

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**CYTOMEGALOVIROVÁ INFEKCE KMENEM HCMV A JEJÍ
VZTAH K IMUNOSUPRESI**

Aneta Nová

Vedoucí diplomové práce: prof. PharmDr. Tomáš Šimůnek, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Klára Kubelková, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ

2018

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 15. 5. 2018

Touto cestou děkuji své školitelce RNDr. Kláře Kubelkové, Ph.D. za cenné rady a odborné vedení mé diplomové práce. Dále děkuji katedře Molekulární patologie a biologie Fakulty vojenského zdravotnictví UO v Hradci Králové za umožnění přístupu do laboratoří a využívání přístrojové techniky a materiálu k vykonání diplomové práce.

Poděkování patří také prof. PharmDr. Tomáši Šimůnkovi, Ph.D. za zaštitění vedení této diplomové práce.

ABSTRAKT

Cíl práce: Cílem diplomové práce bylo zavedení metodiky *in vitro* infekce lidským cytomegalovirem (HCMV) kmene VR-1590, studium průběhu *in vitro* HCMV infekce xCelligence RTCA metodikou a použití ionizujícího záření k zajištění imunosuprese u hostitelských fibroblastů. Detekce a analýza vybraných signálních drah imunosuprimovaných hostitelských buněk za použití 1D elektroforézy, Western blotu, imunodetekce a protilátkové PathScan technologie.

Metody: V rámci této práce bylo pracováno s infekcí HCMV kmene VR-1590 a lidskými embryonálními fibroblasty linie MRC-5. Byly využity základní laboratorní techniky, dále ionizujícího gama záření produkovaného uzavřeným zářičem ^{60}Co jako faktoru imunosuprese. Změny signálních drah v hostitelských fibroblastech byly sledovány pomocí PathScan protilátkové technologie a dále ověřovány pomocí jednorozměrné elektroforézy s využitím Western blot techniky.

Výsledky: Buněčná proliferace hostitelských buněk byla ověřena v reálném čase. K přípravě vzorků byly vytvořeny modelové situace využívající infekci optimalizovanou dávkou infekce HCMV a následným navozením imunosuprese či modelu s navozenou imunosupresí. Expres detekovaných signálních molekul (p53, Bad, kaspáza 3, Stat1, Stat3, ERK1/2 a dalších) ukazuje, že buňky ovlivněné ionizujícím zářením patrně zanikají cestou apoptózy, protože proapoptotické markery vykazovali zvýšenou expresi s rostoucí dávkou záření. Z našich výsledků vyplývá, že linie fibroblastů bez vlivu infekce je značně radiorezistentní, tomu odpovídají změny v expresi pro a anti-apoptotických markerů.

Závěr: CMV moduluje v časných fázích infekce signální dráhy v rámci přirozené i adaptivní imunity. Vlivem ionizujícího záření byla u infikovaných buněk prokázána exprese proapoptotických proteinů vedoucí k aktivaci NF- κ B signální dráhy, která řídí genovou expresi protizánětlivých cytokinů nutných k funkční synchronizaci buněk imunitního systému, ale také k redukcí interferonové produkce, která je ovšem potřebná k redukcí virové replikace uvnitř infikovaných buněk a k inhibici replikace DNA.

Klíčová slova: lidský cytomegalovirus; ionizující záření; apoptóza; imunosuprese.

ABSTRACT

Goal of the thesis: The main aim of this thesis was to introduce the *in vitro* cytomegalovirus (HCMV) infection method of the VR-1590 strain, followed by study of the *in vitro* HCMV infection by xCelligence RTCA methodology and to use ionizing radiation to provide the immunosuppression in host fibroblasts. The detection and analysis of selected signaling pathways of immunosuppressed host cells was provided using 1D electrophoresis, Western blot, immunodetection, and PathScan antibody technology.

Methods: In this work, infection of human embryonic fibroblasts of the MRC-5 line with HCMV infection of VR-1590 line was performed. Basic laboratory techniques, as well as ionizing gamma rays produced by ^{60}Co ionizing radiation, were used as a factor for immunosuppression. Changes in signaling pathways in host fibroblasts were monitored by PathScan antibody technology and further verified by one-dimensional Western blot electrophoresis techniques and immunodetection.

Results: Cellular proliferation of the host cells was verified in real time. Specimens were developed using modeling situations using optimized dose of HCMV infection and subsequent induction of immunosuppression or model with induced immunosuppression. Expression of detected signal molecules (p53, Bad, caspase 3, Stat1, Stat3, ERK1/2 and others) indicates that cells affected by ionizing radiation apparently disappear via apoptosis because proapoptotic markers exhibit increased expression with increasing radiation doses. Our results show that the line of fibroblasts without the influence of infection is extensively radioresistant, corresponding to changes in the expression of anti-apoptotic markers.

Conclusions: CMV modulates the early stages of signal pathway infection within both natural and adaptive immunity. Due to ionizing radiation, proliferation of pro-apoptotic proteins has been demonstrated to drive the NF- κ B signaling pathway, which controls the gene by expressing the anti-inflammatory cytokines necessary to functionally synchronize the immune system cells, but also to reduce interferon production, which is required to reduce viral replication infected cells and to inhibit DNA replication.

Key words: human cytomegalovirus; ionizing radiation; apoptosis; immunosuppression.

POUŽITÉ ZKRATKY

1D – jednorozměrná (z angl. One-dimensional)

AA – akrylamid

Ab – protilátka (z angl. Antibody)

AIDS – syndrom získaného selhání imunity (z angl. Acquired immune deficiency syndrome)

APS – persíran amonný

ATB – antibiotika

BSA – bovinní sérový albumin

CID – cytomegalické inkluzní onemocnění (z angl. Cytomegalic inclusion disease)

CMV – cytomegalovirus

Co – kobalt

CO₂ – oxid uhličitý

ČR – Česká republika

dH₂O – destilovaná voda

DMEM – (z angl. Dulbecco's modified eagle medium)

DMSO – dimethylsulfoxid

DNA – deoxyribonukleová kyselina

E – časný (z angl. Early)

ELISA – enzymatická imunoanalýza

FBS – fetální bovinní sérum (z angl. Fetal bovine serum)

FDA – Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (z angl. Food and Drug Administration)

Gy – gray

HCl – kyselina chlorovodíková

HCMV – lidský cytomegalovirus (z angl. Human cytomegalovirus)

HHV – Lidský herpesvirus (z angl. Human herpesvirus)

HIV – virus lidské imunitní nedostačnosti (z angl. Human immunodeficiency virus)

HRP – křenová peroxidáza (z angl. Horse radish peroxidase)

IE – okamžitě časný (z angl. Immediate-early)

IFN γ – interferon gama

IL – interleukin

L – pozdní (z angl. Late)

mAb – monoklonální protilátka

MCMV – myší cytomegalovirus (z angl. Mouse cytomegalovirus)

MHC – hlavní histokompatibilní komplex (z angl. Major histocompatibility complex)

MIEP – hlavní okamžitě časný promotor (z angl. Major immediate early promoter)

miRNA – mikro ribonukleová kyselina

Na₂EDTA – edetan disodný

NaCl – chlorid sodný

NK buňky – přirození zabíječi (z angl. Natural killer cell)

NMS – netučné sušené mléko

PAGE elektroforéza – polyakrylamidová gelová elektroforéza

PBS – fosfátový pufr (z angl. Phosphate buffered saline)

PC – pentamerický komplex (z angl. Pentameric complex)

PCR – polymerázová řetězová reakce (z angl. Polymerase chain reaction)

PDA – polydiethylenamid

PFU – jednotka formující plaky (z angl. Plaque forming unit)

PVDF – polyvinylidendifluorid

RPM – otáčky za minutu (z angl. Rotate per minute)

RTCA – analýza v reálném čase (z angl. Real time cell analysis)

RTK – receptorové tyrozinkinázy

SDS – dodecylsulfát sodný

SR – Slovenská republika

TBS – pufovaný fyziologický roztok (z angl. Tris-buffered saline)

TEMED – tetramethylethyldiamin

TNF α – tumor nekrotizující faktor / kachektin (z angl. Tumor necrosis factor)

USA – Spojené státy americké

WB – Western blot

VZV – Varicella Zoster virus

OBSAH

1	CÍLE PRÁCE.....	11
2	TEORETICKÁ ČÁST	12
2.1	Rodina herpesvirů	12
2.1.1	Nomenklatura herpesvirů	12
2.1.2	Podrodiny herpesvirů	13
2.1.3	Historie cytomegaloviru.....	13
2.1.4	Struktura cytomegaloviru.....	15
2.1.5	Replikace cytomegaloviru.....	17
2.2	Rozvoj imunologické odpovědi hostitele na infekci cytomegalovirem.....	18
2.2.1	Rozvoj humorální imunity	19
2.2.2	Rozvoj buněčné imunity	19
2.2.3	Latentní a lytická fáze infekce	20
2.3	Epidemiologie	24
2.4	Klinická manifestace CMV infekce	26
2.5	Prevence a léčba hostitele	27
2.6	Ionizující záření.....	30
2.6.1	Účinky ionizujícího záření na molekulární a buněčné úrovni	31
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32
3.1	Použité chemikálie a materiál	32
3.1.1	Použité chemikálie	32
3.1.2	Přístroje a použitý materiál	34
3.1.3	Roztoky	35
3.2	Příprava vzorků	37
3.2.1	Kultivace fibroblastů linie MRC-5.....	37
3.2.2	Ozáření a infikace fibroblastů	38
3.2.3	Ionizující záření.....	40
3.2.4	Lýza buněk	41
3.2.5	Stanovení bílkovin	42
3.3	Metoda PathScan.....	43
3.3.1	Pathscan Akt analýza	45

3.3.2	PathScan RTK analýza.....	48
3.3.3	PathScan intracelulární analýza	50
3.3.4	PathScan Th1/Th2/Th17 cytokinová analýza	51
3.4	Metoda Mini 1D elektroforéza.....	52
3.5	Metoda Western blot.....	57
3.6	Imunodetekce	59
3.7	Princip metody sendvičové enzymatické imunoanalýzy	62
3.8	xCELLigence RTCA analýza	64
4	VÝSLEDKY.....	68
4.1	Infekce buněčné linie fibroblastů	68
4.2	Stanovení celkové bílkoviny	70
4.3	xCELLigence RTCA analýza	71
4.4	Detekce signálních molekul - PathScan Intracellular kit	73
4.5	Detekce signálních molekul - PathScan RTK kit.....	78
4.6	PathScan Th1/Th2/Th17 Cytokinová analýza	80
4.7	Imunodetekce vybraných signálních molekul.....	82
4.7.1	p38 protein	85
4.7.2	Stat3 protein	86
4.7.3	Bad protein	88
4.7.4	p53 protein	90
4.7.5	p53 protein	91
4.7.6	Kaspáza 3, kaspáza 8 a kaspáza 9	93
5	DISKUZE	97
6	ZÁVĚR.....	103
7	SEZNAM TABULEK	104
8	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	105
9	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	108

1 CÍLE PRÁCE

- Osvojení si základní laboratorní techniky, jako práce s virovými izoláty a buněčnými kulturami. Zavedení metodiky *in vitro* infekce lidským cytomegalovirem kmene VR-1590 v laboratoři.
- Studium průběhu *in vitro* infekce lidským cytomegalovirem kmene VR-1590 s použitím xCelligence RTCA metodiky.
- Použití ionizujícího záření (kobalt 60) k zajištění imunosuprimovaných hostitelských buněk fibroblastů.
- Detekce a analýza vybraných signálních drah imunosuprimovaných hostitelských buněk za použití 1D elektroforézy, Western blotu, imunodetekce a protilátkové PathScan technologie.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Rodina herpesvirů

Herpesviry patří do skupiny DNA virů, které jsou rozděleny do tří podrodin (alfaherpesviry, betaherpesviry a gamaherpesviry) na základě jejich biologických vlastností. Herpesviry jsou v přírodě velmi rozšířeny a vzhledem k tomu, že jen velmi málo z nich je schopno infikovat více než jeden živočišný druh, tak počet herpesvirů v přírodě pravděpodobně přesahuje dvě stě, dosud identifikovaných, členů této rodiny (Knipe a Howley, 2013).

Zařazení do rodiny herpesvirů závisí především na architektuře vlastního virionu. Herpesviry vynikají čtyřmi významnými biologickými vlastnostmi. První z nich je velké množství enzymů podílejících se na metabolismu nukleových kyselin, DNA syntézy nebo zpracování proteinů. Dalším společným znakem je, že genová transkripce a syntéza virové DNA probíhá v jádře a produkce infekčního progenitorového viru (lytická infekce) je obvykle spojena s destrukcí infikované buňky. Dosud zkoumané herpesviry využívají latence pro celoživotní přežívání v hostitelských buňkách (Knipe a Howley, 2013).

2.1.1 Nomenklatura herpesvirů

Herpesviry můžeme označovat dvojím způsobem. První způsob využívá oficiální nomenklaturu jako „Lidský herpesvirus 1“. Druhý pro změnu dlouhodobě zažitá lidová názvy např. „Herpes simplex virus 1“ (Knipe a Howley, 2013). Následující tabulka (Tab. 1) shrnuje názvy jednotlivých zástupců betaherpesvirů, které mají za hostitele člověka.

Tab. 1: Klasifikace lidských herpesvirů

formální název	zkratka	Synonymum	podrodina	velikost genomu (Kbp)
Lidský herpesvirus 1	HHV-1	Herpes simplex virus 1	α	152
Lidský herpesvirus 2	HHV-2	Herpes simplex virus 2	α	155
Lidský herpesvirus 3	HHV-3	Varicella-zoster virus	α	125
Lidský herpesvirus 4	HHV-4	Epstein-Barrové virus	γ	172
Lidský herpesvirus 5	HHV-5	Cytomegalovirus (CMV)	β	236
Lidský herpesvirus 6A	HHV-6A	HHV-6 varianta A	β	230
Lidský herpesvirus 6B	HHV-6B	HHV-6 varianta B	β	159/170*
Lidský herpesvirus 7	HHV-7		β	162/168*
Lidský herpesvirus 8	HHV-8	KSHV (Kaposi-sarcoma associated herpesvirus)	γ	145

* naměřené hodnoty se v různých laboratořích lišily

Zdroj: Dostál a kol., 2004; Braun a kol., 1997; <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> ze dne 15. 2. 2018 (přepracováno).

2.1.2 Podrodiny herpesvirů

Alfaherpesviry jsou rychle rostoucí, cytolytické viry, které přežívají během latentní fáze infekce v neuronech. Do této podrodiny patří Herpes simplex virus 1, Herpes simplex virus 2 a Varicella-zoster virus. Tyto tři viry způsobují vezikulární vyrážky jak při primární infekci, tak při reaktivaci infekce.

Betaherpesviry zahrnují pomalu rostoucí cytomegalovirus. Ten své jméno získal podle enormního zvětšení napadených buněk. Tato podrodina dále zahrnuje lidský herpesvirus 6 (HHV-6) a 7 (HHV-7).

Virus Epstein-Barrové (HHV-4) spolu s lidským herpesvirem 8 patří do podrodiny Gamaherpesvirů.¹

2.1.3 Historie cytomegaloviru

V roce 1881 popsal Ribbert velké buňky v úsecích ledvin mrtvých novorozenců a také v průšních žlázách dětí. Nálezy nedokázal identifikovat do té doby, než uviděl zprávu od „Jesionek a Kilemenoglou“ (Ribbert, 1904), kteří popsali podobné útvary

jako protozoám podobné buňky v plicích, ledvinách a játrech mrtvého osmiměsíčního plodu. Excentricky umístěná jádra těchto buněk obsahovala „centrální jaderné tělo“ obklopené světlým prstencem (Jesionek a Kiolemenoglou, 1904). Löwenstein, který pracoval pro Ribberta našel takové buňky v příušních žlázách u čtyř ze třiceti kojenců. Jednalo o charakter typických cytomegalických buněk s intranukleárními inkluzemi (Löwenstein, 1907). Po objevení buněk s intranukleárními inkluzemi v lézích muže, infikovaného herpes zoster a herpes genitalis, byli Von Glahn a Pappenheimer přesvědčeni, že tyto abnormální buňky jsou produkované viry, a to je nasměřovalo k myšlence, že se jedná o příbuzné viry ze skupiny, kterou dnes označujeme jako Herpesviridae (Lipschuetz, 1921 a Von Glahn a Pappenheimer, 1925). Farber a Wolbach našli stejné buňky s intranukleárními inkluzemi ve slinných žlázách odebraných po smrti z různých příčin u dvaceti šesti ze stoosmdesáti tří dětí. Toto bylo první přiblížení ke skutečnosti, že infekce cytomegalovirem je velmi častá (Farber a Wolbach, 1932).

Do roku 1932 bylo popsáno dvacet pět případů smrti z kongenitální infekce, charakterizované petechiemi hepatosplenomegalii a intracerebrální kalcifikací a u všech se jednalo o typický popis pro typické intranukleární inkluze nesoucí pojmenování generalizované cytomegalické inkluzní onemocnění (CID). Jednotným místem poškození byly renální tubuly, takže bylo navrženo, že by se onemocnění mohlo diagnostikovat již v průběhu života vyhledáním inkluzních buněk v močových sedimentech (Wyatt a kol., 1950).

Lidský cytomegalovirus se nedařilo nakultivovat, dokud se nezačaly rutinně pěstovat lidské buňky a tvořit izoláty. V roce 1954 získal Enders a kol. Nobelovu cenu za izolaci polioviru z lidských embryonálních buněk (Enders a kol., 1949). Cytomegalovirus byl následně izolován v roce 1957 od kojenců, kteří měli kongenitální toxoplazmózu (Weller a kol., 1957).

Téměř dvě desetiletí před izolací viru, respektive CID, z moči novorozenců s kongenitální infekcí, izolovala Dr. Smithová v roce 1955 virus ze slinných žláz mrtvých pacientů, který ale rostl pouze v lidských, nikoliv myších kulturách (Smith, 1956) Dr. Smithová prováděla studie tohoto viru na slinných žlázách myší, dnes je tedy znám spíše jako myší cytomegalovirus (MCMV). Myší a lidský cytomegalovirus vykazoval podobnou cytopatologii, ale pouze na fibroblastech z homologních druhů (tzn. MCMV na myších fibroblastech a HCMV na lidských fibroblastech) (Smith, 1954 a Smith, 1956). To poukázalo na druhovou specifitu cytomegaloviru, které se dodnes

využívá pro klíčové charakterizace během diagnostiky konkrétního cytomegaloviru (Knipe a Howley, 2013 a Smith, 1956).

2.1.4 Struktura cytomegaloviru

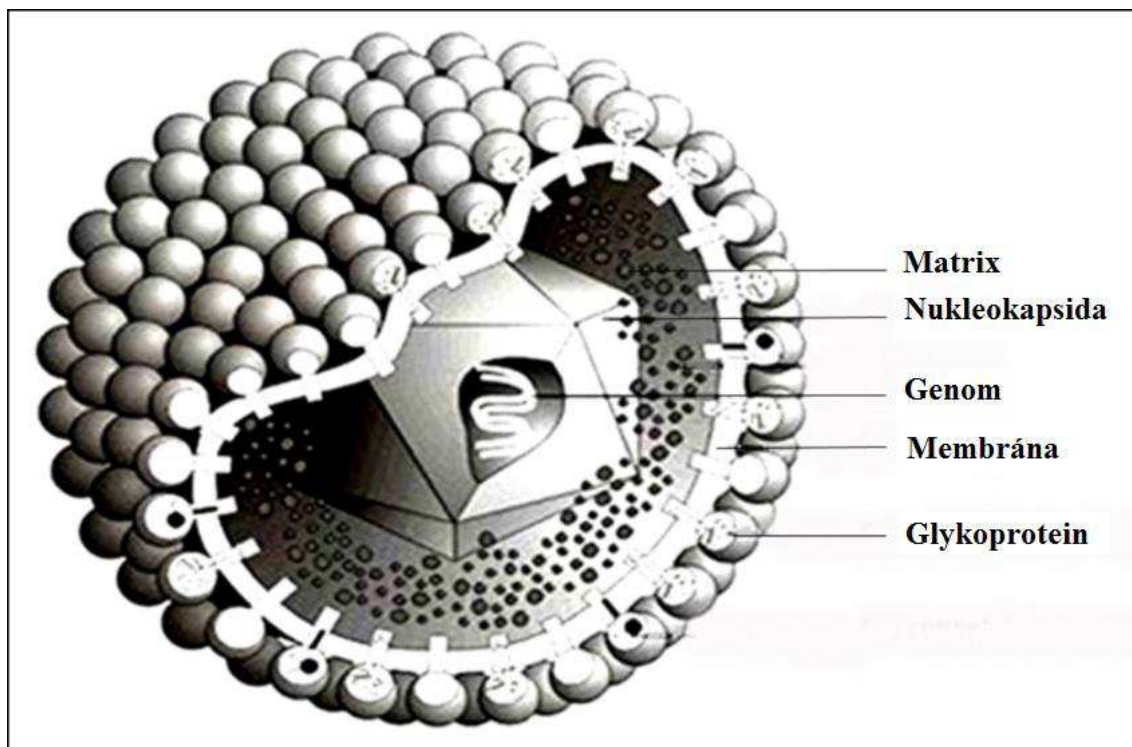
Herpesviry mají extrémně silnou vrstvu matrix, která obsahuje velké množství virových kódovaných proteinů, mezi kapsidou a obálkou (Knipe a Howley, 2013).

Cytomegalovirus je nejčastějším členem herpesvirů, který napadá lidskou populaci (Al-Omari a kol., 2016). Jeho dvouvláknová lineární DNA obsahuje 165 genů, které kódují virové proteiny napodobující lidské buněčné proteiny, interagují s nimi a také souvisí s virulencí a latencí viru (Al-Omari a kol., 2016).

Virion cytomegaloviru se skládá z ikosahedrálního nukleokapsidu o velikosti 100 nm, který obsahuje dvouřetězcovou lineární DNA o velikosti 230 kbp, DNA je obklopená proteinovou vrstvou označovanou jako tegument nebo matrix a ta je dále ohraničena lipidovou dvojvrstvou, která obsahuje velké množství virových glykoproteinů (Obr. 1). Dospělý virion dosahuje v průměru velikosti 150-200 nm (Landolfo a kol., 2003).

Buněčné kultury infikované HCMV produkují infekční virion a další dva typy morfologických buněk. Jedná se o neinfekční obalené částice a denzní tělíska. Neinfekční obalené částice jsou defektní částice viru, složené z obalené nezralé kapsidy, která neobsahuje DNA, ale obsahuje protein, který v dospělých nukleokapsidách chybí. (Mocarski a Courcelle, 2001). Denzní tělíska jsou obalené částice, které postrádají nukleokapsidu a virovou DNA, ale obsahují některé matrixové proteiny, z nich je nejhojnější ppUL83 (pp65) (Mocarski a Courcelle, 2001).

V dospělém infekčním virionu bylo nalezené více než 30 virových proteinů. (Britt a Mach, 1996).



Obr. 1: Struktura cytomegaloviru

Upraveno podle: https://www.researchgate.net/figure/302903051_fig1_Figure-1-A-cartoon-depicting-the-structure-of-the-cytomegalovirus-virion-The ze dne 14. 11. 2017

Třicet dva známých matrixových proteinů plní různé funkce od upravování hostitelské buňky na začátku infekce až po konečné uspořádání virionů. Proteiny se přidávají do dozrávající nukleokapsidy v sekvenčních vrstvách, začínají v jádře a následně pokračují dál do cytoplazmy (Knipe a Howley, 2013). Na začátku infekce se tyto proteiny nachází zcela ve virionu mezi nukleokapsidou a lipidovou dvojitou vrstvou. Virový genom je přenášen přímou translokací na mikrotubuly do komplexu jaderných pórů. Během posledních fází maturace, kontrolují matrixové proteiny např. stabilitu nukleokapsidy a ostatní konečné fáze zrání virionu. Většina matrixových proteinů je fosforylovaných a mnohé jsou značně imunogenní (Takahashi a kol., 1992).

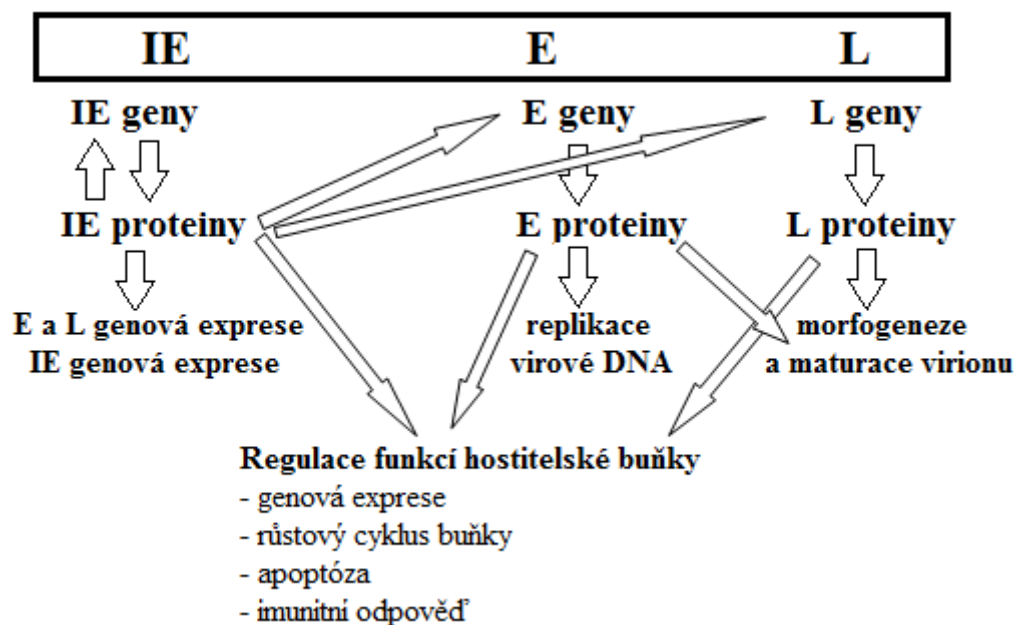
Nejčastějším matrixovým proteinem je pp65 (nižší matrixový protein, genový produkt UL83). Tento protein je hlavní složkou denzních tělísek. Ačkoli má velký význam v infekci v lidské populaci, replikace v kultivovaných buňkách není možná (Renne a kol., 1996).

2.1.5 Replikace cytomegaloviru

HCMV patogeneze zahrnuje produktivní replikaci v různých typech buněk, přes epiteliální, endoteliální, neuronální, myeloidní buňky až po fibroblasty (Revello a Gerna, 2010). Většina studií na replikační procesy HCMV byla provedena na fibroblastech, protože se jedná o stromální buňky, které jsou přítomné ve všech tkáních hostitele. Snadné studium replikace v těchto buňkách a značně vyšší výtěžky z izolací viru a genových produktů umožnily objasnit genovou expresi, regulaci, DNA syntézu a maturaci viru (Knipe a Howley, 2013).

Replikace a uvolňování progenitorých virů se zlepšuje opakovanou pasáží přes fibroblasty, zatímco schopnost infekce endoteliálních a epiteliálních buněk se snižuje (Kempf a kol., 1998). Adaptované kmeny se velmi dobře replikují ve fibroblastech, ale špatně na kultivovaných makrofázích, dendritických buňkách, epitelových a endotelových buňkách (Knipe a Howley, 2013).

Během produktivní infekce je genom HCMV exprimován v časově koordinované a regulované kaskádě transkripčních událostí, které vedou k syntéze tří typů virových proteinů popsanych jako okamžitě-časné (IE nebo α) proteiny, časné (E nebo β) proteiny a pozdní (L nebo γ) proteiny, (Fortunato a Spector, 1999 a Mocarski a Courcelle, 2001) a celkově je z těchto fází syntetizováno přes 200 proteinů (Hoz a kol., 2002). Genová exprese a funkce virových genových produktů je znázorněna na Obr. 2. Stejně jako u jiných herpetických virů se také u CMV předpokládá, že okamžitě-časné geny jsou stimulovány matrixovými proteiny (Hoz a kol., 2002). Produkty okamžitě-časných genů jsou syntetizovány ihned po infekci v závislosti na faktorech hostitele a slouží jako transaktivátory časných genů. Mezi časné geny patří ty, které kódují proteiny zapojené do genové replikace (DNA polymeráza, thymidin kináza). Pozdní geny jsou transkribovány až po replikaci virové DNA a zahrnují ty, které kódují strukturní virionové složky. (Fortunato a kol., 2000). Pozdní genové produkty, především strukturní proteiny, nejsou tak dobře známy (Krech, 1973). Porucha exprese časného genu a následná replikace virové DNA může být pro nepermissivní buňky více omezující událost než samotná penetrace. Geny HCMV jsou v infikovaných buňkách přepisovány pomocí RNA polymerázy II a spojeného bazálního transkripčního mechanismu s intervencí hostitelem kódovaných transkripčních faktorů, jejichž aktivita může být stimulována virovými transaktivátory (Fortunato a Spector, 1999 a Mocarski a Courcelle, 2001).



Obr. 2: Genová exprese HCMV a funkce genových produktů během produktivní infekce

Zdroj: Landolfo a kol., 2003 (přepracováno)

2.2 Rozvoj imunologické odpovědi hostitele na infekci cytomegalovirem

Cytomegalovirus je velmi starý virus, který se vyvíjel paralelně s lidským imunitním systémem. Je velmi dobře adaptován na soužití se svým hostitelem, způsobuje nízkou míru morbidity a mortality u imunokompetentních jedinců. Subklinická primární infekce je následována celoživotní perzistencí v myeloidních a dendritických progenitorových buňkách (Kondo a kol., 1996 a Hahn a kol., 1998), kde je pod kontrolou imunitního systému hostitele. Anticytomegalovirová imunitní odpověď řeší primární infekce a zabraňuje reaktivaci viru. K dosáhnutí těchto cílů jsou potřebné antivirové protilátky (Adler a kol., 1995), NK buňky a CMV specifické T buňky (Forbes, 1989). Buněčná imunita kontroluje replikaci viru a protilátky zabraňují rozšíření viru v krevním řečišti a do sousedních buněk (Hahn a kol., 1998). Reaktivace z latentní fáze není běžná u imunokompetentních osob, ale komplikace nastávají u imunosuprimovaných jedinců (Landolfo a kol., 2003).

2.2.1 Rozvoj humorální imunity

Protilátky proti cytomegaloviru se obvykle tvoří 1 až 3 týdny po primární infekci. U osob s normálním imunitním systémem, přítomnost IgM a rostoucí koncentrace IgG značí nedávnou primární infekci. Alfa CMV IgG protilátky jsou přítomny celý život a jejich koncentrace v plazmě se stanovuje hlavně u pacientů před transplantacemi. (Britt a kol., 1990). Počet proteinů exprimovaných virem je vysoký, proto se generuje široká škála protilátek. Pro diagnostické účely se používají metody založené na detekci protilátek, které rozpoznávají matrix nebo kapsidu. Alfa CMV IgG protilátky cílí proti molekulám na povrchu viru (Urban a kol., 1996 a Britt a kol., 1990). Protilátky nejsou schopné pacienta zcela zbavit CMV infekce, ale pomáhají zastavit šíření viru v krevním řečišti (Nigro a kol., 2005).

2.2.2 Rozvoj buněčné imunity

Klíčovou roli v CMV infekci hrají CD4 a CD8 T lymfocyty. V akutní fázi infekce jsou vytvářeny velké podjednotky CMV-specifických T buněk. Během infekce celkový počet lymfocytů na periférii roste, hlavně CD8 lymfocyty (Wang a kol., 1995). Infikované buňky vykazují fragmenty viru ve formě peptidů na jejich MHC I molekulách, a ty rozpoznávají receptory T buněk na CMV-specifických CD8 lymfocytech. V kombinaci se signalizací cytokinů z CMV-specifických CD4 buněk se aktivují CD8 buňky. Jsou vytvořeny klony efektorových buněk s vysokou mírou proliferace (Hammann a kol., 1997). Tyto klony produkují obrovské množství cytokinů (především interferon gama (IFN γ) a faktor nádorové nekrózy neboli kachektin (TNF α) a efektorových proteinů, které indukují apoptózu v infikovaných buňkách. Jakmile jsou hladiny antigenu sníženy, efektorové populace se snižují prostřednictvím apoptózy a dochází k vytvoření více heterogenní populace paměťových T buněk. Ve srovnání s naivními T buňkami se paměťové buňky jednak rychleji aktivují, ale i reagují na odpověď antigenu a navíc mají schopnost produkovat úplnější soubor cytokinů (Wang a kol., 1995).

Infikované buňky vykazují na svých MHC molekulách (z angl. Major Histocompatibility Complex – hlavní histokompatibilní komplex) více peptidů odvozených od CMV. V počáteční fázi imunitní odpovědi se reakce T buněk zaměřují na širokou škálu virových epitopů. (Day a kol., 2007). Když imunitní systém dostane infekci pod kontrolu, mnoho klonů T buněk se ve větší míře stáhne a epitopy, hojně

během počáteční imunitní odpovědi, mohou být v latentní fázi nedetekovatelné (Day a kol., 2007). Z imunodominantních CMV proteinů jsou dva dlouho známé jako hlavní cíle pro CMV-specifické T buňky, je to matrixový protein pp65 (Wills a kol., 1996) a hlavní okamžitě-časný protein IE1 (Kern a kol., 2000.) Rozpoznávání CMV-antigenů je ovšem mnohem komplexnější z toho důvodu, že existuje více imunogenních proteinů např. pp28, pp50, glykoprotein gH, glykoprotein gB, a další (Elkington a kol., 2003). CMV infekce indukuje podmnožinu CD4 T buněk, především CD28- buňky a serinovou proteázu granzym B+, tyto buňky jsou spojovány s virovými infekcemi (Schmidt a kol., 1996 a Thewissen a kol., 2007). U cytomegalovirové infekce se okamžitě objevují CD4+, CD28- a granzym B+ a jejich hladina stoupá i po dosažení vrcholu virové zátěže. Produkce INF γ , po střetnutí s CMV, avšak ne s VZV odvozenými antigeny, dokazuje, že jsou tyto buňky CMV-specifické (van Leeuwen a kol., 2004). Velký výskyt těchto buněk je také detekován u séropozitivních jedinců (van Leeuwen a kol., 2006).

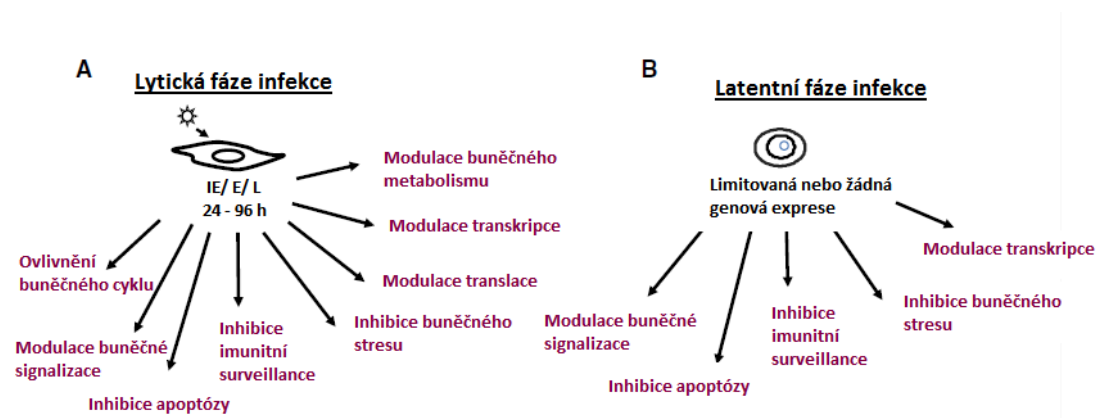
2.2.3 Latentní a lytická fáze infekce

Lidský cytomegalovirus je typický lidský herpesvirus, u kterého se střídá latentní a lytická fáze jeho životního cyklu skrze periodicky se opakujících reaktivací (Poole a Sinclair, 2015). Bylo prokázáno, že CD14+ monocyty periferní krve jsou jednou z nejdůležitějších buněčných populací nesoucích latentní HCMV *in vivo* (Taylor-Wiedeman a kol., 1991). Nedávno byla identifikována místa výskytu HCMV v kostní dřeni, zvláště v nediferenciovaných myeloidních CD34+ buňkách (Maciejewski a kol., 1992). Bohužel *ex vivo* studie jsou omezeny nízkou četností virových genom-pozitivních mononukleárních buněk (asi 0,01 %) a nízkým obsahem cytomegalovirové DNA (Slobedman a kol., 1999 a Roback a kol., 2001 a Roback a kol., 2003 a Sinclair a Sissons, 2006 a Parry a kol., 2016).

