

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

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



Bc. Jana Elsterová

Patogeneze *eczema vaccinatum*
Pathogenesis of *eczema vaccinatum*

Diplomová práce

Školitel: MUDr. Zora Mělková, Ph.D.

Praha, 2012

Prohlášení:

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

V Praze, 06.09.2012

Podpis

Poděkování

V první řadě bych chtěla poděkovat své školitelce paní MUDr. Zoře Mělkové, Ph.D. za odborné vedení a trpělivost.

Ráda bych také poděkovala laborantce paní Monice Kaplanové a paní RNDr. Věře Hájkové za pomoc s experimenty *in vivo* a cenné rady. Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu virologické laboratoře Ústavu imunologie a mikrobiologie 1 LF. UK v Praze.

V neposlední řadě děkuji Ing. Janu Špačkovi za rady při statistickém vyhodnocení výsledků a mé rodině za podporu.

Abstrakt

Virus vakcínie (VACV) je znám především jako vakcína proti jemu příbuznému viru variola, který je původcem černých neštovic. Tímto očkováním byly černé neštovice v 70. letech 20. století eradikovány a následně bylo očkování proti této chorobě zastaveno. V současnosti se v některých zemích opět začalo s očkováním, a to u vybraných armádních zaměstnanců a u zdravotníků. Očkování VACV však ve vysokém procentu způsobuje komplikace, zejména u imunokompromitovaných jedinců. Jednou z komplikací je i *eczema vaccinatum*, které se může rozvinout u lidí trpících atopickou dermatitidou.

Laboratoř MUDr. Zory Mělkové, Ph.D. se dlouhodobě zabývá vývojem modelu *eczema vaccinatum* na myších Nc/Nga a studiem patogeneze této komplikace. Cílem mé diplomové práce je přispět k charakterizaci imunopatogeneze *eczema vaccinatum* u myši Nc/Nga infikovaných VACV kmene Western Reverse (WR) a rekombinantním virem vakcínie WR-IRF3 s integrovanou cDNA pro transkripční faktor IRF-3 (Interferon Regulatory Factor 3). IRF-3 reguluje expresi interferonů typu I v odpověď na virovou infekci a tento rekombinant byl v minulosti zkonstruován v laboratoři MUDr. Zory Mělkové, Ph.D. Mým cílem bylo ověřit expresi integrované cDNA pro IRF-3 a charakterizovat růst tohoto rekombinantního viru.

Z výsledků získaných pomocí RT-PCR pro vybrané cytokiny (IL-1 β , IL-18 a IL-33) exprimované v kůži nesenzitizovaných myši Nc/Nga se zdá, že infekce VACV kmene WR modifikuje expresi IL-1 β a IL-33. Na detekci exprese IL-18 infekce VACV neměla vliv. Detekci cDNA pro jednotlivé cytokiny ovlivňoval také způsob senzitzace a inokulace VACV. Dále byl charakterizován růst rekombinantního viru WR-IRF3 *in vitro* a *in vivo*. Z experimentů na myších Nc/Nga vyplývá, že imunitní odpověď na infekci rekombinantním virem WR-IRF3 je zvýšená.

Klíčová slova

virus vakcínie, *eczema vaccinatum*, atopická dermatitida, IL-1 β , IL-18, IL-33, myši Nc/Nga, IRF-3 transkripční faktor

Abstract

Vaccinia virus (VACV) is primarily known as a vaccine against its close relative variola virus, the causative agent of smallpox. In the seventies of the 20th century, the vaccination campaign with VACV led to eradication of smallpox. Consequently, vaccination of the general population was stopped. Currently, the vaccination was reintroduced in certain countries, namely among army and healthcare professionals. However, vaccination with VACV is accompanied with a high incidence of vaccination-related complications, namely among immunocompromised individuals. One of these complications is *eczema vaccinatum*, occurring in individuals suffering of atopic dermatitis.

The laboratory of Dr. Zora Mělková has focused on development of a model of *eczema vaccinatum* in mice Nc/Nga and on studies of pathogenesis of this complication. The goal of my diploma thesis is to contribute to characterization of immunopathogenesis of *eczema vaccinatum* in mice Nc/Nga infected either with VACV strain Western Reserve (WR) or with a recombinant VACV with the integrated cDNA for IRF-3 (Interferon Regulatory Factor 3; WR-IRF3). IRF-3 regulates the expression of interferon type I in response to viral infection. This recombinant virus has been previously constructed in the laboratory of Dr. Zora Mělková. The objective of my work was to verify the expression of the integrated cDNA for IRF-3 and to characterize the growth of this recombinant virus.

The results were obtained by RT-PCR from the skin of mice Nc/Nga with specific primers for certain cytokines (IL-1 β , IL-18 a IL-33). They suggest that infection with VACV strain WR modifies the expression of IL-1 β and IL-33, while the infection has not affected expression of IL-18. The detection of cDNA for each cytokine was affected also by the way of sensitization and inoculation of VACV. Further, the growth of the recombinant virus WR-IRF3 was characterized *in vitro* and *in vivo*. The results of these experiments suggest that immune responses against infection with recombinant virus WR-IRF3 are increased.

Key words

Vaccinia virus, *eczema vaccinatum*, atopic dermatitis, IL-1 β , IL-18, IL-33, Nc/Nga mice, IRF-3 transcription factor

Zkratky:

AD – atopic dermatitis – atopická dermatitida

AP – acetamido-phenol - acetamidofenol

BALB/c – kmen myší

bp – base pair – pár bází

BSC-40 - African green monkey kidney cell line – buněčná linie z ledvinných buněk kočkodana zeleného

C57Bl/6 – kmen myší

CEV - cell-associated enveloped virion - obalený virion asociovaný s buňkou

CIITA - MHC class II transcription activator – transkripční aktivátor MHC třídy II

CrmA - Cytokine response modifier A

DAI - DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors

DAMP – danger-associated molecular pattern – molekulární vzor asociovaný s nebezpečím

DC – dendritic cell – dendritická buňka

DDX3 - DEAD/H BOX 3 helicase - DEAD/H BOX 3 helikáza

DMEM – Dulbecco's modified Eagle medium – modifikované Dulbecco Eaglovo medium

DNA – deoxyribonucleic acid – deoxyribonukleová kyselina

d.p.i. – days post infection – dny po infekci

dsRNA – double strand RNA – dvouvláknová RNA

EEV - extracellular enveloped virion - extracelulární obalený virion

eIF2 – eukaryotic initiation factor 2 – eukaryotický iniciační faktor 2

EtBr – ethidium bromid

FBS – fetal bovine serum – fetální bovinní sérum

GAPDH - glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase – glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza

h.p.i. – hours post infection – hodiny po infekci

IFN - interferon

IFNAR - interferon- α/β receptor – receptor pro interferon α/β

IKK - I κ B kinase - I κ B kináza

IL - interleukin

ILR – interleukin receptor – receptor interleukinu

IMV - intracellular mature virion - intracelulární maturovaný virion

IPS-1 - interferon-beta promoter stimulator 1 – stimulátor 1 promotoru interferonu beta
IRAK - interleukin-1 receptor-associated kinase – kináza asociovaná s interleukin-1 receptorem
Jak – Janus kinase – Janusova kináza
kDa – kilo Dalton
LB pufr – loading buffer – nanášecí pufr
LRR - leucine-rich repeat – repetice bohatá na leucin
MAL - myelin and lymphocyte protein – myeloidní a lymfocytární protein
MAPK – mitogen-activated protein kinase – mitogenem aktivovaná protein kináza
M.O.I. – multiplicity of infection – multiplicita infekce
mRNA – messenger RNA – mediátorová RNA
mTOR – mammalian target of rapamycin
MyD88 - myeloid differentiation primary response gene 88 – myeloidní diferenační primární responzivní gen 88
NAIP - neuronal apoptosis inhibitory protein – protein inhibující apoptózu nervu
Nc/Nga – kmen myši
neinf. – neinfikované buňky
NCS – neonatal calve serum – neonatální telecí sérum
NF-κB - nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells – lehký řetězec enhanceru jaderného faktoru pro aktivované B buňky
NIH 3T3 - mouse embryonic fibroblast cell line – buněčná linie myších embryonálních fibroblastů
NK - natural killer - přirozený zabijáč
2'-5' OAS - 2',5'-oligoadenylate synthetase - 2',5'-oligoadenylát syntáza
ORF – open reading frame – otevřený čtecí rámeček
OVA – ovoalbumin - ovoalbumin
p38 - p38 mitogen-activated protein kinase – mitogenem aktivovaná protein kináza 38
PAMP – pathogen-associated molecular pattern – molekulární vzor asociovaný s patogenem
PBS – phosphate buffer saline – fosfátový pufr
PCR – polymerase chain reaction – polymerázová řetězová reakce
PFU – plaque forming unit
PYD 3 - pyrin domain 3 – pyrinová doména 3
RIG-I - retinoic acid-inducible gene 1 – gen 1 indukovatelný retinovou kyselinou

