk. 2004. „Heart and skeletal muscle inflammation in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: A new infectious disease". *Journal of Fish Diseases* 27(6):351–58. doi: 10.1111/j.1365-2761.2004.00549.x.
- Kongtorp, R. T., T. Taksdal, a A. Lyngøy. 2004. „Pathology of heart and skeletal muscle inflammation (HSMI) in farmed Atlantic salmon *Salmo salar*". *Diseases of aquatic organisms* 59:217–24. doi: 10.3354/dao059217.
- Kuehn, Ralph, Bernhard C. Stoeckle, Marc Young, Lisa Popp, Jens Eike Taeubert, Michael W. Pfaffl, a Juergen Geist. 2018. „Identification of a piscine reovirus-related pathogen in proliferative darkening syndrome (PDS) infected brown trout (*Salmo trutta fario*) using a next-generation technology detection pipeline". *PLoS ONE* 13(10). doi: 10.1371/journal.pone.0206164.
- Kumagai, Akira, Tomokazu Takano, Tomomasa Matsuyama, Takamitsu Sakai, Yuki Nochiri, Ryo Honda, Takumi Kikuta, a Miho Honjo. 2019. „Detection of Erythrocytic Inclusion Body Syndrome (EIBS) Virus (Piscine orthoreovirus 2) from Ovarian Fluid of Coho Salmon Survivor". *Fish Pathology* 54:20–23. doi: 10.3147/jsfp.54.20.
- Lauscher, Astrid, Bjørn Krossøy, Petter Frost, Søren Grove, Melanie König, Jon Bohlin, Knut Falk, Lars Austbø, a Espen Rimstad. 2011. „Immune responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) following protective vaccination against Infectious salmon anemia (ISA) and subsequent ISA virus infection". *Vaccine* 29(37):6392–6401. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.04.074.
- Li, J., R. Peters, S. Lapatra, M. Vazzana, a J. O. Sunyer. 2004. „Anaphylatoxin-like molecules generated during complement activation induce a dramatic enhancement of particle uptake in rainbow trout

phagocytes". *Developmental and Comparative Immunology* 28(10):1005–21. doi: 10.1016/j.dci.2004.03.004.

- *Li, Lei, a Nikolai Petrovsky. 2016. „Molecular mechanisms for enhanced DNA vaccine immunogenicity". *Expert Review of Vaccines* 15(3):313–29. doi: 10.1586/14760584.2016.1124762.Molecular.
- Løvoll, Marie, Marta Alarcón, Britt Bang Jensen, Torunn Taksdal, Anja B. Kristoffersen, a Torstein Tengs. 2012. „Quantification of piscine reovirus (PRV) at different stages of Atlantic salmon *Salmo salar* production". *Diseases of aquatic organisms* 99(1):7–12. doi: 10.3354/dao02451.
- Malik, Muhammad Salman, Håvard Bjørgen, Ingvild Berg Nyman, Øystein Wessel, Erling Olaf Koppang, Maria K. Dahle, a Espen Rimstad. 2021. „PRV-1 Infected Macrophages in Melanized Focal Changes in White Muscle of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Correlates With a Pro-Inflammatory Environment". *Frontiers in Immunology* 12. doi: 10.3389/fimmu.2021.664624.
- Malik, Muhammad Salman, Lena H. Teige, Stine Braaen, Anne Berit Olsen, Monica Nordberg, Marit M. Amundsen, Kannimuthu Dhamotharan, Steingrim Svenning, Eva Stina Edholm, Tomokazu Takano, Jorunn B. Jørgensen, Øystein Wessel, Espen Rimstad, a Maria K. Dahle. 2021. „Piscine orthoreovirus (PRV)-3, but not PRV-2, cross-protects against PRV-1 and heart and skeletal muscle inflammation in atlantic salmon". *Vaccines* 9(3):1–20. doi: 10.3390/vaccines9030230.