Cytomegalovirus vykazuje latentní fázi i u jiných druhů, avšak mechanismy, kterými se tvoří, se u jednotlivých druhů liší. Řada studií prokázala, že myší cytomegalovirus MCMV přežívá v latentní fázi. Ta je velmi podobná latentní fázi HCMV (Kurz a kol., 1997 a Seckert a kol., 2012). Inhibice exprese lytického genu v průběhu latence je nejspíše ovlivněna represivními chromatinovými značkami kolem promotoru hlavního virového okamžitě-časného promotoru (MIEP – major immediate early promoter). Po diferenciaci progenitorových myeloidních buněk nebo makrofágů

se represivní chromatinová struktura kolem MIEP rozvolní, což vede ke změnám v posttranslačních modifikacích histonů kolem MIEP spojených s aktivací transkripce a souběžnou indukci lytické okamžitě časné (IE) genové exprese viru (Sinclair a Poole, 2014 a Murphy a kol., 2002 a Reeves a kol., 2005 a Sinclair a Sissons, 2006 a Reeves a kol., 2006 a Groves a kol., 2009). Reaktivace probíhá *in vivo*, ale klinicky se neprojeví kvůli silným imunitním reakcím hostitele, neboť makrofágy jsou místem pro reaktivaci viru u zdravého hostitele (Reeves a Sinclair, 2013 a Poole a kol., 2014).

Z výsledků studií Weekese (Weekes a kol., 2014) a dalších vyplývá, že četné HCMV kódované geny exprimované během lytické fáze infekce působí společně a mají různé účinky na infikovanou buňku, což má za následek modulaci různých buněčných funkcí a následných účinků. To zahrnuje modulaci buněčného metabolismu, transkripci, translaci, buněčný cyklus, buněčnou signalizaci, buněčnou surveillance, buněčný stres a buněčnou smrt (Poole a Sinclair, 2015). Nicméně, některé studie ukázaly, že i latentní fáze infekce, ačkoli má velmi omezenou schopnost modifikovat transkripci, je spojena s ovlivňováním transkripce hostitelských buněk, buněčnou signalizací, buněčným stresem, buněčnou surveillance a také smrtí buněk (Poole a kol., 2014 a Sinclair a Poole, 2014 a Poole a kol., 2011 a Mason a kol., 2012 a Mason a kol., 2013 a Poole a kol., 2013 a Weekes a kol., 2013 a Wills a kol., 2014). Ovlivnění buněčných funkcí hostitele během lytické a latentní fáze je znázorněno na Obr. 3.



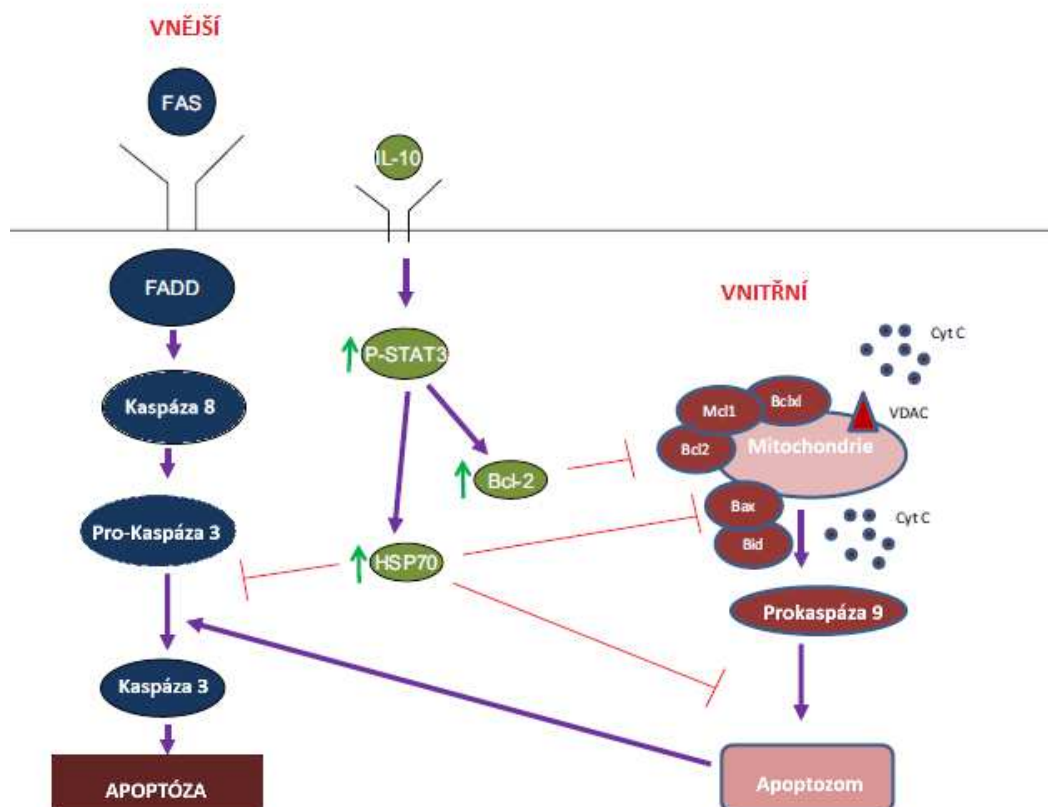
Obr. 3: Ovlivnění funkcí buněk hostitele během lytické a latentní fáze infekce

Upraveno podle: Poole a Sinclair, 2015.

Kromě regulace sekrece proteinů během latence se také značně mění hladiny antiapoptotických proteinů během infekce CD34+ buněk cytomegalovirem. Jiný způsob regulace genové exprese je cestou mikroRNA (miRNA) o délce asi 21 nukleotidů (Lee a kol., 1993). Během latence HCMV dochází ke změnám v počtu buněčných miRNA (Poole a kol., 2011) a samotný HCMV také kóduje množství miRNA. V důsledku toho je možné, že mnoho pozorovaných změn v antiapoptotických proteinech během latence HCMV je částečně způsobeno regulací miRNA (Poole a kol., 2011).

Jedna z miRNA, která je během latentní fáze infekce CD34+ progenitorových buněk downregulována je hsa-miR-92a. Tato miRNA cílí na myeloidní transkripční faktor GATA2 a jeho hladina během latence vzroste (Poole a kol., 2011 a Poole a kol., 2013). GATA2 nereguluje pouze virové geny, ale reguluje expresi řady buněčných genů, včetně IL-10. Buněčný IL-10 je sekretovaný cytokin, který má imunomodulační vlastnosti a má vliv na životnost myeloidních progenitorových buněk tak, že řídí expresi antiapoptotického faktoru Bcl-2 (Poole a kol., 2011). Cytokin IL-10 je během latence HCMV upregulován a moduluje supresi vnějších a vnitřních proapoptotických signálů (Obr. 4).

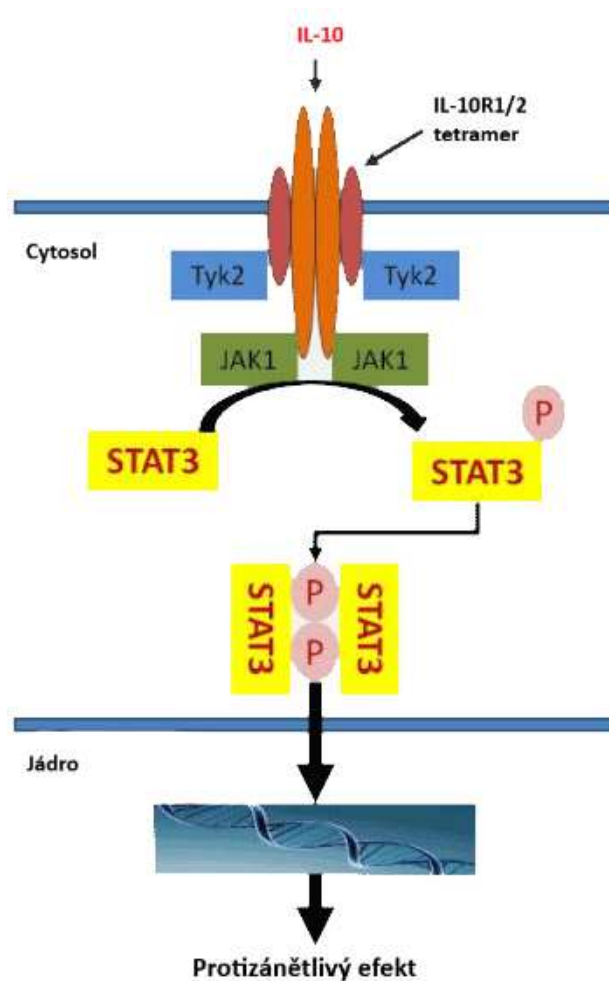
Spojení cytokinu IL-10 s receptorem IL-10 R1/2 vede k indukci signalizace cestou fosforylace STAT3 (Obr. 5). Výsledkem je pozitivní autoregulace exprese cytokinu IL-10, stejně jako exprese vnitřních inhibitorů buněčné smrti např. Bcl2 (Poole a kol., 2011 a Weber-Nordt a kol., 1996) a HSP70 (Zorzi a Bonvini, 2011) (protein teplotního šoku). HSP70 hraje důležitou roli v negativní regulaci vnitřní cesty kvůli jeho vlastnosti zacílit pro-kaspázu 3 (Mosser a kol., 2000 a Sabirzhanov a kol., 2012), přítomné v signální cestě zprostředkované FAS. Během latence je FAS signální dráha zaměřena na různá stádia apoptózy zprostředkované FAS cestou vnější signalizace apoptózy (viz Obr. 5).



Obr. 4: Pro- a antiapoptotické faktory v signální kaskádě FAS

Upraveno podle: Poole a Sinclair, 2015.

Během latence nedochází jen ke změnám antiapoptotických faktorů. Například hladina proteinu p53 fosforylovaného na serinu 15 (Ser15) se zvýšila 3,5krát. Je známo, že fosforylovaný p53 má proapoptotické vlastnosti, je schopen upregulovat transkripci proapoptotického faktoru Bax a zároveň snížit expresi antiapoptotického faktoru Bcl2 (Basu a Haldar, 1998).



Obr. 5: Schéma interakce interleukinu IL-10 se specifickým receptorem

Upraveno podle: <http://www.oatext.com/Twenty-five-years-of-studies-and-trials-for-the-therapeutic-application-of-IL-10-immunomodulating-properties-From-high-doses-administration-to-low-dose-medicine-new-paradigm.php> ze dne 13. 3. 2018

2.3 Epidemiologie

Lidé jsou primárními hostiteli pro osm známých herpesvirů. Herpes simplex virus typ 1 infikuje kolem 70 % dospělé populace, Herpes simplex virus 2 infikuje asi 30 % dospělých a příležitostně způsobuje infekce i u novorozenců. Varicella-zoster virus infikuje více než 90 % dospělé populace, přes 90 % populace je nakaženo virem Epstein-Baarové, ten je navíc zodpovědný za 85 % případů infekční mononukleózy (Braun a kol., 1997). Cytomegalovirus by se dal považovat za jednoho z neúspěšnějších parazitů (Landolfo a kol., 2003). Vyskytuje se kosmopolitně a s vysokou prevalencí 50 – 90 % v celé lidské populaci (Tu a kol., 2004 a Adler, 1991).

V rozvojových zemích je výskyt HCMV vyšší a infekce se projevuje hlavně v mladším věku (Knipe a Howley, 2013) Cytomegalovirus způsobuje 10-15 % případů infekční mononukleózy (Braun a kol., 1997). Virus se šíří horizontálně tělními tekutinami jako jsou sliny, mateřské mléko, sperma a cervikální sekrece (Dostál a kol., 2014). Vzhledem k tomu, že je virus nestabilní, je zapotřebí kontakt s osobou s primární nebo reaktivovanou infekcí. Z toho důvodu přenos infekce probíhá hlavně mezi rodinnými příslušníky, sexuálními partnery a např. ve školkách (Tu a kol., 2004 a Adler, 1991). Přesný mechanismus infekce během dětství není znám, nicméně je zapotřebí blízký kontakt s infikovanou osobou. Riziko infekce se zvyšuje, pokud lidé žijí v přelidněných městech a sociálně slabých zemích, kde nejsou dobré hygienické podmínky (Griffiths, 2000 a Knipe a Howley, 2013). Děti, které byly HCMV infikovány ještě v předškolním věku, představují hlavní zdroj nákazy pro společnost (Tu a kol., 2004 a Adler, 1991).

Běžnou cestou pro přenos virové infekce je vertikální přenos z matky na plod (Dostál a kol., 2014). Nákaza přes placentu, během porodu a kojením představuje 10 - 15 % infekcí v dětském věku. Kongenitální infekce, nejvýznamnější klinický problém související s HCMV, má prevalenci 0,1 – 2,2 % u živě narozených dětí v rozvojových zemích (Gaytant a kol., 2005 a Ahlfors a kol., 1999 a Griffiths, 1991 a Murph a kol., 1998 a Stagno, 2001). Vysoká séroprevalence je u homosexuálních mužů a promiskuitních žen a mužů (Dannenmaier a kol., 1985). CMV infekce je ještě více spojena s homosexuálním sexem u imunokompetentního muže. Existuje velký rozdíl mezi četností séropozitivity u homosexuálního muže ve srovnání s heterosexuálními muži stejné společensko-ekonomické vrstvy, konkrétně 94 vs. 54 % (Drew a kol., 1984). K transplacentárnímu přenosu může dojít u ženy, která je séropozitivní před začátkem těhotenství a u žen s primární infekcí, přičemž vyšší riziko je u druhé skupiny. Ještě častější je přenos infekce během porodu. Virová nákaza přes vagínu nebo děložní čípek také není neobvyklá, zvláště u mladších žen. Pokud je virus přítomen během porodu je 50% šance, že se dítě nakazí (Reynolds a kol., 1973). Takto infikované děti začínají sami přenášet infekci kolem 6. týdne života. Kojení je pravděpodobně jedna z nejdůležitějších cest přenosu infekce (Pass, 2007) HCMV je možné detekovat v mléce přibližně 90 % kojících séropozitivních matek pomocí metody polymerázové řetězové reakce (Pass, 2007). Asi 25 % dětí kojených séropozitivní matkou je nakaženo do 12 měsíců věku (Reynolds a kol., 1973). Méně častý, ale velmi sledovaný je přenos krevní transfuzí nebo při transplantaci orgánů a kostní dřeně. Tato

cesta přenosu je častým důvodem morbidity u takto imunokompromitovaných pacientů (Lidehäll, 2008).

2.4 Klinická manifestace CMV infekce

Primární infekce u imunokompetentních pacientů nemívá klinické projevy, manifestuje se jen ve 2-5 % případů, virus v těle hostitele perzistuje (Dostál a kol., 2014). U dětí a mladých dospělých se může projevit syndromem infekční mononukleózy, který se projevuje horečkou, bolestí svalů, únavou a bolestí hlavy. Běžné symptomy jsou lymfadenopatie, faryngitida, splenomegalie a lymfocytóza s atypickými lymfocyty, u těchto pacientů nalezneme zvýšené jaterní transaminázy (Stagno a kol., 1986). Naopak meningeální encefalitida, Guillain-Barréův syndrom, retinitida, pneumonie a kožní projevy (vzhled rubeoliformního enantému) jsou vzácné komplikace označované jako „komplikace cytomegalovirové mononukleózy“. U kojenců s HCMV se obvykle objevují pouze mírné příznaky jako je teplota a bolest hlavy a kloubů, výjimku tvoří předčasně narozené děti. (Stagno a kol., 1986).

Většina dětí infikovaných in utero (85-90 %) má v neonatálním období asymptomatické příznaky (Stagno a kol., 1986 a Dostál a kol., 2004). Petechie, trombocytopenie, mikrocefalie, žloutenka, hepatosplenomegálie a hemolytická anémie jsou běžně pozorované symptomy u zbývajících 10-15 % infikovaných dětí (Boppana a kol., 1992). Děti se symptomatickou formou infekce jsou vystaveny vyššímu riziku dlouhodobých následků například neurologické poškození, mentální retardace, deficity sluchu až hluchota a zrakové poškození (Jones, 2003). Cytomegalovirová infekce u těhotných žen, ať už primární nebo opakovaná, se obvykle klinicky nemanifestuje. Děti s vrozenou CMV infekcí mají dlouhodobý (až 10 let) nález CMV v moči. Naopak u imunokompetentních dospělých pacientů nalezneme CMV v moči asi až měsíc po primární infekci, ale v latentní fázi infekce už se CMV v moči nevyskytuje (Zanghellini a kol., 1999). CMV infekce je nejčastější infekcí u pacientů po transplantacích orgánů. Do jednoho roku po transplantaci infikuje CMV až 70 % příjemců transplantátů (Pereyra a Rubin, 2004). Mezi pacienty, kteří podstoupili transplantaci ledviny, 8-36 % alespoň jednou prodělalo akutní fázi infekce (Rayes a kol., 2007 a Sagedal a kol., 2004 a Sampathkumar a Paya, 2007). Zdroj infekce pro pacienty představují transplantované orgány nebo krevní transfúze. Významné je také riziko aktivace viru z latentní fáze u séropozitivních pacientů z důvodu narušené imunity. To způsobí především léčiva

s imunosupresivní aktivitou, které je nutné pacientům před transplantací podávat, aby se zabránilo odmítnutí transplantovaného orgánu (Dostál a kol., 2004 a McLaughlin a kol., 2002).

Od 80. let 20. století se dává důraz na zvýšenou pozornost k HCMV infekcím u HIV pozitivních pacientů a nemocných s AIDS (Acquired immune deficiency syndrome, česky syndrom získaného selhání imunity), kdy se zjistilo, že se jedná o nejčastější oportunní infekci u těchto pacientů. Reaktivace CMV je častá při poklesu CD4 lymfocytů pod $100/\text{mm}^3$ (Dostál a kol., 2014). CMV se v tomto případě nejčastěji manifestuje jako retinitida, dále bolestivá periferní neuropatie a gastrointestinální onemocnění, může dojít i k akutní pankreatitidě. Po zavedení vysoce aktivní antiretrovirové terapie, která potlačuje HIV replikaci a přetváří imunitní odpověď, se počet oportunních infekcí značně snížil. Nicméně CMV infekce je stále majoritním důvodem mortality u pacientů s AIDS, navíc v rozvojových zemích je pro většinu pacientů léčba vysoce aktivní antiretrovirové terapie nedostupná. V České republice jsou pacienti s HIV infekcí a AIDS sledováni v AIDS centrech ve fakulturních a krajských nemocnicích (Dostál a kol., 2004 a Jabs a kol., 2005). Protože je CMV u imunokompetentních pacientů benigní, byl dlouho považován za neškodný patogen u lidí (Lidehäll, 2008). Jak se zdokonalovaly analytické metody, byly objeveny CMV proteiny ve vyšším počtu v místech zánětu a onemocnění (Ho, 2008). Interakce mezi virem a imunitním systémem vytvoří zánětlivé prostředí, předpokládá se totiž, že se CMV podílí na patogenezi zánětlivého onemocnění střev (Hommes a kol., 2004), psoriázy (Asadullah a kol., 1999), kardiovaskulárního onemocnění a tumorů (Soderberg-Naucler, 2007). Vzhledem ke všem těmto nežádoucím účinkům přiřazuje U.S. Institute of Medicine nejvyšší prioritu k vynalezení vakcíny proti HCMV (Arvin a kol., 2004).

2.5 Prevence a léčba hostitele

Za účelem prevence proti vzniku infekce je doporučováno dodržování obvyklých hygienických zásad, vyšetření dárců krve a orgánů k transplantaci a vyřazení infikovaných dárců. U těhotných žen s primoinfekcí je doporučováno přerušování těhotenství. Zatím se, naneštěstí, rutinně neprovádí prenatální screening (Dostál a kol., 2004).

Byly přijaty dvě hlavní strategie pro prevenci vzniku cytomegalovirové infekce u příjemců transplantátů. Jedná se o obecné profylaktické podávání antivirových léčiv a imunoglobulinů, nebo o preemptivní terapii u transplantovaných jedinců, u kterých jsou během screeningu důkazy o asymptomatické cytomegalovirové infekci (Hodson a kol., 2013). Antivirová léčiva mohou být podávána intravenózně (aciklovir, ganciklovir, imunoglobuliny) nebo perorálně jednou denně (valganciklovir, valganciklovir). Profylaktická léčba trvá obvykle 3 až 6 měsíců, v době, kdy jsou pacienti nejvíce ohroženi CMV infekcí (Ljungman a Hakki a Boeckh, 2011).

Lékem volby v prevenci CMV infekce u pacientů po transplantacích solidních orgánů je valganciklovir (Hodson a kol., 2005). Mezi léky druhé volby pak patří foscarnet a cidofovir, případně off-label podání leflunomidu. Experimentálně je podáván maribavir a brincidofovir, obě látky jsou v klinickém testování a měly by být používány při multilékové rezistenci. V listopadu 2017 FDA schválila použití letermoviru pro profylaktickou léčbu u dospělých příjemců transplantátů alogenetických hematopoetických kmenových buněk (Lischka a kol., 2010 a Melendez a Razonable, 2015). Důležité je zabránit iatrogenním infekcím a pokusit se snížit počet všech imunosupresivních faktorů pro pacienty s cytomegalovirovou infekcí, u nichž je důležitá správná výživa a hydratace, protože jsou ve většině případů oslabeni po již zmiňovaných transplantacích nebo těžké nemoci. Na druhou stranu, zdraví lidé, kteří mají cytomegalovirovou infekci, avšak nevykazují žádné symptomy, obvykle nedostávají žádnou farmakoterapii (Hodson a kol., 2015).

Lékem volby pro léčbu CMV infekce je intravenózní ganciklovir, nicméně valganciklovir je možné použít u méně závažných případů (Tseng a Foisy 1996). Při léčbě CMV pneumonie se ganciklovir podává společně s CMV-specifickým imunoglobulinem (Reed, 1988). Leflunomid se používá v léčbě revmatoidní artritidy, ale je možné jej off-label použít i při léčbě cytomegalovirové infekce (nejen v profylaxi) (Morita a kol., 2016 a John a kol., 2004).

Protože je lidský cytomegalovirus převládající infekční příčinou kongenitálních abnormalit od eliminace zarděnek, a také nejběžnější komplikací u transplantací orgánů a hematogenních kmenových buněk, je vakcína proti cytomegaloviru opravdu potřebná (Adler, 2013 a Arvin a kol., 2004 a Griffiths a kol., 2013). První vakcína proti CMV, která se rozsáhle testovala na lidech, byla živá atenuovaná vakcína vynalezena v laboratoři S. A. Plotkina (Plotkin a kol., 1990). Kmen, Towne, byl po subkutánní injekci imunogenní, ale u testovaných jedinců nedošlo k latenci viru. Byla tedy

bezpečná, ale bohužel se nedokázalo zabránit získání „wild CMV“ u dětí žen vystavených infekci (Adler a kol., 1995). Avšak u jedinců, kteří neměli získanou imunitu vůči CMV a podstoupili transplantaci ledviny od séropozitivního dárce, vakcína značně snížila vážnost onemocnění (Plotkin a kol., 1994).

Další byla vyvinuta vakcína obsahující povrchový glykoprotein gB, který je důležitým antigenem pro neutralizující protilátky (Pass a kol., 2009) a který blokuje vstup HCMV do fibroblastů (Wussow a kol., 2014). Tento produkt byl imunogenní, ale hladina protilátek rychle klesala. Nicméně u příjemců transplantátů ledvin a jater snížila virémii až o 80 % (Griffiths a kol., 2011). Sérové titry protilátek, které neutralizují infekci epiteliálních a endoteliálních buněk, korelují s protilátkami proti pentamerickému gH/gL/UL128/UL123/UL131A komplexu (PC) (Fouts a kol., 2012 a Genini a kol., 2011 a Gema a kol., 2008). O tomto mechanismu se nevědělo, protože všechny pokusy byly prováděny na fibroblastech, ale CMV se vyskytuje i v endoteliálních a epiteliálních buňkách, do kterých vstupuje jiným mechanismem (Plotkin a kol., 1994). Tento komplex se skládá z glykoproteinů gH a gL společně s proteiny UL128, UL130 a UL131 (Fu a kol., 2014). Dosavadní pokusy o vývoj vakcíny se zakládaly na vakcinaci podjednotky proti virovým proteinům. Nyní jsou v genovém inženýrství k dispozici technologie, umožňující vytvořit rekombinační cytomegalovirus, z něhož jsou odstraněny geny, které způsobují imunitní změny. Tato technologie by měla vést k vývoji bezpečnější živé atenuované vakcíny proti cytomegaloviru (Schleiss a kol., 2015). Ve vývoji jsou jak živé, tak neživé vakcíny. Mezi živé patří například atenuovaná vakcína Towne, rekombinanty s divokým virem Towne-Toledo (Suárez a kol., 2017), replikon Alphaviru ke generování virům podobných částic (Loomis a kol., 2013) nebo RNA a virové vektory nesoucí CMV antigeny (Bahl a kol., 2017). Mezi neživé patří DNA plazmidy, peptidy a virům podobné částice (Plotkin, 2015). V následující Tab. 2 je seznam vakcín proti cytomegaloviru v různých fázích jejich vývoje.

Tab. 2: Přehled dostupných CMV vakcín

Vakcíny v preklinických studiích	Vakcíny hodnocené v klinických studiích, neprobíhá vývoj	Vakcíny v klinických studiích, ve vývoji
Vakcíny na bázi denzních tělísek	AD169 vakcína	V160-001 replikaci poškozující vakcína
RNA vakcíny	Towne vakcína	Vakcíny s fúzním peptidem PADRE-pp65-CMV +/- CpG DNA adjuvans
Electroporovaná DNA vakcína	Towne/Toledo chimerická vakcína	Modifikovaná vakcína viru Ankara (MVA) Triplex vakcína
RedBiotech gB/pp65 VLP vakcína	Podjednotkové rekombinantní adjuvans s glykoproteinem B MF59/AS01	Virem gB/pp65 lymfocytické choriomeningitidy vektorovaná bivalentní vakcína
Vakcína založená na rozpustném PC	Alfavirem vektorovaná gB/pp65/IE1 vakcína	gB/pp65/IE1 trivalentní DNA vakcína; gB/pp65 bivalentní DNA vakcína
MVA vektorovaná PC vakcína	Canarypoxem vektorovaná glykoprotein B vakcína	Vakcína založená na obalených virových částicích
MVA vektorovaný pp65/IE1 fúzní protein	Canarypoxem vektorovaná pp65 (UL83) vakcína	
Adenovirem vektorované gB/Polyepitopy (Ad-gBCMVpoly vakcína)		

Upraveno podle: Schleiss a kol., 2017.

2.6 Ionizující záření

Ionizující záření je schopné ionizovat hmotu, kterou projde. To znamená, že vytváří z neutrálních částic kladně a záporně nabitě částice (Švec, 2005). Ionizující záření má duální povahu, existuje záření elektromagnetických vln (fotony) a částicové (korpuskulární) záření, které je zprostředkováno alfa a beta částicemi a neutrony (Österreicher a Vávrová, 2003). Ionizující záření lze také rozdělit na přímo ionizující

a nepřímo ionizující. Přímě ionizující záření je tvořeno nabitými částicemi s energií k vyvolání ionizace (elektrony, pozitrony, protony, částice alfa, částice beta). Částice bez náboje (fotony, neutrony) jsou součástí nepřímo ionizujícího záření. Tyto částice hmotu neionizují, ale při průchodu prostředím vytváří sekundární, přímo ionizující částice, které už ionizaci prostředí způsobí (Švec, 2005).

Gama záření je elektromagnetické záření s velmi krátkou vlnovou délkou, to znamená, že do materiálů proniká lépe než záření alfa a beta, ale je méně ionizující. Gama záření reaguje s materiálem hlavně fotoelektrickým jevem, Comptonovým jevem a vznikem elektron-pozitronového páru (Österreicher a Vávrová, 2003 a Švec 2005).

Kobalt 60 (^{60}Co) je přirozený beta a gama zářič. Jeho fyzikální poločas rozpadu je 5,27 let a efektivní poločas 1,6 roku. Energie gama záření je u tohoto zářiče relativně nízká 1,173 a 1,332 MeV. Většina radioizotopu kobaltu je vylučována ledvinami (84 %), dalších 14 % je vylučováno žlučovými cestami. Při kontaminaci kobaltem se provádí výplach dutiny ústní, nosní a žaludku, aby nedošlo ke vstřebávání. Dále se doporučuje podat furosemid, který urychlí eliminaci kobaltu. Dále je možné podání penicilaminu, případně EDTA. Tento zářič se používá k ozařování malých objektů (např. buněčné kultury) ve vzdálenosti cca 100 cm (Švec, 2005).

2.6.1 Účinky ionizujícího záření na molekulární a buněčné úrovni

Účinek ionizujícího záření začíná na buněčné úrovni, což má následně vliv na poškození tkání, orgánů a organismu². Časově lze účinek ionizujícího záření rozdělit na 3 fáze. Fyzikální fázi, kde dochází k interakci záření s organismem a dochází k excitaci a ionizaci molekul (Österreicher a Vávrová, 2003). Tato fáze je velmi krátká, trvá asi 10^{-16} až 10^{-14} s. Ve fyzikálně chemickém stádiu dochází k tvorbě volných radikálů, tato část se pohybuje v rozmezí 10^{-14} až 10^{-10} s². Ty společně s dalšími ionty a excitovanými atomy reagují s molekulami buněk během chemické fáze, která je dlouhá 10^{-3} až 10 s. V této fázi může dojít k poškození DNA². Poslední je fáze biologická, kde dochází k odpovědi organismu na ozáření na všech úrovních od molekulární až po odpověď celého organismu (Österreicher a Vávrová, 2003).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie a materiál

3.1.1 Použité chemikálie

Agaróza - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Akrylamid (AA) - Bio-Rad, Herkules, CA, USA

Ampholyte pH 3-10 - Fluka, Buchs, Švýcarsko

Ampholyte pH 8-10 - Fluka, Buchs, Švýcarsko

Azid sodný (NaN_3) - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

1,4 Bisacryloylpiperazine (PDA) - Fluka, Buchs, Švýcarsko

β -merkaptoetanol - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Blotting Grade Blocker - Bio-Rad, Herkules, CA, USA

BM Chemiluminiscenční blotovací substrát (POD) - Luminiscenční substrát, roztok A -
Manheim, Německo

BM Chemilumiscence Blotting Substrate (POD) - Startovací roztok B, Manheim,
Německo

Bovinní sérový albumin (BSA) - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Bromfenolová modř - Lachema, Brno, ČR

Complete EDTA free - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Činidlo A - Bicinchoninová kyselina - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Činidlo B - Roztok sulfidu měďnatého - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Developer - AGFA, Mortzel, Belgie

Dithiotreitol (DTT) - Bio-Rad, Herkules, CA, USA

DMEM – Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Dimetylsulfoxid (DMSO) - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Dodecylsírán sodný (SDS) - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

EGTA - ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Etanol - Kulich, Hradec Králové, ČR

FBS - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

HRP-linked Streptavidin - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Hydroxid sodný (NaOH) - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Chlorid sodný - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Jodacetoamide (IAA) - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Leupeptin - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

LumiGLO – Cell Signaling Technologies, Leiden, Nizozemí

Metanol - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

N, N, N, N – tetramethylethylendiamin (TEMED) - Bio-Rad, Herkules, CA, USA

Ortovanadičitan sodný - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

PBS - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Peroxid vodíku (H_2O_2) - Fluka, Buchs, Švýcarsko

Persírán amonný (APS) – Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Polyklonální kozí anti-myší imunoglobulinyHRP - DAKO, Glostrup, Dánsko

Protein standard - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Pyrofosfát sodný - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Sekundární butanol - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Sušené mléko - Bio-Rad, Herkules, CA, USA

TBS - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Tris/HCl - Bio-Rad, Herkules, CA, USA

Triton X - 100 - Sigma Aldrich, St. Louis MO, USA

Trypsin - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

TWEEN 20 - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Ustalořač G 354 – AGFA, USA

Vývojka G153 – AGFA, USA

3.1.2 Přístroje a použitý materiál

Automatické mikropipety - Proline, Biohit, Finsko

Běžný laboratorní materiál

Bürkerova komůrka - Meopta, Praha, ČR

CO₂ Inkubátor SL SHELAB - Sheldon Manufacturing, CA, USA

Colloidal Blue Stain kit CBB, G 250 - Invitogen, Caresbad, CA, USA

Curix 6OICP 1000 typ 9462, přístroj na vyvolávání RTG filmů - AGTA, Mortzel, Belgie

EK – 200G předvážky - AND, Mulpitas, CA, USA

Filtrační papíry - Whatman, USA

Flow box - Bioair Instruments, USA

IEF filtrační papírky - Bio-Rad, Herkules, CA, USA

ImmobilineTM dry Strip - IPG proužky pH 3-10 NL 7 cm - GE Healthcare, Švédsko

Ino Lab pH Level 1 pH metr - WTW, Weilheim, Německo

Inverzní mikroskop – Meopta, Česká republika

Lidský herpesvirus 5 (ATCC® VR1590™) - ATCC
Mettler Toledo Ax 105 - Greifensee, Švýcarsko
Mini-Protean^R Tetra Cell - Bio-Rad, Herkules, CA, USA
Minishaker MS 1 - IKA, Wilmington, Nebraska, USA
Parafilm SPI Striplies - West Chester, PA, USA
Plicní fibroblasty MRC-5 - ATCC
Podložní a krycí sklička - Menzel-Glaser, Německo
Protean IEF cell - Bio-Rad, Herkules CA, USA
PVDF membrány - Poll Corporation, FL, USA
Rotátor mini HIM 20 - Grand Instruments, Cambridge, Velká Británie
RTG film - CL-X PosureTM, Pierce, USA
Světelný mikroskop - Carl Zeiss, Jena, Německo
Thermo Spectronic - Helios γ , USA
Trans Blot R SD Semi-Dry blot, polosuchý blot - Bio-Rad, Herkules, CA, USA
Zkumavky a špičky - Eppendorf, Německo

3.1.3 Roztoky

0,5% Agaróza - 0,2 g agarózy + 40 ml horního pufru, zahřívát ve vodní lázni, uchovávat při 4 °C.