RNA – ribonucleic acid – ribonukleová kyselina
ROR γ - RAR-related orphan receptor gamma
rpm – revolutions per minute – otáčky za minutu
rRNA – ribosomal RNA – ribozomální RNA
RSB – reducing sample buffer – redukční vzorkovací pufr
RT – reverse transkriptase – reverzní transkriptáza
SARM - sterile alpha- and armadillo-motif-containing protein – protein obsahující sterilní alfa a armadillo motiv
SDS – sodium dodecyl sulphate – sodium dodecyl sulfát
SDS-PAGE – SDS polyacrylamide gel electrophoresis – SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza
SEM – standard error of mean – standardní chyba mediánu
SNP – single nucleotid polymorphism – jednonukleotidový polymorfismus
STAT - signal transducer and activator of transcription – transduktor signálu a aktivátor transkripce
TANK - TRAF family member-associated NF-kappa-B activator – člen TRAF rodiny asociovaný s NF-kappa-B aktivátorem
TBE – Tris borate EDTA – Tris-kyselina boritá-EDTA
T-bet - T-box expressed in T cells – T-box exprimovaný v T buňkách
TBK1 - TANK-binding kinase 1 – kináza 1 vázající TANK
TEMED – tetramethylethylenediamine - tetramethylethylenediamin
TIR - toll/interleukin-1 receptor – toll/interleukin-1 receptor
TNF – tumor necrosis factor – tumor nekrotizující faktor
TP1 - telomerase-associated protein 1 – protein 1 asociovaný s telomerázou
TRAM - translocating chain-associating membrane protein – membránový protein asociovaný s translokačním lehkým řetězcem
TRIF - TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β – adapter obsahující TIR doménu indukující interferon β
TS - tapestripping
VACV - vaccinia virus - virus vakcínie
VCP - vaccinia virus complement control protein – vakcíniový protein kontrolující komplement
WHO – World Health Organisation – Světová zdravotnická organizace
WR – Western Reserve

WR-IRF3 – VACV exprimující IRF-3 pod časným a pozdním promotorem 7,5
WR-Luc – VACV exprimující luciferázu pod časným a pozdním promotorem 7,5
WR-wt – WR-wild type – WR-divoký kmen

Obsah

1. Úvod	14
2. Literární přehled	16
2.1. Charakteristika čeledi <i>Poxviridae</i>	16
2.1.1. Klasifikace	16
2.1.2. Struktura	16
2.1.3. Genom poxvirů	17
2.1.4. Vstup poxvirů do buňky	17
2.1.5. Růstový cyklus poxvirů	18
2.1.5.1. Časná transkripce	20
2.1.5.2. Replikace a její regulace	20
2.1.5.3. Intermediární a pozdní transkripce	21
2.1.6. Vliv infekce poxviry na hostitelskou buňku	21
2.2. Imunitní odpověď proti poxvirům	22
2.2.1. TLR signalizace	23
2.2.2. RLR signalizace	24
2.2.3. NLR signalizace	24
2.2.4. DAI signalizace	25
2.3. Cytokiny důležité při protivirové odpovědi	25
2.3.1. Interferon α a interferon β	25
2.3.2. Interleukiny a další cytokiny důležité při protivirové odpovědi	28
2.3.2.1. Interleukin-1	29
2.3.2.2. Interleukin-18	30
2.3.2.3. Interleukin-33	30
2.4. Obrana poxvirů proti imunitní odpovědi hostitele	31
2.5. VACV inhibitory imunitní odpovědi	32
2.5.1. Inhibitory interferonů	32
2.5.2. Inhibitory interleukinů a dalších cytokinů	34
2.5.3. Inhibitory apoptózy	35
2.5.4. Inhibitory drah NF- κ B a IRF-3	36
2.6. Atopická dermatitida	37
2.7. Očkování VACV a postvakcinační komplikace	40
2.7.1. Očkování VACV	40
2.7.2. <i>Eczema vaccinatum</i>	41
3. Materiál a metody	42
3.1. Materiál	42
3.1.1. Chemikálie a roztoky	42
3.1.1.1. Chemikálie	42
3.1.1.2. Roztoky	42
3.1.2. Kultivační média a přísady	43
3.1.3. Protilátky	44
3.1.4. Hmotnostní standardy	44
3.1.5. Kity	44
3.1.6. Přístroje, nástroje a programy	44
3.1.6.1. Přístroje	44
3.1.6.2. Nástroje a pomůcky	45
3.1.6.2.1. Nástroje a pomůcky s myšmi	45
3.1.6.2.2. Pipety	45
3.1.6.2.3. Laboratorní plast	46

3.1.6.2.4. Ostatní použitý materiál pro molekulárně biologické techniky	46
3.1.6.3. Počítačové programy	46
3.1.7. Buněčné linie	47
3.1.8. Myši kmeny	47
3.1.9. Viry	47
3.1.10. Plazmidy	47
3.2. Metody	48
3.2.1. Metody <i>in vitro</i>	48
3.2.1.1. Pasážování buněk	48
3.2.1.2. Počítání buněk	49
3.2.1.3. Nasetí buněk	49
3.2.1.4. Příprava hrubého extraktu viru	49
3.2.1.5. Příprava purifikovaného viru	50
3.2.1.6. Stanovení infekčního titru hrubého extraktu viru a purifikovaného viru	50
3.2.1.7. Infekce buněčných linií	50
3.2.1.8. Sklizení	51
3.2.1.8.1. Sklizení na stanovení infekčního titru viru	51
3.2.1.8.2. Sklizení na detekci exprese genu pomocí RT-PCR	51
3.2.1.8.3. Sklizení na detekci proteinu pomocí western blot analýzy	52
3.2.1.9. Stanovení růstu viru plakovou zkouškou	52
3.2.1.10. Western blot analýza	52
3.2.1.10.1. Příprava vzorku	53
3.2.1.10.2. SDS-PAGE	53
3.2.1.10.3. Transblot	53
3.2.1.10.4. Imunoblot	55
3.2.1.11. Detekce exprese genů pomocí RT-PCR	55
3.2.1.11.1. Izolace RNA	55
3.2.1.11.2. Měření koncentrace RNA	56
3.2.1.11.3. Ošetření RNA DNázou	56
3.2.1.11.4. Reverzní transkripce	56
3.2.1.11.5. Polymerázová řetězová reakce (PCR)	57
3.2.1.11.6. Elektroforéza	57
3.2.2. Metody <i>in vivo</i>	58
3.2.2.1. Senzitizace myši	58
3.2.2.2. Infekce myši	59
3.2.2.2.1. Příprava virového inokula	59
3.2.2.2.2. Aplikace virového inokula na pokožku myši Nc/Nga	59
3.2.2.3. Usmrcení myši a odběr tkáně	60
3.2.2.4. Zpracování vzorku tkáně	60
3.2.2.4.1. Stanovení infekčního titru infikované tkáně	60
3.2.2.4.2. Detekce exprimovaného genu z infikované tkáně	61
3.2.2.5. Statistické vyhodnocení	61
4. Výsledky	62
4.1. Experimenty <i>in vitro</i>	62
4.1.1. Charakterizace růstu hrubého extraktu viru WR-IRF3 v ledvinných buňkách kočkodana zeleného BSC-40	62

4.1.1.1. Hrubý extrakt rekombinantního viru WR-IRF3 exprimuje mRNA pro IRF-3 transkripční faktor	62
4.1.1.2. Stanovení růstu hrubého extraktu viru WR-IRF3 v buňkách BSC-40	64
4.1.1.3. Charakterizace exprese VACV proteinů	64
4.1.2. Charakterizace růstu hrubého extraktu rekombinantního viru WR-IRF3 v buňkách myších embryonálních fibroblastů NIH 3T3	66
4.1.2.1. Hrubý extrakt rekombinantního viru WR-IRF3 exprimuje IRF-3 v buňkách NIH 3T3	66
4.1.2.2. Stanovení růstu hrubého extraktu rekombinantního viru WR-IRF3 v buňkách myších embryonálních fibroblastů NIH 3T3	70
4.1.3. Charakterizace růstu purifikovaného rekombinantního viru WR-IRF3 v buňkách NIH 3T3	72
4.1.3.1. Příprava purifikovaného rekombinantního viru WR-IRF3	72
4.1.3.2. Purifikovaný rekombinantní virus WR-IRF3 exprimuje IRF-3	72
4.1.3.3. Stanovení růstu purifikovaného rekombinantního viru WR-IRF3	75
4.1.4. Pozitivní kontrola pro detekci cytokinů – myší makrofágy J774.G8 infikované virem VACV kmene WR	76
4.2. Experimenty <i>in vivo</i>	79
4.2.1. Charakterizace vlivu různého ošetření místa senzitivace a infekce myší Nc/Nga na expresi cytokinů	79
4.2.1.1. Vliv aplikace náplasti a „tapestrippingu“ na charakter exprese cytokinů u myší Nc/Nga bez senzitivace	80
4.2.1.2. Vliv aplikace náplasti a „tapestrippingu“ na charakter exprese cytokinů u myší Nc/Nga senzitivovaných OVA	89
4.2.2. Vliv infekce purifikovaného rekombinantního viru WR-IRF3 <i>in vivo</i>	96
4.2.2.1. Detekce cytokinů v kůži myší Nc/Nga inokulovaných WR-IRF3	96
4.2.2.2. Charakterizace vlivu rekombinantního viru WR-IRF3 na patogenezi u myší Nc/Nga	101
5. Diskuse	107
5.1. Charakterizace WR-IRF3	
5.2. Charakterizace odpovědi myší Nc/Nga na imunizaci virem vakcínie	107
5.2.1. Vliv různého způsobu senzitivace a infekce na detekci cDNA jednotlivých cytokinů	112
5.2.2. Charakterizace odpovědi na imunizaci myší Nc/Nga rekombinantním virem WR-IRF3	115
6. Shrnutí	117
7. Seznam literatury	118