- Markussen, Turhan, Maria K. Dahle, Torstein Tengs, Marie Løvoll, Øystein W. Finstad, Christer R. Wiik-Nielsen, Søren Grove, Silje Lauksund, Børre Robertsen, a Espen Rimstad. 2013. „Sequence Analysis of the Genome of Piscine Orthoreovirus (PRV) Associated with Heart and Skeletal Muscle Inflammation (HSMI) in Atlantic Salmon (*Salmo salar*)". *PLoS ONE* 8(7). doi: 10.1371/journal.pone.0070075.
- Marty, G. D., D. B. Morrison, J. Bidulka, T. Joseph, a A. Siah. 2015. „Piscine reovirus in wild and farmed salmonids in British Columbia, Canada: 1974-2013". *Journal of Fish Diseases* 38(8):713–28. doi: 10.1111/jfd.12285.
- Medzhitov, Ruslan, a Charles A. Janeway. 2000. „How does the immune system distinguish self from nonself?" *Seminars in Immunology* 12(3):185–88. doi: 10.1006/smim.2000.0230.
- Meyers, Theodore R. 2007. „First report of erythrocytic inclusion body syndrome (EIBS) in chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* in Alaska, USA". *Diseases of aquatic organisms* 76:169–72. doi: 10.3354/dao076169.
- Michak, Patty, Charlie E. Smith, a Kathleen Hopper. 1992. „Erythrocytic inclusion body syndrome: a light and electron microscopic study of infected erythrocytes of chinook *Oncorhynchus tshawytscha* and coho *O. kisutch* salmon". *Diseases of aquatic organisms* 12:229–33.
- Mikalsen, Aase B., Oyvind Haugland, Marit Rode, Inge Tom Solbakk, a Oystein Evensen. 2012. „Atlantic salmon reovirus infection causes a CD8 T cell myocarditis in atlantic salmon (*salmo salar* L.)". *PLoS ONE* 7(6). doi: 10.1371/journal.pone.0037269.
- Morera, Davinia, Nerea Roher, Laia Ribas, Joan Carles Balasch, Carmen Doñate, Agnes Callol, Sebastian Boltaña, Steven Roberts, Giles Goetz, Frederick W. Goetz, a Simon A. MacKenzie. 2011. „Rna-seq reveals an integrated immune response in nucleated erythrocytes". *PLoS ONE* 6(10). doi: 10.1371/journal.pone.0026998.
- Mortensen, Stein H., Roald Kire Nilsen, a Brit Hjeltnes. 1998. „Stability of an infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) isolate stored under different laboratory conditions". *Diseases of aquatic organisms* 33:67–71. doi: 10.3354/dao033067.
- Munang'andu, Hetron Mweemba, Børge Nilsen Fredriksen, Stephen Mutoloki, Roy Ambli Dalmo, a Øystein Evensen. 2013. „Antigen dose and humoral immune response correspond with protection for

- inactivated infectious pancreatic necrosis virus vaccines in Atlantic salmon (*Salmo salar* L)". *Veterinary Research* 44(1). doi: 10.1186/1297-9716-44-7.
- Nibert, Max L., Leslie A. Schiff, a Bernard N. Fields. 1991. „Mammalian Reoviruses Contain a Myristoylated Structural Protein". *Journal of Virology* 65:1960–67. doi: 10.1128/jvi.65.4.1960-1967.1991.
- Nygaard, Randi, Susanna Husgard, Ann Inger Sommer, Jo Ann C. Leong, a Børre Robertsen. 2000. „Induction of Mx protein by interferon and double-stranded RNA in salmonid cells". *Fish and Shellfish Immunology* 10(5):435–50. doi: 10.1006/fsim.1999.0249.
- Olsen, Anne Berit, Monika Hjortaas, Torstein Tengs, Hege Hellberg, a Renate Johansen. 2015. „First description of a new disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)) similar to heart and skeletal muscle inflammation (HSMI) and detection of a gene sequence related to piscine orthoreovirus (PRV)". *PLoS ONE* 10(7). doi: 10.1371/journal.pone.0131638.