Alkylující ekvilibrační pufr - 0,96 g 4% IAA + 24 ml ekvilibračního pufru

10% persíran amonný (APS) - 0,47 g APS + 4,7 ml deion. H₂O

Cell Wash - 5 ml ohřáté želatiny + 985 ml PBS + 10 ml 10% azid sodný, doplnit do 1 l deion. H₂O

Dolní pufr - 15 g Tris base + 72 g glycin + 5 g SDS, doplnit do 5 l deion. H₂O

Ekvilibrační pufr - 9 g urea + 0,5 g SDS + 7,5 ml glycerol + 0,835 g 1,5 M Tris/HCl + 0,4% SDS, pH 8,8, doplnit do 25 ml deion. H₂O

Fosfátový pufr (PBS) - 80 g NaCl + 2 g KCl + 32,1 g Na₂HPO₄.12H₂O + 2 g KH₂PO₄, doplnit do 1 l deion. H₂O a upravit pH na hodnotu 7,2-7,4

Horní pufr - 7,25 g Tris base + 36 g glycin + 2,5 g SDS, doplnit do 2,5 l deion. H₂O, pH 8,5

10 x koncentrovaný TBS - 48,4 g Tris base + 160 g NaCl, doplnit do 2 l deion. H₂O

2M kyselina sírová (H₂SO₄) - 53,3 ml konc. H₂SO₄, doplnit do 500 ml deion. H₂O

PBS-Tween pufr (promývací pufr) - 0,5 ml Tween 20 rozpustit v 1000 ml PBS pufru

Redukující ekvilibrační pufr - 0,25 g 1% DTT + 25 ml ekvilibračního pufru

Roztok bromfenolové modře - 0,1 g bromfenolové modře + 20 ml deion. H₂O, uchovávat při 4 °C

Roztoky pro přípravu separačního a zaostřovacího gelu:

4,5 g akrylamid + 0,12 g PDA doplnit do 15 ml deion. H₂O

10% APS - 50 mg APS, doplnit 0,5 ml deion. H₂O

10% SDS - 0,5 g SDS doplnit 5 ml deion. H₂O

Roztok 4% mléka + 0,1% TBS Tween 20 - 1,6 g sušeného mléka + 40 ml 0,1% TBS Tween 20

Roztok pro rychlé modření - 250 ml metanolu + 10 ml 5% CH₃COOH + 650 ml deion. H₂O + 1 g Comassie brilant

Roztok sekundárního butanolu - 50 ml sekundární butanol + 10 ml deion. H₂O

12% Separační gel - 6 ml roztok AA s PDA + 3,8 ml 1,5M TRIS-HCl pH 8,8 + 5 ml deion. H₂O, odvzdušnit, pak přidat 150 µl 10% SDS + 50 µl 10% APS + 6 µl TEMED

20% Síran amonný - 18 g síran amonný + 900 ml deion. H₂O

Transfer pufr - 15,15 g Tris base + 72 g glycin + 1 l metanolu, doplnit do 5 l deion. H₂O

0,5M Tris-HCl pH 6,8 - 6,05 g TRIS base, doplnit do 100 ml deion. H₂O

1,5M TrisHCl pH 8,8 - 72,66 g TRIS base + 23,64 TRIS-HCl doplnit do 500 ml deion. H₂O

Tris/HCl - 3,94 g Tris/HCl, doplnit do 1 l deion. H₂O a upravit pH na 7,34

Triton X-100 - 0,2% - 998 ml PBS + 2 ml Tritonu X-100

Zaostřovací gel - 1,3 ml AA s PDA + 2,5 ml 0,5M TRIS-HCl pH 6,8 + 6,1 ml deion. H₂O, odvzdušnit, pak přidat 100 µl 10% SDS + 50 µl 10% APS + 10 µl TEMED

3.2 Příprava vzorků

3.2.1 Kultivace fibroblastů linie MRC-5

V rámci experimentální části práce jsme využili lidské fibroblasty buněčné linie MRC-5. Tato linie byla poprvé izolována Jacobsem v září roku 1966 z plicní tkáně 14 týdenního plodu po potratu z psychiatrických důvodů od 27 leté fyzicky zdravé kansaské ženy. Jedná se o diploidní mužské fibroblasty (Jacobs a kol., 1970).

Kultivační médium pro fibroblasty jsme připravili smícháním 500 ml DMEM kultivačního média (Biosera, Francie) s 50 ml FBS (Biosera, Francie) a 5 ml L-glutaminu bez antibiotik (ATB) (Sigma Aldrich, USA). Kultivační médium je nutné uchovávat při teplotě 4 °C a spotřebovat do 1 měsíce. Před vlastní kultivací jsme jej zahřáli na 37 °C.

Zamrazovací médium pro fibroblasty jsme připravili smícháním 0,5 ml DMSO (Sigma Aldrich, USA) s 4,5 ml FBS a 5 ml kultivačního média. Zamrazovací médium jsme uchovávali při teplotě -20 °C.

Pro práci buněčnou linií MRC-5 jsme fibroblasty rozmrazili následujícím způsobem. Do dvou 15 ml zkumavek jsme napipetovali po 2 ml kultivačního média. Do každé zkumavky jsme přidali 1 ml suspenze buněk z kryozkumavek a zkumavky jsme stočili při 1100 rpm, 5 minut za účelem odstranění DMSO. Supernatant jsme následně slili a buněčnou suspenzi jsme resuspendovali v 1 ml kultivačního média. Do kultivačních lahví o velikosti 125 cm² jsme napipetovali 50 ml předeřátého kultivačního média a přidali jsme buněčnou suspenzi fibroblastů tak, abychom získali koncentraci 5x10⁶ buněk/ml. Kultivační láhev jsme označili názvem buněk, číslem

pasáže a datem provedení. Buňky jsme inkubovali v prostředí oxidu uhličitého při teplotě 37 °C do vytvoření monovrstvy buněk na dně kultivační lahve.

Pro účely udržení buněk naživu lze použít techniku pasážování (přeočkování) buněk. Buňky jsme pasážovali následujícím způsobem. Do nové kultivační lahve jsme napipetovali kultivační médium a buněčnou suspenzi dle následující tabulky (Tab. 3) a kultivovali v CO₂ inkubátoru.

Pro další práci jsme pasážovali pouze buňky s konfluencí nad 90 %. Z kultivační lahve jsme odstranili veškeré kultivační médium. K buňkám jsme napipetovali asi 2 ml PBS (GE Healthcare LifeSciences, Rakousko) pro promytí neuniformních buněk. K takto připraveným buňkám jsme přidali 0,5 ml trypsinu (Promega Corporation, USA), který jsme rozlili po celém dně lahve. Následně jsme celou buněčnou kulturu trypsinizovali 3 minuty při 37 °C.

Tab. 3: Pravidlo pro pasážování buněk

Velikost kultivační lahve	Celkový počet buněk	Celkový objem růstového média
25 cm ²	1 x 10 ⁶	5ml - 10 ml
75 cm ²	2-3 x 10 ⁶	15 ml - 30 ml
150 cm ²	5 x 10 ⁶	30 ml - 50ml

Po oddělení buněk od dna kultivační lahve jsme buňky separovali od trypsinu centrifugací při 1100 rpm s následnou resuspendací v kultivačním médiu. Množství buněk jsme ověřili pomocí počítání v Bürkerově komůrce.

3.2.2 Ozáření a infekce fibroblastů

Připravili jsme si kultivační médium pro fibroblasty podle postupu uvedeného v podkapitole 1.1. Kultivační médium jsme rozmrazili chvíli před vlastní prací. Do dvou 15 ml zkumavek jsme napipetovali 2 ml média do každé z nich. Obsah kryozkumavek (2 x 1 ml) jsme přepipetovali do zkumavek. Zkumavky s buňkami jsme stočili

na centrifuze při otáčkách 1100 rpm 5 minut a následně jsme odstranili DMSO. Buněčnou suspenzi jsme resuspendovali v 1 ml kultivačního média.

Do 16 kultivačních lahví o velikosti 25 cm² jsme pipetovali 10 ml předehřátého média na 37 °C a přidali buněčnou suspenzi, aby v kultivační ládvi byla v koncentraci 1 x 10⁶ buněk/1 ml. Fibroblasty jsme kultivovali v CO₂ inkubátoru při teplotě 37°C do vytvoření monovrstvy. Následně jsme takto připravené buňky ozařovali uzavřeným zářičem ⁶⁰Co a infikovali je lidským cytomegalovirem (Human herpesvirus 5 (ATCC® VR1590™)) (Tab. 4).

Tab. 4: Příprava vzorků — prvotní model

Číslo vzorku	0 min	15 min	30 min	1 hod	1 hod 15 min	2 hod
1	kontrolní MRC-5					
2	2 Gy	odběr				
3	2 Gy			odběr		
4	10 Gy	odběr				
5	10 Gy			odběr		
6	80 Gy	odběr				
7	infekce		odběr			
8	infekce			odběr		
9	infekce			2 Gy	odběr	
10	infekce			2 Gy		odběr
11	infekce			10 Gy	odběr	
12	infekce			10 Gy		odběr
13	2 Gy	infekce			odběr	
14	2 Gy			infekce		odběr
15	10 Gy	infekce			odběr	
16	10 Gy			infekce		odběr

Tato příprava vzorků byla poměrně složitá a vyhodnocování výsledků nebylo snadné a ideální. Proto jsme přípravu vzorků dále optimalizovali dle Tab. 5. Připravené fibroblasty linie MRC-5 jsme opět ozařovali uzavřeným zářičem ⁶⁰Co a infikovali lidským cytomegalovirem (Human herpesvirus 5 (ATCC® VR1590™)).

3.2.3 Ionizující záření

V rámci diplomové práce jsme ozařovali plicní fibroblasty ionizujícím zářením. Ionizující záření představuje imunosupresivní faktor pro fibroblasty. Jako zdroj ionizujícího záření jsme používali uzavřený zářič kobalt 60 (^{60}Co). Čas nutný pro ozáření jsme si vypočítali podle hodnot vypočítaných na konkrétní měsíce z aktuálního dávkového příkonu zářiče (Tab. 6).

Tab. 5: Příprava vzorků — optimalizovaný model

vzorek	záření	infekce	odběr
1	kontrola	NE	po ozáření
2	0,5 Gy	NE	po ozáření
3	2 Gy	NE	po ozáření
4	10 Gy	NE	po ozáření
5	20 Gy	NE	po ozáření
6	50 Gy	NE	po ozáření
7	80 Gy	NE	po ozáření
8	100 Gy	NE	po ozáření
9	kontrola	MOI-1	15 min po infekci
10	0,5 Gy	MOI-1	15 min po infekci
11	2 Gy	MOI-1	15 min po infekci
12	10 Gy	MOI-1	15 min po infekci
13	20 Gy	MOI-1	15 min po infekci
14	50 Gy	MOI-1	15 min po infekci
15	80 Gy	MOI-1	15 min po infekci
16	100 Gy	MOI-1	15 min po infekci

Tab. 6: Čas potřebný k ozáření 1 Gy při použití uzavřeného zářiče ^{60}Co

rok 2014	čas na ozáření 1 Gy (min)	dávkový příkon Gy/min
leden	1,996	0,501055
únor	2,018	0,495492
březen	2,039	0,490521
duben	2,062	0,485076
květen	2,084	0,479864
červen	2,107	0,474537
červenec	2,13	0,469438
srpen	2,154	0,464226
září	2,178	0,459073
říjen	2,202	0,45414
listopad	2,227	0,449098
prosinec	2,251	0,444273

Výpočet časů pro ozáření jsme provedli podle jednoduchého vzorce:

čas na ozáření 1 Gy [min/Gy]	x	požadovaná dávka ionizujícího záření [Gy]	=	čas potřebný k ozáření [min]
---------------------------------------	---	---	---	---------------------------------------

Ozařovaný objekt se nesmí přímo dotýkat skla zářiče a musí být krytý minimálně 3 mm vrstvou umělé hmoty nebo plexiskla. Na ozařovací podstavec jsme umístili kultivační láhev ve vodorovné poloze tak, aby byl její střed pod centrálním paprskem.

3.2.4 Lýza buněk

Lýzu fibroblastů MRC-5 jsme provedli po odběru vzorků, za podmínek bez denaturace, pomocí lyzačního pufru určeného pro PathScan analýzu (Cell Signaling 7018). Lyzační pufr obsahuje 20 mM Tris-HCl (Bio-RAD, USA), 150 mM NaCl (Sigma Aldrich, USA), 1 mM Na₂EDTA (Sigma Aldrich, USA), 1 mM EGTA (Sigma Aldrich, USA), 1% TRITON X (Amersham Pharmacia Biotech, Švédsko), 20 mM sodium pyrofosfát (Sigma Aldrich, USA), 25 mM sodium fluoride (Roche Live Science, Německo), 1 mM beta-glycerolfosfát (Sigma Aldrich, USA), 1 mM Na₃VO₄ (Sigma Aldrich, USA) a 1 µg/ml leupeptin (Roche Live Science, Německo).

Pro vlastní lýzu buněk jsme připravili 1x zředěný lyzační pufr (1x lyzační pufr). Nejdříve jsme rozpustili tento pufr při 24 – 30 °C, po rozmražení jsme pufr zamíchali pomocí vortexu. Následně jsme 1x lyzační pufr uchovávali po celou dobu na ledu. Ihned po připravení 1x lyzačního pufru jsme přidali inhibitory proteáz Complete EDTA free (Roche Live Science, Německo) dle návodu. Všechny reagentie jsme uchovávali během pokusu na ledu nebo v chladu, protože jsme pracovali s adherentní linií MRC-5 fibroblastů.

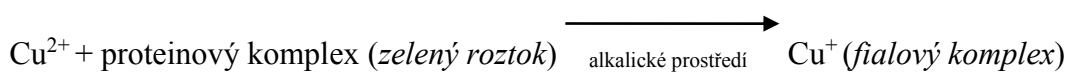
Do malé kultivační lahve jsme přidali PBS k odstranění zbývajících kultivačního média. Dále jsme přidali 500 µl 1x lyzačního pufru na 10 cm, tj. asi 1,0 - 1,5 ml na kultivační lahev velikosti 25 cm². Poté jsme lahev drželi na ledu po dobu 2 minut, krouživým pohybem jsme omyli stěny kultivační lahve. Poté jsme získanou suspenzi centrifugovali při 14 000 rpm po dobu 3 minut při teplotě 4 °C. Po centrifugaci jsme supernatant umístili do nových zkumavek a vytvořili vhodné alikvóty pro další práci, takto vytvořené vzorky důkladně popsali a jsme umístili do mrazícího boxu na - 80°C pro následnou PathScan analýzu.

3.2.5 Stanovení bílkovin

Celkovou bílkovinu v námi připravených vzorcích jsme stanovovali bicinchoninovou metodou (metodou bez přesražování vzorku). Používali jsme bicinchoninovou kyselinu (činidlo A) (Sigma Aldrich, USA) a 4% pentahydrát sulfátu měďnatého (činidlo B) (Sigma Aldrich, USA). Jako standard byl použit bovinní sérový albumin (BSA) (Sigma Aldrich, USA).

Princip metody: Bicinchoninová metoda slouží ke spektrofotometrickému stanovení celkových bílkovin. Měďnatý iont je proteinovým komplexem alkalicky redukován na mědný iont, následuje chelatace měďného iontu bicinchoninovou kyselinou a vzniká komplex, který vykazuje červené až fialové zbarvení (Káš a kol., 2006).

Schéma reakce:



Připravili jsme si kalibrační řadu (Tab. 7). Reakční činidlo jsme připravili smícháním 50 dílů činidla A a 1 dílu činidla B v dostatečném objemu odpovídajícím celkovému množství testovaných vzorků.

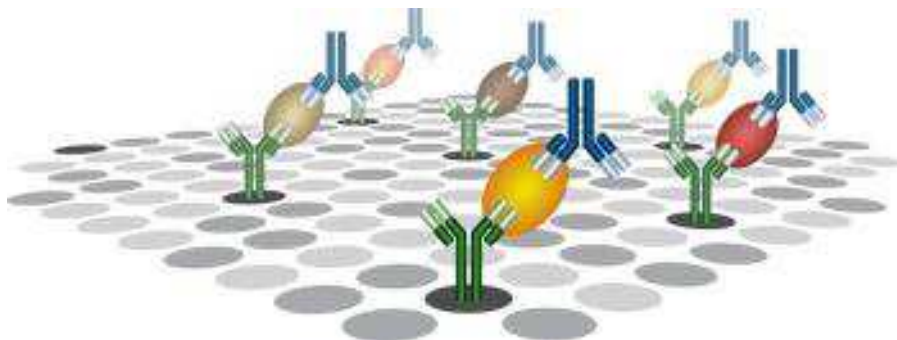
Tab. 7: Složení vzorků pro kalibrační řadu

Číslo zkumavky	H ₂ O	Standard
1	50 ml	0 ml
2	40 ml	10 ml
3	30 ml	20 ml
4	20 ml	30 ml
5	10 ml	40 ml
6	0 ml	50 ml

Každý vzorek jsme připravovali v dubletu. Smíchali jsme 5 μ l vzorku se 45 μ l destilované vody a 1 ml činidla. Vše jsme promíchali pomocí vortexu a nechali inkubovat při teplotě 37 °C. Výslednou hodnotu absorbance jsme měřili spektrofotometricky při vlnové délce 562 nm přístrojem Helios-Thermo Spectronic (Thermo Electron Corporation, USA) za podmínky, že jsme kalibrační řadu vždy proměřili jako první a následně jsme měřili vzorky. Koncentraci bílkovin jsme stanovili pomocí kalibrační křivky.

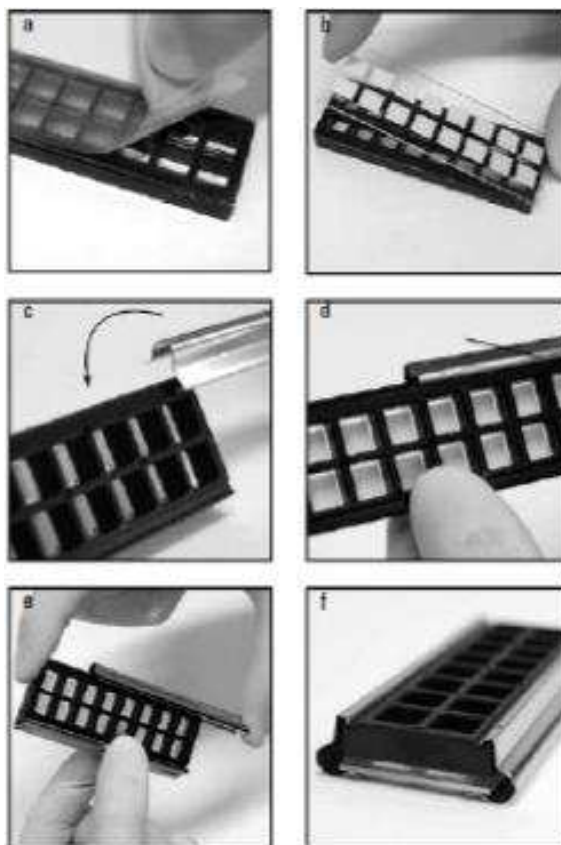
3.3 Metoda PathScan

Metoda PathScan od firmy Cell Signaling Technology je kvalitativní analýza molekulární signální transdukce založena na principu sandwichového ELISA testu (Obr. 6). Na sklíčku je místo pro 8 nebo 16 vzorků (v závislosti na konkrétní soupravě) a každé místo pro vzorek je potaženo membránou z nitrocelulózy, ve které je umístěna primární protilátka proti důležitým signálním molekulám. Využívali jsme ji pro výzkum klíčových zástupců signálních drah. Sestavení soupravy pro tuto metodu je uvedeno na Obr. 7.



Obr. 6: Princip Sandwichového ELISA testu

Zdroj: <http://www.cellsignal.com/common/content/content.jsp?id=pathscan-antibody-arrays> ze dne 15. 4. 2015



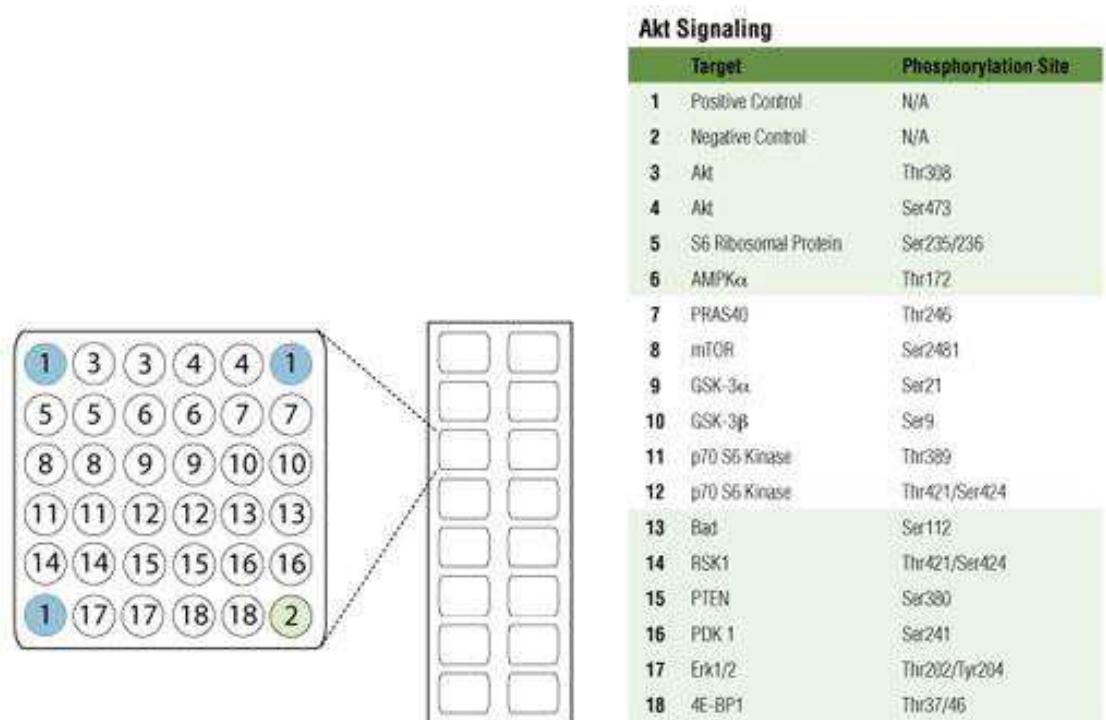
Obr. 7: Souprava pro PathScan analýzu

Vysvětlivky k obrázku: 9a - nejprve jsme odstranili fólii z mřížky, 9b - následně jsme na mřížku položili sklíčko s nitrocelulóзовými membránami tak, aby strana sklíčka s membrány mířili do mřížky. 9c, d, e - mřížku jsme ke sklíčku připevnili pomocí držáků. 9f - takto vypadá souprava připravena k vlastnímu experimentu.

3.3.1 Pathscan Akt analýza

Akt signální cesta je typicky aktivována jako odpověď na růstové faktory stimulující receptorové tyrozin kinázy transmitující primárně anabolické růstové faktory a signály přežití. Signální molekuly Akt1/2 jsou všudypřítomné proteinkinázy, které se podílejí na regulaci široké škály buněčných procesů.

Tato metoda umožňuje současnou detekci 16 fosforylovaných proteinů, které převážně patří do signalizační sítě Akt. Seznam proteinů je uveden v tabulce na Obr. 8. Protilátky specifické pro cílové proteiny jsou umístěny na sklíčkách potažených nitrocelulózou a jsou vždy v duplikátech. Schéma rozložení protilátek na sklíčku je uvedeno na Obr. 8. Každá sada obsahuje dvě sklíčka s 16 podložkami z nitrocelulózy, což umožňuje testovat až 32 vzorků najednou a získat až 512 výsledků v jediném experimentu.



Obr. 8: Seznam protilátek a schéma jejich rozložení na sklíčku pro PathScan Akt analýzu

Převzato z: <https://www.cellsignal.com/product/productDetail.jsp?productId=9474>

ze dne 10. 3. 2018

Buněčné lyzáty jsme inkubovali na sklíčku a následně jsme k nim přidali detekční protilátkový koktejl. Streptavidinem konjugovaná chřestová peroxidáza a LumiGlo se používají ke zviditelnění detekčních protilátek chemiluminiscencí. Obraz snímků je možno zobrazit pomocí digitálního zobrazovacího systému standardního chemiluminiscenčního filmu. Výsledný obraz je možno hodnotit vizuálně nebo využít analytický software, který kvantitativně zhodnotí intenzity bodů.

Těsně před analýzou se vzorky naředily na 0,2-1 mg/ml bílkoviny. Vyndali jsme sklíčko z držáku a blocking buffer (Cell Signaling Technology, USA), který byl před samotnou prací vytemperován na pokojovou teplotu. Připravili jsme si 1x Wash buffer (Cell Signaling Technology, USA) naředěním 20x Wash bufferu v dH₂O a nechali při pokojové teplotě. Dále 1x Detection antibody cocktail vzniklý naředěním 10x Detection AB cocktail (Cell Signaling Technology, USA) v Array Dilute buffer (Cell Signaling Technology, USA). Tento roztok jsme museli držet na ledu. Nakonec jsme si připravili 1x HRP-linked Streptavidin naředěním 10x HRP-linked Streptavidin (Amersham Pharmacia Biotech) v Array Dilute buffer a drželi jej na ledu.

V tabulkách č. 8 a 9 jsou uvedeny seznamy vzorků pro Path Scan analýzu.

Tab. 8: Seznam vzorků pro 1. sklíčko pro analýzu PathScan metodou

Pozice na sklíčku	Popis vzorku	Označení
1	kontrolní MRC-5	MRC-5
2	2 Gy - po 15' odběr	2Gy/15□
3	2 Gy - po 1 hod odběr	2Gy/60□
4	10 Gy - po 15' odběr	10Gy/15□
5	10 Gy - po 1 hod odběr	10Gy/60□
6	80 Gy - po 15' odběr	80Gy/15□
7	infekce - po 30' odběr	VR-1590/30□
8	infekce - po 1 hod odběr	VR-1590/60□

Tab. 9: Seznam vzorků pro 2. sklíčko pro analýzu PathScan metodou

Pozice na sklíčku	Popis vzorku	Označení
9	Infekce - po 1 hod 2 Gy - po 15' odběr	VR-1590/60□/2Gy/15□
10	Infekce - po 1 hod 2 Gy - po 1 hod odběr	VR-1590/60□/2Gy/60□
11	Infekce - po 1 hod 10 Gy - po 15' odběr	VR-1590/60□/10Gy/15□
12	Infekce - po 1 hod 10 Gy- po 1 hod odběr	VR-1590/60□/10Gy/60□
13	2 Gy - po 15' infekce - po 1 hod odběr	2Gy/15□/VR1590/60□
14	2 Gy - po 1 hod infekce - po 1 hod odběr	2Gy/60□/VR1590/60□
15	10 Gy - po 15' infekce - po 1 hod odběr	10Gy/15□/VR1590/60□
16	10 Gy - po 1 hod infekce - po 1 hod odběr	10Gy/60□/VR1590/60□

Připravili jsme si držák na sklíčka dle obrázkové předlohy. Plastový držák jsme vyndali na stůl a sejmulí plastový film. Sklíčko s nitrocelulózou směřující dovnitř jsme opatrně položili do držáku. Kovový držák jsme upevnili na plastový a zkontrolovali jsme upevnění kovového držáku z obou stran.

Přidali jsme 100 μ l 1x Array blocking buffer (Cell Signaling Technology, USA) ke každé jamce. Překryli jsme plastovým víčkem a nechali 15 minut inkubovat při pokojové teplotě na orbitální třepačce. Po inkubaci jsme Array blocking buffer opatrně slili a do každé jamky přidali 50–75 μ l lyzátu (vzorku 1–16). (V každé jamce je cca 1 mg proteinu). Všechna víčka jsme překryli a nechali přes noc při teplotě 4 °C inkubovat za stálého míchání na orbitální třepačce.

Druhý den jsme všechny jamky slili a do každé jamky přidali 100 μ l 1x Wash buffer a 5 minut při pokojové teplotě promývali na rotační třepačce. Tento postup jsme

opakovali celkem 3x. Poté jsme do každé jamky přidali 75 μ l 1x Detection Ab cocktail, zakryli jsme jamky a inkubovali 1 hodinu při pokojové teplotě na rotační třepačce. Po inkubaci jsme 4x opakovali promývací krok se 100 μ l 1x Wash buffer. Po důkladném promytí jsme do každé jamky přidali 75 μ l 1x HRP- linked Streptavidin, zakryli jsme a inkubovali 30 minut na orbitální třepačce. Poté jsme znovu 4x opakovali promývání.

Takto připravené vzorky jsme detekovali chemiluminiscenční metodou. Těsně před analýzou jsme si připravili roztok LumiGLO (Kirkegaard and Perry Laboratories, USA) s peroxidem vodíku (Sigma Aldrich, USA), protože sklíčko musí být vždy pokryto vrstvou tohoto roztoku pro následné vyvolání. Do kazety jsme si připravili parafilm tak, aby vytvořil kapsičku, která by zabránila případnému vytečení vyvolávacího roztoku. Vyvolávací roztok jsme nanесли na parafilm a sklíčko stranou s nitrocelulózou jsme položili do roztoku. Kazetu jsme nechali exponovat dle potřeby a poté jsme detekovali na přístroji Curix 60 ICP 1000 typ 9462 (AGFA, Belgie). Použili jsme vývojku G153 (AGFA, Belgie), ustalovač G 354 (AGFA, Belgie) a RTG filmy CP malé (KODAK, USA).

3.3.2 PathScan RTK analýza

Receptorové tyrozinkinázy (RTK) jsou receptory na povrchu buněk, které primárně signalizují fosforylace tyrozinu (Schlessinger, 2000). RTK spouští širokou škálu signalizačních kaskád, včetně cest PI3/Akt, MAPK a Jak/Stat. Tyto signální cesty řídí základní buněčné funkce jako je dělení, růst, diferenciace, migrace a přežití. Dysregulace RTK signalizace je přítomná např. u různých typů rakoviny (Blume-Jensen a Hunter, 2001).

Souprava pro PathScan RTK analýzu umožňuje detekci 28 receptorových tyrozinkináz a 11 důležitých signálních uzlů fosforylace na tyrozin nebo jiných reziduí. Specifické protilátky, pozitivní kontrola (biotinylovaný protein) a negativní kontrola (nespecifické IgG) jsou v duplikátech umístěné na nitrocelulózovou podložku na sklíčku. Každá sada obsahuje 2 sklíčka s 8 jamkami, což uživateli umožní testovat až 16 vzorků najednou. Seznam molekul a schéma jejich rozložení na sklíčku je znázorněno na Obr. 9.



Receptor Tyrosine Kinases

Target	Phosphorylation Site	Family	
1	EGFR/ErbB1	pan-Tyr	EGFR
2	HER2/ErbB2	pan-Tyr	EGFR
3	HER3/ErbB3	pan-Tyr	EGFR
4	FGFR1	pan-Tyr	FGFR
5	FGFR3	pan-Tyr	FGFR
6	FGFR4	pan-Tyr	FGFR
7	InsR	pan-Tyr	Insulin R
8	IGF-1R	pan-Tyr	Insulin R
9	TrkA/NTRK1	pan-Tyr	NGFR
10	TrkB/NTRK2	pan-Tyr	NGFR
11	Met/HGFR	pan-Tyr	HGFR
12	Ron/MST1R	pan-Tyr	HGFR
13	Ret	pan-Tyr	Ret
14	ALK	pan-Tyr	LTK
15	PDGFR	pan-Tyr	PDGFR
16	c-KIT/SCFR	pan-Tyr	PDGFR
17	FLT3/Flk2	pan-Tyr	PDGFR
18	M-CSFR/CSF-1R	pan-Tyr	PDGFR
19	EphA1	pan-Tyr	EphR
20	EphA2	pan-Tyr	EphR
21	EphA3	pan-Tyr	EphR
22	EphB1	pan-Tyr	EphR
23	EphB3	pan-Tyr	EphR
24	EphB4	pan-Tyr	EphR
25	Tyro3/Dtk	pan-Tyr	Axl
26	Axl	pan-Tyr	Axl
27	Tie2/TEK	pan-Tyr	Tie
28	VEGFR2/KDR	pan-Tyr	VEGFR

Signaling Nodes

Target	Phosphorylation Site	Family	
29	Akt/PKB/Rac	Thr308	Akt
30	Akt/PKB/Rac	Ser473	Akt
31	p44/42 MAPK (ERK1/2)	Thr202/Tyr204	MAPK
32	S6 Ribosomal Protein	Ser235/236	RSK
33	c-Abl	pan-Tyr	Abl
34	IRS-1	pan-Tyr	IRS
35	Zap-70	pan-Tyr	Zap-70
36	Src	pan-Tyr	Src
37	Lck	pan-Tyr	Src
38	Stat1	Tyr701	Stat
39	Stat3	Tyr705	Stat

Obr. 9: Receptorové tyrozinkinázy a signální uzly testované během PathScan RTK analýzy a jejich rozložení na sklíčku

Zdroj: <https://www.cellsignal.com/product/productDetail.jsp?productId=7982>

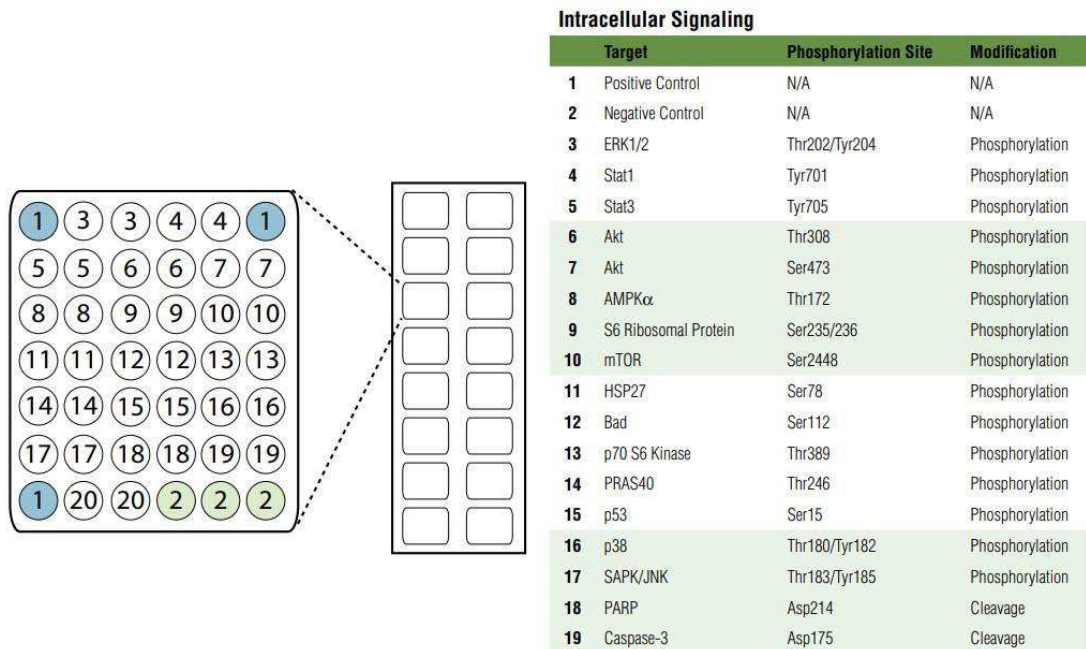
ze dne 11. 3. 2018

Vlastní pracovní postup byl stejný jako u PathScan Akt analýzy, viz kapitola 3.3.1.

3.3.3 PathScan intracelulární analýza

Fosforylace a proteolýza jsou rozšířené kovalentní posttranslační modifikace, které představují důležité regulační mechanismy. Detekce těchto modifikací na úrovni buněčných proteinů může poskytnout významný přehled o intracelulární signalizaci.

Souprava pro analýzu umožňuje současnou detekci 18 důležitých a dobře charakterizovaných signálních molekul při fosforylaci nebo štěpení. Protilátky jsou na sklíčku umístěné vždy v duplikátech. Každá sada obsahuje 2 sklíčka se 16 podložkami z nitrocelulózy, což umožňuje testovat až 32 vzorků a získat tak až 576 výsledků v jediném experimentu. Seznam protilátek a jejich rozmístění na sklíčku je znázorněno na Obr. 10.



Obr. 10: Seznam protilátek a jejich rozložení na sklíčku pro PathScan intracelulární analýzu

Zdroj: https://www.cellsignal.com/products/elisa-kits/intracellular-signaling-array-kit-chemiluminescent-readout/7323?_=1520774595587&Ntt=pathScan%20Intrace&tahead=true

ze dne 11. 3. 2018

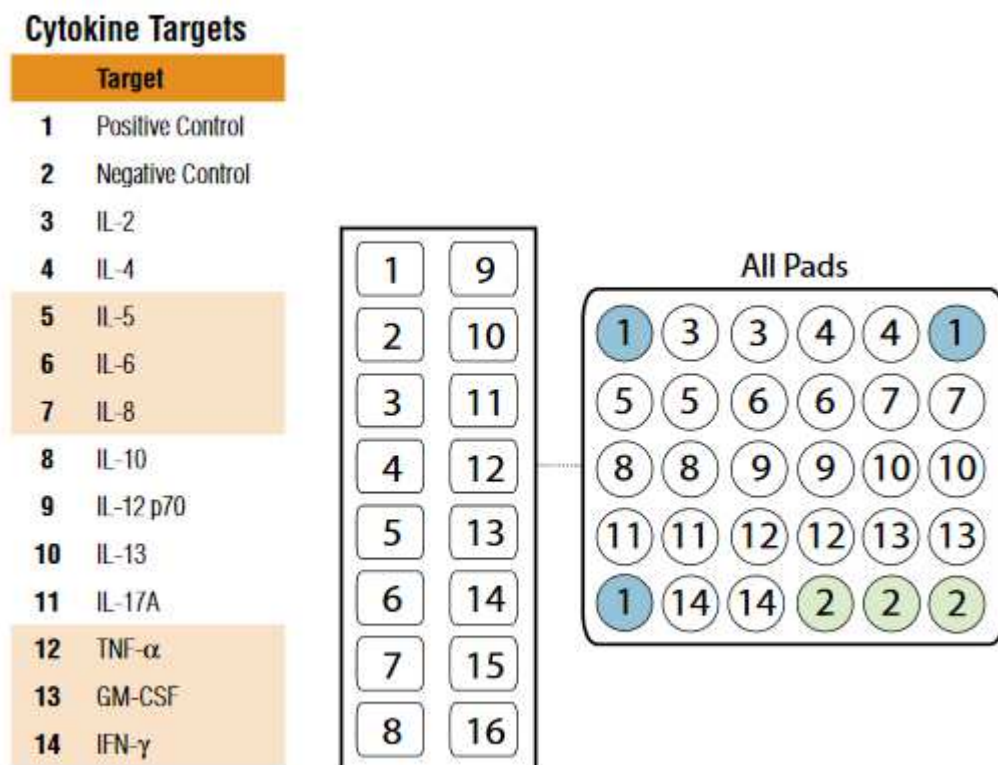
Pracovní postup byl stejný jako u PathScan Akt analýzy, viz Kapitola 3.3.1.