1. Úvod

Do čeledi *Poxviridae* patří kromě viru vakcínie (VACV), zejména její blízké příbuzný variola virus, původce černých (pravých) neštovic. V roce 1796 začal Edward Jenner očkovat proti černým neštovicím virem kravských neštovic, méně patogenním kmenem této čeledi. V roce 1939 Downie prokázal, že očkovačím kmenem není již virus kravských neštovic, ale jiný virus, který byl pojmenován *vaccinia virus*. Původ viru vakcínie není dodnes znám.

Mezinárodní zdravotnická organizace WHO (World Health Organization) vyhlásila eradikační program černých neštovic očkováním virem vakcínie, který byl v roce úspěšně 1980 ukončen. V současnosti se v některých zemích, zejména v USA, očkuje pouze armádní personál a vybraní zdravotníci vakcínou 1. generace Dryvax nebo 2. generace ACAM 2000. Vzhledem k riziku zneužití viru varioly jako bioteroristické zbraně se uvažuje o opětovném celoplošném očkování proti tomuto viru (Artenstein, 2009). Očkování virem vakcínie však způsobuje závažné zdravotní komplikace. Jednou z nich je rozsev vakcínie v kůži, tzv. *eczema vaccinatum*, který se může vyvinout u jedinců trpících atopickou dermatitidou.

Laboratoř MUDr. Zory Mělkové Ph.D. se dlouhodobě zabývá patogenezí viru vakcínie (VACV), v posledních letech i na myším modelu atopické dermatitidy Nc/Nga. Záměrem této laboratoře je charakterizace imunitní odpovědi u myši Nc/Nga infikovaných virem vakcínie. Počáteční práce jsou zaměřeny na produkci cytokinů v kůži infikovaných myši. Moje diplomová práce charakterizuje expresi cytokinů rodiny interleukinu 1 (IL-1), a to konkrétně IL-1 β , IL-18 a IL-33. Moje diplomová práce navazuje na dizertační práci Mgr. Jarmily Knitlové, která porovnává odpověď na virus vakcínie u myšičího kmene Nc/Nga s dalšími dvěma kmeny, C57Bl/6 a BALB/c (Knitlová, in preparation).

Životní cyklus VACV probíhá v cytoplasmě hostitelské buňky. Z tohoto důvodu virus kóduje nejen mnoho proteinů katalyzujících virovou replikaci a transkripci, ale i různé proteiny modifikující odpověď infikované buňky a organismu (Moss, 1990). Inhibuje např. cytokinovou a chemokinovou odpověď, brání aktivaci komplementu, modifikuje produkci interferonů (IFN) a reguluje apoptózu.

Jedním z hlavních účinných mechanismů přirozené imunitní odpovědi v obraně proti virové infekci je produkce interferonů typu I. Ty jsou produkovány jako odpověď na

detekci tzv. PAMP (Pathogen-associated molecular pattern) receptory PRR (Pattern recognition receptor) v infikované buňce. Následná signalizace vede k fosforylaci a aktivaci transkripčních faktorů IRF (Interferon regulatory factors), které jsou translokovány do jádra, kde dimerizují a regulují tak transkripci genů pro IFN typu I, ke kterým patří IFN α a IFN β .

V laboratoři MUDr. Zory Mělkové, Ph.D. byl v minulosti Mgr. Jarmilou Knitlovou a Mgr. Janou Liškovou, Ph.D. zkonstruován rekombinantní VACV s integrovanou cDNA pro myši IRF-3 transkripční faktor (WR-IRF3).

Cílem mé diplomové práce bylo přispět k objasnění imunopatogeneze *eczema vaccinatum*, který může virus vakcínie způsobit u lidí trpících atopickou dermatitidou.

K naplnění vytčeného cíle jsme stanovili 3 úkoly:

1. Ověřit, zda rekombinantní VACV WR-IRF3 exprimuje integrovanou cDNA v buňkách BSC-40 a NIH 3T3, a charakterizovat účinek exprimovaného genu na růst viru.
2. Charakterizovat vliv různých způsobů senzitivace a imunizace myši Nc/Nga virem vakcínie na expresi cytokinů rodiny IL-1 (IL-1 β , IL-18 a IL-33).
3. Charakterizovat imunitní odpověď u myši Nc/Nga imunizovaných rekombinantním virem WR-IRF3.

2. Literární přehled

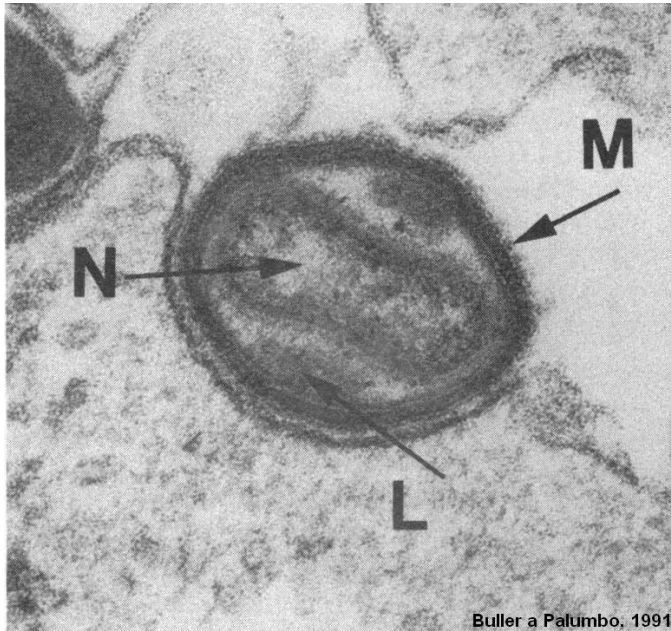
2.1. Charakteristika čeledi *Poxviridae*

2.1.1. Klasifikace

Virus vakcínie patří do čeledi *Poxviridae* a podčeledi *Chordopoxviridae*, jejíž zástupci infikují obratlovce. Charakteristické pro tuto čeleď jsou replikace virionu v cytoplasmě hostitelské buňky, specifický tvar a velikost virionu. Podčeleď *Chordopoxviridae* je dále členěna do osmi rodů na základě podobností v sekvenci genomu a hostitelů. Virus vakcínie patří do rodu *Orthopoxviridae* (Buller a Palumbo, 1991).

2.1.2. Struktura

Zástupci čeledi *Poxviridae* patří mezi největší doposud známé viry a mají oválný tvar o velikosti přibližně 200 x 400 nm. Virovou nukleovou kyselinu obklopuje bikonkávní jádro, tzv. core. To je spolu s postranními laterálními tělísky obaleno lipoproteinovou dvouvrstvou membránou (Buller a Palumbo, 1991). Existence laterálních tělísek je však zpochybňována a tělíška bývají často považována za artefakty (Dubochet et al., 1994). Struktura virionu je znázorněna na obrázku 1.



Obr.1: Struktura virionu poxviru z elektronového mikroskopu při zvětšení 12 000x (Buller a Palumbo, 1991).

M, membrána; L, laterální tělíska; N, nukleosom

2.1.3. Genom poxvirů

Genom poxvirů tvoří dvouvláknová lineární DNA, na jejímž konci jsou vlásenky tvořené tzv. invertovanými terminálními repeticemi bohatými na AT nukleotidové páry. Tyto vlásenky obsahují stejné sekvence v obráceném pořadí a spojují jednotlivá vlákna DNA na obou koncích.

Genom poxvirů je složen převážně z nepřekrývajících se genů, které tvoří funkční skupiny. Geny důležité pro replikaci se vyskytují ve střední vysoce konzervované části, naopak geny pro interakci s hostitelem se vyskytují na okrajích ve více variabilních oblastech genomu (Moss, 1990).