- Palacios, Gustavo, Marie Lovoll, Torstein Tengs, Mady Hornig, Stephen Hutchison, Jeffrey Hui, Ruth Torill Kongtorp, Nazir Savji, Ana V. Bussetti, Alexander Solovovov, Anja B. Kristoffersen, Christopher Celone, Craig Street, Vladimir Trifonov, David L. Hirschberg, Raul Rabadan, Michael Egholm, Espen Rimstad, a W. Ian Lipkin. 2010. „Heart and skeletal muscle inflammation of farmed salmon is associated with infection with a novel reovirus". *PLoS ONE* 5(7). doi: 10.1371/journal.pone.0011487.
- Pojezdal, Ľubomír, Mikolaj Adamek, Eva Syrová, Dieter Steinhagen, Hana Minářová, Ivana Papežíková, Veronika Seidlová, Stanislava Reschová, a Miroslava Palíková. 2020. „Health surveillance of wild brown trout (*Salmo trutta fario*) in the Czech Republic revealed a coexistence of proliferative kidney disease and piscine orthoreovirus-3 infection". *Pathogens* 9(8):1–13. doi: 10.3390/pathogens9080604.
- Polinski, Mark P., Gary D. Marty, Heindrich N. Snyman, a Kyle A. Garver. 2019. „Piscine orthoreovirus demonstrates high infectivity but low virulence in Atlantic salmon of Pacific Canada". *Scientific Reports* 9(1). doi: 10.1038/s41598-019-40025-7.
- *Polinski, Mark P., Niccoló Vendramin, Argelia Cuenca, a Kyle A. Garver. 2020. „Piscine orthoreovirus: Biology and distribution in farmed and wild fish". *Journal of Fish Diseases* 43(11):1331–52. doi: 10.1111/jfd.13228.
- Purcell, M. K., R. L. Powers, J. Evered, J. Kerwin, T. R. Meyers, B. Stewart, a J. R. Winton. 2018. „Molecular testing of adult Pacific salmon and trout (*Oncorhynchus* spp.) for several RNA viruses demonstrates widespread distribution of piscine orthoreovirus in Alaska and Washington". *Journal of Fish Diseases* 41(2):347–55. doi: 10.1111/jfd.12740.
- Purcell, Maureen K., Krista M. Nichols, James R. Winton, Gael Kurath, Gary H. Thorgaard, Paul Wheeler, John D. Hansen, Russell P. Herwig, a Linda K. Park. 2006. „Comprehensive gene expression profiling following DNA vaccination of rainbow trout against infectious hematopoietic necrosis virus". *Molecular Immunology* 43(13):2089–2106. doi: 10.1016/j.molimm.2005.12.005.
- Purcell, Maureen K., Rachel L. Powers, Torunn Taksdal, Doug McKenney, Carla M. Conway, Diane G. Elliott, Mark Polinski, Kyle Garver, a James Winton. 2020. „Consequences of Piscine orthoreovirus genotype 1 (PRV-1) infections in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*), coho salmon (*O. kisutch*) and rainbow trout (*O. mykiss*)". *Journal of Fish Diseases* 43(7):719–28. doi: 10.1111/jfd.13182.
- Ramirez-Gomez, Francisco, Whitney Greene, Katherine Rego, John D. Hansen, Greg Costa, Priti Kataria, a Erin S. Bromage. 2012. „Discovery and Characterization of Secretory IgD in Rainbow Trout: Secretory IgD Is Produced through a Novel Splicing Mechanism". *The Journal of Immunology* 188(3):1341–49. doi: 10.4049/jimmunol.1101938.
- Robertsen, Børre. 2011. „Can we get the upper hand on viral diseases in aquaculture of Atlantic salmon?" *Aquaculture Research* 42:125–31. doi: 10.1111/j.1365-2109.2010.02671.x.