3.3.4 PathScan Th1/Th2/Th17 cytokinová analýza

Cytokiny jsou sekretované intercelulární signální molekuly, které regulují biologické procesy, včetně zánětu, obranných reakcí hostitele a diferenciacie buněk. Cytokiny mohou poskytnout přehled o molekulárních mechanismech, které rozlišují zdravé a patologické stavy (O'Garra a Arai, 2000).

PathScan Th1/Th2/Th17 cytokinová analýza nabízí panel protilátek proti široké škále cytokinů tak, aby bylo možné měřit jejich relativní změny v supernatantech buněčných kultur.

Tato souprava umožňuje současnou detekci 12 extracelulárních signálních molekul. Specifické protilátky jsou umístěné na sklíčku z nitrocelulózy. Každá sada obsahuje 2 sklíčka, umožňující testovat až 32 vzorků a generovat 384 výsledků v jediném experimentu. Seznam cytokinů a jejich rozmístění na sklíčku je uvedeno na Obr. 11.



Obr. 11: Seznam cytokinů a jejich rozložení na sklíčku pro PathScan Th1/Th2/Th17 cytokinovou analýzu

Zdroj: https://www.cellsignal.com/products/elisa-kits/th1-th2-th17-cytokine-antibody-array-kit-chemiluminescent-readout/13047?_=1525267767678&Ntt=cytokine%20pat&tahead=true

ze dne 11. 3. 2018

Pracovní postup byl stejný jako u PathScan Akt analýzy, viz Kapitola 3.3.1.

3.4 Metoda Mini 1D elektroforéza

Gelová elektroforéza separuje nabitě makromolekuly jako proteiny, polynukleotidy a uhlohydráty na základě jejich velikosti. Rozlišení těchto makromolekul závisí na koncentraci gelu. Při běžné migrační dráze o velikosti 10 – 20 cm se na takových gelech může rozlišit 30 až 50 složek, které mají různou elektroforetickou pohyblivost (Cox a Phillips, 2008). Princip elektroforézy je aplikace elektrického pole na roztok obsahující molekuly proteinů. Molekuly proteinů v elektrickém poli migrují dle jejich náboje a velikosti (Alberts a kol., 1998).

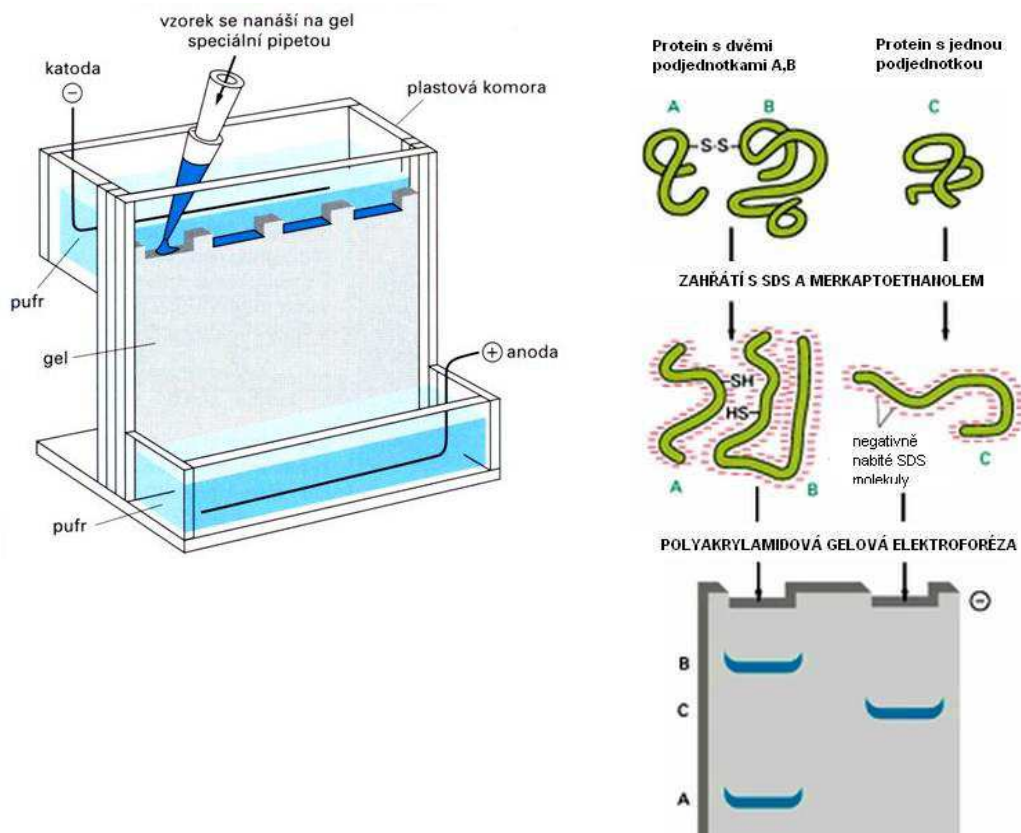
Jako gelové médium je běžně používán zesíťovaný polyakrylamid a různé typy agarózy. První médium je vhodné pro relativně malé makromolekuly a druhé spíše pro větší makromolekuly. Elektroforéza v jediném směru migrace je nazývána jednorozměrná a označujeme ji 1D (z angl. „one-dimensional“). V současné době je nejpoužívanější gelovou elektroforetickou separací.

Nejčastěji se používají vertikálně nebo horizontálně orientované gelové desky v komerčně dostupných a jednoduchých typech přístrojů, které umožňují připojení gelu s jednou koncentrací nebo gelu s pórovitým gradientem ke katodickému a anodickému pufovacímu roztoku. Oddělené složky jsou zvýrazněné jako pásy (bandy) a po imunologickém přenosu a fixaci na blotovací membrány jsou detekovány např. chemiluminiscenčně nebo pomocí biologické a enzymatické aktivity nebo radioaktivity.

Nejčastěji se makromolekulární směs, která se má rozdělit, nanáší na rovnoběžné dráhy na gelové desky. Migrační vzdálenosti bandů jsou porovnávány vizuálně, aby se zjistila jejich identita (Cox a Phillips, 2008). V rámci této diplomové práce jsme využívali denaturující polyakrylamidový gelový (PAGE) systém s využitím

dodecylsulfátu sodného (SDS) k oddělení proteinů podle jejich velikosti, tzv. SDS-PAGE. Tento systém poprvé popsal Laemmli v roce 1970 (Laemmli, 1970).

SDS-PAGE je velmi užitečná metoda pro rozdělení proteinů podle jejich velikosti (Obr. 12). SDS je detergent, který denaturuje sekundární a nedisulfidické terciární struktury a váže se na ně s negativním nábojem na povrchu, který koreluje s jejich délkou, což nám umožní odhadnout jejich molekulovou hmotnost (Brunelle a Green, 2014). Denaturace pomocí SDS je znázorněna na Obr. 12. Pro přerušení disulfidických vazeb se používá redukční činidlo, např. β -mercaptoethanol. Pronikání gelem může být ovlivněno stavem proteinu, např. fosforylací. Laemmliho systém SDS-PAGE je diskontinuální gel s horním gelem a nižším rozlišovacím gelem, které mají různé hodnoty pH a koncentrace polyakrylamidu. Horní (stacking) gel má nižší procentuální podíl polyakrylamidu, která umožňuje rychlý pohyb proteinů do těsného bandu, než vstoupí do gelu s vyšším procentuálním zastoupením polyakrylamidu, kde probíhá separace. Koncentrace polyakrylamidu může být optimalizována podle velikosti proteinů ve vzorku (Brunelle a Green, 2014).



Obr. 12: Gelová elektroforéza a princip SDS-PAGE

Nejdříve jsme si připravili roztoky na polyakrylamidové gely. Na přípravu 4 gelů jsme do 50 ml kádinky navážili 4,5 g akrylamidu (AA, Bio-RAD, USA), k němu jsme přidali 0,12 g polydiethylenamidu (PDA, Sigma Aldrich, USA) a doplnili jsme destilovanou vodou (dH₂O) do 15 ml. Míchali jsme až do úplného rozpuštění. Následně jsme roztok přelili do odměrného válce, doplnili dH₂O přesně na 15 ml a nalili jsme roztok zpátky do kádinky. Dále jsme si připravili 10% persíran amonný (APS, Sigma Aldrich, USA) a 10% dodecylsírán sodný (SDS, Sigma Aldrich, USA).

K nalití separačních gelů jsme používali sadu Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-RAD, USA). Pro jeden gel je nutné vždy připravit 1 kratší a 1 delší sklo, které má po stranách připevněné proužky k určení tloušťky gelu. Před použitím musí být skla důkladně odmaštěná pomocí lihu. Připravili jsme si separační gel podle molekulové hmotnosti proteinů. Pro náš účel jsme používali pouze 12% gel, což odpovídá proteinům o velikosti 20 – 60 kDa. K nalití 2 gelů jsme postupovali dle následující Tab. 10.

Tab. 10: Schéma k přípravě 2 gelů na mini 1D elektroforézu

SEPARAČNÍ GEL	12%
AA+ PDA	4,8 ml
1,5M TRIS-HCl pH 8,8	3,04 ml
dH ₂ O	4,0 ml
	odvzdušnit
10% SDS	120 μl
10% APS	40 μl
TEMED	4,8 μl
Objem	cca 4,5 ml/gel
Doba polymerace	1 hod

Šipky znázorňují, v jakém pořadí jsme jednotlivé reagenty přidávali. Začali jsme u dH₂O, 1,5M TRIS-HCl pH 8,8 a směs AA + PDA, poté jsme takto smíchanou směs odvzdušnili a přidali 10% SDS, 10% APS (dle Tab. 10). Následně jsme v co

nejkratším čase po přidání APS přidali tetramethylethyldiamin (TEMED, Serva, Německo). APS a TEMED katalyzují polymerizaci akrylamidu. Po vytvoření separačních gelů, které polymerovaly 1 hod, jsme si připravili zaostřovací gely dle následující tabulky (Tab. 11), ve které je uveden návod na přípravu pro různé množství zaostřovacích gelů.

Tab. 11: Schéma k přípravě zaostřovacích gelů

ZAOSTŘOVACÍ GELY	4% 2 gely	4% 4 - 6 gelů	4% nad 6 gelů
AA + PDA	0,65 ml	1,3 ml	1,95 ml
1,5M TRIS-HCl pH 6,8	1,25 ml	2,5ml	3,75 ml
dH ₂ O	3,05 ml	6,1 ml	9,15 ml
	odvzdušnit	odvzdušnit	odvzdušnit
10% SDS	50 μl	100 μl	150 μl
10% APS	25 μl	50 μl	75 μl
TEMED	5 μl	10 μl	15 μl
Objem	cca 1,3 ml/gel	cca 1,3 ml/gel	cca 1,3 ml/gel
Doba polymerace	45 min	45 min	45 min

Reagencie pro přípravu zaostřovacích gelů jsme opět přidávali v pořadí dH₂O, 1,5 mM TRIS-HCl pH 6,8, směs AA + PDA, poté jsme celou směs odvzdušnili a přidali k této směsi 10% SDS, 10% APS a TEMED.

Po nalití zaostřovacích gelů jsme mezi skla vsunuli příslušný hřebínek, abychom si vytvořili jamky pro nanášení vzorků. Po 2 - 3 min jsme doplnili zaostřovací gel podél okrajů hřebínku a nechali gely polymerizovat minimálně 45 min.

V dalším kroku jsme si připravili vzorky, které jsme nanášeli ve vzorkovacím pufru (cc pufr). Vzorky jsme ředili dle Tab. 12. Smícháním 2 dílů vzorku a 1 dílu pufru jsme získali 3x zředěný vzorkovací pufr. Takto připravené vzorky jsme povařili v termobloku po dobu 5 minut při teplotě 95 °C a následně jsme je ochladili na pokojovou a vortexovali pro zajištění vzorku, který by případně mohl ulpět na víčku zkumavky.

Tab. 12: Příprava vzorků pro elektroforézu

vzorky	koncentrace mg/ml	přepočet na 40 µg /µl	3x cc pufr/ µl	celkem/µl	vzorek na 4 gely /µl	3x cc pufr na 4 gely /µl
1	0,79	50,62	25,31	75,93	202,48	101,24
2	0,66	60,78	30,39	91,17	243,12	121,56
3	0,93	43,18	21,59	64,77	172,72	86,36
4	0,58	68,50	34,25	102,75	274,00	137,00
5	0,74	54,07	27,03	81,10	216,26	108,13
6	0,55	72,91	36,45	109,36	291,62	145,81
7	0,69	57,84	28,92	86,76	231,35	115,67
8	0,64	62,06	31,03	93,09	248,24	124,12
9	0,87	46,11	23,05	69,16	184,43	92,21
10	0,78	51,52	25,76	77,28	206,09	103,05
11	0,86	46,74	23,37	70,11	186,97	93,49
12	0,80	49,97	24,99	74,96	199,89	99,94
13	0,82	48,51	24,25	72,76	194,03	97,02
14	0,98	40,77	20,39	61,16	163,09	81,55
15	0,88	45,40	22,70	68,10	181,60	90,80
16	0,74	54,19	27,10	81,29	216,77	108,39

Po zpolymerování gelů jsme opatrně vysunuli hřebínek, vzniklé jamky jsme opláchli dH₂O a opatrně osušili filtračním papírem. Skla s gely jsme umístili do sady Mini-PROTEAN. Skla se zajistila pomocí páček směrem k elektrodám a tím se také vytvořil prostor pro horní pufr (Bio-RAD, USA). Horní pufr jsme nejdříve nalili mezi skla, abychom zjistili, jestli neprotéká. Poté jsme skla umístili do tanku a ledový horní pufr jsme nalili do výšky 0,5 cm pod okraj. Ledový dolní pufr (Bio-RAD, USA) jsme nalili do tanku asi do jedné třetiny skel.

Do jamek jsme napipetovali naředěné vzorky a dolili jsme dolní pufr tak, aby byly hladiny horního a dolního pufru ve stejné úrovni. Tank jsme uzavřeli víkem s elektrodami, které jsou zapojeny do zdroje.

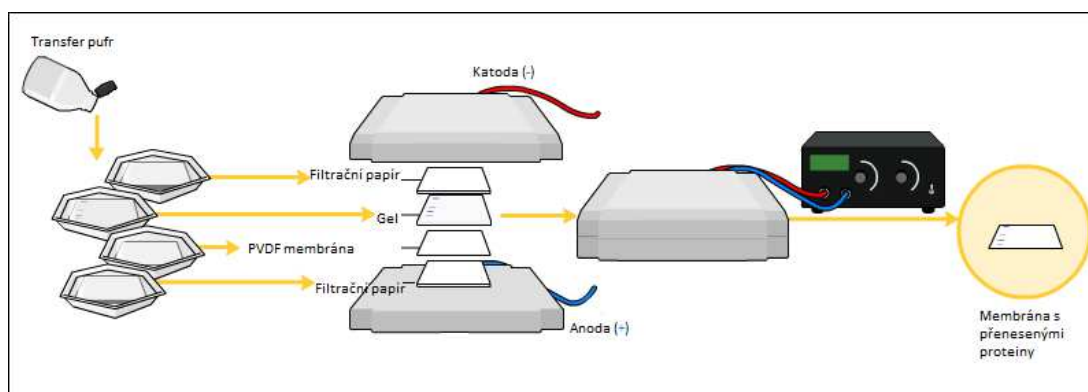
Museli jsme dodržet zvolené podmínky pro elektroforézu. Konstantní napětí 200 V, proud 0,12 A pro 2 gely, proud 0,24 A pro 4 gely. Záporně nabitě proteiny migrují shora dolů směrem ke kladně nabitě elektrodě. Po ukončení elektroforézy, zhruba po 50 minutách, jsme odřízli zaostřovací gel a gely v levém dolním rohu, abychom je měli

správně zorientované pro další postupy. Poté jsme je umístili do 100 ml transfer pufru, ve kterém jsme je nechali promývat cca 10 minut.

3.5 Metoda Western blot

Western blot představuje analytickou metodu, která slouží k detekci specifického proteinu ve směsi více proteinů. Využívá gelovou elektroforézu k oddělení proteinů podle jejich molekulové hmotnosti. Následně jsou proteiny přeneseny z gelu na povrch membrány a detekovány specifickými protilátkami.

Vlastní přenesení na membránu (blotování) se provádí také proto, že práce s gelem není příliš praktická a příjemná. Přístroj pro blotování se skládá ze dvou hlavních částí, a to spodního dílu – anoda a vrchního dílu (víko) – katoda. Na anodu se nanáší v pořadí vlhký filtrační papír, membrána, gel a vlhký filtrační papír. Toto je znázorněno na Obr. 13. Vlhkost je nutná pro kontinuitu elektrického pole. Záporně nabitě proteiny migrují směrem ke kladně nabitě anodě, tzn. směrem dolů.



Obr. 13: Schéma metody Western blot

upraveno podle:

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/93/Western_blot_transfer.png

ze dne 12. 3. 2018

Proteiny jsme z gelu přenášeli na polyvinylidendifluoridovou membránu (PVDF membrána) (BIORAD, USA) o velikosti 8,3 x 5,4 cm pomocí Trans-Blot SemiDry Electrophoresis Transfer Cell (Bio-RAD, USA). Membránu jsme kvůli orientaci popsali v horním levém rohu obyčejnou tužkou. Membrány jsme nejprve aktivovali v metanolu po dobu jedné minuty. Poté jsme je ponořili v příslušné nádobě do transferového pufru,

který jsme během 20 minut 3x vyměnili. Filtrační papíry jsme namočili do transferového pufru (na jednu membránu je potřeba 1x Extra Thick Blot Paper mini blot size (BioRad, USA) a 5x filtrační papír Whatman 3 mm Chr Blotting paper 8,5 x 7 scm).

Do blotovacího přístroje jsme nejprve na anodu položili extra silný filtrační papír, na něj jsme následně položili membránu tak, aby značka byla v levém horním rohu, odstranili jsme bubliny pomocí zkumavky, na membránu jsme položili gel označeným rohem gelu na roh membrány označený tužkou a na něj 5 kusů obyčejného filtračního papíru a opět jsme odstranili bubliny. Potom jsme přiklopili katodu a víko.

Mezi podmínky polosuchého přenosu proteinů na membránu patří konstantní napětí, avšak hodnota proudu se liší podle počtu blotovaných gelů, což je znázorněno v Tab. 13.

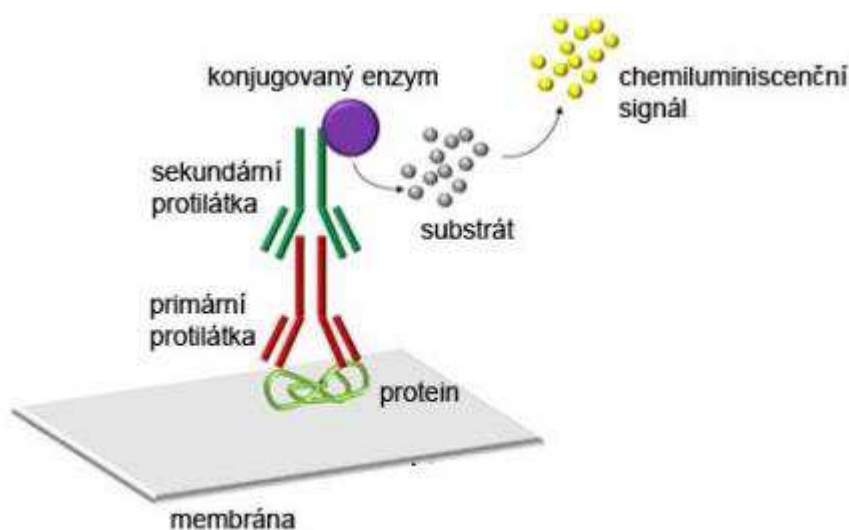
Tab. 13: Podmínky pro Western blot

Počet gelů	Napětí	Proud	Čas
1	25 V	170 mA	20 min
2	25 V	170 mA	30 min
3	25 V	200 mA	60 min
4	25 V	200 mA	75 min
5	25 V	200 mA + 350 mA	75 min + 20 min
6	25 V	200 mA + 350 mA	75 min + 20 min

Po uplynutí potřebné doby pro přenos proteinů z gelu na membránu jsme membrány a gely opatrně vyndali z blotovací soupravy a opláchli je dH₂O. Membrány jsou připravené k okamžité imunodetekci nebo se dají uchovat umístěním při teplotě 2-8 °C mezi filtračními papíry. Pro kontrolu a zviditelnění je možné gely obarvit pomocí modřícího roztoku.

3.6 Imunodetekce

Proteiny na membráně se detekují primárními protilátkami. Tyto protilátky se zviditelní pomocí značených sekundárních protilátek (např. konjugovanými s křenovou HRP peroxidázou). To je znázorněno na Obr. 14. Křenová peroxidáza reaguje s chemiluminiscenční látkou, která vykazuje luminiscenci a ta pak může být detekována pomocí RTG filmů. Existuje chemiluminiscenční a fluorescenční způsob detekce. V rámci této diplomové práce jsme používali chemiluminiscenční způsob detekce. Před vlastní imunodetekcí musí dojít k zablokování nespecifických protilátek. K tomu se využívá nejčastěji netučné sušené mléko nebo BSA. Mléko není vhodné pro fosforylované proteiny. Tyto proteiny obsadí všechna místa na membráně, které by mohly vázat primární protilátku nespecifickou vazbou. Pro utlumení nespecifického pozadí se používají detergenty.



Obr. 14: Princip chemiluminiscence

upraveno podle: <http://labguide.cz/wp-content/uploads/2014/10/western-final-1024x500.jpg> ze dne 12. 3. 2018

Membrány s přenesenými proteiny jsme aktivovali v metanolu po dobu jedné minuty. Poté jsme je promývali v 10 minut v TBS, 1 hodinu v 5% roztoku sušeného mléka (Bio-RAD, USA) v 0,1% TBS (případně v 0,05% TBS). Následně jsme membrány 3x promyli v 0,1% TBS a přes noc při teplotě 4 °C jsme nechali membrány

inkubovat s primární protilátkou (Ab) v roztoku 5% sušeného mléka nebo BSA v 0,1% TBS. Použité primární Ab jsme shrnuli do Tab 14.

Všechny protilátky byly zakoupeny od firmy Cell Signaling Technology, USA a bylo použito ředění 1:500 Ab v BSA.

Druhý den jsme membrány při pokojové teplotě promývali 6 x zředěným 0,1% TBS, poté hodinu inkubovali se sekundární protilátkou (anti-myší nebo anti-králičí Ab konjugovaná s HRP, Dako Cytochromation, Untermyli, Švýcarsko) v 5% mléku, nebo BSA s 0,1% TBS v ředění 1:1000 (Tab. 14). Po ukončení inkubace jsme znovu membrány 6x promyli v 0,1% TBST a nakonec jsme je na 5 minut nechali v koncentrovaném TBS. Během posledních 30 minut před posledním promýváním jsme si připravili chemiluminiscenční roztok s peroxidem vodíku (Sigma Aldrich, USA), pro následné chemiluminiscenční vyhodnocení. Připravili jsme si parafilm tak, aby vytvořil kapsičku, která by zabránila případnému vytečení vyvolávacího roztoku. Vyvolávací roztok jsme nanесли na parafilm a membránu do něj ponořili tak, aby se přenesené proteiny bezprostředně dotýkaly vyvolávacího roztoku. Poté jsme nechali tento roztok působit jednu minutu, po uplynutí této doby jsme membrány přenesli do kazety pro vyvolání filmů. Kazetu jsme nechali exponovat dle potřeby a chemiluminiscenční reakci jsme detekovali na přístroji Curix 60 ICP 1000 typ 9462 (AGFA, Belgie). Použili jsme vývojku G153, ustalovač G 354 – AGFA a RTG filmy CP malé (KODAK, USA). V rámci experimentální práce jsme také detekovali vzorky pomocí fluorescenční metody, nicméně jsme neměli k dispozici dostatečné technické zázemí.

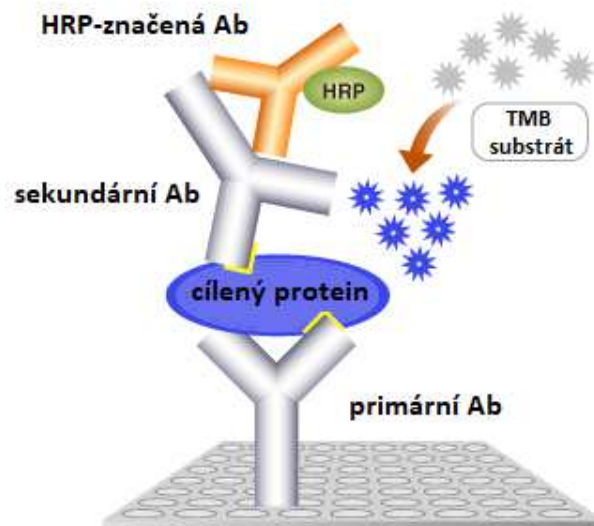
Tab. 14: Přehled použitých primárních protilátek pro imunodetekci

Primární protilátka	Molekulová hmotnost / kDa	Sekundární protilátka	Inkubace WB membrán
Stat 3 (124H6) myší mAb	79, 86	Anti-myší	5% NSM, TBST 0,1%
Fosfo Stat 3 (D3A7) králičí mAb	79, 86	Anti-králičí	5% BSA, TBST 0,1%
Kaspáza-9 (lidská specifická)	47	Anti-králičí	5% NSM, TBST 0,1%
Štěpená kaspáza 3 (5A1E) králičí mAb	17, 19	Anti-králičí	5% NSM, TBST 0,1%
Kaspáza-3 (8G10) králičí mAb	35	Anti-králičí	5% NSM, TBST 0,1%
p53 (7F5) králičí mAb	53	Anti-králičí	5% BSA, TBST 0,1%
fosfo-p53 (16G8) myší mAb	53	Anti-králičí	5% NSM, TBST 0,1%
Bad (D24A9) králičí mAb	23	Anti-králičí	5% BSA, TBST 0,1%
P44/42 MAPK (Erk1/2) (137F5) králičí mAb	42, 44	Anti-králičí	5% BSA, TBST 0,1%
Fosfo-P44/42 MAPK (Erk1/2) králičí mAb	42, 44	Anti-králičí	5% BSA, TBST 0,1%
Kaspáza-8 (1C12) myší mAb	57	Anti-myší	5% BSA, TBST 0,1%
Štěpená kaspáza-8 (D5B2) králičí mAb	18, 43	Anti-králičí	5% BSA, TBST 0,1%
Fosfo-Bad (40A9) králičí mAb	23	Anti-králičí	5% BSA, TBST 0,1%
Fosfo-ATM (10H11.E12) myší Ab	350	Anti-myší	5% NSM, TBST 0,1%
Fosfo-AMPK α (40H9) králičí mAb	62	Anti-králičí	5% BSA, TBST 0,1%
AMPK α (D63G4) králičí mAb	62	Anti-králičí	5% BSA, TBST 0,1%
NF- κ B (L8F6) myší mAb	65	Anti-myší	5% BSA, TBST 0,1%
Fosfo-p38 (D3F9) králičí mAb	43	Anti-králičí	5% BSA, TBST 0,1%
p38 (D13E1) králičí mAb	40	Anti-králičí	5% BSA, TBST 0,1%

Pozn.: NSM= netučné sušené mléko

3.7 Princip metody sendvičové enzymatické imunanalýzy

Sendvičová enzymatická imunanalýza (ELISA) funguje na principu vazby antigen-protilátka. Na nosiči je uchycena primární Ab, na kterou se váže antigen (vzorek). Na antigen se následně naváže sekundární protilátka označená křenovou peroxidázou (Obr. 15).



Obr. 15: Princip sendvičového ELISA testu

zdroj: www.cellsignal.com ze dne 5. 4. 2018 (upraveno)

Nejprve jsme opláchli 96 jamkovou destičku v dH₂O. Přidali jsme cca 200 µl dH₂O do každé jamky, dH₂O jsme vylili a jamky vysušili papírovými ubrousky, abychom měli jistotu, že jsou jamky suché. Primární Ab jsme zředili v PBS (GE Healthcare Life Sciences, Rakousko) v poměru 1:100. Pro jednu 96 jamkovou destičku jsme smíchali 100 µl primární Ab s 9,9 ml PBS. Do každé jamky jsme přidali 100 µl tohoto roztoku. Destičku jsme přikryli a inkubovali přes noc při teplotě 4 °C. Následující den jsme vylili obsah jamek a promývali jsme 4x 200 µl promývacího pufru do každé jamky. Po každém promytí jsme promývací pufr odsáli čistým ubrouskem, ale nikdy jsme jamky nevysušili kompletně. Spodní stranu jamek jsme otřeli nežmolujícím ubrouskem. Přidali jsme 150 µl blokovacího pufru do každé jamky a destičku jsme nechali inkubovat při teplotě 37 °C po dobu 2 hodin. Následně jsme jamky znovu promývali promývacím pufrem stejným způsobem jako při prvním promývání. Do takto

připravené destičky jsme napipetovali 100 μ l vzorků (Tab. 6) do každé jamky a nechali jsme destičku inkubovat při 37 °C po 2 hodiny. Po inkubaci jsme opět provedli promývání promývacím pufrem. Detekční protilátku jsme zředili v blokovacím pufru v poměru 1:100. Pro jednu 96 jamkovou destičku jsme smíchali 100 μ l sekundární detekční Ab a 9,9 ml blokovacího pufru. Tento roztok jsme přidávali po 100 μ l do každé jamky. Destičku jsme přikryli a nechali inkubovat při 37 °C 1 hodinu. Destičku jsme následně opět 4x promyli promývacím pufrem. Sekundární Ab jsme ředili v blokovacím pufru v poměru 1:1000. Do každé jamky jsme napipetovali 100 μ l tohoto roztoku. Destičku jsme poté přikryli krycí fólií a inkubovali při teplotě 37 °C po dobu 30 minut. Následně jsme destičku opět 4x promývali promývacím pufrem. Do každé jamky jsme přidali 100 μ l TMB substrátu (CellSignaling Technology, USA) a destičku jsme přikryli a inkubovali 10 minut při teplotě 37 °C. Nakonec jsme do každé jamky přidali 100 μ l STOP roztoku (CellSignaling Technology, USA). Destičku jsme detekovali na Thermo Spectronic - Helios γ , USA při vlnové délce 425nm nebo 450 nm dle konkrétní protilátky. Touto metodou jsme měřili následující molekuly (Tab. 15).

Tab. 15: Měřené molekuly s příslušnými protilátkami

Název	Capture Ab	Detekční Ab	Sekundární Ab	Absorbance
Total Chk1	Chk1 myší	Chk1 králičí	anti-králičí IgG, HRP značená	450 nm
Total Chk2	Chk2	Chk2 myší	anti-myší IgG, HRP značená	450 nm
Total Akt1	Akt králičí	Akt1 myší	anti-myší IgG,HRP značená	425 nm
Phospho-Akt1	Fosfo-Akt1	Akt1 myší	anti-myší IgG, HRP značená	450 nm
Total Akt2	Akt králičí	Akt2 myší	anti-myší IgG, HRP značená	450 nm
Phospho-Akt2	fosfo-Akt králičí	Akt2 myší	anti-myší IgG, HRP značená	450 nm
Total GSK-3 β	GSK-3 β myší	GSK-3 β králičí	anti-králičí IgG, HRP značená	450 nm
Phospho-GSK-3 β	GSK-3 β myší	Fosfo- GSK-3 β králičí	anti-králičí IgG, HRP značená	450 nm

3.8 xCELLigence RTCA analýza

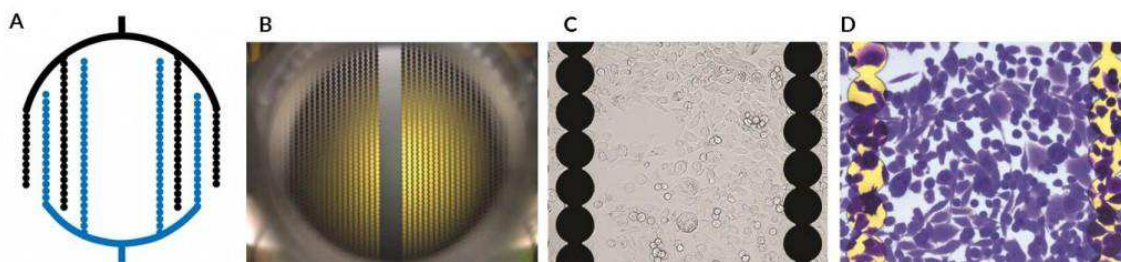
Princip metody xCELLigence RTCA je založen na neinvazním sledování dynamických procesů v buněčné populaci (buněčná adheze, proliferace, buněčná smrt a další). Při využití této metody není potřeba barvení a značení buněk. Jde o monitorování buněk, které rostou na destičkách o různém počtu jamek a jsou podobné mikrotitračním destičkám. Touto metodou lze sledovat pouze adherentní buňky. Na dně jamek jsou umístěné zlaté elektrody (Obr. 18). Využívá se zde nízkého napětí (méně než 20 mV) střídavého proudu a tím vzniká elektrické pole mezi zlatými elektrodami a ty reagují s iontovým prostředím média v jamce. Elektrické pole se mění podle počtu adherentních buněk na dně jamky a dle síly jejich adheze. Interakce mezi elektrodami a buňkami na dně jamky je zaznamenána jako elektrická impedance. Čím vyšší je počet adherentních buněk, tím vyšší je naměřená impedance. Míra impedance je dále vyjádřena pomocí bezrozměrných jednotek, tzv. buněčného indexu (Vondráčková a kol., 2010 a Ziebolz a Burkhard, 2010).

Buňky se dají sledovat několik dní, destička je po celou dobu pokusu umístěna v CO₂ inkubátoru, což jim zajišťuje optimální kultivační prostředí. Během pokusu je možné k buňkám za stálého monitorování přidávat různé reagenty a sledovat buněčnou odpověď (Obr. 16, 17)



Obr. 16: xCELLigence RTCA

Zdroj: <https://www.aceabio.com/products/rtca-dp/> ze dne 12. 3. 2018



Obr. 17: Impedanční zlaté elektrody na E-destičkách

Zdroj: <https://www.aceabio.com/products/rtca-dp/> ze dne 12. 3. 2018

Vysvětlivky k obrázkům: A – Zjednodušené schéma interdigitovaných elektrod použitých v každé jamce E-destičky. B – Fotografie jedné jamky v 96 jamkové E-destičce. C – Zvětšený obraz jasných polí stínovaných elektrod a lidských buněk. D-zlaté elektrody a krystalovou violetí obarvené lidské buňky, jak jsou vidět v mikroskopu.

V rámci vlastního principu práce s xCelligence RTCA, jsme celé měření zahájili přípravou buněčné kultury. Pro měření byly opět zvoleny lidské fibroblasty linie MRC-5. V krátkosti, nejprve jsme si připravili kultivační médium pro fibroblasty. Poté jsme fibroblasty rozmrazili a do kultivační lahve 25 cm² jsme napipetovali 10 ml přehřátého kultivačního média ke kterému jsme přidali buněčnou suspenzi fibroblastů o koncentraci 1 x 10⁶ buněk/10 ml. Takto připravenou suspenzi jsme nechali inkubovat při 37 °C, 5% CO₂ do vytvoření monovrstvy, jejichž existenci jsme ověřili inverzním světelným mikroskopem.