2.1.4. Vstup poxvirů do buňky

Viry této čeledi se vyskytují ve dvou infekčních formách, a to jako extracelulární obalený virion (EEV) a intracelulární maturovaný virion (IMV). IMV má pouze jednu vnější membránu, která se skládá z jedné lipidové dvojvrstvy, zatímco EEV je obalen dvěma lipidovými dvojvrstvami, a tudíž se liší způsobem vstupu do buňky (Smith *et al.*, 2002).

Poxviry jsou jednou z mála čeledí, u kterých doposud není znám receptor. Také se stále spekuluje o mechanismu vstupu viru do buňky. Virus nejspíše vstupuje do buňky více mechanismy, a to v závislosti na typu infekční partikule.

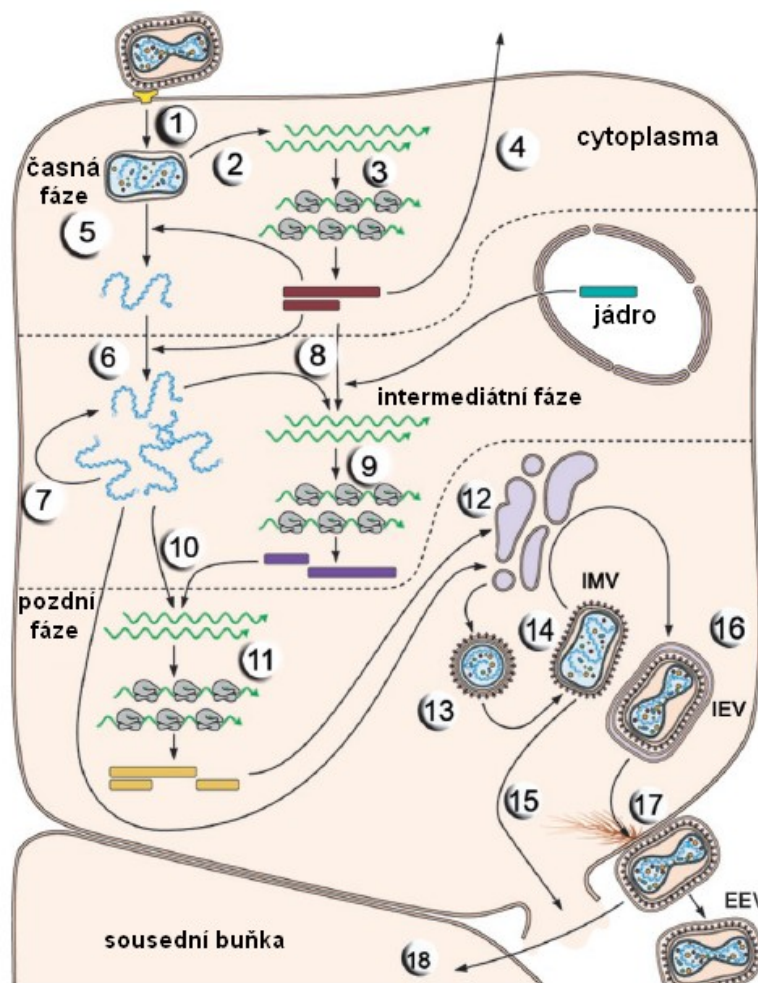
IMV proniká do hostitelské buňky fúzí s plasmatickou membránou nebo membránou endocytického váčku. Byly identifikovány virové proteiny, které se podílejí na vazbě a fúzi s buněčnou membránou a na vstupu do buňky. Nejsou to však esenciální proteiny vysvětlující strategii vstupu viru do buňky. Mezi tyto proteiny patří D8L (Hsiao *et al.*, 1999), který váže chondroitin sulfát, a A27L protein, který váže heparan sulfát (Chung *et al.*, 1998). Později byl objeven multiproteinový komplex, tzv. vstupní/fúzní komplex, který zahrnuje mnoho proteinů podílejících se na virové fúzi s plasmatickou membránou buňky (Senkevich *et al.*, 2005).

EEV, obsahující dvě membrány, musí vnější membránu odstranit před vstupem do buňky, jelikož multiproteinový vstupní/fúzní komplex, který umožní fúzi s plasmatickou membránou, je obsažen ve vnitřní membráně. EEV vstupuje do buňky fúzí s plasmatickou membránou při neutrálním pH (Law *et al.*, 2006), nebo fúzí s membránou endozomu při kyselém pH (Townesley *et al.*, 2006)

2.1.5. Růstový cyklus poxvirů

Růstový cyklus poxvirů probíhá v cytoplasmě od vstupu viru do buňky přes celý jeho replikační cyklus až po únik z buňky, což je popsáno na obrázku 2.

V závislosti na fázi životního cyklu se virion mění z intracelulárního maturovaného virionu (IMV) přes intracelulární obalený virion (IEV) na virion asociovaný s membránou (CEV), který pučí membránou ven z buňky exocytózou a tvoří extracelulární obalený virion (EEV). Další možností, jak virion opouští hostitelskou buňku, je indukce polymerizace aktinu v buňce a tvorba tzv. aktinových komet, v jejichž vrcholu se vyskytuje EEV, který tímto způsobem infikuje sousední buňku. Poslední známou variantou úniku virionu z infikované buňky je po její lýze, kdy jsou IMV uvolněny do mezibuněčného prostoru (Harrison *et al.*, 2004). Tento mechanismus znázorňuje obrázek 2.



Harrison et al., 2004

Obr. 2: Růstový cyklus poxvirů. 1. Vstup IMV nebo EEV do buňky fúzí virové membrány s buněčnou plazmatickou membránou a obnažení virového core. 2. Časná fáze transkripce pomocí virových enzymů přítomných ve virionu. 3. Translace časných virových mRNA pomocí buněčného proteosyntetického aparátu. 4. Některé z těchto proteinů jsou transportovány ven z infikované buňky (analogy buněčných růstových faktorů nebo proteiny modifikující imunitní odpověď hostitelské buňky). 5. Některé z těchto proteinů způsobují penetraci stěny virového core. 6. Některé z těchto proteinů katalyzují replikaci virového genomu. 7. Některé nově syntetizované molekuly DNA slouží jako matrice pro replikaci. 8. Některé nově syntetizované molekuly DNA slouží pro transkripci genů intermediální fáze. 9. Virové transkripty intermediální fáze jsou translatovány buněčným aparátem. 10. Některé proteiny intermediální fáze katalyzují transkripci pozdní fáze. 11. Translace transkriptů pozdní fáze (iniciační proteiny pro časnou transkripci, virové enzymy a stavební podjednotky virionu). 12. Sestavování virových partikulí. 13. Sestavení nezralého virionu. 14. Zrání v IMV. 15. Uvolnění IMV z buňky po její lýze. 16. Formování IEV. IMV může získat druhou membránu trans-Golgi cestou nebo z časných endozomů. 17. Formování CEV (Cell-associated virion) fúzí IEV s buněčnou membránou. 18. CEV indukuje tvorbu aktinových komet a infekci sousedních buněk. CEV se odločí od buněčné membrány a vytvoří EEV (Harrison *et al.*, 2004).

IMV a IEV se morfologicky liší pouze v aditivní membráně. Ta obsahuje glykoproteiny a neglykosilované proteiny, které nejsou přítomny v membráně IMV. Membrána se tvoří při intracelulárním obalování IMV, který je uvolněn z buňky

exocytózou nebo při pučení CEV plasmatickou membránou. IMV se v buňce pohybuje pomocí mikrotubulů (Harrison *et al.*, 2004, Condit *et al.*, 2006).

Při časných fázích infekce se spíše tvoří EEV, v pozdějším intervalu infekce převažují IMV, nejspíše z důvodu vyčerpání obalovacích membrán (Smith *et al.*, 2002).

U některých *Orthopoxvirů* IMV pučí ven z buňky nebo se internalizuje do inkluzních tělísek typu A. Toto se ale neděje u VACV, poněvadž je gen pro tvorbu těchto tělísek přerušeny (Smith *et al.*, 2002).

2.1.5.1. Časná transkripce

Časná exprese začíná ve virovém core ihned po vstupu viru do buňky. V core jsou přítomny virové proteiny jako DNA dependentní RNA polymeráza, RNA polymeráza-asociovaný protein, časný transkripční faktor, který byl popsán u VACV, enzymy tvořící čepičku, methyláza, poly(A)polymeráza, nukleotid fosfohydroláza, či topoizomeráza. Tyto enzymy se přímo účastní syntézy a modifikace mRNA. Z toho vyplývá, že purifikovaná poxviróvá DNA není sama o sobě infekční (Broyles, 2003)

Virové mRNA mají čepičku a jsou polyadenylovány za katalýzy virovými enzymy, takže jsou rozpoznány buněčným translačním aparátem (Buller a Palumbo, 1991).