- *Sahin, Ergin, Michael E. Egger, Kelly M. McMasters, a Heshan Sam Zhou. 2013. „Development of Oncolytic Reovirus for Cancer Therapy". *Journal of Cancer Therapy* 04(06):1100–1115. doi: 10.4236/jct.2013.46127.
- *Sahoo, Bikash Ranjan. 2020. „Structure of fish Toll-like receptors (TLR) and NOD-like receptors (NLR)". *International Journal of Biological Macromolecules* 161:1602–17. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.07.293.
- Sakai, Tadashi, Hisashi Murata, Kiyoshi Yamauchi, Kiyotaka Takahashi, Nobuaki Okamoto, Kenji Kihira, Takahiko Hoshita, a Yoshito Tanaka. 1994. „Hyperbilirubinemia of Coho Salmon *Oncorhynchus kisutch* Infected with Erythrocytic Inclusion Body Syndrome (EIBS) Virus". *Fisheries Science* 60(5):519–21. doi: 10.2331/fishsci.60.519.
- Sommerset, Ingunn, Jannicke Wiik-Nielsen, Torfinn Moldal, Victor Henrique Silva de Oliveira, Julie Christine Svendsen, Asle Haukaas, a Edgar Brun. 2024. *Norwegian Fish Health Report 2023*. (<https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2024/fishhealthreport-2023>)
- Sørensen, Juliane, Niccolò Vendramin, Camilla Priess, Dhamotharan Kannimuthu, Niels Henrik Henriksen, Tine Moesgaard Iburg, Niels Jørgen Olesen, a Argelia Cuenca. 2020. „Emergence and spread of piscine orthoreovirus genotype 3". *Pathogens* 9(10):1–19. doi: 10.3390/pathogens9100823.
- *Stark, George R., Ian M. Kerr, Bryan R. G. Williams, Robert H. Silverman, a Robert D. Schreiber. 1998. „How Cells Respond to Interferons". *Annual Review of Biochemistry*. doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.227.
- Steward, Grieg F., Alexander I. Culley, a Elisha M. Wood-Charlson. 2013. „Marine Viruses". S. 127–44 z *Encyclopedia of Biodiversity: Second Edition*. Roč. 5. Elsevier Inc.
- Strauss, James H., a Ellen G. Strauss. 2008. „Viruses That Contain Double-Stranded RNA: Family". S. 193–210 z *Viruses and Human Disease: Second Edition*. Elsevier Inc.
- Strong, James E., Matthew C. Coffey, Damu Tang, Pauline Sabinin, a Patrick W. K. Lee. 1998. „The molecular basis of viral oncolysis: usurpation of the Ras signaling pathway by reovirus". *The EMBO Journal* 17(12):3351–62. doi: 10.1093/emboj/17.12.3351.
- Su, Yiling, Bing Wang, Ying Zhang, Zilun Ruan, Hao Bai, Jian Wan, Chen Xu, Guoqi Li, Shengqiang Wang, Hui Ai, Li Xiong, a Hui Geng. 2019. „Mass spectrometric determination of disulfide bonds and free cysteine in grass carp IgM isoforms". *Fish and Shellfish Immunology* 95:287–96. doi: 10.1016/j.fsi.2019.10.051.
- Sunyer, J. Oriol, Ioannis K. Zarkadis, Arvind Sahu, a John D. Lambris. 1996. „Multiple forms of complement C3 in trout that differ in binding to complement activators". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93:8546–51. doi: 10.1073/pnas.93.16.8546.
- Takahashi, K., N. Okamoto, A. Kumagai, M. Maita, Y. Ikeda, a J. S. Rohovec. 1992. „Epizootics of erythrocytic inclusion body syndrome in coho salmon cultured in seawater in japan". *Journal of Aquatic Animal Health* 4(3):174–81. doi: 10.1577/1548-8667(1992)004<0174:EOEIBS>2.3.CO;2.