Po nárůstu kultivační lahve 25 cm² do monovrstvy jsme si připravili další materiál pro Xcelligence RTCA analýzu. Pracovali jsme s 96 jamkovou destičkou se zlatými elektrodami, specificky vytvořenou pro tuto metodu. Do této destičky jsme napipetovali přehřáté kultivační médium na 37 °C o objemu 150 µl na jamku. Destičku jsme nejprve nechali inkubovat při 37 °C bez přítomnosti buněk. Na přístroji xCelligence RTCA jsme nejprve změřili pozadí pro vlastní měření vzorků pomocí destičky, která obsahovala pouze kultivační médium. Po proměření pozadí jsme veškeré kultivační médium odsáli a do každé jamky přidali 7 000 buněk v celkovém objemu 150 µl přehřátého kultivačního média. Destičku jsme vložili do přístroje a monitorovali chování buněk až do vytvoření monovrstvy. Po vytvoření monovrstvy jsme buňky ozařovali uzavřeným zářičem ⁶⁰Co ze vzdálenosti 50 cm od destičky (73 cm nastavení přístroje) o následujících dávkách uvedených v Tab. 16.

Tab. 16: Ozařování 96 jamkové destičky

	0,5 Gy	10 Gy	Kontrola
Vzdálenost [cm]	50 cm (73cm)	50 cm (73cm)	-
Čas [min a s]	19 s	6 min a 23 s	-

Po ozaření jsme velice opatrně odsáli kultivační médium tak, abychom nenarušili monovrstvu buněk. Pro vlastní in vitro infekci fibroblastů jsme použili vir HHV-5 VR1590. Výsledná koncentrace viru na jednotlivou jamku destičky byla navržena dle Obr. 18 v celkovém objemu 20 μ l, u kontrolních buněk jsme přidali 20 μ l předeřátého kultivačního média a nechali jsme 20 min pasivně difundovat.

		infikace buněk (ředění)											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
záření (Gy)	A		2	2			2	2					2
	B		4	4			4	4					4
	C		8	8			8	8					8
	D		16	16			16	16					16
	E		32	32			32	32					32
	F		64	64			64	64					64
	G		128	128			128	128					128
	H		256	256			256	256					256
		0,5	0,5	0,5	10	10	10	kontrola					0

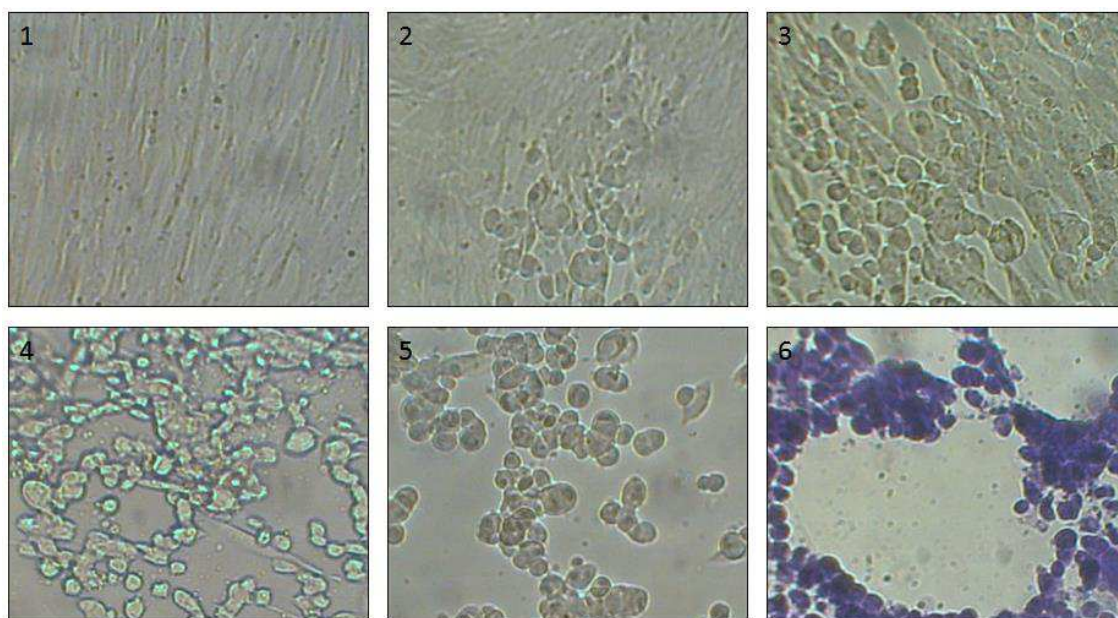
Obr. 18: Schéma pro ozaření 96 jamkové destičky

Následně jsme přidali předeřáté kultivační médium do celkového objemu 150 μ l/jamka a připojili jsme destičku k přístroji. Měření impedance bylo prováděno automaticky každých 15sec. po námi zvolenou dobu. Výsledky jsme zpracovali pomocí softwaru RTCA 1.2 (ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA).

4 VÝSLEDKY

4.1 Infekce buněčné linie fibroblastů

V rámci diplomové práce jsme pro studium vztahu infekce CMV k imunosuprimovanému hostiteli využili lidské fibroblasty buněčné linie MRC-5. Fibroblasty byly kultivovány v kultivačním médiu s přidavkem FBS a L- glutaminu. Pro účely práce jsme pracovali s fibroblasty, které jsme pasážovali. Pro vlastní experimenty jsme použili fibroblasty s konfluencí min. 90 %, což jsme si ověřili pomocí světelného mikroskopu (viz Obr. 19, část 1).

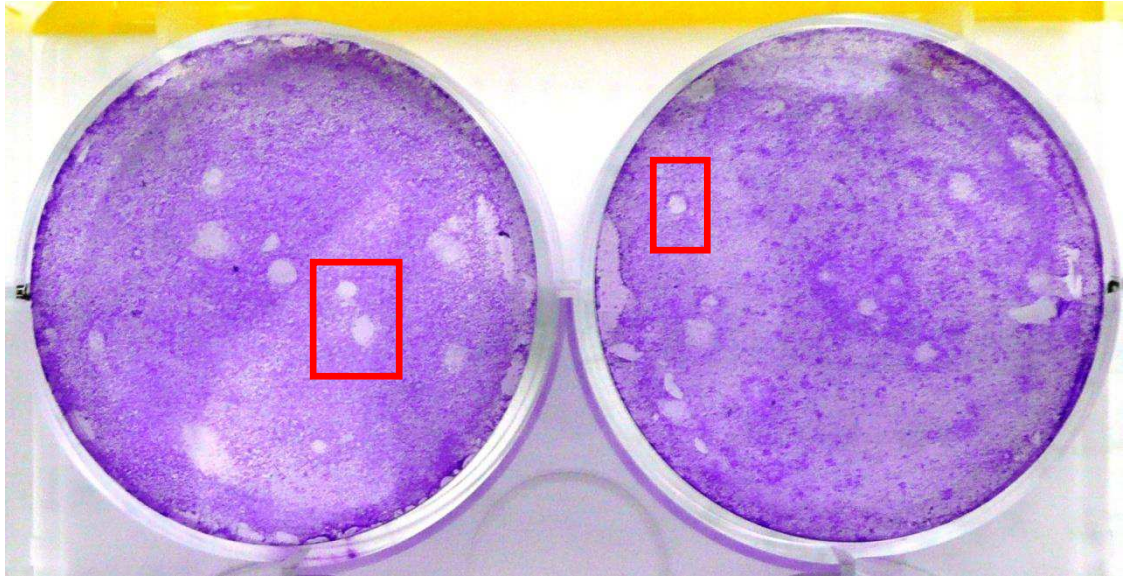


Obr. 19: Infekce fibroblastů MRC-5 v čase, zvětšení 500x.

Fibroblasty jsme tedy kultivovali v CO₂ inkubátoru při teplotě 37 °C do vytvoření monovrstvy (konfluencí nad 90 %). Následně jsme takto narostlé fibroblasty infikovali lidským cytomegalovirem ATCC® VR1590™. Na Obr. 19 lze pozorovat infekci buněk v čase. Na snímku č. 1 je vidět neporušená monovrstva plicních fibroblastů v čase 0. Na snímcích 2 – 5 pozorujeme průběh infekce v čase (tvořící se lytickou fází fibroblastů jsme pozorovali v průběhu 3 – 5 dní v závislosti na množství přidaného viru). Na snímku č. 5 je již zcela vytvořený plak. Snímek č. 6 je obarven krystalovou violetí.

Po přidavku suspenze obsahující virové částice k buněčné linii fibroblastů jsme byli schopni vidět, za několik hodin, v buněčné vrstvě kulaté otvory o průměru jen několika málo milimetrů, které označujeme podle jejich objevitele d'Herellea jako plaky, které studovat při infekci bakterií bakteriofágy (D'Herelle, 1917). Plak je místo, které vznikne tam, kde jsou buňky usmrceny virovou infekcí. Infekce vzniká od jedné virové částice. Po rozpadu dané buňky nové virové částice napadnou další okolní buňky fibroblastů. Po několika hodinách fibroblasty vyčerpají živné médium a jejich růst se zpomalí a ustane tak i produkce nových virových částic. Díky procesu buněčného množení lze tedy pouhým okem vidět, kde se na začátku pokusu usadila virová částice (viz Obr. 20). Tato jednoduchá biologická metoda je nesmírně citlivá a velice účinná pro zjišťování virů. Chemicky nelze tak malé množství hmoty, jako je virová částice, vůbec prokázat. Elektronový mikroskop je schopen zobrazit jednu virovou částici, ale při zpracování výchozího materiálu musíme vyjít z několika miliónů virových částic. Plakovou metodou lze pak najít příslušný virus, pokud vytvoří své potomstvo v živném médiu prostřednictvím hostitelských buněk. Nicméně důsledkem virové infekce však nemusí být v každém případě usmrcení a rozpad hostitelské buňky. Může dojít k tomu, že se vir po vniknutí do hostitelské buňky nijak neprojevuje a hostitelská buňka žije zdánlivě zdravě dále. Dochází tak k tvorbě latentní infekce. Dceřiné buňky vzniklé z takto napadené hostitelské buňky se pak rozpadnou a uvolní stovky virových částic.

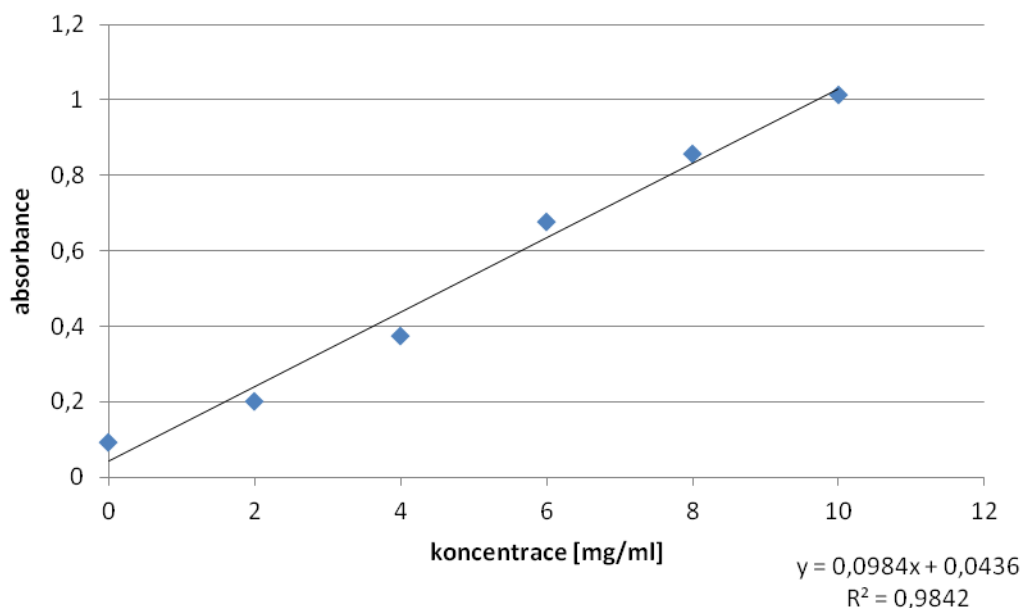
Plaková metoda se tedy používá v mikrobiologii ke stanovení počtu virových (fágových) částic, které jsou schopny tvořit plaky. Jeden plak je odvozen od jedné infekční částice. Lze tedy dále stanovit jednotky tvořící plak označené jako plaque-forming units (pfu). Plaková assay na Obr. 20 je viditelná tedy pouhým okem. Na tomto obrázku je vidět plaková assay plicních fibroblastů MRC-5, která byla kultivována 14 dní po infekci virem HCMV ATCC-VR 1590. Vir způsobil lýzu buněk, která je viditelná ve formě plaku, a množství viru lze tedy vyjádřit v jednotkách pfu. Provedli jsme několik experimentů infekce, Obr. 20 je reprezentativním obrázkem tvorbu plaků u vybraného experimentu s odečtenou hodnotou $1,8 \times 10^6$ pfu.



Obr. 20: Plaková assay na buněčné linii MRC-5 po infekci HCMV ATCC-VR 1590

4.2 Stanovení celkové bílkoviny

Pro potřeby v rámci dalších experimentů jsme buněčnou linii po ovlivnění lyzovali lyzačním roztokem. Ke studiu vybraných signálních molekul v rámci imunoblotu či Pathscan metodiky jsme zjistili množství celkové bílkoviny v jednotlivých vzorcích. Celkovou bílkovinu v námi připravených vzorcích jsme stanovovali bicinchoninovou metodou. Používali jsme bicinchoninovou kyselinu a pentahydrát sulfátu měďnatého. Jako standard byl použit bovinní sérový albumin. Provedli jsme měření absorbance v jednotlivých vzorcích, z předem připravených standardních roztoků jsme stanovili kalibrační křivku (Obr. 21), s regresním koeficientem 0,9842.



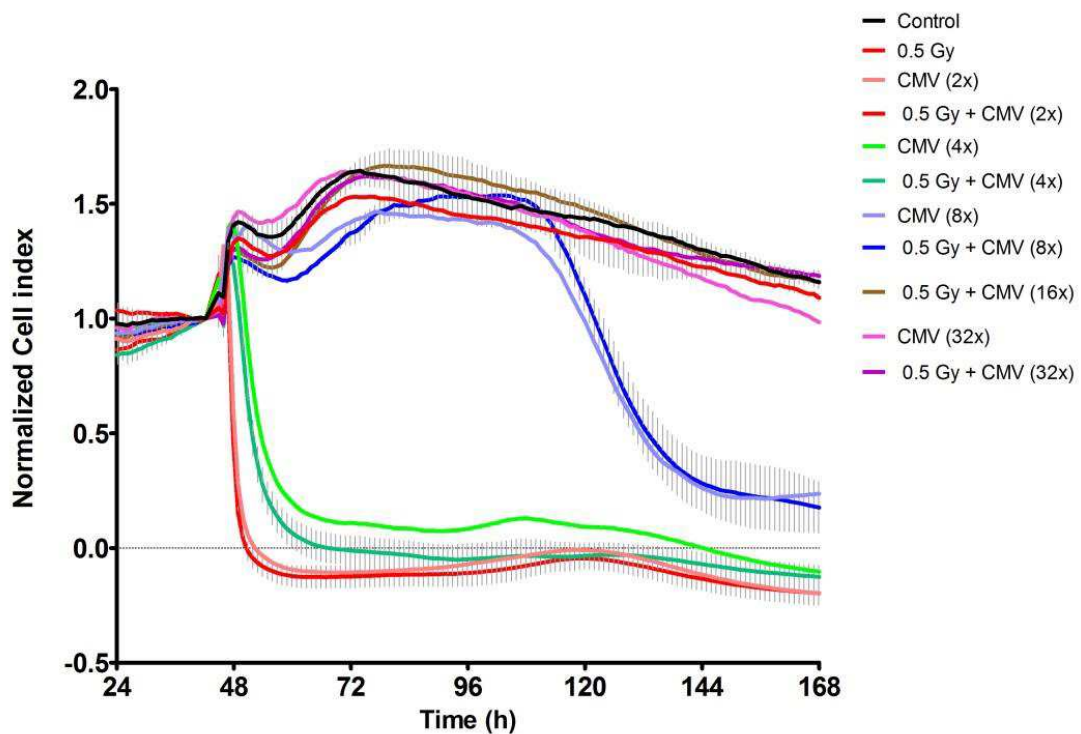
Obr. 21: Reprezentativní kalibrační křivka závislosti absorbance na koncentraci bílkovin v připravených vzorcích

4.3 xCELLigence RTCA analýza

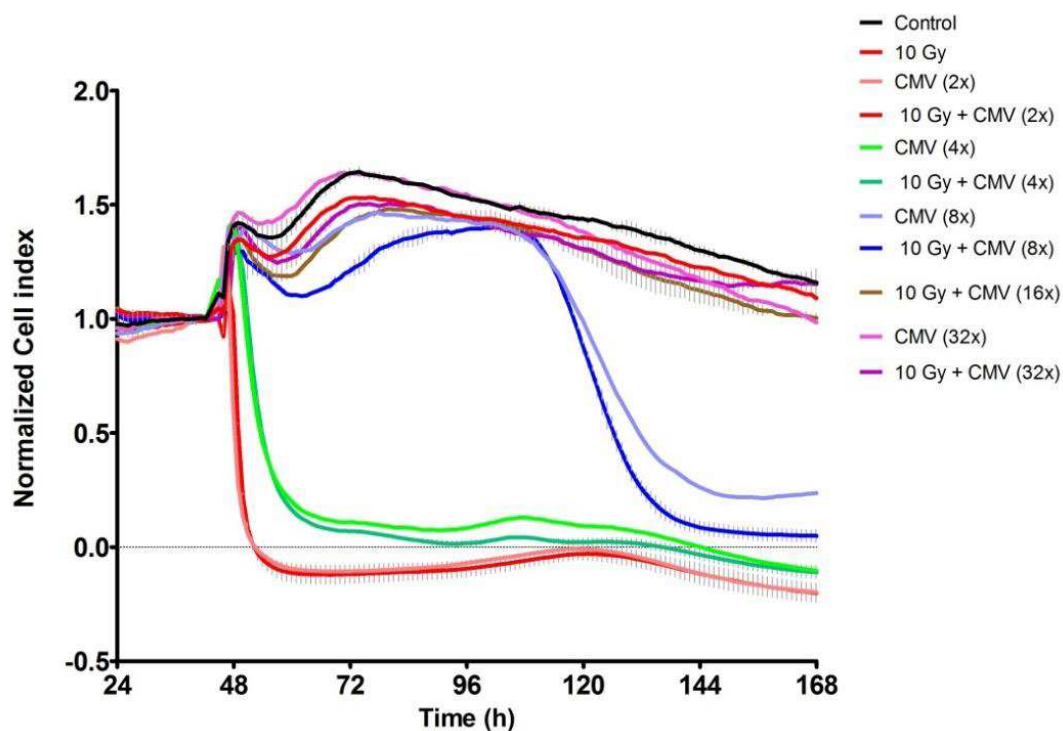
Pro studium dynamických buněčných procesů jsme zvolili systém xCelligence RTCA. Tímto zvoleným přístupem lze sledovat buněčné procesy v reálném čase a tím získat podstatně kvalitnější a užitečnější výsledky ve srovnání s klasickou end-point analýzou. Buněčné události lze touto metodikou monitorovat od samotného počátku experimentu a navíc se jedná o metodu neinvazivní, bez potřebného značení či barvení buněk. Metodu xCelligence RTCA jsme tedy zvolili pro nástin kontroly růstu hostitelských buněk a informace o buněčném růstu v průběhu ovlivnění (ozáření/infekce).

Na grafech závislosti buněčného indexu na čase (Obr. 22 a 23) jsme pozorovali postupný úhyn hostitelských buněk, které byly ozářeny zvolenými dávkami. Na Obr. 23 můžeme pozorovat postupný úhyn hostitelských buněk při jejich ovlivnění. V rámci diplomové práce jsme, pro tyto účely, zvolili dávku 0,5 Gy. Jak je z obrázku patrné, životnost hostitelských buněk byla do jisté míry ovlivněna množstvím virových částic, které byly použity pro infekci monovrstvy hostitelských buněk v 96 jamkové destičce.

Je patrné, že s klesající koncentrací virových částic v roztoku dochází k prodloužení doby do úhynu hostitelských buněk. Také lze vyhodnotit, že kombinace dávky záření 0,5 Gy a roztok obsahující 16x a 32x naředěnou virovou suspenzi (při $1,8 \times 10^6$ pfu/ml) vykazoval stejný průběh buněčného růstu jako kontrolní hostitelské buňky, které nebyly ovlivněny. Téměř totožného výsledku lze také pozorovat při použití dávky ionizujícího záření 10 Gy (Obr. 23).



Obr. 22: Graf závislosti normalizovaného buněčného indexu na čase. Hostitelské buňky byly ozářené dávkou 0,5 Gy ionizujícího záření ^{60}Co .

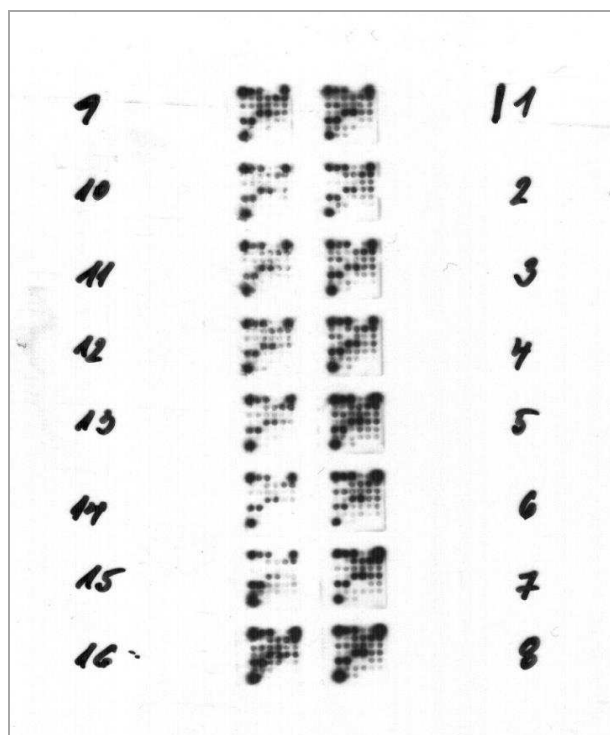


Obr. 23: Graf závislosti normalizovaného buněčného indexu na čase. Hostitelské buňky byly ozářené dávkou 10 Gy ionizujícího záření ^{60}Co .

4.4 Detekce signálních molekul - PathScan Intracellular kit

Intracelulární PathScan kit detekuje specifické množství vybraných buněčných bílkovin a signalizačních uzlů pouze pokud jsou v daném okamžiku fosforylovány. Pro vlastní provedení jsme používali optimální množství koncentrace bílkovin ve vzorku, která se měla pohybovat mezi 0,2 a 1 mg/ml.

S použitím PathScan intracelulárního kitu byly měřeny tyto signální molekuly: ERK1/2, Stat1, Stat3, Akt, AMPK α , ribozomální protein S6, mTOR, HSP27, Bad, p70 S6 kináza, PRAS40, p53, p38, SAPK/JNK, PARP a kaspáza 3. Výsledný PathScan na Obr. 24. Detailnější informace o rozmístění signálních molekul jsou uvedeny v Tab. 18 a také v rámci experimentální části diplomové práce.



Obr. 24: Reprezentativní smínek PathScan Intracellular získaný chemiluminiscenční metodou na film KODAK.

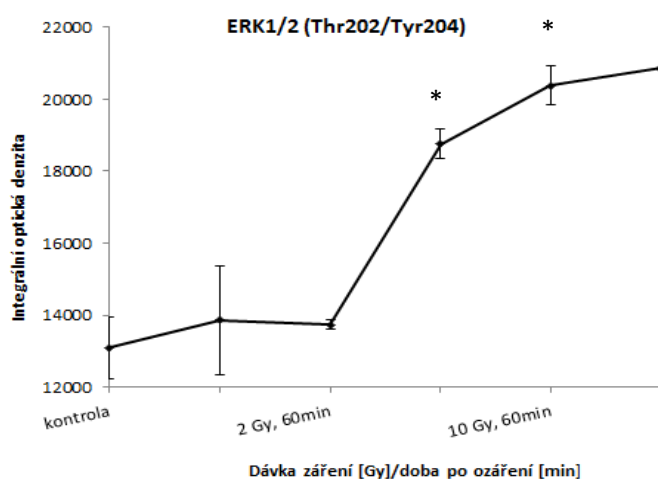
Pod jednotlivými čísly je zobrazeno pořadí námi připravených vzorků. Podrobnější analýza výsledků byla zpracována dále.

Pro vyhodnocení výsledků PathScan analýzy byla zvolena metoda pro získání dat v podobě jednotek integrální optické denzity jako míry regulace těchto molekul. Byl použit běžný software na zpracování obrazu. Na základě získaných výsledků z PathScan analýzy jsme pro další analýzu a data integrální optické denzity vybrali tři signální molekuly, které vykazovali patrnou změnu v expresi v rámci ovlivnění hostitelských buněk. Byla vybrána signální molekula ERK $\frac{1}{2}$, Stat1 a p53 protein. Na základě informací o hodnotách integrální optické denzity jsme zpracovali jednoduchý grafy vyjadřující závislost integrální optické denzity na typu ovlivnění hostitelských buněk (infekce v čase/dávka ionizujícího záření závislá na čase).

Tab. 17: Identifikace a pořadí vzorků použitých k analýze PathScan

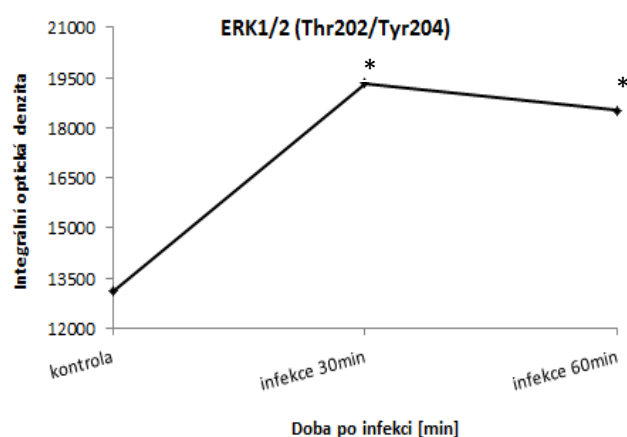
vzorek	záření	infekce	odběr
1	kontrola	NE	po ozáření
2	0,5 Gy	NE	po ozáření
3	2 Gy	NE	po ozáření
4	10 Gy	NE	po ozáření
5	20 Gy	NE	po ozáření
6	50 Gy	NE	po ozáření
7	80 Gy	NE	po ozáření
8	100 Gy	NE	po ozáření
9	kontrola	MOI-1	15 min po infekci
10	0,5 Gy	MOI-1	15 min po infekci
11	2 Gy	MOI-1	15 min po infekci
12	10 Gy	MOI-1	15 min po infekci
13	20 Gy	MOI-1	15 min po infekci
14	50 Gy	MOI-1	15 min po infekci
15	80 Gy	MOI-1	15 min po infekci
16	100 Gy	MOI-1	15 min po infekci

Fosforylovaná forma molekuly ERK1/2 (Thr202/Tyr204) byla významně up-regulována v závislosti na zvyšující se dávce záření, jak je patrné z Obr. 25.



Obr. 25: Graf závislosti signálu integrované optické hustoty na dávce záření u signální molekuly ERK 1/2 (Thr202/Tyr204)

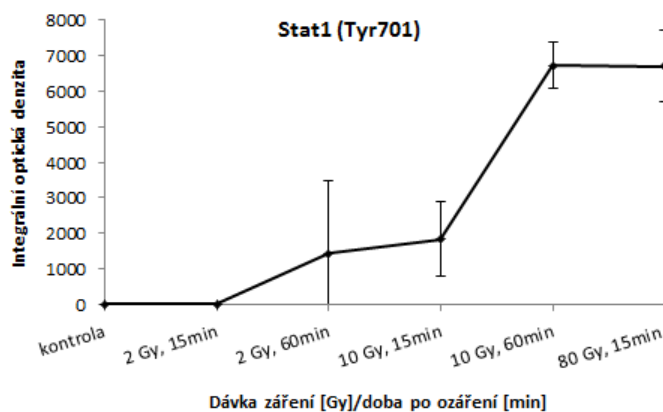
V případě infekce fibroblastů lidským cytomegalovirem vykazovala signální molekula ERK1/2 (Thr202/Tyr204) významný nárůst exprese v časné fázi po infekci hostitelských buněk (Obr. 26).



Obr. 26: Graf závislosti signálu integrální optické hustoty na čase po infekci u signální molekuly ERK1/2 (Thr202/Tyr204).

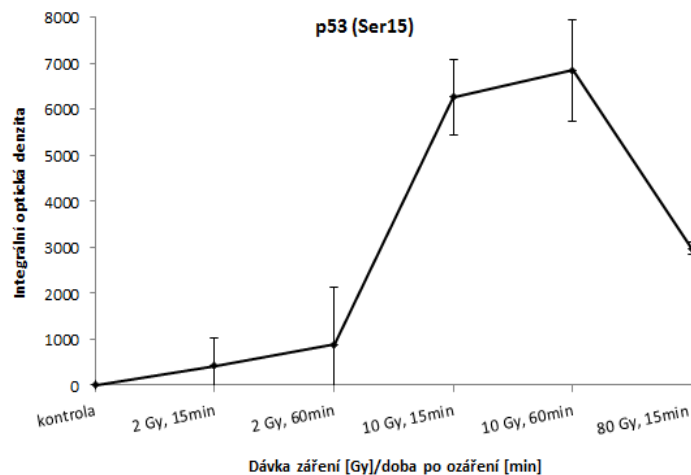
Další sledovanou signální molekulou byl Stat1 (Tyr701). Dle získaných výsledků signálu integrální optické hustoty byla pozorováno významné zvýšení exprese této signální molekuly především v závislosti na dávce ionizujícího záření, které bylo použito k získání modelu imunosuprimovaných buněk. Z Obr. 27 je patrné, že exprese Stat1 (Tyr701) vzrůstala v závislosti jednak na množství ionizujícího záření, ale také na čase, ve kterém byly hostitelské buňky lyzovány po ozáření. Lze pozorovat, že signál integrální optické hustoty při dávce 10 Gy a intervalu 15 min po lýze buněk, byl jen mírně zvýšen, v porovnání se signálem integrální optické hustoty při dávce 2 Gy a intervalu 60 min po lýze buněk. Z tohoto výsledku lze usuzovat, že hostitelské buňky reagovaly na použitou dávku záření 2 Gy zvýšenou expresí fosforylované formy Stat1. Proces reparace poškození v hostitelských buňkách byl víceméně započat až po 60 min od ozáření dávkou 2 Gy. Z výsledků dále vyplývá, že hostitelské buňky reagovaly téměř stejně, pokud pro ozáření byla použita dávka 10 Gy, avšak s ohledem na následný odběr buněk pro lýzu buněk. V tomto případě došlo k nárůstu fosforylované formy Stat1 (Tyr701) již 15 min po ozáření. K dalšímu nárůstu exprese fosforylované formy Stat1

došlo při použití ozáření o dávce 10 Gy, avšak odběr buněk proběhl až za 60 min od ozáření. Z tohoto výsledku lze usuzovat, že v hostitelských buňkách dále probíhal reparační mechanismus jako reakce po ozáření. Překvapivě v použití dávky ionizujícího záření 80 Gy, již exprese fosforylované formy Stat1 (Tyr701) nevykazovala významné zvýšení ve srovnání se signálem s použitím 2 Gy/60 min.



Obr. 27: Graf závislosti signálu integrované optické hustoty na čase po infekci u signální molekuly Stat1 (Tyr 701).

Třetí vybranou signální molekulou, která byla vybrána na základě výsledků z PathScan Intracellular analýzy byla fosforylovaná forma p53 proteinu. Tento protein jsme také vybrali na základě toho, že reguluje expresi mnohých genů, které mohou kontrolovat růst buněk, apoptózu, opravu DNA nebo stárnutí buněčných populací. Protein p53 vyhledává na DNA poškozená místa a pokud takové najde, spustí transkripci genu p21, který zastaví dělení buňky, dokud není poškozené místo reparováno. Pokud to nelze, buňka spustí apoptózu. Expresi signální molekuly p53 (Ser 15) byla up-regulována v závislosti na dávce záření a odběru hostitelských buněk k vlastní lýze (Obr. 28). Lze pozorovat významný nárůst exprese až při použití ozáření o dávce 10 Gy, nicméně již nelze pozorovat významný signifikantní rozdíl mezi časem odběru po této dávce ozáření. Na rozdíl od signálu fosforylované molekuly Stat1 vykazuje p53 protein významný pokles v expresi fosforylované formy při použití záření o dávce 80 Gy. V tomto případě lze usuzovat, že dělení hostitelských buněk bylo zastaveno směrem ke vznikající programované buněčné smrti.



Obr. 28: Graf závislosti signálu integrální optické denzity na čase po infekci u signální molekuly p53 (Ser15).

4.5 Detekce signálních molekul - PathScan RTK kit

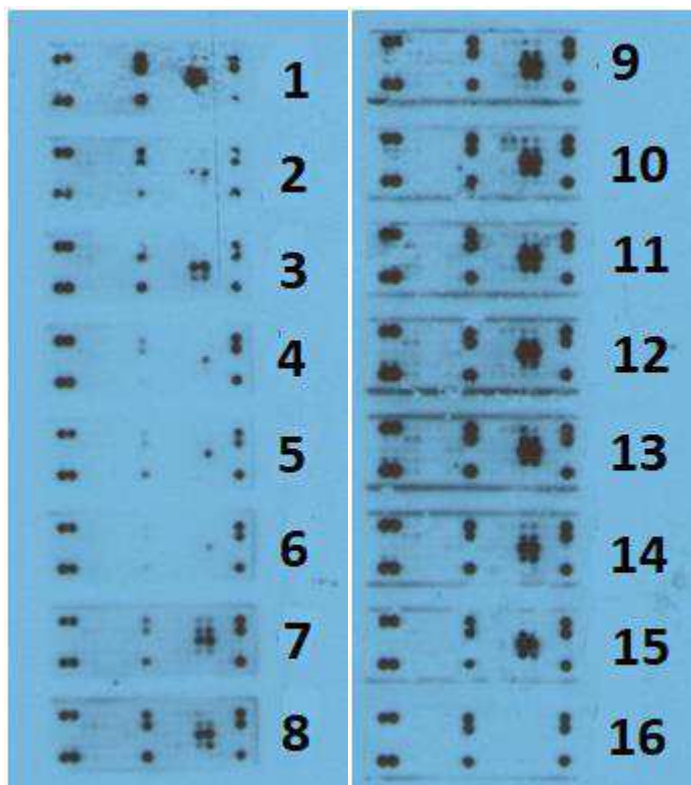
Tyrozinkinázy představují enzymy ze skupiny proteinkináz, které katalyzují přenos fosfátové skupiny (fosforylace) z nukleosidtrifosfátů na aminokyselinu tyrozin v proteinech. Přenos fosfátu na jeden či více aminokyselinových zbytků způsobí konformační změny ovlivňující funkci proteinu. Fosforylace je tedy nejčastější posttranslační modifikací proteinů a má důležitou funkci v regulaci mnoha buněčných signálních drah.

V rámci PathScan RTK kitu jsme testovali fosforylované formy membránově vázaných receptorových tyrosinkináz a dalších signálních uzlů jako např.: EGFR/ErbB1, HER2/ErbB2, HER3/ErbB3, FGFR1, FGFR3, FGFR4, InsR, IGF-IR, TrkA/NTRK1, TrkB/NTRK2, Met/HGFR, Ron/MST1R, Ret, ALK, PDGFR, c-Kit/SCFR, FLT3/Fik2, M-CSFR/CSF-1R, EphA1, EphA3, EphB1, EphB3, EphB4, Tyro3/Dtk, Axi, Tie2/TEK, VEGFR2/KDR, Akt/PJB/Rac, p44/42 MAPK (ERK1/2), ribozomální protein S6, c-Abl, IRS-1, Zap-70, Src, Lck, Stat1, Stat3.