Kontrola genové exprese se děje na úrovni iniciace transkripce kaskádovitým mechanismem. Transkripční faktory potřebné pro expresi intermediárních genů jsou exprimovány jako časné proteiny a transkripční faktory potřebné pro expresi pozdních genů jsou exprimovány jako intermediární proteiny. Transkripční faktory důležité pro expresi časných genů jsou produkovány při pozdní transkripci a jsou přítomny ve virionech (Broyles, 2003)

2.1.5.2. Replikace a její regulace

Replikace virové DNA začíná zavedením tzv. "nicku" (štěpení v jednom místě) jednoho z vláken DNA genomu v blízkosti jeho konce (Pogo *et al.*, 1981) a pokračuje tvorbou konkatemeru (Moyer a Graves, 1981). Konkatermer je štěpen na jednotková lineární vlákna DNA virovou topoizomerázou, která však pro tento proces není esenciální. Místo, kde se konkatemer štěpí, je shodné se sekvencí vlásenky na konci virového genomu.

Replikace probíhá ve specifických místech v cytoplasmě hostitelské buňky, obvykle v blízkosti jádra v tzv. virozomech. Virus kóduje vlastní enzymy podílející se na

metabolismu virové DNA, např. thymidin kinázu, thymidylát syntetázu, ribonukleotid reduktázu nebo dUTPázu. Virus je však stále schopen omezené replikace, pokud jsou tyto enzymy deletovány. Virové proteiny, jejichž přítomnost je pro replikaci poxvirů nutná, jsou DNA polymeráza, nukleosid trifosfatáza a DNA glykosyláza. Geny těchto tří proteinů jsou přítomny u všech osekvenovaných poxvirů a jsou vysoce konzervovány (Buller a Palumbo 1991).

Replikace v cytoplasmě hostitelské buňky je příčinou nezávislosti virové multiplikace na metabolismu infikované buňky. Tato nezávislost je však relativní a pro syntézu virových proteinů jsou zapotřebí některé buněčné proteiny a energetické zdroje (ATP).

Poxviry kódují přibližně dvě stě proteinů zajišťujících virovou multiplikaci a ochranu před imunitní odpovědí. Tato čeleď reguluje replikaci genomu a sestavení virionu přesným pořadím exprese jednotlivých genů. Regulace replikace virového genomu a jeho sbalení do virových částic jsou tak časově koordinovány a jednotlivé fáze jsou závislé na úspěšném průběhu fází předchozích. Ve virionu jsou již obsaženy enzymy podílející se na virové replikaci a syntéze nukleotidů, které jsou transkribovány v časné fázi.

2.1.5.3. Intermediární a pozdní transkripce

Během replikace virové DNA začíná intermediární fáze transkripce. Tyto geny kódují transkripční faktory pro pozdní transkripci, RNA helikázu aj. Pozdní exprese pokračuje až do ukončení růstového cyklu viru. Během ní se virové produkty ve vysoké míře akumulují, hlavně pak komponenty sestavující virion.

Sestavení virionu probíhá v granulární elektrondenzní oblasti cytoplasmy. Virion je sestaven pomocí tzv. scaffold proteinů tvořících lešení, které je tvořeno šestiúhelníky připomínajícími plástve z včelího úlu (Szajner *et al.*, 2005)

2.1.6. Vliv infekce poxviru na hostitelskou buňku

Infekce poxviru morfologicky mění většinu typů buněk. Buňky se typicky zakulacují a vzájemně se od sebe odlučují v závislosti na expresi časných genů. Cytopatické efekty jsou doprovázeny změnou stavby mikrotubulů, aktinu a filament. V průběhu infekce je také inhibována proteosyntéza buněčné mRNA, klesá množství buněčné mRNA v cytoplasmě a převažuje virová mRNA. Je redukován jak transport

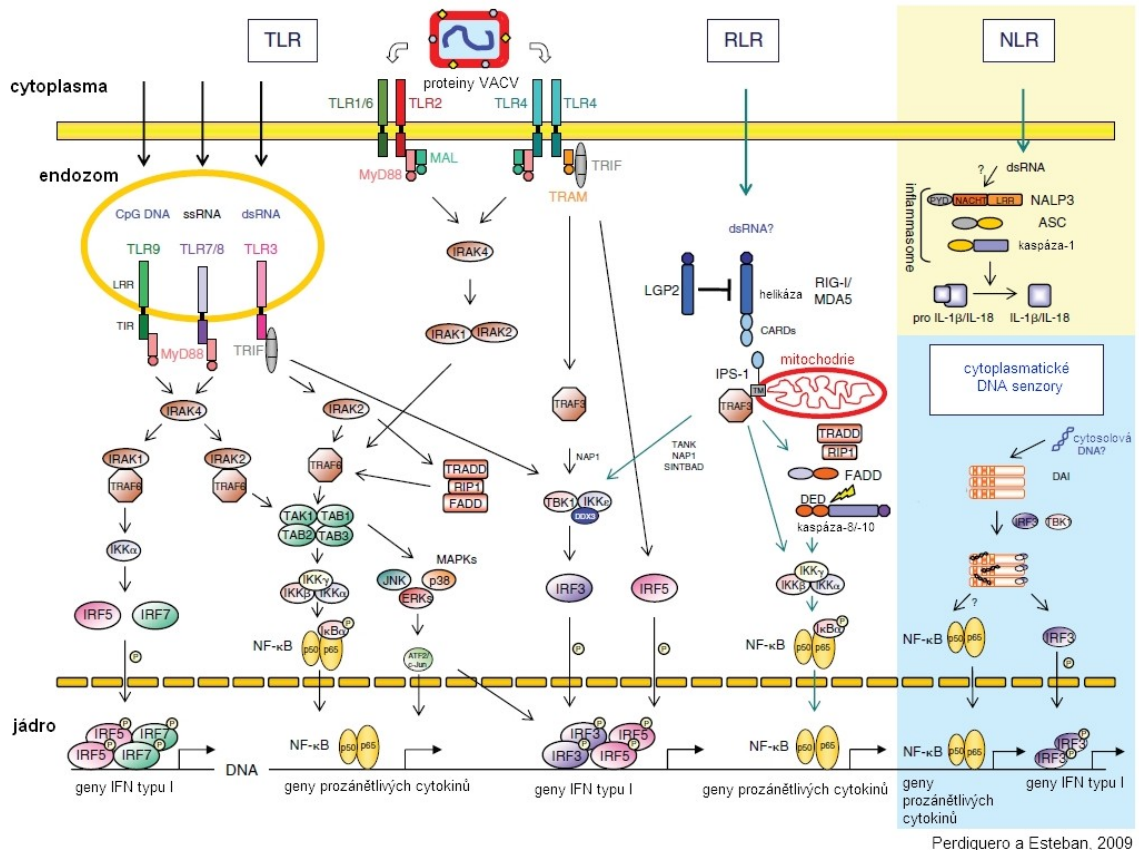
buněčné mRNA, tak její syntéza (Bablanian *et al.*, 1981). Vzhledem k tomu, že během infekce převažují virové mRNA a buněčné mRNA jsou inhibovány, je inhibována také buněčná proteosyntéza. U VACV byla navíc detekována inhibice replikace buněčné DNA (Jungwirth a Launer, 1968).

Některé poxviry mají schopnost indukovat hyperplastickou odpověď nebo tumory v kůži infikovaných zvířat. U orthopoxvirů je příčinou homolog buněčného epidermálního růstového faktoru (Vaccinia epidermal-like growth factor), který je také důležitý pro virulenci (Buller *et al.*, 1988).

2.2. Imunitní odpověď proti poxvirům

Buňka v první řadě virus rozpozná mechanismy přirozené imunitní odpovědi, a to na základě PAMP (Pathogen associated molecular pattern). PAMP jsou komponenty patogena, které přirozená imunita rozpoznává jako signál nebezpečí (Danger signal). Jsou to virové proteiny, genomová DNA, jednořetězcová DNA, dvouřetězcová RNA a jednořetězcová RNA s trifosfátem na 5' konci.

Buňka rozeznává PAMP pomocí specifických receptorů PRR (Pattern recognition receptor). Doposud jsou známy čtyři druhy PRR, které rozpoznávají virovou infekci, a to TLR ("Toll-like receptor), RLR (RIG-like receptor), NLR (NOD-like receptor) a cytoplasmatické DNA senzory, tzv. DAI (DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors). Signalizace přirozené imunitní odpovědi skrze PRR receptory je znázorněna na obrázku 3.