- Takano, Tomokazu, Akatsuki Nawata, Takamitsu Sakai, Tomomasa Matsuyama, Takafumi Ito, Jun Kurita, Sachiko Terashima, Motoshige Yasuie, Yoji Nakamura, Atushi Fujiwara, Akira Kumagai, a Chihaya Nakayasu. 2016. „Full-genome sequencing and confirmation of the causative agent of erythrocytic inclusion body syndrome in coho salmon identifies a new type of piscine orthoreovirus". *PLoS ONE* 11(10). doi: 10.1371/journal.pone.0165424.
- Teige, Lena Hammerlund, Morten Lund, Hanne M. Haatveit, Magnus Vikan Røsæg, Øystein Wessel, Maria K. Dahle, a Anne K. Storset. 2017. „A bead based multiplex immunoassay detects Piscine

- orthoreovirus specific antibodies in Atlantic salmon (*Salmo salar*)". *Fish and Shellfish Immunology* 63:491–99. doi: 10.1016/j.fsi.2017.02.043.
- Thorarinsson, Ragnar, Jeffrey C. Wolf, Makoto Inami, Lisa Phillips, Ginny Jones, Alicia M. Macdonald, Jose F. Rodriguez, Hilde Sindre, Eystein Skjerve, Espen Rimstad, a Øystein Evensen. 2021. „Effect of a novel DNA vaccine against pancreas disease caused by salmonid alphavirus subtype 3 in Atlantic salmon (*Salmo salar*)". *Fish and Shellfish Immunology* 108:116–26. doi: 10.1016/j.fsi.2020.12.002.
- Toda, Hideaki, Yasutaka Saito, Takuhito Koike, Fumio Takizawa, Kyosuke Araki, Takeshi Yabu, Tomonori Somamoto, Hiroaki Suetake, Yuzuru Suzuki, Mitsuru Ototake, Tadaaki Moritomo, a Teruyuki Nakanishi. 2011. „Conservation of characteristics and functions of CD4 positive lymphocytes in a teleost fish". *Developmental and Comparative Immunology* 35(6):650–60. doi: 10.1016/j.dci.2011.01.013.
- Toda, Hideaki, Yasuhiro Shibasaki, Takuhito Koike, Maki Ohtani, Fumio Takizawa, Mitsuru Ototake, Tadaaki Moritomo, a Teruyuki Nakanishi. 2009. „Alloantigen-specific killing is mediated by CD8-positive T cells in fish". *Developmental and Comparative Immunology* 33(4):646–52. doi: 10.1016/j.dci.2008.11.008.
- *Tort, Lluís, Joan Carles Balasch, a Simon Mackenzie. 2004. „Fish health challenge after stress. Indicators of immunocompetence". *Contribution to science* 2(4):443–54.
- Tyler, Kenneth L., Mary Anne Mann, Bernard N. Fields, a Herbert W. Virgin. 1993. „Protective Anti-Reovirus Monoclonal Antibodies and Their Effects on Viral Pathogenesis". *Journal of Virology* 67(6):3446–53. doi: 10.1128/JVI.67.6.3446-3453.1993.
- Vallejos-Vidal, Eva, Felipe E. Reyes-López, Ana María Sandino, a Mónica Imarai. 2022. „Sleeping With the Enemy? The Current Knowledge of Piscine Orthoreovirus (PRV) Immune Response Elicited to Counteract Infection". *Frontiers in Immunology* 13. doi: 10.3389/fimmu.2022.768621.
- Vendramin, Niccoló, Argelia Cuenca, Juliane Sørensen, Anna L. F. Alencar, Debes H. Christiansen, Jan A. Jacobsen, Charlotte Axen, François Loeffrig, Neil M. Ruane, Patrick Martin, Timothy Sheehan, Tine M. Iburg, Espen Rimstad, a Niels J. Olesen. 2019. „Presence and genetic variability of Piscine orthoreovirus genotype 1 (PRV-1) in wild salmonids in Northern Europe and North Atlantic Ocean". *Journal of Fish Diseases* 42(8):1107–18. doi: 10.1111/jfd.13025.