K vybraným molekulám tohoto kitu, signální molekula ERK 1/2 (p44/42) byla up-regulována v závislosti na zvyšující se dávce záření. V případě kombinace infekce

a záření byla viditelná mírná up-regulace pouze v časných fázích po infekci. Molekuly Stat1 a Stat3 byly exprimovány až při kombinaci záření a infekce, u samotného záření nebyla pozorována žádná aktivita. Podle hodnoty integrální optické denzity nelze s jistotou určit jaký je vztah mezi mírou záření a infekcí. U signálního uzlu Akt/Pkb/Rac je výrazně vyšší exprese v případě kombinace záření a infekce a je zde viditelná up-regulace v závislosti na zvyšující se dávce záření, v modelu, kdy byly hostitelské fibroblasty nejdříve ozařovány a následně byla provedena infekce. Samotné záření vyvolává minimální odezvu. V případě samotné infekce je exprese výrazně vyšší než u samotného záření.

Přesné rozmístění molekul na sklíčku je uvedeno na Obr. 29. Detailnější informace o rozmístění signálních molekul jsou uvedeny v Tab. 19 a také v rámci experimentální části diplomové práce.



Obr. 29: Reprezentativní smínek PathScan RTK analýzy získaný chemiluminiscenční metodou na film KODAK. Pod jednotlivými čísly je zobrazeno pořadí námi připravených vzorků.

Výsledky z analýzy PathScan RTK jsme již dále nezpracovávali z časových důvodů. Na základě základní analýzy pouhým okem jsme následně analyzovali vybrané signální molekuly s použitím imunodetekce vybranými monoklonálními protilátkami zaměřenými proti vybraným signálním molekulám či signálním uzlům.

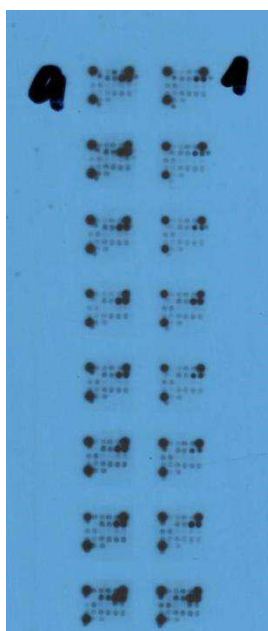
Tab. 18: Identifikace a pořadí vzorků použitých k analýze PathScan

vzorek	záření	infekce	odběr
1	kontrola	NE	po ozáření
2	0,5 Gy	NE	po ozáření
3	2 Gy	NE	po ozáření
4	10 Gy	NE	po ozáření
5	20 Gy	NE	po ozáření
6	50 Gy	NE	po ozáření
7	80 Gy	NE	po ozáření
8	100 Gy	NE	po ozáření
9	kontrola	MOI-1	15 min po infekci
10	0,5 Gy	MOI-1	15 min po infekci
11	2 Gy	MOI-1	15 min po infekci
12	10 Gy	MOI-1	15 min po infekci
13	20 Gy	MOI-1	15 min po infekci
14	50 Gy	MOI-1	15 min po infekci
15	80 Gy	MOI-1	15 min po infekci
16	100 Gy	MOI-1	15 min po infekci

4.6 PathScan Th1/Th2/Th17 Cytokinová analýza

Vnitřní prostředí organismu se udržuje v dynamické rovnováze (homeostáze), kterou zajišťují hormony. Ty působí systémově a propojují nervový a imunitní systém. Komunikaci jednotlivých buněk a synchronizaci jejich aktivit však zprostředkují cytokiny. A právě mezi nesporné účinky ionizujícího záření patří zvýšená produkce cytokinů jako obranná reakce hostitele na dávku ionizujícího záření. V rámci diplomové

práce jsme pro analýzu vybraných cytokinových drah použili PathScan Th1/Th2/Th17 cytokinový kit. V základní sadě jsme testovali následující intracelulární signální molekuly: IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 p70, IL-13, IL-17A, TNF- α , GM-CSF a IFN- γ . Výsledný PathScan reprezentativní smínek filmu po chemiluminiscenčním vyvolání je zobrazen na Obr. 29. Přesné rozmístění signálních molekul na sklíčku je obdobné jako u předchozích PathScan kitů (viz např. Tab. 19), v Obr. 30 není vyznačeno.

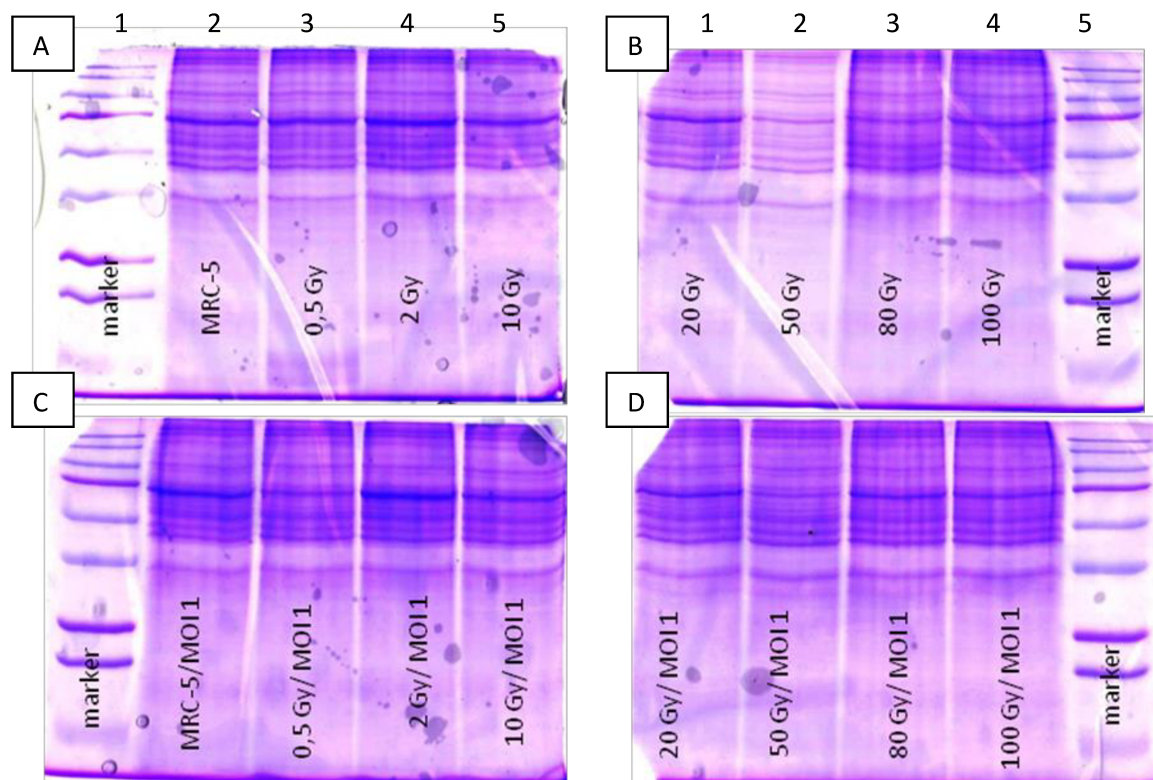


Obr. 30: Reprezentativní smínek PathScan cytokinové analýzy získaný chemiluminiscenční metodou na film KODAK.

Z výsledků PathScan cytokinové analýzy je patrné, že za podmínek, které byly použity k ovlivnění hostitelské buňky (ionizující záření/infekce), nedošlo k významnému zvýšení žádného z vybraných cytokinů. Důvodem pro tento výsledek je nejspíše fakt, že došlo k velmi časnému odběru/zpracování vzorků po ovlivnění a tedy buněčná imunita, zodpovědná za rozvoj cytokinové odpovědi, nebyla v době zpracování naplno rozvinutá a aktivní. Dalším zpracování výsledků z PathScan cytokinové analýzy jsme se dále nezabývali.

4.7 Imunodetekce vybraných signálních molekul

Z předběžných výsledků z PathScan analýzy jsme získali určitou představu, na základě které jsme se mohli v další analýze zaměřit na vybrané signální molekuly, které vykazovaly rozdílnou míru exprese v rámci vlivu ionizujícího záření/infekce na hostitelské buňky. K provedení imunodetekci jsme nejprve vzorky podrobily 1D SDS-PAGE elektroforéze. Reprezentativní gel, včetně tajenky s umístěním jednotlivých vzorků, je zobrazen na Obr. 31. Použitý marker molekulových hmotností je uveden na Obr. 32.



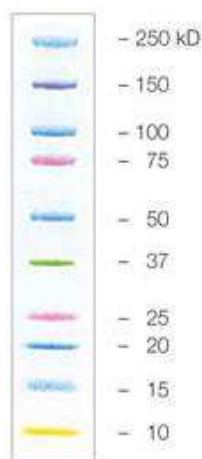
Obr. 31: Reprezentativní 1D SDS-PAGE gely. Ke zviditelnění výsledných spot (bandů) jsme použili rychlé modření.

(A) pozice 1 – marker molekulových hmotností, pozice 2 – kontrolní fibroblasty, pozice 3 -5 – ozářené fibroblasty příslušnou dávkou ionizujícího záření ^{60}Co .

(B) pozice 1 - 4 – ozářené fibroblasty příslušnou dávkou ionizujícího záření ^{60}Co , pozice 5 – marker molekulových hmotností.

(C) pozice 1 – marker molekulových hmotností, pozice 2 – fibroblasty infikované HCMV v dávce MOI 1, pozice 3 - 5 – infikované fibroblasty (MOI 1) a ozářené příslušnou dávkou ionizujícího záření ^{60}Co .

(D) pozice 1 - 4 – infikované fibroblasty (MOI 1) a ozářené příslušnou dávkou ionizujícího záření ^{60}Co , pozice 5 – marker molekulových hmotností.



Obr. 32: Použitý marker určující rozdělení proteinů na gelu dle molekulové hmotnosti.

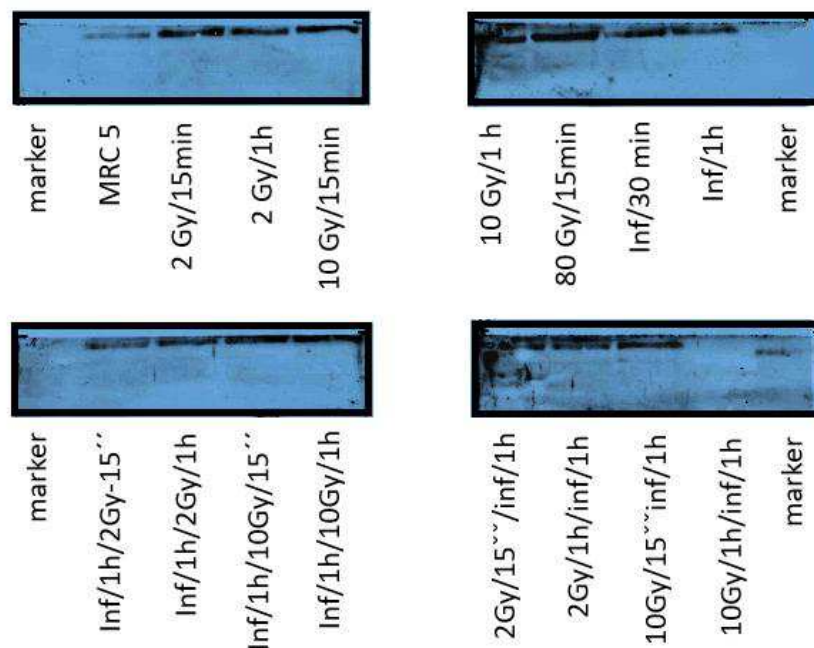
Na základě připravených 1D SDS-PAGE gelů jsme provedli přenos proteinů na PVDF membránu polosuchým přenosem Western blot. Vlastí provedení metody Western blot je uvedeno v metodické části této diplomové práce. Přenesené proteiny jsme následně podrobili imunodetekční analýze s použitím monoklonálních Ab namířených proti vybraných fosforylovaným signálním molekulám. V následující Tab. 20 je pro lepší orientaci v textu uveden seznam použitých monoklonálních Ab včetně jejich specifit. Výsledné imunoblotty, tedy reakce primárních monoklonálních Ab s vybranými proteiny, po reakci se sekundární Ab jsme detekovali chemiluminiscenční metodou. Výsledné reprezentativní snímky detekce jednotlivých vybraných fosforylovaných proteinů pomocí monoklonálních Ab jsou zobrazeny na Obr. 33 - 45.

Tab. 19: Seznam použitých monoklonálních Ab včetně jejich specifit.

Primární protilátka	Molekulová hmotnost / kDa	Sekundární protilátka	Inkubace WB membrán
Stat 3 (124H6) myší mAb	79, 86	Anti-myší	5% NSM, TBST 0,1%
Fosfo Stat 3	79, 86	Anti-králičí	5% BSA, TBST 0,1%
Kaspáza-9 (lidská specifická)	47	Anti-králičí	5% NSM, TBST 0,1%
Štěpená kaspáza 3 (Asp175)	17, 19	Anti-králičí	5% NSM, TBST 0,1%
Kaspáza-3 (8G10) králičí mAb	35	Anti-králičí	5% NSM, TBST 0,1%
p53 (7F5) králičí Ab	53	Anti-králičí	5% BSA, TBST 0,1%
Bad (D24A9) králičí mAb	23	Anti-králičí	5% BSA, TBST 0,1%
P44/42 MAPK (Erk1/2) (137F5) králičí mAb	42 (p42 MAPK), 44 (p44 MAPK)	Anti-králičí	5% BSA, TBST 0,1%
Fosfo-P44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)	42, 44	Anti-králičí	5% BSA, TBST 0,1%
Kaspáza-8 (1C12)	57	Anti-myší	5% BSA, TBST 0,1%
Štěpená kaspáza 8 p43/p41	43		
Štěpená kaspáza 8 p18	18		
Fosfo-ATM (Ser1981) (10H11.E12) myší Ab	350	Anti-myší	5% NSM, TBST 0,1%
Fosfo-AMPK α (Thr172) (40H9) králičí mAb	62	Anti-králičí	5% BSA, TBST 0,1%
NF-kappaB (L8F6) myší mAb	65	Anti-myší	5% BSA, TBST 0,1%

4.7.1 p38 protein

Protein p38 (Obr. 33) byl, v případě ozáření hostitelských buněk, exprimován v závislosti na dávce a času ozáření. Expres nefosforylované formy p38 byla vyšší u vzorků, které byly ozářeny a také infikovány, než u samotné infekce. Tento jev lze vysvětlit kombinací faktorů působící na hostitelskou buňku, nicméně tento ukazatel neupřesňuje děj, který v hostitelských buňkách probíhá (vhodnějším ukazatelem je právě fosforylovaná forma proteinu, což platí i pro další, takto analyzované, proteiny). Navíc, stejně jako u fosforylované formy proteinu p38, buňky, které byly ozářeny dávkou 100 Gy a infikovány, nevykazovaly žádnou míru exprese. Opět předpokládáme, že se jednalo o chybu např. ve zpracování vzorku. Nicméně výše zmíněný vzorek byl připraven, podle našeho mínění, správně, jelikož vykazuje jistou míru exprese dalších vybraných signálních molekul (viz dále).



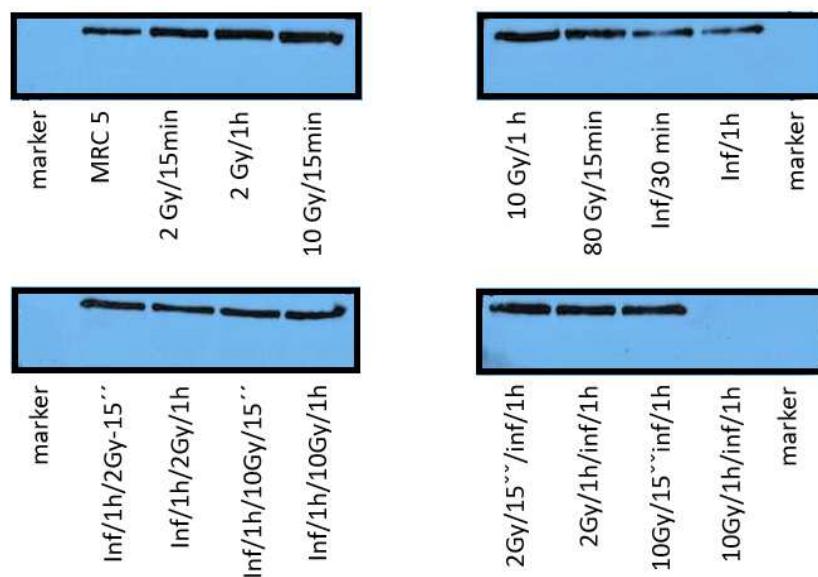
Obr. 33: Reprezentativní snímek imunodetekci s použitím monoklonální Ab namířené proti p38 proteinu.

Primární Ab: p38 MAPK Antibody (Ab, 43 kDa), Cell Signaling Technologies.

Sekundární Ab: polyklonální anti-králičí imunoglobuliny/HRP, DakoCytomation.

Reprezentativní výsledky blotů, provedené na 3 biologických replikátech, jako pozitivní kontrola byl použit beta-aktin.

Fosforylovaný protein p38 (Obr. 34) byl up-regulován v závislosti na zvyšující se dávce záření a na čase, kdy byly vzorky odebrány k následné analýze. Při kombinaci záření a infekce byl tento protein exprimován více než při samotné infekce. V případě ozáření dávkou 100 Gy v kombinaci s infekcí nebyl viditelný žádný band. Předpokládáme, že se jedná o chybu při zpracování.

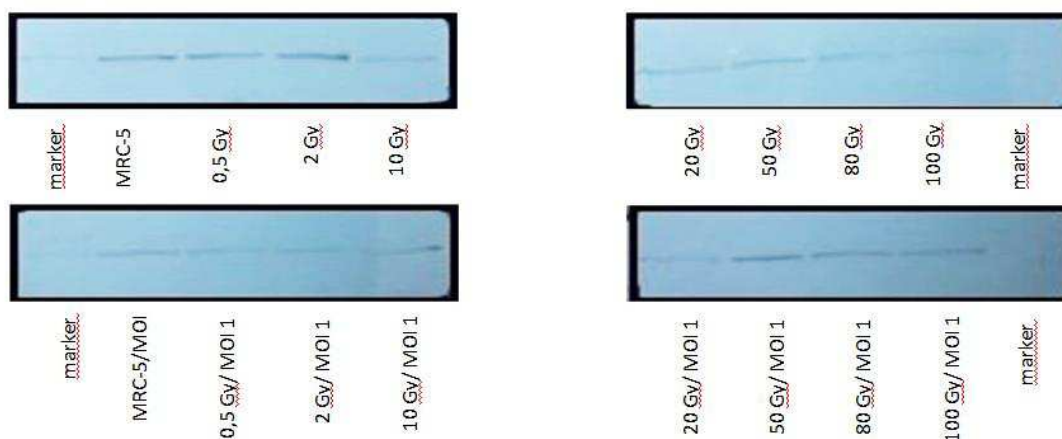


Obr. 34: Reprezentativní snímek imunodetekce s použitím monoklonální Ab namířené proti fosforylované formě proteinu p38.

Primární Ab: Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (12F8) králičí mAb (Ab, 43 kDa), Cell Signaling Technologies. Sekundární Ab: Sekundární Ab: polyklonální anti-králičí imunoglobuliny/HRP, DakoCytomation. Reprezentativní výsledky blotů, provedené na 3 biologických replikátech, jako pozitivní kontrola byl použit beta-aktin.

4.7.2 Stat3 protein

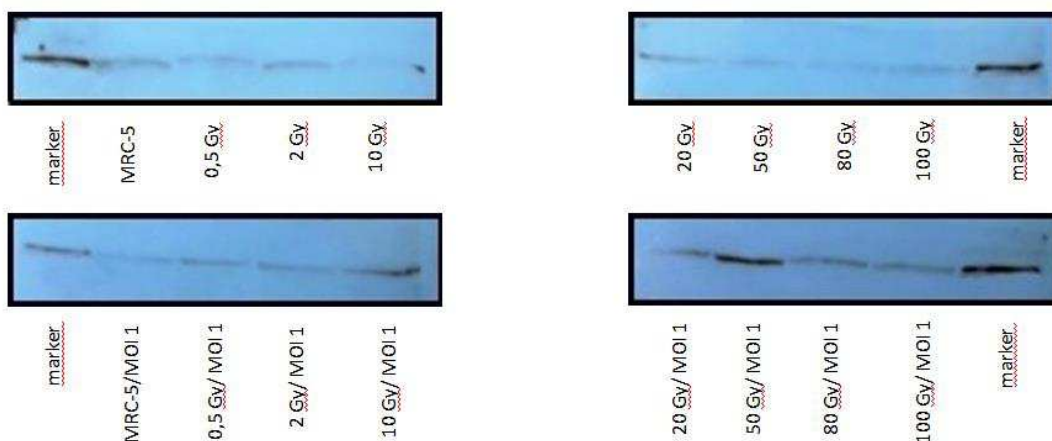
Signální molekula Stat3 (Obr. 35) vykazovala po ozáření stejnou míru exprese až do dávky ozáření 2 Gy, poté lze sledovat jistou míru down-regulace. Po infekci buněk dochází také k down-regulaci do dávky 10 Gy, od 20 do 50 Gy je viditelná zvýšená exprese, následně však opět dochází k mírné down-regulaci.



Obr. 35: Reprezentativní snímek imunodetekci s použitím monoklonální Ab namířené proti Stat3 protein.

Primární Ab: anti-Stat3 (124H6) protilátka (Ab, 79,86 kDa, myší), Cell Signaling Technologies. Sekundární Ab: polyklonální anti-králičí imunoglobuliny/HRP, DakoCytomation. Reprezentativní výsledky blotů, provedené na 3 biologických replikátech, jako pozitivní kontrola byl použit beta-aktin.

Fosforylovaná forma Stat3 proteinu (Obr. 36) po ozáření vykazovala nepřímo úměrnou expresi vůči zvyšující se dávce záření. U infikovaných/ozářených buněk je mírná up-regulace pozorovatelná do hodnoty 50 Gy, poté, při dávkách 80 a 100 Gy již dochází ke snížení exprese tohoto proteinu.

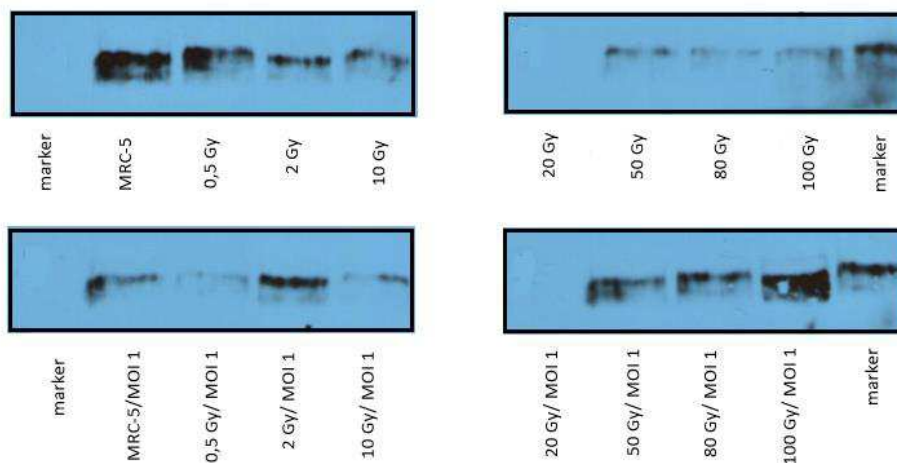


Obr. 36: Reprezentativní snímek imunodetekci s použitím monoklonální Ab namířené proti fosforylované formě proteinu Stat3

. Primární Ab: anti-Stat3 (Tyr705) protilátka (Ab, 79,86 kDa, králičí), Cell Signaling Technologies. Sekundární Ab: polyklonální anti-králičí imunoglobuliny/HRP, DakoCytomation. Reprezentativní výsledky blotů, provedené na 3 biologických replikátech, jako pozitivní kontrola byl použit beta-aktin.

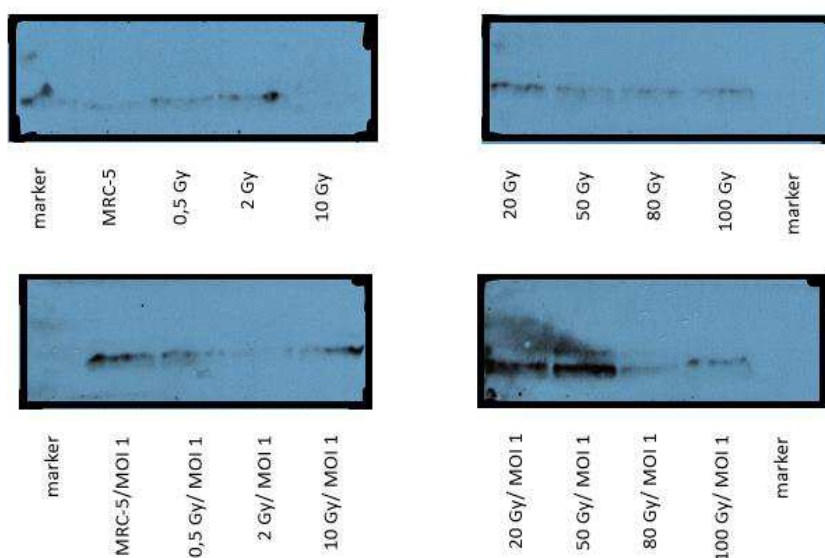
4.7.3 Bad protein

Protein Bad (Obr. 37) vykazoval snižující se míru exprese do hodnoty dávky ozáření 80 Gy. U infikovaných hostitelských buněk se jeho exprese naopak zvyšuje s rostoucí dávkou záření. Může to být zapříčiněno tím, že hostitelské buňky jsou ovlivněny infekcí natolik, že reagují na zvolené dávky ozáření, pokud výsledky srovnáváme s neinfikovanými hostitelskými buňkami.



Obr. 37: Reprezentativní snímek imunodetekci s použitím monoklonální Ab namířené proti Bad protein.

Primární Ab: anti – Bad (D24A9) protilátka (Ab, 23 kDa, králičí), Cell Signaling Technologies. Sekundární Ab: polyklonální anti-králičí imunoglobuliny/HRP, DakoCytomation. Reprezentativní výsledky blotů, provedené na 3 biologických replikátech, jako pozitivní kontrola byl použit beta-aktin



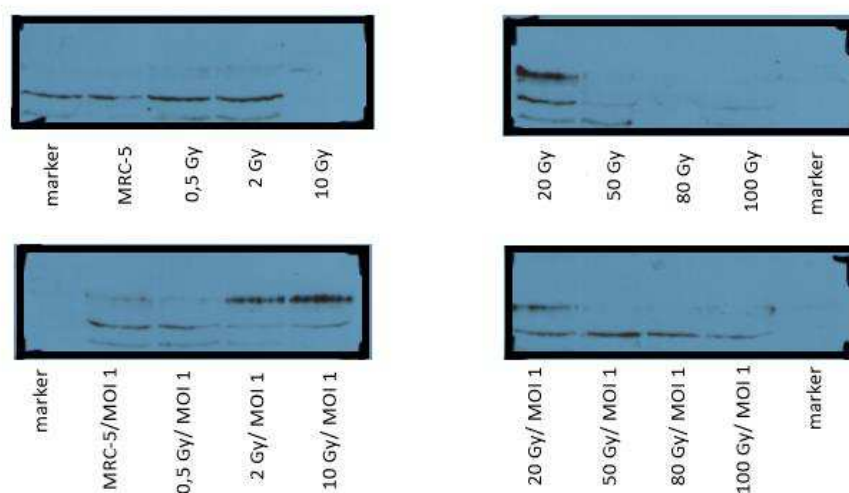
Obr. 38: Reprezentativní snímek imunodetekci s použitím monoklonální Ab namířené proti fosforylované formě Bad (Ser112).

Primární Ab: anti-Bad (Ser112) protilátka (Ab, 23 kDa, králičí). Sekundární Ab: polyklonální anti-králičí imunoglobuliny/HRP, DakoCytomation. Reprezentativní výsledky blotů, provedené na 3 biologických replikátech, jako pozitivní kontrola byl použit beta-aktin.

Fosforylovaná forma proteinu Bad (Obr. 38) byla viditelně upregulována při kombinaci infekce se zářením v dávce 20 a 50 Gy, poté se míra exprese opět snižovala.

4.7.4 p53 protein

Při hodnocení proteinu p53 (Obr. 39) se na membráně Western blotu opakovaně objevovaly nespecifické vazby, což mohlo být způsobeno nedostatečným promytím membrány. Při pouhém ozařování byl protein p53 up-regulován do dávky 20 Gy, následně došlo k nepřímě úměrnému snížení exprese se zvyšující se dávkou záření. U ozařených buněk jsme pozorovali zvyšující se expresi v závislosti na zvyšující se dávce záření.

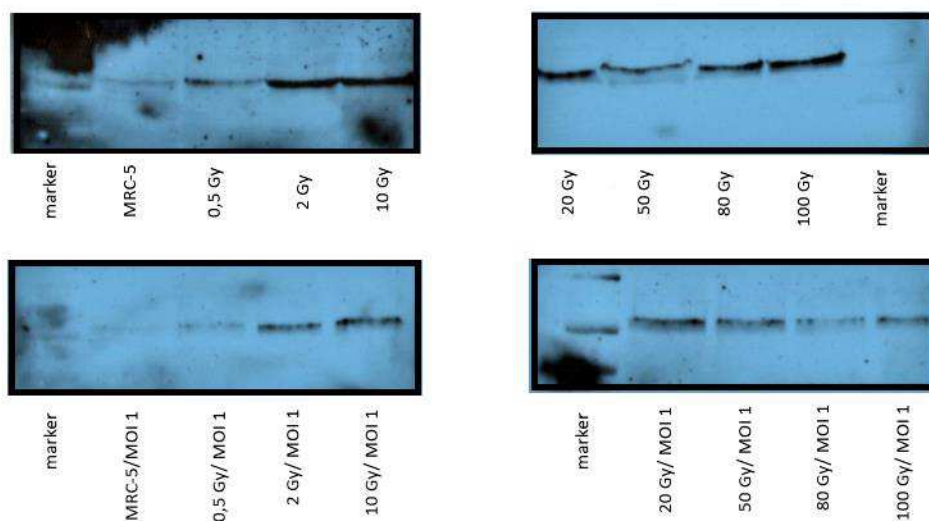


Obr. 39: Reprezentativní snímek imunodetekci s použitím monoklonální Ab namířené proti p53 proteinu (7F5).

Primární Ab: anti-p53 (7F5) protilátka (Ab, 53 kDa, králičí). Sekundární Ab: polyklonální anti-králičí imunoglobuliny/HRP, DakoCytomation. Reprezentativní

výsledky blotů, provedené na 3 biologických replikátech, jako pozitivní kontrola byl použit beta-aktin.

Fosforylovaná forma proteinu p53 (Obr. 40) byla up-regulován v závislosti na zvyšující se dávce záření. U infikovaných hostitelských buněk byla situace stejná až do dávky 50 Gy, poté se opět exprese snižovala s dávkou záření.

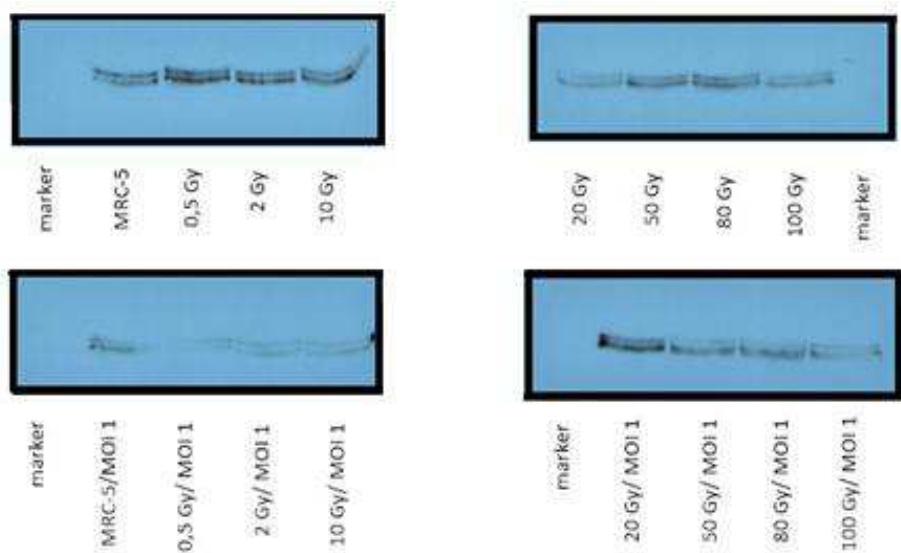


Obr. 40: Reprezentativní snímek imunodetekci s použitím monoklonální Ab namířené proti fosforylované formě p53 (Ser15).

Primární Ab: anti-p53 (Ser15) protilátka (Ab, 53 kDa, králičí). Sekundární Ab: polyklonální anti-králičí imunoglobuliny/HRP, DakoCytomation. Reprezentativní výsledky blotů, provedené na 3 biologických replikátech, jako pozitivní kontrola byl použit beta-aktin.

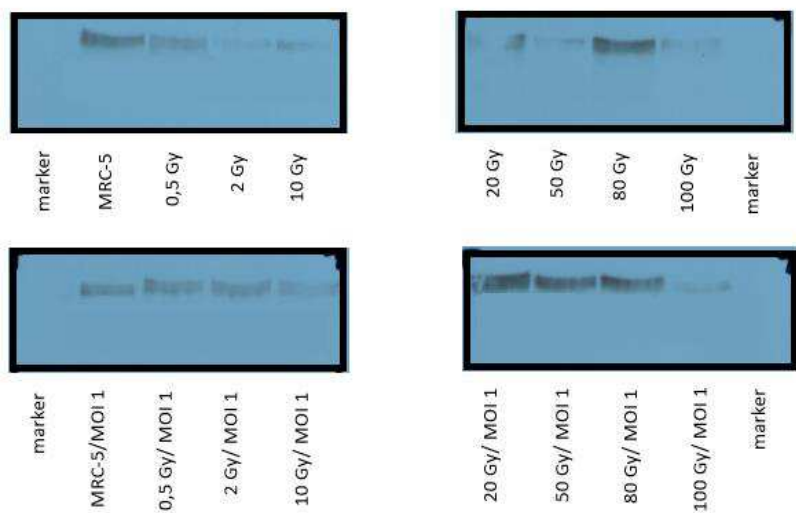
4.7.5 p53 protein

Protein p 44/42 (Obr. 41) byl po záření mírně up-regulován do záření 10 Gy. Hodnota záření 20 Gy způsobila značnou down-regulaci a při vyšších dávkách záření došlo opět ke zvýšení exprese. U infikovaných buněk byl trend down-regulace do hodnoty 10 Gy, při ozáření 20 Gy došlo k výrazně expresi a při vyšších dávkách záření byl protein opět down-regulován.



Obr. 41: Reprezentativní snímek imunodetekci s použitím monoklonální Ab namířené proti p 44/42 MAPK (Erk1/2) (137F5).

Primární Ab: anti-p 44/42 (137F5) protilátka (Ab, 42, 44 kDa, králičí). Sekundární Ab: polyklonální anti-králičí imunoglobuliny/HRP, DakoCytomation. Reprezentativní výsledky blotů, provedené na 3 biologických replikátech, jako pozitivní kontrola byl použit beta-aktin.



Obr. 42: : Reprezentativní snímek imunodetekci s použitím monoklonální Ab namířené proti fosforylované formě p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204).