Obr. 3: Čtyři typy PRR a jejich signální dráhy, které rozpoznávají komponenty VACV. Dráha **TLR**: TLR 1, 2, 4, 6 se nachází na cytoplasmatické membráně a TLR 3, 7, 8, 9 na membráně endozomu. Adaptorové proteiny MyD88 a TRIF přenášejí signál přes aktivaci kináz IRAK 1, 2, 4 (Interleukin-1 receptor-associated kinase), které aktivují další skupinu kináz, tzv. IKK (I κ B kinase) komplexu přes proteiny TRAF3 a TRAF6. Signalizace vede dále přes aktivaci IRF-3, 5, 7 a NF- κ B transkripčních faktorů k expresi prozánětlivých cytokinů a IFN typu I. Dráha **RLR**: cytoplasmatické proteiny RIG-1, MDA5 obsahující helikázovou doménu a CARD doménu (Caspase activation and recruitment domain), jejíž funkcí je přenos signálu přes asociaci s adaptorovým proteinem IPS-1 (IFN β promotor stimulator), dále pak interakcí s TRAF3 k aktivaci IKK komplexu a následné IRF-3 a NF- κ B vede signalizace k expresi prozánětlivých cytokinů a IFN typu I. Dráha **NLR**: Signalizace vede k sestavení tzv. inflammasomu, který katalyzují NALP proteiny přes interakci adaptorového proteinu ASC-1, který vede k připojení kaspázy 1 do komplexu. To vede ke štěpení prekurzorů IL-1 β a IL-18 na funkční produkty. Dráha **DAI**: DAI jako cytosolový DNA senzor interaguje s DNA, což vede k aktivaci IRF-3 a NF- κ B transkripčních faktorů a k expresi prozánětlivých cytokinů a IFN typu I (Perdiguero a Esteban, 2009).

2.2.1. TLR signalizace

TLR receptory se vyskytují na imunitních buňkách, jako jsou dendritické buňky (Kadowaki *et al.*, 2001), B buňky, T buňky, ale také na epitelálních buňkách (Muzio a Mantovani, 2000). Je známo deset druhů lidských TLR a 12 druhů myších TLR. TLR jsou glykoproteiny, které mají vnější extramembránovou doménu vázající ligand, kotvící membránovou doménu a vnitřní TIR doménu (Toll/IL-1 receptor), která má funkci indukce další signalizace uvnitř buňky (O'Neill, 2006).

Glykoproteiny virionů jsou rozpoznávány TLR2 a TLR4, které jsou na povrchu buněčné membrány. Naproti tomu TLR3, TLR7 (u myši)/TLR8 (u člověka) a TLR9 jsou uvnitř buňky na membráně endozomu a rozpoznávají virovou nukleovou kyselinu. TLR3 je specifický pro dvouvláknovou RNA, TLR7/8 a TLR9 rozpoznávají jednovláknovou RNA a DNA s CpG motivy.

Po rozpoznání signálu TLR dimerizuje a interaguje s adaptorovými proteiny, kterými jsou MyD88 (Myeloid differentiation factor 88), TRIF (Toll receptor-associated activator if IFN), TRAM (TRIF-related adaptor molecule), SARM (Sterile- α and armadillo motif-containing protein) a MAL (MyD88 adaptor-like). Signalizace MyD88 vede přes transkripční faktory IRF-5 a IRF-7 k produkci IFN typu I, nebo přes NF- κ B k produkci prozánětlivých cytokinů. Adaptorová molekula TRIF, doprovázená molekulou TRAM u TLR4 signalizace, vede signál a aktivuje transkripční faktor IRF-3, který dimerizuje a indukuje expresi IFN Typu I (Perdiguero a Esteban, 2009).

2.2.2. RLR signalizace

RLR receptory se nacházejí například u fibroblastů nebo dendritických buněk (kromě plasmocytoidních dendritických buněk) a rozpoznávají virovou RNA. Receptor, který se nachází v cytoplasmě, představují RIG-I (Retinoic acid-inducible gene 1), MDA5 (Melanoma differentiation-associated gen 5) a LGP2 (Laboratory of genetics and physiology 2). RIG-I a MDA5 mají helikázovou aktivitu, kdežto LGP2 ji postrádá (Eisenächer a Krug, 2012).

RLR rozpozná dsRNA nebo ssRNA s trifosfátem na 5' konci a signální dráha vede k fosforylaci IRF-3, k jeho dimerizaci a k transportu homodimeru do jádra, kde se váže na ISRE element, a tím indukuje expresi IFN β . RLR aktivuje také NF- κ B, což vede k produkci prozánětlivých cytokinů (Perdiguero a Esteban, 2009).

2.2.3. NLR signalizace

NLR, NOD-like receptor (Nucleotide oligomerization domain), je rodinou intracelulárních sensorů PAMP, které detekují mikrobiální PAMP v cytosolu (Perdiguero a Esteban, 2009). Iniciují prozánětlivou odpověď přirozené imunitní odpovědi aktivací řady proteinů. Ty vytvářejí multiproteinový komplex zvaný inflammasom, který aktivuje kaspázu 1. Pro detekci virů je vedle NALP1 a NALP2 důležitým proteinem NALP3, jehož

název zahrnuje zkratky NACHT (NAIP (Neuronal apoptosis inhibitory protein), CIITA (MHC class II transcription activator), HET-E (Incompatibility locus protein from *Podospora anserina*) a TP1 (Telomerase-associated protein)), LRR (Leucine-rich repeat) a PYD 3 (Pyrin domain 3). Kaspáza 1 následně štěpí pro-IL-1 β a pro-IL-18 na funkční produkty. (Muruve *et al.*, 2008).

2.2.4. DAI signalizace

Senzory, které přímo interagují s B formou DNA v cytosolu, se nazývají DAI (DNA-dependent activator of IFN regulatory factors). Tyto senzory spouští signalizační dráhu vedoucí k aktivaci transkripčních faktorů NF- κ B a IRF-3 (Takaoka *et al.*, 2007).

Buňka se brání proti virové infekci primárně produkcí interferonů, které jsou exprimovány v reakci na přítomnost dsRNA (dvouvláknová RNA), což je častý intermediát při virové replikaci. dsRNA se v buňce jak eukaryotické, tak prokaryotické běžně nevyskytuje. Buňka reaguje na přítomnost dsRNA aktivací řady enzymů, např. PKR (Protein kináza R), 2'-5' OAS (2'-5' oligoadenylát syntáza) a RNázy L. Tyto enzymy reagují dvěma základními signalizačními drahami. dsRNA v buňce způsobí autofosforylaci PKR, která fosforyluje eIF2-alfa (Eukaryotický iniciační faktor proteosyntézy 2-alfa), a tím jej inhibuje. Aktivitou 2'-5' OAS vznikají 2'-5' oligoadenyláty, které aktivují RNázu L, a ta pak štěpí jak virovou, tak buněčnou RNA. Aktivace PKR a 2'-5' OAS/RNáza L vede k utlumení proteosyntézy, což následně vede k apoptóze infikované buňky.

PKR je též důležitým regulátorem exprese cytokinů. PKR aktivuje signalizaci skrze p38, kinázy patřící do rodiny MAPK (Mitogenem aktivovaná protein kinázy) a také přes NF- κ B (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) (García *et al.*, 2006).

2.3. Cytokiny důležité při protivirové odpovědi

2.3.1. Interferon α a interferon β

Interferony α a β (IFN) patří mezi interferony typu I. Do této skupiny patří i další interferony, jako např. IFN κ , IFN ϵ , IFN ω nebo IFN τ . Další skupinou jsou IFN typu II, do