- *Wang, Tiehui, a Christopher J. Secombes. 2013. „The cytokine networks of adaptive immunity in fish". *Fish and Shellfish Immunology* 35(6):1703–18. doi: 10.1016/j.fsi.2013.08.030.
- Wen, Yi, Wei Fang, Li Xin Xiang, Ruo Lang Pan, a Jian Zhong Shao. 2011. „Identification of Treg-like cells in tetraodon: Insight into the origin of regulatory T subsets during early vertebrate evolution". *Cellular and Molecular Life Sciences* 68(15):2615–26. doi: 10.1007/s00018-010-0574-5.
- Wessel, Øystein, Stine Braaen, Marta Alarcon, Hanne Haatveit, Norbert Roos, Turhan Markussen, Torstein Tengs, Maria K. Dahle, a Espen Rimstad. 2017. „Infection with purified Piscine orthoreovirus demonstrates a causal relationship with heart and skeletal muscle inflammation in Atlantic salmon". *PLoS ONE* 12(8). doi: 10.1371/journal.pone.0183781.
- Wessel, Øystein, Elisabeth F. Hansen, Marie Løvoll, Makoto Inami, Asbjørn Husby, Gesa Kruse, Maria K. Dahle, a Espen Rimstad. 2020. „Inactivation of Piscine orthoreovirus". *Journal of Fish Diseases* 43(9):1039–48. doi: 10.1111/jfd.13214.
- Wessel, Øystein, Ingvild Berg Nyman, Turhan Markussen, Maria Krudtaa Dahle, a Espen Rimstad. 2015. „Piscine orthoreovirus (PRV) $\sigma 3$ protein binds dsRNA". *Virus Research* 198:22–29. doi: 10.1016/j.virusres.2015.01.001.

- Wessel, Øystein, Christel Moræus Olsen, Espen Rimstad, a Maria Krudtaa Dahle. 2015. „Piscine orthoreovirus (PRV) replicates in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) erythrocytes ex vivo". *Veterinary Research* 46(1):1–11. doi: 10.1186/s13567-015-0154-7.
- Wiik-Nielsen, C. R., P. M. R. Ski, A. Aunsmo, a M. Løvøll. 2012. „Prevalence of viral RNA from piscine reovirus and piscine myocarditis virus in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., broodfish and progeny". *Journal of Fish Diseases* 35(2):169–71. doi: 10.1111/j.1365-2761.2011.01328.x.
- Wilson, Melanie R., Ann Marcuz, Frederick Van Ginkel, Norman W. Miller, L. William Clem, Darlene Middleton, a Gregory W. Warr. 1990. „The immunoglobulin M heavy chain constant region gene of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*: an unusual mRNA splice pattern produces the membrane form of the molecule". *Nucleic Acids Research* 18(17):5227. doi: 10.1093/nar/18.17.5227.
- Yoneyama, Mitsutoshi, Mika Kikuchi, Takashi Natsukawa, Noriaki Shinobu, Tadaatsu Imaizumi, Makoto Miyagishi, Kazunari Taira, Shizuo Akira, a Takashi Fujita. 2004. „The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses". *Nature Immunology* 5(7):730–37. doi: 10.1038/ni1087.
- *Zhang, Cuiling, Giuletta Maruggi, Hu Shan, a Junwei Li. 2019. „Advances in mRNA vaccines for infectious diseases". *Frontiers in Immunology* 10(MAR):1–13. doi: 10.3389/fimmu.2019.00594.
- Zhang, Yong An, Irene Salinas, Jun Li, David Parra, Sarah Bjork, Zhen Xu, Scott E. Lapatra, Jerri Bartholomew, a J. Oriol Sunyer. 2010. „IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity". *Nature Immunology* 11(9):827–35. doi: 10.1038/ni.1913.