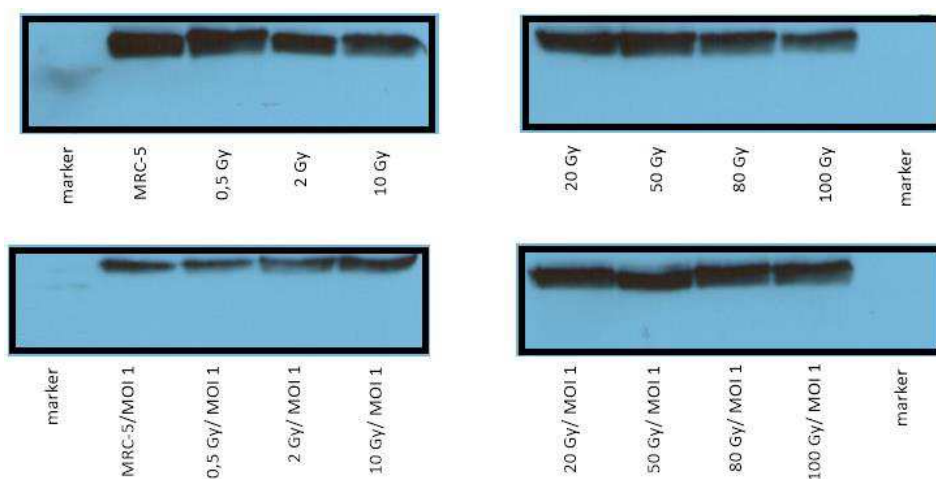
Primární Ab: anti – p44/42 (Thr202/Tyr204) (Ab, 42, 44 kDa, králičí). Sekundární Ab: polyklonální anti-králičí imunoglobuliny/HRP, DakoCytomation. Reprezentativní výsledky blotů, provedené na 3 biologických replikátech, jako pozitivní kontrola byl použit beta-aktin.

Fosforylovaný protein p 44/42 (Obr. 42) byl down-regulován do 50 Gy, u hodnoty 80 Gy je výrazná up-regulace. V případě infikovaných hostitelských buněk je dochází ke zvýšené expresi v závislosti na zvyšující se dávce záření do hodnoty 80 Gy.

4.7.6 Kaspáza 3, kaspáza 8 a kaspáza 9

Pro další imunodetekci jsme vybrali také hlavní zástupce kaspáz účastnících se regulace buněčného cyklu. V rámci diplomové práce jsme provedli imunodetekci následujících kaspáz: kaspáza 3, kaspáza 8 a kaspáza 9. Z časového důvodu jsme nebyli již schopni detekovat fosforylované formy těchto kaspáz, nicméně v rámci návazné práce bude v budoucnu popracováno.

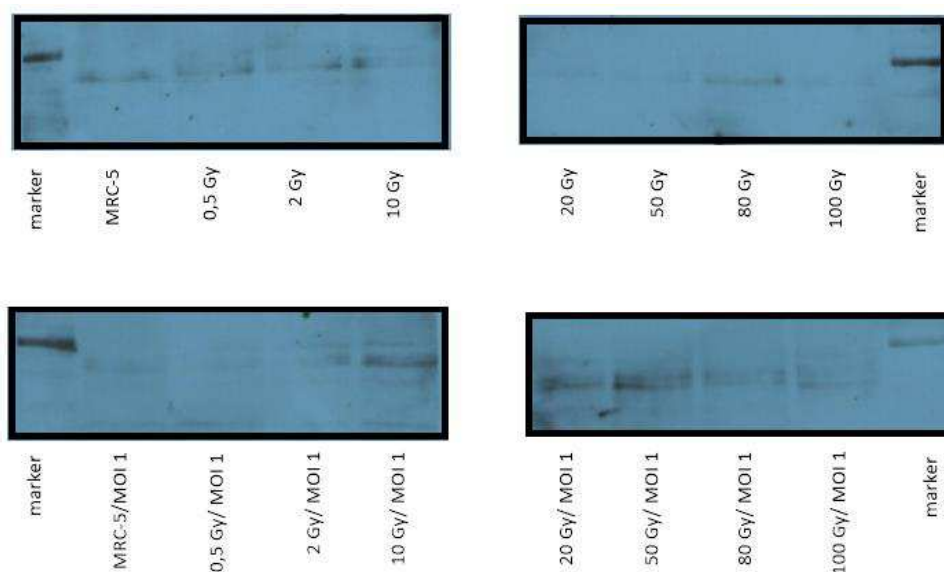
Kaspáza 3 (Obr. 43) vykazovala přibližně stejně velkou expresi u vzorků, které byly ozářené, nezávisle na dávce ozáření. Vzorky s kombinací infekce a záření vykazovaly mírně zvýšenou expresi tohoto proteinu v závislosti na zvyšující se dávce záření.



Obr. 43: Reprezentativní snímek imunodetekce s použitím monoklonální Ab namířené proti kaspáze 3 (8G10).

Primární Ab: anti-Caspase 3 protilátka (Ab, 17, 19,35 kDa, králičí IgG). Sekundární Ab: polyklonální anti-králičí imunoglobuliny/HRP, DakoCytomation. Reprezentativní výsledky blotů, provedené na 3 biologických replikátech, jako pozitivní kontrola byl použit beta-aktin.

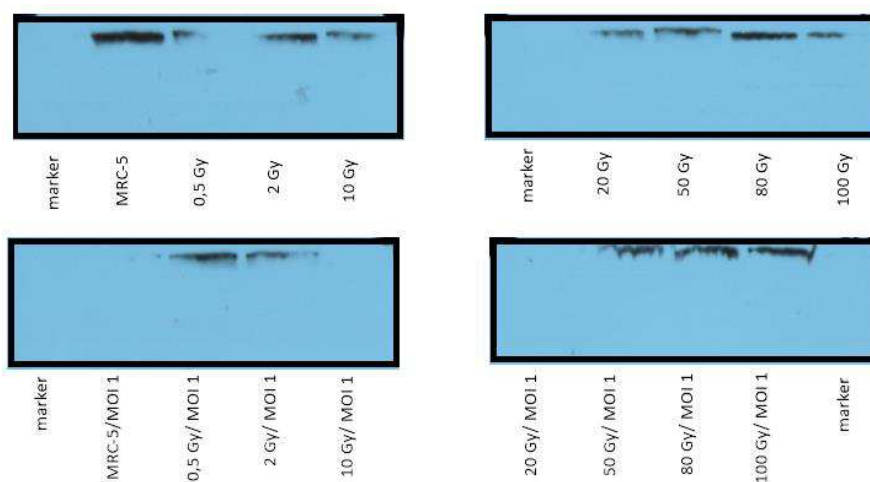
Kaspáza 8 (Obr. 44) byla exprimována včetně objevení nespecifických vazeb v rámci imunodetekce. Nelze určit, zda došlo ke snížení či zvýšení míry exprese tohoto proteinu.



Obr. 44: Reprezentativní snímek imunodetekci s použitím monoklonální Ab namířené proti kaspáze 8 (1C12).

Primární Ab: anti-Caspase-8 protilátka (Ab, 18, 43, 57 kDa, myší IgG1). Sekundární Ab: polyklonální anti-králičí imunoglobuliny/HRP, DakoCytomation. Reprezentativní výsledky blotů, provedené na 3 biologických replikátech, jako pozitivní kontrola byl použit beta-aktin.

Při hodnocení výsledků imunodetekce kaspázy 9 (Obr. 45) byly opakovaně proteiny při elektroforéze špatně odděleny. Nelze proto míru exprese správně vyhodnotit.



Obr. 45: Reprezentativní snímek imunodetekci s použitím monoklonální Ab namířené proti kaspáze 9.

Primární Ab: anti-Caspase-9 protilátka (Ab, 35, 37, 47 kDa, králičí). Sekundární Ab: polyklonální anti-králičí imunoglobuliny/HRP, DakoCytomation. Reprezentativní výsledky blotů, provedené na 3 biologických replikátech, jako pozitivní kontrola byl použit beta-aktin.

5 DISKUZE

Tématem této diplomové práce bylo studium cytomegalovirové infekce kmenem HCMV a její vztah k imunosupresi. Lidský cytomegalovirus (HCMV) patří do čeledi Herpesviridae (β -herpesvirus, HHV-5). Tato čeleď virů během koevoluce s hostiteli získala schopnost modulovat imunitní odpověď hostitelů a vytvářet tak latentní stav, který je, v případě oslabení hostitele, reaktivován a vyvolá infekci. Po primární infekci imunokompetentních jedinců zůstává virus v těle hostitele stále přítomný, bez klinických projevů, ty se objeví až při oslabení imunity jedince následkem stresu, imunosupresí či vlivem ionizujícího záření (radioterapie). Pro profylaxi této infekce je vyvíjena řada vakcín založených na různých principech, žádná z nich však zatím není plně efektivní a bezpečná.

Z tohoto důvodu jsme se zaměřili na studium a pochopení průběhu vzájemné interakce HCMV a hostitelské buňky *in vitro* a analýzy mezibuněčných signálů, které souvisí s HCMV infekcí u imunosuprimovaných jedinců. Pracovali jsme s metodou PathScan (Cell Signaling Technology), díky které jsme získali velké množství výsledků o expresi důležitých signálních molekul. Tyto výsledky jsme následně ověřovali pomocí metody Western blot, kde jsme se zaměřili na expresi konkrétních signálních molekul. V rámci diplomové práce jsme si osvojili základní laboratorní techniky, včetně práce s virovými izoláty a buněčnými kulturami. V laboratoři jsme zavedli metodiku *in vitro* infekce lidským cytomegalovirem kmene VR-1590. Tento cíl práce byl tudíž splněn.

K zajištění imunosuprese u hostitelských fibroblastů linie MRC-5 jsme využívali ionizující záření. Ionizující záření způsobuje ionizaci atomu nebo molekuly, přičemž tyto změny se v organismu projeví porušením důležitých biochemických procesů např. fosforylace. Pomocí enzymové imunoanalýzy byla sledována celá řada fosforylovaných buněčných proteinů a signálních uzlů podílejících se na buněčné odpovědi na poškození DNA a rozvoji apoptózy.

Během měření jsme pozorovali, že protein p38, i jeho fosforylovaná forma, nevykazovaly v případě kombinace infekce a záření o dávce 100 Gy žádnou expresi na PVDF membráně, v případě fosforylované p42/44 došlo v případě infekce a záření k výrazně nižší expresi než byla u záření 80 Gy. Tento jev mohl znamenat, že buňky již nebyly živé, protože z literatury víme, že plicní fibroblasty linie MRC-5 jsou značně

radiorezistentní a jsou schopné tolerovat záření do hodnoty 80 Gy (Bluwstein a kol. 2013).

Cílem této práce bylo nicméně také seznámit se s metodou PathScan Array, která doposud nebyla v laboratoři, kde byla realizována diplomová práce, zavedena. Při prvním vyhodnocování výsledků z PathScan metody jsme zjistili, že původní model přípravy vzorků je složitý pro vyhodnocování, proto jsme přípravu vzorků optimalizovali na jednodušší schéma. Ověření výsledků metody PathScan jsme provedli metodou jednorozměrné elektroforézy, následovanou Western blotem a imunodetekcí s použitím vhodných monoklonálních protilátek.

Sledováním exprese vybraných signálních molekul (p53, fosfo-p53, Caspase-3, Bad, fosfo-Bad, ERK1/2, p38) jsme zaznamenali, že infikované hostitelské buňky ovlivněné ionizujícím zářením pravděpodobně zanikají cestou apoptózy, jelikož proapoptické markery vykazovali zvýšenou expresi s rostoucí dávkou záření (Tab. 21).

Tab. 20: Souhrn výsledků exprese vybraných signálních molekul

Signální molekula	Apoptóza	Záření	Záření + infekce
Kaspáza 3	pro-	stejná exprese	zvýšená exprese
Kaspáza 8	pro-	nelze určit	nelze určit
Kaspáza 9	pro-	nelze určit	zvýšená exprese
Stat 3	anti-	snížená exprese	zvýšená exprese do 50 Gy
fosfo-Stat 3	anti-	snížená exprese	
p53	pro-	snížená exprese	zvýšená exprese
fosfo-p53	pro-	zvýšená exprese	mírně zvýšená exprese do 50 Gy
Bad	pro-	snížená exprese	zvýšená exprese
fosfo-Bad	pro-	snížená exprese	zvýšená exprese do 50 Gy
p44/42	pro-	zvýšená exprese	zvýšená exprese
fosfo p44/42	pro-	zvýšená exprese	zvýšená exprese
fosfo-ATM	pro-	nelze určit	nelze určit (výsledky nepubl.)
fosfo-AMPK α		zvýšená exprese	snížená exprese (výsledky nepubl.)
NF- κ B	pro-	nelze určit	nelze určit (výsledky nepubl.)
p38	pro-	zvýšená exprese	zvýšená exprese
fosfo-p38	pro-	zvýšená exprese	zvýšená exprese
Stat 1	anti-	nelze určit	nelze určit
fosfo-Stat 1	anti-	zvýšená exprese	snížená exprese

Vlastní růst hostitelských buněk a jejich zánik jsme ověřovali v reálném čase metodou xCelligence RTCA, nicméně jsme zatím nestihli získat dostatečný počet výsledků pro různé dávky záření. Po získání dalších výsledků budeme schopni lépe vyhodnotit expresi vybraných signálních molekul z PVDF membrán vyloučením případných odumřelých/mrtvých hostitelských buněk.

Většina studií se zaměřuje v rámci infekce HCMV na konkrétní signální kaskádu a její změny např. zablokováním konkrétního genu. My jsme chtěli získat komplexnější pohled na to, které signální molekuly byly exprimovány a jaký je rozdíl v jejich expresi při samotném záření a v kombinaci záření a infekce.

Proteinkináza Akt hraje rozhodující roli při kontrole přežití buněk a apoptózy. Tato proteinkináza je aktivována inzulinem a různými růstovými faktory a funguje v cestě citlivé na wormannin, která zahrnuje PI3 kinázu (Franke a kol., 1997 a Burgering a Coffey, 1995). Akt podporuje přežití buněk inhibicí apoptózy, fosforylací a inaktivací několika cílových molekul, včetně Bad, transkripčních faktorů a kaspázy-9 (Brunet a Ziegler, 1999). Další důležitou funkcí Akt je regulace syntézy glykogenu prostřednictvím fosforylace a inaktivace GSK-3. Akt může také hrát roli v inzulinové stimulaci transportu glukózy (Hajdúch a kol., 2001). Proteinkináza Akt se také podílí na regulaci buněčného cyklu tím, že brání fosforylaci a degradaci cyklinu D1 zprostředkované GSK-3, Akt také negativně reguluje inhibitory cyklinindependenční kinázy p27 (Gesbert a kol., 2000) a p21 (Zhou a kol., 1999). Proteinkináza Akt je také důležitým faktorem v buněčném růstu, řídí fosforylaci mTOR v rapamycin-senzitivním komplexu (Navé a kol., 1999). Ještě důležitější je, že Akt fosforyluje tuberin (TSC2), inhibitor mTOR, který zastavuje proteosyntézu (Manning a kol., 2002).

Molekula Bad je proapoptický člen rodiny Bcl-2, která podněcuje buněčnou smrt vytěsněním Bax z vazby na Bcl-2 a Bcl-xL (Yang a kol., 1995). Faktory přežití, jako třeba IL-3, inhibují apoptotickou aktivitu Bad aktivací vnitrobuněčných signálních cest, které vedou k fosforylaci Bad na Ser112 a Ser136 (Zha a kol., 1996). Tato fosforylace na Ser136 podporuje přežití buňky (Datta a kol., 1997).

Protein p53 byl exprimován v závislosti na zvyšující se dávce záření, což se potvrdilo také na výsledcích z imunodetekce s použitím monoklonální protilátky, čímž jsme potvrdili fakt, že protein p53 („strážce genomu“) hraje důležitou roli v odpovědi buňky na poškozenou DNA a další genomové aberace. Poškození DNA vede k zastavení buněčného cyklu a opravě DNA nebo k apoptóze (Levine, 1997). Poškození DNA vede k fosforylaci p53 na Ser15. Protein p53 může být fosforylován ATM a ATR

na Ser15 a Ser37 (Shieh a kol., 1997 a Tibbetts a kol., 1999). Chk2 a Chk1 mohou fosforylovat p53 na Ser20, zvyšují tak jeho tetramerizaci, stabilitu a aktivitu (Shieh, 1999 a Hirao, 2000). Fosforylace p53 na Ser392 je zvýšená v lidských nádorech (Ullrich a kol., 1993) a také bylo zjištěno, že to ovlivňuje jeho funkci suprese růstu, opravy DNA a transkripční aktivitu (Kohn, 1999). Schopnost p53 indukovat apoptózu je regulována pomocí fosforylace na Ser46 (Oda a kol., 2000).

Transkripční faktor Stat1 je aktivován velkým množstvím ligandů a je nezbytný pro reakci na IFN- α a IFN- γ (Heim, 2009). Nevhodná aktivace Stat1 se vyskytuje u mnoha nádorů (Frank, 1999). Kromě fosforylace na Tyr701 se Stat1 fosforyluje také na Ser727 prostřednictvím signální cesty přes p38 mitogenem aktivovanou proteinkinázu (MAPK) jako odpověď na IFN- α a jiný buněčný stres (Frank, 1999).

Signální molekula Stat3 je klíčová nejen pro mnoho cytokinů a receptorů růstových faktorů (Heim, 2009), Stat3 je hlavně aktivován v mnoha lidských nádorových buňkách (Catlett-Falcon a kol., 1999) a její poškození způsobuje spoustu lidských onemocnění (Heim, 2009), má onkogenní potenciál (Bromberg a kol., 1999) a antiapoptotickou aktivitu (Catlett-Falcon a kol., 1999). Molekula Stat3 je aktivována fosforylací na Tyr705, což zahrnuje dimerizaci, jadernou translokaci a vazbu na DNA (Darnell a kol., 1994). Transkripční aktivace je zřejmě regulovaná fosforylací na Ser727 přes MAPK nebo mTOR (Wen a kol., 1995 a Yokogami a kol., 2000). Míra vyjádření isoformy Stat3 reflektuje biologickou funkci: relativní expresi Stat3a a Stat3b v závislosti na typu buňky, pozici ligandů nebo stádiu buněčného zrání (Yokogami a kol., 2000).

Ve studii Harwardta a kol. bylo dokázáno, že protein IE1, který je zodpovědný za replikaci HCMV, je důležitý ke změně signální cesty pomocí IL-6 na cestu INF γ . Výsledkem je snížení aktivity signální molekuly STAT3 a aktivace STAT1 (Harwardt a kol., 2016). V naší práci se rovněž potvrdilo snižování exprese STAT3 po infekci buněk HCMV. Schopnost viru snížit aktivitu anti apoptotického faktoru vede ke snížení obranných mechanismů hostitele.

Mitogenem aktivované protein kinázy (MAPKs) jsou velmi specifická rodina serin/treoninových protein-kináz zasahujících do mnoha programů buňky, jako například buněčné proliferace, diferenciace, pohybu a buněčné smrti. MAP kinázy reagují na mitogenní a stresové stimuly prostřednictvím fosforylace řízené prolinem a aktivace kinázové domény extracelulárními signálně regulovanými kinázami ERK1, ERK2 (p44/42) a p38 MAPK (Roux a Blenis, 2004). Typická MAPK signální cesta je

ERK1/2, která může být aktivovaná jako odpověď na pestré škále extracelulárních stimulů zahrnujících mitogeny, růstové faktory a cytokiny (Meloche a Pouyssegur, 2007) a je důležitá součást v diagnostice a léčbě nádorových onemocnění (Roberts a Der, 2007).

V této práci byla molekula ERK 1/2 up-regulována pouze v časně fázi po infekci HCMV, což koreluje s daty ve studii Rodemse a Spectra, kde byla prokázána stimulace extracelulárně-signálně regulovaných kináz (ERK) po infekci lidských fibroblastů s HCMV (Rodems a Spector, 1998). Tato indukovaná aktivita ERK je způsobena primárně spíše inhibicí fosfatázy než zvýšenou rychlostí fosforylace ERK. Infekce buněk s UV-inaktivovaným virem neindikuje fosforylaci nebo aktivitu ERK. Časná aktivace ERK je pravděpodobně nutná k vytvoření optimálního buněčného prostředí pro účinnou transkripci a replikaci viru. Zjištění, že inhibice aktivace RTK blokuje indukci HCMV časně genové exprese podporuje toto tvrzení (Rodems a Spector, 1998).

Rodina proteáz, které obsahují ve svém aktivním místě cystein a specificky štěpí peptidovou vazbu za aspartátem (z angl. Cysteiny aspartate specific protease) se nazývá kaspázy. Sedm kaspáz (z 12 známých u člověka) se vyskytuje v apoptotické kaskádě (Voet D. a Voet J., 2004). Neaktivní formy kaspáz se označují jako prokaspázy (Alberts a kol., 2002). Apoptózou indukovaná CD95 (FAS/APO-1) a receptorem faktoru nádorové nekrózy 1 (TNFR1) aktivuje iniciační kaspázu 8 (MACH/FLICE/Mch5), což vede k uvolnění jejích aktivních fragmentů p18 a p10 (Muzio a kol., 1996). Aktivní kaspáza 8 je schopna dále rozštěpit a aktivovat proapoptické kaspázy jako je např. kaspáza 1, 3, 6 a 7³. Kaspáza 9 (ICE-LAP6) je důležitým členem rodiny cysteinových proteáz (Duan a kol., 1996). Po stimulaci apoptózy se cytochrom c uvolněný z mitochondrií spojí s 47kDa pro-kaspázou 9/Apaf 1. Aktivace kaspázy 9 cestou Apaf-1 zahrnuje vnitřní proteolytické procesy štěpení na Asp315 a produkci podjednotky p35. Další štěpení nastane na Asp315, kdy je produkována podjednotka p37, která slouží k zesílení apoptotické odpovědi (Zou a kol., 1999 a Li a kol., 1997). Rozštěpená kaspáza 9 dále zpracovává další kaspázy, také kaspázu 3 a 7, čímž se zahájí kaspázová kaskáda vedoucí k apoptóze (Voet D. a Voet J., 2004). Kaspáza 3 je zásadním činitelem v apoptóze. Je částečně nebo plně zodpovědná za proteolytický rozklad mnoha klíčových proteinů, např. jaderný enzym poly(ADP-ribóza) polymerázu (PARP) (Fernandes-Alnemri a kol, 1994). Aktivace této kaspázy vyžaduje proteolýzu inaktivního zymogenu na aktivované části p17 a p21. Toto rozštěpení vyžaduje aspartovou kyselinu v pozici P1 (Nicholson a kol., 1995).

Kaspáza 3 nakonec vyvolá morfologické znaky apoptózy, jako je rozštěpení DNA a smrštění buňky³.

K přípravě vzorků byly vytvořeny modelové situace využívající infekci optimalizovanou dávkou infekce HCMV s následným navozením imunosuprese či modelu, který navodil nejprve imunosupresi s následnou infekcí hostitelských buněk. Tyto modelové situace byly odvozeny z dostupných literárních zdrojů s přihlédnutím k faktu, že hostitelská buněčná linie MRC-5 je vysoce radiorezistentní. Radioaktivní záření způsobuje ionizaci atomu nebo molekuly přičemž tyto změny se v organismu projeví porušením důležitých biochemických procesů např. fosforylace. Pomocí enzymové imunoanalýzy byla sledována celá řada fosforylovaných buněčných proteinů a signálních uzlů podílejících se na buněčné odpovědi na poškození DNA a rozvoji apoptózy. Na základě výsledků z imunoanalýzy byly pomocí monoklonálních protilátek detekovány vybrané fosforylované signální molekuly např. p53, Caspase-3, Bad, Stat-1, Stat-3, ERK1/2 či AMPK α .

Sledováním exprese vybraných proteinů jsme tedy zaznamenali, že infikované buňky ovlivněné ionizujícím zářením, pravděpodobně jako poškozené, zanikají cestou apoptózy, jelikož všechny proapoptické markery vykazovali zvýšenou míru exprese s rostoucí dávkou ionizujícího záření. Nicméně z našich výsledků také vyplývá, že vybraná buněčná linie bez vlivu infekce je vysoce radiorezistentní, čemuž odpovídají změny v genové expresi dalších vybraných pro- a anti-apoptických markerů.

Tato práce byla prezentována na Studenstké vědecké konferenci lékařských fakult ČR a SR 2016 a je uvedena jako abstrakt ve sborníku abstraktů (Jurajda, 2016).

6 ZÁVĚR

Výzkum epigenetických procesů, které nejsou způsobeny změnou nukleotidové sekvence DNA, je dáván do souvislosti především se vznikem civilizačních chorob. Schopnost CMV přežít v latentní fázi patří k základním vlastnostem herpetických virů. V případě zhoršení imunitního stavu ve smyslu rozvoje lymfopenie může dojít k reaktivaci viru, proliferaci a virémii. CMV moduluje v časných fázích infekce signální dráhy a fenotyp buněk v rámci přirozené i adaptivní imunity. Vlivem ionizujícího záření byla u infikovaných buněk prokázána exprese proapoptických proteinů vedoucí k aktivaci NF- κ B signální dráhy, která řídí genovou expresi prozánětlivých cytokinů nutných k funkční synchronizaci buněk imunitního systému, ale také k redukci interferonové produkce, která je však potřebná k redukci virové replikace uvnitř infikovaných buněk a k inhibici replikace DNA.

7 SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Klasifikace lidských herpesvirů	13
Tab. 2: Přehled dostupných CMV vakcín.....	30
Tab. 3: Pravidlo pro pasážování buněk.....	38
Tab. 4: Příprava vzorků — prvotní model.....	39
Tab. 5: Příprava vzorků — optimalizovaný model.....	40
Tab. 6: Čas potřebný k ozáření 1 Gy při použití uzavřeného zářiče ⁶⁰ Co	41
Tab. 7: Složení vzorků pro kalibrační řadu.....	43
Tab. 8: Seznam vzorků pro 1. sklíčko pro analýzu PathScan metodou.....	47
Tab. 9: Seznam vzorků pro 2. sklíčko pro analýzu PathScan metodou.....	47
Tab. 10: Schéma k přípravě 2 gelů na mini 1D elektroforézu.....	54
Tab. 11: Schéma k přípravě zaostřovacích gelů	55
Tab. 12: Příprava vzorků pro elektroforézu.....	56
Tab. 13: Podmínky pro Western blot.....	58
Tab. 14: Přehled použitých primárních protilátek pro imunodetekci	61
Tab. 15: Měřené molekuly s příslušnými protilátkami.....	63
Tab. 16: Ozařování 96 jamkové destičky	66
Tab. 17: Identifikace a pořadí vzorků použitých k analýze PathScan	75
Tab. 18: Identifikace a pořadí vzorků použitých k analýze PathScan	80
Tab. 19: Seznam použitých monoklonálních Ab včetně jejich specifit.....	84
Tab. 20: Souhrn výsledků exprese vybraných signálních molekul	98

8 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Struktura cytomegaloviru	16
Obr. 2: Genová exprese HCMV a funkce genových produktů během produktivní infekce.....	18
Obr. 3: Ovlivnění funkcí buněk hostitele během lytické a latentní fáze infekce.....	21
Obr. 4: Pro- a antiapoptotické faktory v signální kaskádě FAS	23
Obr. 5: Schéma interakce interleukinu IL-10 se specifickým receptorem	24
Obr. 6: Princip Sandwichového ELISA testu	44
Obr. 7: Souprava pro PathScan analýzu	44
Obr. 8: Seznam protilátek a schéma jejich rozložení na sklíčku pro PathScan Akt analýzu.....	45
Obr. 9: Receptorové tyrozinkinázy a signální uzly testované během PathScan RTK analýzy a jejich rozložení na sklíčku	49
Obr. 10: Seznam protilátek a jejich rozložení na sklíčku pro PathScan intracelulární analýzu.....	50
Obr. 11: Seznam cytokinů a jejich rozložení na sklíčku pro PathScan Th1/Th2/Th17 cytokinovou analýzu	51
Obr. 12: Gelová elektroforéza a princip SDS-PAGE	53
Obr. 13: Schéma metody Western blot.....	57
Obr. 14: Princip chemiluminiscence.....	59
Obr. 15: Princip sendvičového ELISA testu.....	62
Obr. 16: xCELLigence RTCA	64
Obr. 17: Impedanční zlaté elektrody na E-destičkách	65
Obr. 18: Schéma pro ozáření 96 jamkové destičky	66
Obr. 19: Infekce fibroblastů MRC-5 v čase, zvětšení 500x.....	68
Obr. 20: Plaková assay na buněčné linii MRC-5 po infekci HCMV ATCC-VR 1590 ..	70
Obr. 21: Reprezentativní kalibrační křivka závislosti absorbance na koncentraci bílkovin v připravených vzorcích	71
Obr. 22: Graf závislosti normalizovaného buněčného indexu na čase.....	72
Obr. 23: Graf závislosti normalizovaného buněčného indexu na čase.....	73

Obr. 24: Reprezentativní smínek PathScan Intracelular získaný chemiluminiscenční metodou na film KODAK.....	74
Obr. 25: Graf závislosti signálu integrální optické denzity na dávce záření u signální molekuly ERK 1/2 (Thr202/Tyr204).....	75
Obr. 26: Graf závislosti signálu integrální optické denzity na čase po infekci u signální molekuly ERK1/2 (Thr202/Tyr204).....	76
Obr. 27: Graf závislosti signálu integrální optické denzity na čase po infekci u signální molekuly Stat1 (Tyr 701).....	77
Obr. 28: Graf závislosti signálu integrální optické denzity na čase po infekci u signální molekuly p53 (Ser15).	78
Obr. 29: Reprezentativní smínek PathScan RTK analýzy získaný chemiluminiscenční metodou na film KODAK. Pod jednotlivými čísly je zobrazeno pořadí námi připravených vzorků.	79
Obr. 30: Reprezentativní smínek PathScan cytokinové analýzy získaný chemiluminiscenční metodou na film KODAK.	81
Obr. 31: Reprezentativní 1D SDS-PAGE gely. Ke zviditelnění výsledných spot (bandů) jsme použili rychlé modření.	82
Obr. 32: Použitý marker určující rozdělení proteinů na gelu dle molekulové hmotnosti.	83
Obr. 33: Reprezentativní snímek imunodetekci s použitím monoklonální Ab namířené proti p38 proteinu.....	85
Obr. 34: Reprezentativní snímek imunodetekci s použitím monoklonální Ab namířené proti fosforylované formě proteinu p38.....	86
Obr. 35: Reprezentativní snímek imunodetekci s použitím monoklonální Ab namířené proti Stat3 protein.	87
Obr. 36: Reprezentativní snímek imunodetekci s použitím monoklonální Ab namířené proti fosforylované formě proteinu Stat3.....	88
Obr. 37: Reprezentativní snímek imunodetekci s použitím monoklonální Ab namířené proti Bad protein.	89
Obr. 38: Reprezentativní snímek imunodetekci s použitím monoklonální Ab namířené proti fosforylované formě Bad (Ser112).....	89
Obr. 39: Reprezentativní snímek imunodetekci s použitím monoklonální Ab namířené proti p53 proteinu (7F5).....	90

Obr. 40: Reprezentativní snímek imunodetekci s použitím monoklonální Ab namířené proti fosforylované formě p53 (Ser15).	91
Obr. 41: Reprezentativní snímek imunodetekci s použitím monoklonální Ab namířené proti p 44/42 MAPK (Erk1/2) (137F5).	92
Obr. 42: : Reprezentativní snímek imunodetekci s použitím monoklonální Ab namířené proti fosforylované formě p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204).	92
Obr. 43: Reprezentativní snímek imunodetekci s použitím monoklonální Ab namířené proti kaspáze 3 (8G10).	94
Obr. 44: Reprezentativní snímek imunodetekci s použitím monoklonální Ab namířené proti kaspáze 8 (1C12).	95
Obr. 45: Reprezentativní snímek imunodetekci s použitím monoklonální Ab namířené proti kaspáze 9.	96

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Adler SP, Starr SE, Plotkin SA, et al. Immunity induced by primary human cytomegalovirus infection protects against secondary infection among women of childbearing age. *J Infect Dis* 1995; 171:26–32.

Adler SP. Immunization to prevent congenital cytomegalovirus infection. *Br Med Bull* 2013; 107:57–68.

Adler SP. Molecular epidemiology of cytomegalovirus: a study of factors affecting transmission among children at three day-care centers. *Pediatr Infect Dis J* 1991;10:584-90.

Ahlfors K, Ivarsson SA and Harris S. Report on a long-term study of maternal and congenital cytomegalovirus infection in Sweden. Review of prospective studies available in the literature. *Scand J Infect Dis* 1999;31:443-57.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; 2002. Programmed Cell Death (Apoptosis)

Alberts, Bruce. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. Ústí nad Labem: Espero, c1998. ISBN 80-902906-0-4. str. 163.

Al-Omari, Awad, Fadi Aljamaan, Waleed Alhazzani, Samer Salih a Yaseen Arabi. Cytomegalovirus infection in immunocompetent critically ill adults: literature review. *Annals of Intensive Care*. 2016, 6(1).

Anna Karin Lindehäll. *Cellular immune responses to cytomegalovirus*. Uppsala: Acta Universitatis Upsaliensis, 2008. ISBN 978-915-5471-323.

Arvin AM, Fast P, Myers M, Plotkin S and Rabinovich R. Vaccine development to prevent cytomegalovirus disease: report from the National Vaccine Advisory Committee. *Clin Infect Dis* 2004;39:233-9. Převzato z: Anna Karin Lindehäll. *Cellular immune responses to cytomegalovirus*. Uppsala: Acta Universitatis Upsaliensis, 2008. ISBN 978-915-5471-323.

Asadullah K, Prosch S, Audring H, et al. A high prevalence of cytomegalovirus antigenaemia in patients with moderate to severe chronic plaque psoriasis: an association with systemic tumour necrosis factor alpha overexpression. *Br J Dermatol* 1999;141:94-102.

Bahl K, Senn JJ, Yuzhakov O, Bulychev A, Brito LA, Hassett KJ, Laska ME, Smith M, Almarsson Ö, Thompson J, Ribeiro AM, Watson M, Zaks T, Ciaramella G. 2017. Preclinical and clinical demonstration of immunogenicity by mRNA vaccines against H10N8 and H7N9 influenza viruses. *Mol Ther* 25:1316-1327.

Basu A, Haldar S (1998) The relationship between Bcl2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. *Mol Hum Reprod* 4(12):1099–1109.

Blume-Jensen, O. and Hunter, T. (2001) *Nature* 411, 355-65.

Bluwstein A, Kumar N, Léger K, et al. PKC signaling prevents irradiation-induced apoptosis of primary human fibroblasts. *Cell Death & Disease*. 2013;4(2):e498-. doi:10.1038/cddis.2013.15.

Boppana SB, Pass RF, Britt WJ, Stagno S and Alford CA. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality. *Pediatr Infect Dis J* 1992;11:93-9.

Braun DK, Dominguez G, Pellett PE. Human herpesvirus 6. *Clinical Microbiology Reviews*. 1997;10(3):521-567. ISSN 0893-8512.

Britt WJ, Vugler L, Butfiloski EJ and Stephens EB. Cell surface expression of human cytomegalovirus (HCMV) gp55-116 (gB): use of 60 HCMV-recombinant vaccinia virus-infected cells in analysis of the human neutralizing antibody response. *J Virol* 1990;64:1079-85.

Britt, W. J., & Mach, M. (1996). Human cytomegalovirus glycoproteins. *Intervirology* 39, 401– 412. Převzato z: Landolfo, Santo, Marisa Gariglio, Giorgio Gribaudo a David Lembo. *The human cytomegalovirus*. Pharmacology. 2003, 98(3), 65-73.

Bromberg, Jacqueline F, Melissa H Wrzeszczynska, Geeta Devgan, Yanxiang Zhao, Richard G Pestell, Chris Albanese a James E Darnell. Stat3 as an Oncogene. *Cell* [online]. 1999, 98(3), 295-303. Doi: 10.1016/S0092-8674(00)81959-5.

Brunelle, Julie L. a Rachel Green. One-dimensional SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (1D SDS-PAGE). *Laboratory Methods in Enzymology: Protein Part C* [online]. Elsevier, 2014, 2014, s. 151-159.

Brunet, Anne, Azad Bonni, Michael J Zigmund, et al. Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor. *Cell* [online]. 1999, 96(6), 857-868. Doi: 10.1016/S0092-8674(00)80595-4.

Burgering, Boudewijn M. Th. a Paul J. Coffey. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature* [online]. 1995, 376(6541), 599-602. Doi: 10.1038/376599a0.

Catlett-Falcone, Robyn, Terry H Landowski, Marc M Oshiro, et al. Constitutive Activation of Stat3 Signaling Confers Resistance to Apoptosis in Human U266 Myeloma Cells. *Immunity* [online]. 1999, 10(1), 105-1150. Doi: 10.1016/S1074-7613(00)80011-4.