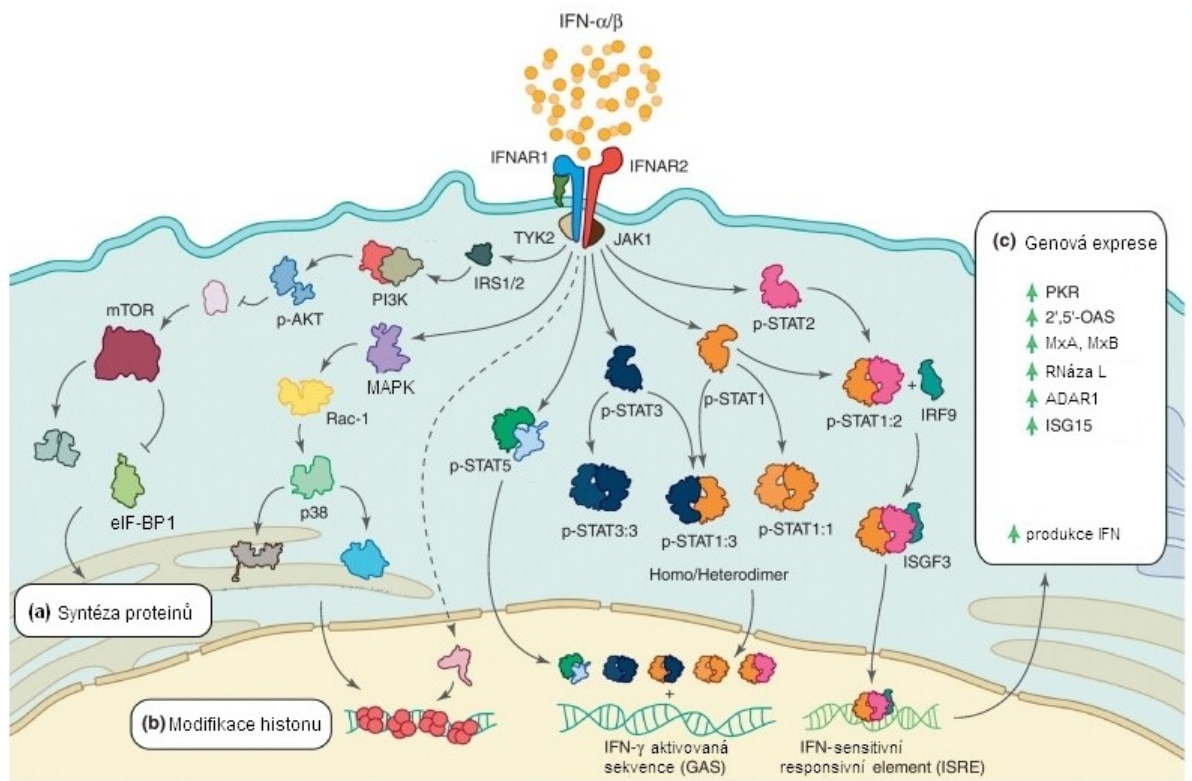
které patří IFN γ . Tento IFN signalizuje přes odlišný receptor, a to komplexem IFNGR receptoru. IFN γ je produkován aktivovanými T a NK buňkami a směřuje imunitní odpověď směrem k Th1 typu. Poslední skupinou jsou IFN typu III. Tato skupina obsahuje několik genů IFN λ (Perdiguero a Esteban, 2009).

Interferony typu I (IFN α/β) jsou základními efektorovými molekulami v počáteční obraně proti virové infekci. Jsou indukovány pomocí aktivace PRR. Jejich funkce spočívá v aktivaci exprese interferonem stimulovaných genů po vazbě na interferonové receptory (IFNAR). Tyto geny kódují proteiny se schopností inhibovat různé kroky ve virové infekci - virovou replikaci, vstup viru do buňky, ztrátu virového obalu při vstupu do buňky, správné složení virových proteinů a únik virového potomstva z buňky (Wang a Fish, 2012).

Hlavními producenty interferonu α jsou plasmocytoidní dendritické buňky, ale v menší míře jej produkují také makrofágy, fibroblasty a buňky endotelu. IFN β je produkován mnoha typy buněk. Receptory pro IFN jsou přítomny téměř na všech buňkách lidského těla.

Tyto interferony disponují nejen protivirovou (interferují s virovým růstem), ale také imunomodulační a protinádorovou aktivitou (Takaoka a Yanai, 2006). Účinek interferonu se projeví v první řadě aktivací přirozené imunity, tj. indukcí exprese IFN-stimulovaných genů, a dále pak modulací adaptivní imunity, což vede k podpoře vitality neutrofilů, k aktivaci makrofágů, NK buněk, dendritických buněk (DC), B buněk a CD8⁺ T buněk a k polarizaci efektorových CD4⁺ T buněk směrem k Th1 typu imunitní odpovědi (Wang a Fish, 2012).

Expese IFN typu I je regulována dvěma signálními drahami. První je virem indukovaná signální dráha vedoucí k produkci IFN, která již byla popsána v předešlé kapitole a druhá, receptorem zprostředkovaná sekundární signální dráha je shrnuta na obrázku 4.



Wang a Fish, 2012

Obr. 4: Signální dráha IFN typu I. Vazba IFN α/β na interferonový receptor složený z heterodimeru IFNAR1 a IFNAR2. Kinázy JAK1/TYK2 (Tyrosine kinase 2) aktivují transkripční faktory. Tato signalizace vede: A. Přes PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase) kinázy k aktivaci mTOR (Mammalian target of rapamycin), což je serin/threonin proteinkináza, která reguluje buněčnou proliferaci, růst, motilitu a syntézu proteinů. B. Přes MAPK kinázovou dráhu k modifikaci histonů. C. Přes aktivaci STAT (Signal transducer and activator of transcription) transkripčních faktorů a jejich dimerizaci k vazbě na GAS sekvenci (Interferon-gamma activated sequence) a přes aktivaci STAT, jejich dimerizaci a vazbou IRF-9 transkripčního faktoru k vazbě na ISRE (Interferon stimulated response element) (Wang a Fish, 2012).

Klíčovými regulátory první dráhy aktivace genové exprese IFN jsou IRF-3 (Interferon regulatory factor-3), který je aktivátorem genu pro IFN β , a IRF-7, který aktivuje geny pro IFN α i IFN β . První signální dráha je indukována rozpoznáním tzv. PAMP. Signál je poté veden přes adaptorové molekuly (např. TRIF a TRAM u signalizace přes TLR) a řadu kináz k aktivaci transkripčních faktorů (IRF nebo NF- κ B), které jsou následně translokovány do jádra, kde se váží na promotor a indukují expresi buď IFN typu I v případě IRF-3, IRF-5 a IRF-7, nebo prozánětlivých cytokinů pomocí NF- κ B. Další možností, jak aktivovat expresi IFN genů, je enhanceosom, což je multiproteinový komplex interagující s RNA polymerázovým komplexem. Enhanceosom se váže na promotory genů pro IFN a indukuje tak jejich expresi. Exprimované IFN poté spouští sekundární signalizaci vazbou na interferonové receptory (Perdiguero a Esteban, 2009).

Druhou dráhu signalizace spouští vazba IFN typu I na jejich receptor (obrázek 4). Interferonový receptorový komplex IFNAR je komplex o dvou podjednotkách. IFNAR1 zajišťuje efektivní vazbu interferonu. Druhou podjednotku tvoří IFNAR2. Pokud se IFN naváže na komplex IFNAR, způsobí fosforylaci tyrozinových kináz (Jak/Stat), které jsou vázány na receptor. Tyto kinázy regulují proteosyntézu přes PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase) a mTOR (Mammalian target of rapamycin), modifikaci histonů přes aktivaci MAPK dráhy a expresi IFN stimulovaných genů (ISG). To se děje fosforylací STAT transkripčních faktorů. Ty se poté translokují do jádra, kde se váží na ISRE (IFN-senzitive response element) v promotorech IFN stimulovaných genů. Tyto kroky vedou k expresi genů s protivirovými účinky (Wang a Fish, 2012). Jsou to zejména ISG15 (IFN-stimulated gene 15), což je homolog ubiquitinu, GTPáza MxA a MxB, která reguluje endocytózu a transport vesikulů, 2'-5' OAS (2'-5' oligoadenylát syntáza), PKR (Proteinkináza R), RNáza L, ADAR1 (dsRNA specifická adenosin deamináza), která je schopna posttranskripčně editovat RNA a tím měnit její stabilitu.

STAT transkripční faktory se u IFN γ signalizace vážou na specifické genové elementy GAS (IFN γ -activated sequence) vedoucí k expresi např. NO syntázy (iNOS), která mění L-arginin na NO a citrulin (Wang a Fish, 2012).

2.3.2. Interleukiny a další cytokiny důležité při protivirové odpovědi

Pro odpověď na virovou infekci je důležitá polarizace imunitní odpovědi. Th1 imunitní odpověď je definována produkcí prozánětlivých cytokinů (IL-1 β , TNF α). Diferenciace efektorů Th1 imunitní odpovědi se děje účinkem IL-12, který je produkován makrofágy a dendritickými buňkami. Produkce IL-12 aktivuje NK buňky, které následně produkují IFN γ , a tím aktivují makrofágy. Th2 typ imunitní odpovědi naopak napomáhá virové infekci např. tím, že je inhibována aktivace makrofágů a produkují se protizánětlivé cytokiny (IL-4, IL-10)

Cytokiny IL-1 α/β , IL-18 a IL-33 jsou si podobné svou strukturou, signálními drahami a mechanismem, jakým se z nich stává funkční produkt. Všechny tyto cytokiny jsou syntetizovány jako prekurzory a k jejich maturaci je potřeba štěpení enzymem kaspáza 1, jejíž aktivaci poxviry inhibují (CrmA, SPI-2 a další (Pickup, 1994)). IL-1 α a IL-33 jsou funkční už v neštěpené formě. Poxviry též kódují různé solubilní receptory, které tyto cytokiny vyvazují a neutralizují tak jejich efekty.