D'Herelle F. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *C R Acad Sci (Paris)* 1917;165:373–375.

Dannenmaier B, Alle W, Hoferer EW, Lorenz D, Oertel PJ, Doerr HW. Incidences of antibodies to hepatitis B, herpes simplex and cytomegalovirus in prostitutes. *Zbl Bakt Hyg A* 1985;259:275_/83.

Darnell, J., I. Kerr a G. Stark. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* [online]. 1994, 264(5164), 1415-1421. Doi: 10.1126/science.8197455.

Datta, Sandeep Robert, Henryk Dudek, Xu Tao, Shane Masters, Haiyan Fu, Yukiko Gotoh a Michael E Greenberg. Akt Phosphorylation of BAD Couples Survival Signals to the Cell-Intrinsic Death Machinery. *Cell* [online]. 1997, 91(2), 231-241. Doi: 10.1016/S0092-8674(00)80405-5.

Day EK, Carmichael AJ, ten Berge IJ, Waller EC, Sissons JG and Wills MR. Rapid CD8+ T cell repertoire focusing and selection of highaffinity clones into memory following primary infection with a persistent human virus: human cytomegalovirus. *J Immunol* 2007;179:3203-13.

De la Hoz, Rafael E, Gwen Stephens a Christopher Sherlock. Diagnosis and treatment approaches of CMV infections in adult patients. *Journal of Clinical Virology* [online]. 2002, 25, 1-12.

Diehl, J. A., Cheng, M., Roussel, M. F., & Sherr, C. J. (1998). Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes & Development*, 12(22), 3499–3511.

Dostál, Václav. *Infektologie*. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0749-2.

Drew WL, Sweet ES, Miner RC et al (1984) Multiple infections by cytomegalovirus in patients with acquired immune deficiency syndrome: documentation by southern blot hybridization. *J infect Dis* 155:891–896.

Duan, Hangjun, Kim Orth, Arul M. Chinnaiyan, Guy G. Poirier, Christopher J. Froelich, Wei-Wu He a Vishva M. Dixit. ICE-LAP6, a Novel Member of the ICE/Ced-3 Gene Family, Is Activated by the Cytotoxic T Cell Protease Granzyme B. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1996, 271(28), 16720-16724. Doi: 10.1074/jbc.271.28.16720.

Elkington R, Walker S, Crough T, et al. Ex vivo profiling of CD8⁺-Tcell responses to human cytomegalovirus reveals broad and multispecific reactivities in healthy virus carriers. *J Virol* 2003;77:5226-40.

Eltjo Fredericus de Maar. Changing images of cytomegalovirus infection. [S.l: s.n.], 2003. ISBN 9036717779.

Enders, J. F., T. H. Weller a F. C. Robbins. Cultivation of the Lansing Strain of Poliomyelitis Virus in Cultures of Various Human Embryonic Tissues. *Science* [online]. 1949, 109(2822), 85-87.

Farber, S., & Wolbach, S. B. (1932). Intranuclear and Cytoplasmic Inclusions (“Protozoan-Like Bodies”) in the Salivary Glands and Other Organs of Infants. *The American Journal of Pathology*, 8(2), 123–136.3.

Fernandes-Alnemri, T. et al. (1994) *J Biol Chem* 269, 30761-4.

Forbes, B A. Acquisition of cytomegalovirus infection: an update. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 1989, 2(2), 204-216.

Fortunato, E. A., & Spector, D. H. (1999). Regulation of human cytomegalovirus gene expression. *Adv Virus Res* 54, 61–128.

Fortunato, Elizabeth A, Anita K McIroy, Veronica Sanchez a Deborah H Spector. Exploitation of cellular signaling and regulatory pathways by human cytomegalovirus. *Trends in Microbiology* [online]. 2000, 8(3), 111-119.

Fouts AE, Chan P, Stephan JP, Vandlen R, Feierbach B. Antibodies against the gH/gL/UL128/UL130/UL131 complex comprise the majority of the anti- CMV neutralizing antibody response in CMV-HIG. *J Virol* 2012;86(April (13)):7444–7.

Frank, D. A. (1999). STAT signaling in the pathogenesis and treatment of cancer. *Molecular Medicine*, 5(7), 432–456.

Franke, Thomas F, David R Kaplan a Lewis C Cantley. PI3K: Downstream AKTion Blocks Apoptosis. *Cell* [online]. 1997, 88(4), 435-437. Doi: 10.1016/S0092-8674(00)81883-8.

Gaytant MA, Galama JM, Semmekrot BA, et al. The incidence of congenital cytomegalovirus infections in The Netherlands. *J Med Virol* 2005;76:71-5.

Genini E, Percivalle E, Sarasini A, Revello MG, Baldanti F, Gerna G. Serum antibody response to the gH/gL/pUL128-131 five-protein complex of human cytomegalovirus (HCMV) in primary and reactivated HCMV infections. *J Clin Virol* 2011;52(October (2)):113–8.

Gerna G, Sarasini A, Patrone M, Percivalle E, Fiorina L, Campanini G, et al. Human cytomegalovirus serum neutralizing antibodies block virus infection of endothelial/epithelial cells, but not fibroblasts, early during primary infection. *J Gen Virol* 2008;89(April (Pt 4)):853–65.

Gesbert, Franck, William R. Sellers, Sabina Signoretti, Massimo Loda a James D. Griffin. BCR/ABL Regulates Expression of the Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p27 Kip1 through the Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT Pathway. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2000, 275(50), 39223-39230. Doi: 10.1074/jbc.M007291200.

Gossmann WG, Bhimji SS. Cytomegalovirus. [Updated 2017 Oct 22]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2017 Jun-. Available.

Griffiths P, Plotkin S, Mocarski E, et al. Desirability and feasibility of a vaccine against cytomegalovirus. *Vaccine* 2013; 31(suppl 2): B197–203.

Griffiths PD, Baboonian C, Rutter D and Peckham C. Congenital and maternal cytomegalovirus infections in a London population. *Br J Obstet Gynaecol* 1991;98:135-40.

Griffiths PD, Stanton A, McCarrell E, et al. Cytomegalovirus glycoprotein-B vaccine with MF59 adjuvant in transplant recipients: a phase 2 randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2011; 377:1256–63.

Griffiths, P. D. (2000). Cytomegalovirus. In A. J. Zuckerman, J. E. Banatvala, & J. R. Pattison (Eds.), *Principles and Practice of Clinical Virology* (pp. 79– 116). London: John Wiley and Sons.

Groves IJ, Reeves MB, Sinclair JH (2009) Lytic infection of permissive cells with human cytomegalovirus is regulated by an intrinsic ‘pre-immediate-early’ repression of viral gene expression mediated by histone post-translational modification. *J Gen Virol* 90(Pt 10):2364–2374.

Hahn G, Jores R and Mocarski ES. Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:3937-42.

Hajduch, Eric, Gary J Litherland a Harinder S Hundal. Protein kinase B (PKB/Akt) - a key regulator of glucose transport?. *FEBS Letters* [online]. 2001, 492(3), 199-203. Doi: 10.1016/S0014-5793(01)02242-6.

Hamann D, Baars PA, Rep MH, et al. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *J Exp Med* 1997;186:1407-18.

Harwardt, Thomas, Simone Lukas, Marion Zenger, et al. Human Cytomegalovirus Immediate-Early 1 Protein Rewires Upstream STAT3 to Downstream STAT1 Signaling Switching an IL6-Type to an IFN γ -Like Response. *PLOS Pathogens* [online]. 2016, 12(7), e1005748-. Doi: 10.1371/journal.ppat.1005748.

Heim, Markus H. The Jak-Stat Pathway: Cytokine Signalling from the Receptor to the Nucleus. *Journal of Receptors and Signal Transduction* [online]. 2009, 19(1-4), 75-120. Doi: 10.3109/10799899909036638.

Hirao, A. DNA Damage-Induced Activation of p53 by the Checkpoint Kinase Chk2. *Science* [online]. 2000, 287(5459), 1824-1827. Doi: 10.1126/science.287.5459.1824.

Ho, Monto. The history of cytomegalovirus and its diseases. *Medical Microbiology and Immunology* [online]. 2008, 197(2), 65-73.

Hodson EM, Ladhani M, Webster AC, Strippoli GFM, Craig JC. Antiviral medications for preventing cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2013, Issue 2. Art. No.: CD003774.

Hodson, Elisabeth M, Cheryl A Jones, Angela C Webster, Giovanni Fm Strippoli, Peter G Barclay, Kathy Kable, Dushyanthi Vimalachandra a Jonathan C Craig. Antiviral medications to prevent cytomegalovirus disease and early death in recipients of solid-organ transplants: a systematic review of randomised controlled trials. *The Lancet* [online]. 2005, 365(9477), 2105-2115.

Hommel DW, Sterringa G, van Deventer SJ, Tytgat GN and Weel J. The pathogenicity of cytomegalovirus in inflammatory bowel disease: a systematic review and evidence-based recommendations for future research. *Inflamm Bowel Dis* 2004;10:245-50.

Jabs DA, Holbrook JT, Van Natta ML, et al. Risk factors for mortality in patients with AIDS in the era of highly active antiretroviral therapy. *Ophthalmology* 2005;112:771-9.
Jacobs JP et al. Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature* 227: 168-70, 1970.

Jesionek A, Kiolemenoglou B (1904) Ueber einen Befund von protozoenartigen Gebilden in den Organen eines hereditar-luetischen Foetus. *Muenchner Med Wochenschr* 51:1905–1907.

John GT, Manivannan J, Chandy S, Peter S, Jacob CK. Leflunomide therapy for cytomegalovirus disease in renal allograft recipients. *Transplantation* . 2004 May 15. 77(9):1460-1.

Jones CA. Congenital cytomegalovirus infection. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 2003;33:70-93.

Jurajda, Michal. Studentská vědecká konference lékařských fakult ČR a SR 2016. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2016. 47 s. ISBN 978-80-210-8384-4.

Káš, Jan, Milan Kodíček a Olga Valentová. *Laboratorní techniky biochemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-7080-586-2.

Kempf W, Adams V, Mirandola P, et al. Persistence of human herpesvirus 7 in normal tissues detected by expression of a structural antigen. *J Infect Dis* 1998;178:841–845.

Kern, F., Faulhaber, N., Frömmel, C., Khatamzas, E., Prösch, S., Schönemann, C., Kretzschmar, I., Volkmer-Engert, R., Volk, H.-D. and Reinke, P. (2000), Analysis of CD8 T cell reactivity to cytomegalovirus using protein-spanning pools of overlapping pentadecapeptides. *Eur. J. Immunol.*, 30: 1676–1682.

Khuroo, Mohammad Sultan, Mohammed Ramzan TeliI, Susan Skidmore, Mohammad Amin Sofi a Mohammad Ismail Khuroo. Incidence and severity of viral hepatitis in pregnancy. *The American Journal of Medicine*. 1981, 70(2), 252-255.

Knipe, David M. a Peter M. Howley. *Fields virology*. 6th ed. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health, c2013. ISBN 14-511-0563-0. Str. 1802-1811; 1960-2010.

Kohn, K. W. (1999). Molecular Interaction Map of the Mammalian Cell Cycle Control and DNA Repair Systems. *Molecular Biology of the Cell*, 10(8), 2703–2734.

Kondo K, Xu J and Mocarski ES. Human cytomegalovirus latent gene expression in granulocyte-macrophage progenitors in culture and in seropositive individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:11137-42.

Krech U. Complement-fixing antibodies against cytomegalovirus in different parts of the world. *Bull WHO* 1973;49:103_/6.

Kurz S, Steffens HP, Mayer A, Harris JR, Reddehase MJ (1997) Latency versus persistence or intermittent recurrences: evidence for a latent state of murine cytomegalovirus in the lungs. *J Virol* 71(4):2980–2987.

Laemmli, U. K. (1970). *Nature*, 227, 680–685.

Landolfo, Santo, Marisa Gariglio, Giorgio Gribaudo a David Lembo. The human cytomegalovirus. *Pharmacology*. 2003, 98(3), 65-73.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75(5):843–854
Levine, A.J. (1997) *Cell* 88, 323-331.

Levine, Arnold J. P53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell* [online]. 1997, 88(3), 323-331. Doi: 10.1016/S0092-8674(00)81871-1.

Li, Peng, Deepak Nijhawan, Imawati Budihardjo, Srinivasa M Srinivasula, Manzoor Ahmad, Emad S Alnemri a Xiaodong Wang. Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade. *Cell* [online]. 1997, 91(4), 479-489. Doi: 10.1016/S0092-8674(00)80434-1.

Lindehäll Anna Karin. Cellular immune responses to cytomegalovirus. Uppsala: Acta Universitatis Upsaliensis, 2008. ISBN 978-915-5471-323.

Lipschuetz B (1921) Untersuchungen ueber die Aetiologie der Krankheiten der Herpes genitalis. *Arch Dermatol Syph* 136:428–482.

Lischka P, Hewlett G, Wunberg T, et al. In Vitro and In Vivo Activities of the Novel Anticytomegalovirus Compound AIC246 . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010;54(3):1290-1297.

Ljungman P, Hakki M, Boeckh M. Cytomegalovirus in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 2011;25(1):151-169.

Löwenstein C (1907) Ueber protozoenartige Gebilde in den Organen von Kindern. *Zbl Allg Pathol* 18:513–718.

Maciejewski JP, Bruening EE, Donahue RE, Mocarski ES, Young NS, St Jeor SC. Infection of hematopoietic progenitor cells by human cytomegalovirus. *Blood*. 1992;80:170–8.

Manning, Brendan D, Andrew R Tee, M.Nicole Logsdon, John Blenis a Lewis C Cantley. Identification of the Tuberous Sclerosis Complex-2 Tumor Suppressor Gene Product Tuberin as a Target of the Phosphoinositide 3-Kinase/Akt Pathway. *Molecular Cell* [online]. 2002, 10(1), 151-162. Doi: 10.1016/S1097-2765(02)00568-3.

Mason GM, Jackson S, Okecha G, Poole E, Sissons JG, Sinclair J, Wills MR (2013) Human cytomegalovirus latency-associated proteins elicit immune-suppressive IL-10 producing CD4(+) T Cells. *PLoS Pathog* 9(10):e1003635.

Mason GM, Poole E, Sissons JG, Wills MR, Sinclair JH (2012) Human cytomegalovirus latency alters the cellular secretome, inducing cluster of differentiation (CD)4+ T-cell migration and suppression of effector function. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(36):14538–14543.

McLaughlin K, Wu C, Fick G, Muirhead N, Hollomby D and Jevnikar A. Cytomegalovirus seromismatching increases the risk of acute renal allograft rejection. *Transplantation* 2002;74:813-6.

Melendez DP, Razonable RR. Letermovir and inhibitors of the terminase complex: a promising new class of investigational antiviral drugs against human cytomegalovirus. *Infection and Drug Resistance*. 2015;8:269-277. doi:10.2147/IDR.S79131.

Meloche, S a J Pouysségur. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* [online]. 2007, 26(22), 3227-3239. Doi: 10.1038/sj.onc.1210414.

Michael M. Cox a George N. Phillips. *The handbook of proteins: structure, function and methods*. Hoboken, N.J: Wiley, 2007. ISBN 9780470060988. str. 879 – 880.

Mocarski, E. S., and C. T. Courcelle. 2001. Cytomegaloviruses and their replication, p. 2629-2673. In D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, and S. E. Straus (ed.), *Fields virology*, 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.

Mocarski, E. S., Kemble, G. W., Lyle, J. M., & Greaves, R. F. (1996). A deletion mutant in the human cytomegalovirus gene encoding IE1 (491 aa) is replication defective due to a failure in autoregulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 11321–11326.

Morita, Shinya, Kazunobu Shinoda, Satoshi Tamaki, Hidaka Kono, Hiroshi Asanuma, Ken Nakagawa a Mototsugu Oya. Successful low-dose leflunomide treatment for ganciclovir-resistant cytomegalovirus infection with high-level antigenemia in a kidney transplant: A case report and literature review. *Journal of Clinical Virology* [online]. 2016, 82, 133-138.

Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Meriin AB, Sherman MY, Morimoto RI, Massie B (2000) The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 20(19):7146–7159.

Murph JR, Souza IE, Dawson JD, et al. Epidemiology of congenital cytomegalovirus infection: maternal risk factors and molecular analysis of cytomegalovirus strains. *Am J Epidemiol* 1998;147:940-7.

Murphy JCFW, Verdin E, Sinclair JH (2002) Control of cytomegalovirus lytic gene expression by histone acetylation. *EMBO J* 21:1112–1120.

Muzio, Marta, Arul M Chinnaiyan, Frank C Kischkel, et al. FLICE, A Novel FADD-Homologous ICE/CED-3-like Protease, Is Recruited to the CD95 (Fas/APO-1) Death-Inducing Signaling Complex. *Cell* [online]. 1996, 85(6), 817-827. Doi: 10.1016/S0092-8674(00)81266-0.

Navé, B. T., Ouwens, M., Withers, D. J., Alessi, D. R., & Shepherd, P. R. (1999). Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *Biochemical Journal*, 344(Pt 2), 427–431.

Nigro G, Adler SP, La Torre R and Best AM. Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *N Engl J Med* 2005;353:1350-62.

Nicholson, Donald W., Ambereen Ali, Nancy A. Thornberry, et al. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* [online]. 1995, 376(6535), 37-43. Doi: 10.1038/376037a0.

O'Garra, Anne a Naoko Arai. The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends in Cell Biology* [online]. 2000, 10(12), 542-550. DOI: 10.1016/S0962-8924(00)01856-0.

Oda, Katsutoshi, Hirofumi Arakawa, Tomoaki Tanaka, et al. P53AIP1, a Potential Mediator of p53-Dependent Apoptosis, and Its Regulation by Ser-46-Phosphorylated p53. *Cell* [online]. 2000, 102(6), 849-862. Doi: 10.1016/S0092-8674(00)00073-8.

Österreicher, Jan a Jiřina Vávrová. Přednášky z radiobiologie. Praha: Manus, 2003. ISBN 80-86571-01-7.str.11-12; 29-33.

Parry HM, Zuo J, Frumento G, Mirajkar N, Inman C, Edwards E, Griffiths M, Pratt G, Moss P. Cytomegalovirus viral load within blood increases markedly in healthy people over the age of 70 years. *Immun Ageing*. 2016;13:1.

Pass RF, Zhang C, Evans A, et al. Vaccine prevention of maternal cytomegalovirus infection. *N Engl J Med* 2009; 360:1191–9.

Pass RF. Pathogenesis in the Neonate. In: Emery VC, ed. *Human Cytomegalovirus*. London: International Medical Press, 2007:6.1-6.12.

Pereyra F, Rubin RH (2004) Prevention and treatment of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Curr Opin Infect Dis* 17:357–361.

Plotkin SA, Higgins R, Kurtz JB, et al. Multicenter trial of Towne strain attenuated virus vaccine in seronegative renal transplant recipients. *Transplantation* 1994; 58:1176–8.

Plotkin SA, Starr SE, Friedman HM, Gonczol E, Brayman K. Vaccines for the prevention of human cytomegalovirus infection. *Rev Infect Dis* 1990; 12(suppl 7):S827–38.

Plotkin, Stanley A. Increasing Complexity of Vaccine Development. *Journal of Infectious Diseases* [online]. 2015, 212(suppl 1), S12-S16.

Poole E, McGregor Dallas SR, Colston J, Joseph RS, Sinclair J (2011) Virally induced changes in cellular microRNAs maintain latency of human cytomegalovirus in CD34 progenitors. *J Gen Virol* 92(Pt 7):1539–1549.

Poole E, Walther A, Raven K, Benedict CA, Mason GM, Sinclair J (2013) The myeloid transcription factor GATA-2 regulates the viral UL144 gene during human cytomegalovirus latency in an isolate-specific manner. *J Virol* 87(8):4261–4271.

Poole E, Wills M, Sinclair J (2014) Human cytomegalovirus latency: targeting differences in the latently infected cell with a view to clearing latent infection. *New J Sci* 2014:10.

Poole, Emma a John Sinclair. Sleepless latency of human cytomegalovirus. *Medical Microbiology and Immunology* [online]. 2015, 204(3), 421-429.

Poole, Emma, Jatinder K. Juss, Benjamin Krishna, Jurgen Herre, Edwin R. Chilvers a John Sinclair. Alveolar Macrophages Isolated Directly From Human Cytomegalovirus (HCMV) – Seropositive Individuals Are Sites of HCMV Reactivation In Vivo. *Journal of Infectious Diseases* [online]. 2015, 211(12), 1936-1942.

Rayes N, Seehofer D, Kahl A, et al. Long-term outcome of cytomegalovirus infection in simultaneous pancreas-kidney transplant recipients without ganciclovir prophylaxis. *Transpl Int* 2007;20:974-81.

Reed, Elizabeth C. Treatment of Cytomegalovirus Pneumonia with Ganciclovir and Intravenous Cytomegalovirus Immunoglobulin in Patients with Bone Marrow Transplants. *Annals of Internal Medicine* [online]. 1988, 109(10), 783.

Reeves M, Murphy J, Greaves R, Fairley J, Brehm A, Sinclair J (2006) Autorepression of the human cytomegalovirus major immediate-early promoter/enhancer at late times of infection is mediated by the recruitment of chromatin remodeling enzymes by IE86. *J Virol* 80(20):9998–10009.

Reeves MB, MacAry PA, Lehner PJ, Sissons JG, Sinclair JH (2005) Latency, chromatin remodeling, and reactivation of human cytomegalovirus in the dendritic cells of healthy carriers. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(11):4140–4145.

Reeves, M. B. a J. H. Sinclair. Circulating Dendritic Cells Isolated from Healthy Seropositive Donors Are Sites of Human Cytomegalovirus Reactivation In Vivo. *Journal of Virology* [online]. 2013, 87(19), 10660-10667.

Renne R, Zhong W, Herndier B, et al. Lytic growth of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in culture. *Nat Med* 1996; 2:342–346.

Revello, M. G. and Gerna, G. (2010), Human cytomegalovirus tropism for endothelial/epithelial cells: scientific background and clinical implications. *Rev. Med. Virol.*, 20: 136–155.

Reynolds DW, Stagno S, Hosty TS, Tiller M and Alford CA, Jr. Maternal cytomegalovirus excretion and perinatal infection. *N Engl J Med* 1973;289:1-5.

Ribbert H (1904) Ueber protozoenartige Zellen in der Niere eines syphilitischen Neugeborenen und in der Parotis von Kindern. *Zbl All Pathol* 15:945–948.

Roback JD, Drew WL, Laycock ME, Todd D, Hillyer CD, Busch MP. CMV DNA is rarely detected in healthy blood donors using validated PCR assays. *Transfusion*. 2003;43:314–21.

Roback JD, Hillyer CD, Drew WL, Laycock ME, Luka J, Mocarski ES, Slobedman B, Smith JW, Soderberg-Naucleer C, Todd DS, Woxenius S, Busch MP. Multicenter evaluation of PCR methods for detecting CMV DNA in blood donors. *Transfusion*. 2001;41:1249–57.

Roberts, P J a C J Der. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* [online]. 2007, 26(22), 3291-3310. Doi: 10.1038/sj.onc.1210422.

Rodems, S.M. and Spector, D.H. (1998) Extracellular signalregulated kinase activity is sustained early during human cytomegalovirus infection. *J. Virol.* 72, 9173–9180.

Roizman B. Polykaryosis: results from fusion of mononucleated cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1962;27:327–342.

Roux, P. P. a J. Blenis. ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. 2004, 68(2), 320-344. Doi: 10.1128/MMBR.68.2.320-344.2004.

Sabirzhanov B, Stoica BA, Hanscom M, Piao CS, Faden AI (2012) Over-expression of HSP70 attenuates caspase-dependent and caspase- independent pathways and inhibits neuronal apoptosis. *J Neurochem* 123(4):542–554.

Sagedal S, Hartmann A, Nordal KP, et al. Impact of early cytomegalovirus infection and disease on long-term recipient and kidney graft survival. *Kidney Int* 2004;66:329-37.

Sampathkumar P, Paya F. Pathogenesis in transplant recipients. In: EmeryVC, ed. *Human Cytomegalovirus*. London: Intl Med Press, 2007:7.1-7.14.

Seckert CK, Griessl M, Buttner JK, Scheller S, Simon CO, Kropp KA, Renzaho A, Kuhnappel B, Grzimek NK, Reddehase MJ (2012) Viral latency drives ‘memory inflation’: a unifying hypothesis linking two hallmarks of cytomegalovirus infection. *Med Microbiol Immunol* 201(4):551–566.

Shieh, S.-Y. DNA damage-inducible phosphorylation of p53 at N-terminal sites including a novel site, Ser20, requires tetramerization. *The EMBO Journal* [online]. 1999, 18(7), 1815-1823. Doi: 10.1093/emboj/18.7.1815.

Shieh, Sheau-Yann, Masako Ikeda, Yoichi Taya a Carol Prives. DNA Damage-Induced Phosphorylation of p53 Alleviates Inhibition by MDM2. *Cell* [online]. 1997, 91(3), 325-334. Doi: 10.1016/S0092-8674(00)80416-X.

Schleiss, Mark R., Craig J. Bierle, Elizabeth C. Swanson, Michael A. Mcvoy, Jian Ben Wang, Zainab Al-Mahdi, Adam P. Geballe a K. Frueh. Vaccination with a Live Attenuated Cytomegalovirus Devoid of a Protein Kinase R Inhibitory Gene Results in Reduced Maternal Viremia and Improved Pregnancy Outcome in a Guinea Pig Congenital Infection Model. *Journal of Virology* [online]. 2015, 89(19), 9727-9738.

Schleiss, Mark R., Sallie R. Permar, Stanley A. Plotkin a Christopher J. Papasian. Progress toward Development of a Vaccine against Congenital Cytomegalovirus Infection. *Clinical and Vaccine Immunology* [online]. 2017, 24(12), e00268-17.

Schmidt, D., Martens, P. B., Weyand, C. M., & Goronzy, J. J. (1996). The repertoire of CD4+ CD28- T cells in rheumatoid arthritis. *Molecular Medicine*, 2(5), 608–618.

Sinclair J, Poole E (2014) Human cytomegalovirus latency and reactivation in and beyond the myeloid lineage. *Future Virol* 6:7.

Sinclair J, Sissons P (2006) Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 87(Pt 7):1763–1779.

Slobedman B, Mocarski ES. Quantitative analysis of latent human cytomegalovirus. *J Virol*. 1999;73:4806–12.

Smith MG (1956) Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SVG) disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 92:424–430.

Smith, M. G., *PROC. SOC. EXP. BIOL. AND MED.*, 1954, V86, 277.

Soderberg-Naucler C. HCMV microinfections in inflammatory diseases and cancer. *J Clin Virol* 2007.

Stagno S, Pass RF, Cloud G, et al. Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome. *Jama* 1986;256:1904-8.

Stagno S. In: Remington J, Klein S, eds. *Infectious diseases of the Fetus & Newborn infant*. 5th ed. Philadelphia: W B Saunders, 2001:389-424.

Suárez NM, Lau B, Kemble GM, Lee R, Mocarski ES, Wilkinson GWG, Adler SP, McVoy MA, Davison AJ. 2017. Genomic analysis of chimeric human cytomegalovirus vaccine candidates derived from strains Towne and Toledo. *Virus Genes* 53:650-655.

Švec, Jiří. *Radioaktivita a ionizující záření: doplňující učební text pro předměty Bakalářská fyzika, Aplikovaná fyzika, Ochrana před zářením*. Ostrava: Sdružení požárního a bezpečnostního inženýrství, 2005. ISBN 8086634620.

Takahashi K, Segal E, Kondo T, et al. Interferon and natural killer cell activity in patients with exanthem subitum. *Pediatr Infect Dis J* 1992; 11:369–373.

Taylor-Wiedeman J, Sissons JG, Borysiewicz LK, Sinclair JH. Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *J Gen Virol*. 1991;72:2059–64.

Thewissen, Marielle, Veerle Somers, Koen Venken, Loes Linsen, Pieter van Passen, Piet Geusens, Jan Damoiseaux a Piet Stinissen. Analyses of immunosenescent markers in patients with autoimmune disease. *Clinical Immunology* [online]. 2007, 123(2), 209-218.

Tibbetts, R. S., Brumbaugh, K. M., Williams, J. M., Sarkaria, J. N., Cliby, W. A., Shieh, S.-Y., ... Abraham, R. T. (1999). A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes & Development*, 13(2), 152–157.

Tseng A, Foisy M. The role of ganciclovir for the management of cytomegalovirus retinitis in HIV patients: Pharmacological review and update on new developments. *The Canadian Journal of Infectious Diseases*. 1996;7(3):183-194.

Tu W, Chen S, Sharp M, et al. Persistent and selective deficiency of CD4⁺ T cell immunity to cytomegalovirus in immunocompetent young children. *J Immunol* 2004;172:3260-7.

Ullrich, S. J., Sakaguchi, K., Lees-Miller, S. P., Fiscella, M., Mercer, W. E., Anderson, C. W., & Appella, E. (1993). Phosphorylation at Ser-15 and Ser-392 in mutant p53 molecules from human tumors is altered compared to wild-type p53. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(13), 5954–5958.

Urban M, Klein M, Britt WJ, Hassfurth E and Mach M. Glycoprotein H of human cytomegalovirus is a major antigen for the neutralizing humoral immune response. *J Gen Virol* 1996;77 (Pt 7):1537-47.

van Leeuwen EM, Remmerswaal EB, Heemskerk MH, ten Berge IJ and van Lier RA. Strong selection of virus-specific cytotoxic CD4⁺ T cell clones during primary human cytomegalovirus infection. *Blood* 2006;108:3121-7.

van Leeuwen EM, Remmerswaal EB, Vossen MT, et al. Emergence of a CD4⁺CD28⁻granzyme B⁺, cytomegalovirus-specific T cell subset after recovery of primary cytomegalovirus infection. *J Immunol* 2004;173:1834-41.

Voet, Donald a Judith G. Voet. *Biochemistry*. 3rd ed. Hoboken, N.J: John Wiley, 2004. ISBN 047119350X. str. 1616.

Von Glahn WC, Pappenheimer AM (1925) Intranuclear inclusions in visceral disease. *Am J Pathol* 1:445–465.

Vondráčková, L.; Horvath, V.; Žůrek, D. O zlatých elektrodách. *Labor Aktuell* [online]. 2010, 01.

Wang ECY, Moss PA, Frodsham P, Lehner PJ, Bell JI, Borysiewicz LK. CD8^{high}CD57⁺T lymphocytes in normal, healthy individuals are oligoclonal and respond to human cytomegalovirus. *J Immunol*. 1995;155:5046–5056.

Weber-Nordt RM, Henschler R, Schott E, Wehinger J, Behringer D, Mertelsmann R, Finke J (1996) Interleukin-10 increases Bcl-2 expression and survival in primary human CD34⁺ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 88(7):2549–2558.

Weekes MP, Tan SY, Poole E, Talbot S, Antrobus R, Smith DL, Montag C, Gygi SP, Sinclair JH, Lehner PJ (2013) Latency-associated degradation of the MRP1 drug transporter during latent human cytomegalovirus infection. *Science* 340(6129):199–202.

Weekes, Michael P., Peter Tomasec, Edward L. Huttlin, et al. Quantitative Temporal Viromics: An Approach to Investigate Host-Pathogen Interaction. *Cell* [online]. 2014, 157(6), 1460-1472.

Weller TH, Macauley JC, Craig JM, Wirth P (1957) Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illnesses resembling cytomegalic inclusion disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 94:4–12.

Wen, Zilong, Zhong Zhong a James E Darnell. Maximal activation of transcription by stat1 and stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* [online]. 1995, 82(2), 241-250. Doi: 10.1016/0092-8674(95)90311-9.

Wills MR, Carmichael AJ, Mynard K, et al. The human cytotoxic Tlymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T- cell receptor usage of pp65-specific CTL. *J Virol* 1996;70:7569-79.

Wills MR, Poole E, Lau B, Krishna B, Sinclair JH (2014) The immunology of human cytomegalovirus latency: Could latent infection be cleared by novel immunotherapeutic strategies? *Cell Mol Immunol*.

Wussow F, Chiuppesi F, Martinez J, Campo J, Johnson E, et al. (2014) Human Cytomegalovirus Vaccine Based on the Envelope gH/gL Pentamer Complex. *PLoS Pathog* 10(11): e1004524.

Wyatt, J. P., Saxton, J., Lee, R. S., and Pinkerton, H., *J. Pediat.*, 1950, 36, 271.

Yang, Elizabeth, Jiping Zha, Jennifer Jockel, Lawrence H Boise, Craig B Thompson a Stanley J Korsmeyer. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-xL and Bcl-2, displaces bax and promotes cell death. *Cell* [online]. 1995, 80(2), 285-291. Doi: 10.1016/0092-8674(95)90411-5.

Yang, Ping-Chang a Tahrin Mahmood. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences* [online]. 2012, 4(9), 429-
Yokogami, Kiyotaka, Shinichiro Wakisaka, Joseph Avruch a Steven A. Reeves. Serine phosphorylation and maximal activation of STAT3 during CNTF signaling is mediated by the rapamycin target mTOR. *Current Biology* [online]. 2000, 10(1), 47-50. Doi: 10.1016/S0960-9822(99)00268-7.

Zanghellini F, Boppana SB, Emery VC, Griffiths PD and Pass RF. Asymptomatic primary cytomegalovirus infection: virologic and immunologic features. *J Infect Dis* 1999;180:702-7.

Zha, Jiping, Hisashi Harada, Elizabeth Yang, Jennifer Jockel a Stanley J Korsmeyer. Serine Phosphorylation of Death Agonist BAD in Response to Survival Factor Results in Binding to 14-3-3 Not BCL-XL. *Cell* [online]. 1996, 87(4), 619-628. Doi: 10.1016/S0092-8674(00)81382-3.

Zhou, Binhua P., Yong Liao, Weiya Xia, Bill Spohn, Mong-Hong Lee a Mien-Chie Hung. Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nature Cell Biology* [online]. 2001, 3(3), 245-252. Doi: 10.1038/35060032. ISSN 1465-7392.

Ziebolz, Burkhard. 2010. *Cell Analysis*. Heidelberg, 2010, 4-7.

Zorzi E, Bonvini P (2011) Inducible hsp70 in the regulation of cancer cell survival: analysis of chaperone induction, expression and activity. *Cancers* 3(4):3921–3956.

Zou, Hua, Yuchen Li, Xuesong Liu a Xiaodong Wang. An APAF-1·Cytochrome c Multimeric Complex Is a Functional Apoptosome That Activates Procaspase-9. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1999, 274(17), 11549-11556. Doi: 10.1074/jbc.274.17.11549.

Seznam webových stránek

1 - <http://web.biosci.utexas.edu/field/mic361a/herpes.htm> ze dne 21. 1. 2018

2 - <http://fbmi.sirdik.org/7-kapitola/75.html>

3 - <http://www.uniprot.org/uniprot/Q14790> ze dne 30. 4. 2018

<http://labguide.cz/metody/western-blot/>

<http://labguide.cz/wp-content/uploads/2014/10/western-final-1024x500.jpg>

ze dne 12. 3. 2018

<http://web.biosci.utexas.edu/field/mic361a/herpes.htm> ze dne 21. 1. 2018

<http://www.cellsignal.com/common/content/content.jsp?id=pathscan-antibody-arrays>

ze dne 15. 4. 2015

<http://www.drobkysveta.estranky.cz/clanky/chemie/western-blot.html>

<http://www.oatext.com/Twenty-five-years-of-studies-and-trials-for-the-therapeutic-application-of-IL-10-immunomodulating-properties-From-high-doses-administration-to-low-dose-medicine-new-paradigm.php> ze dne 13. 3. 2018

<https://media.cellsignal.com/pdf/13047.pdf>

<https://media.cellsignal.com/pdf/7982.pdf>

<https://media.cellsignal.com/pdf/9474.pdf>

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/93/Western_blot_transfer.png

ze dne 12. 3. 2018

<https://www.aceabio.com/products/rtca-dp/> ze dne 13. 3. 2018

<https://www.fbi.vsb.cz/export/sites/fbi/050/.content/sys-cs/resource/PDF/studijni-materialy/zareni.pdf> ze dne 23. 4. 2018

<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>

<http://www.rochediagnostics.cz/download/la/0110/Elektrody.pdf>