Všechny tyto cytokiny směřují imunitní odpověď přes STAT (Signal transducer and activator of transcription) transkripční faktory k určitému typu. IL-33 směřuje imunitní odpověď k Th2 přes STAT5. Oproti tomu Th17 buňky exprimují interleukin 17 na popud IL-1 β přes STAT3, a konečně IL-18 indukuje produkci IFN γ Th1 buňkami přes STAT4 (Guo *et al.*, 2009). Podrobněji jsou jednotlivé cytokiny popsány v následujících kapitolách.

2.3.2.1. Interleukin-1

Interleukin 1 α/β je prvním zástupcem rodiny IL-1, která obsahuje více členů (IL-1 α , IL-1 β). IL-1 působí při obraně proti mikroorganismům, které se replikují uvnitř buňky. Hraje důležitou roli v přirozené imunitě a reguluje adaptivní imunitu. V minulosti měl tento cytokin různá pojmenování podle toho, jak byly postupně odhalovány jeho funkce, a to endogenní pyrogen, faktor aktivující lymfocyty, buněčný mononukleární faktor nebo katabolin. Z prekursoru pro IL-1 se štěpí IL-1 α a IL-1 β .

IL-1 β je exprimován jako pro-IL-1 β o velikosti 31 kDa a je štěpen kaspázou 1 (dříve nazývanou ICE protease; ICE = IL-1 β converting enzyme) na maturovaný IL-1 β . Pro-IL-1 β je dopraven na plasmatickou membránu, kde je štěpen kaspázou 1. Pro-IL-1 α je biologicky aktivní už jako neštěpený protein, a to na rozdíl od IL-1 β , jehož neštěpená forma nemá biologickou aktivitu (Arend, 2002). IL-1 α i IL-1 β jsou syntetizovány monocyty, makrofágy, neutrofilů a hepatocyty.

K této rodině patří také antagonist receptoru IL-1 (IL-1Ra), který slouží jako buněčný regulátor IL-1, a dále dva receptory IL-1 typu I a II; typ II je inaktivní, protože na rozdíl od receptoru typu I neobsahuje intracelulární doménu, která zprostředkovává další signalizaci.

Komplex IL-1 a IL-1 receptor aktivuje řadu adaptorových molekul uvnitř buňky, jako jsou MyD88 (Myeloid differentiation factor 88), IRAK (IL-1 receptor associated kinase) a TRAF 6 (TNF receptor associated factor 6), a ty spouští transdukční dráhy vedoucí k aktivaci NF- κ B, AP-1 (Activator protein 1), p38 MAPK a JNK (Arend *et al.*, 2008).

Regulace imunitní odpovědi pomocí IL-1 receptoru I směřuje typ imunitní odpovědi směrem k Th17 a produkci IL-17. To se děje přes transkripční faktor ROR γ (RAR (Retinoic acid receptor) related orphan receptor gamma).

2.3.2.2. Interleukin-18

Interleukin-18 (IL-18) patří do cytokinové rodiny IL-1 a jeho prekurzor je také štěpen kaspázou 1 na funkční produkt. Kaspáza 1 je aktivována působením inflamasomu. Původně byl IL-18 pojmenován jako faktor indukující IFN γ . Prekurzor o velikosti 22 kDa je štěpen na bioaktivní IL-18 o velikosti 17 kDa.

Receptor IL-18R je heterodimer strukturně příbuzný receptorům rodiny IL-1, a to sdílením homologie se sekvencí podjednotky vázající ligand. IL-18R obsahuje TIR doménu, která podobně jako u signalizace IL-1 dále aktivuje NF- κ B dráhu, p38 a JNK (c-Jun N-terminální kináza, která patří mezi kinázy aktivované mitogenem). Expresi tohoto receptoru indukuje IL-12 produkovaný T a B buňkami. IL-18R je exprimován v Th1 buňkách, myeloidních a epiteliálních buňkách. Tento interleukin je signálem k produkci IFN γ u antigenem stimulovaných T buněk a synergisticky s IL-12 stimuluje produkci IFN γ u Th1 typu buněk. Stejně je tomu i u NK buněk (Natural killer), které také stimuluje k produkci IFN γ (Chaix *et al.*, 2008). IL-18 také zvyšuje cytotoxickou aktivitu zvýšením exprese Fas ligandu v Th1 buňkách a dále stimuluje produkci oxidu dusnatého (NO) v makrofázích.

Po podání IL-18 po infekci vakcíní byl pozorován zmenšený výskyt lézí na myším modelu. U těchto myší byla pozorována zvýšená aktivita NK buněk a cytotoxických T lymfocytů (CTL) (Tanaka-Kataoka *et al.*, 1999). IL-18 tedy hraje svou roli v protivirové imunitě.

Regulace pomocí IL-18 receptoru α směřuje k Th1 typu imunitní odpovědi a aktivované T buňky k produkci IFN γ . To se děje přes T-bet transkripční faktor.

2.3.2.3. Interleukin-33

Interleukin-33 (IL-33) také patří do cytokinové rodiny interleukinu-1. Tento cytokin byl dříve nazýván NF-HEV (Nuclear factor in high endothelial venules), protože byl identifikován v těchto specializovaných buňkách. Je exprimován jako 31 kDa prekurzor, který může být dále štěpen kaspázou-1 na maturovaný 18 kDa protein. IL-33 je exprimován ve stromálních buňkách, jako jsou buňky endotelu a epiteliální buňky (Schmitz *et al.*, 2005). Indukuje Th buňky, žírné buňky, eosinofily a basofily, aby produkovaly cytokiny charakteristické pro Th2 typ imunitní odpovědi.

IL-33 má dvě hlavní funkce: jednak jako klasický cytokin, a dále pak jako nukleární faktor regulující transkripci genů (Miller, 2011). V současnosti se také uvažuje o jeho roli jako alarminu (DAMP - Damage-associated molecular pattern), který je uvolňován z nekrotických buněk, aby nastartoval imunitní odpověď v reakci na destrukci tkáně nebo stres (Bonilla *et al.*, 2012).

Signalizaci IL-33 zprostředkovává T1ST2 (IL-33 receptor), který je exprimován hlavně na buňkách indukujících Th2 odpověď (Löhning *et al.*, 1998). Společně tvoří komplex s IL-1RacP (Interleukin-1 receptor accessory protein). Signalizace IL-33 probíhá klasickou signalizací IL-1 rodiny, a to aktivací NF- κ B a MAPK drah (Schmitz *et al.*, 2005).

Exprese T1ST2 Th2 buňkami je regulována transkripčním faktorem GATA3, který je regulován STAT5. GATA3 je hlavním transkripčním faktorem Th2. Jeho exprese se zvýší, pokud se experimentálně buňky kultivují v podmínkách směřujících k Th2 typu imunitní odpovědi, a jeho exprese je také zvýšena v přítomnosti IL-33, IL-2, IL-7 a TSLP (Thymic stromal lymphopoietin). T1ST2 není exprimován na buňkách Th1 ani na naivních CD4⁺ T lymfocytech. V závislosti na aktivaci T1ST2 receptoru pomocí IL-33 je produkována řada dalších cytokinů, zejména IL-13, IL-5, IL-4 (pokud je přítomen také IL-2). Inhibice IL-33 blokuje jejich sekreci.

IL-33 směřuje imunitní odpověď k Th2, a proto je také spojen s chorobami charakterizovanými Th2 odpovědí, jako jsou astma (vysoká exprese IL-33 v plicní tkáni a průduškovém hladkém svalstvu), onemocnění revmatoidního typu (revmatoidní artritida, osteoartróza, systémový lupus erythematoses), kožní zánětlivé poruchy (atopická dermatitida, sklerodermie) a zánětlivé střevní poruchy (ulcerativní kolitida, Crohnova choroba).

V současnosti bylo prokázáno, že exprese IL-33 je regulována dvěma transkripčními faktory IRF-3 a CREB (cAMP response element-binding) (Polumuri *et al.*, 2012).

2.4. Obrana poxvirů proti imunitní odpovědi hostitele

Virus vakcinie kóduje přibližně dvě stě proteinů. Mnohé z nich modulují metabolismus buňky, aby se virus úspěšně zreplikoval a mohl se šířit dál. Virus však také kóduje mnoho proteinů, které modifikují imunitní odpověď hostitelského organismu. Tyto

imunomodulátory fungují jak intracelulárně jako regulátory apoptózy, IFN-zprostředkované odpovědi, signalizace přirozené imunity nebo jako regulátory transkripce genů hostitele, tak extracelulárně jako inhibitory komplementu a IFN, regulátory cytokinů a chemokinů. Lze je rozdělit podle jejich funkce na tři skupiny. Jednak to jsou virokiny, což jsou secernované analogy cytokinů nebo imunoregulačních proteinů, dále pak viroceptory, které napodobují buněčné receptory, a v neposlední řadě vnitrobuněčné proteiny, které zasahují do buněčné signalizace a efektorových drah.

Primární odpovědi organismu na virovou infekci je přirozená „nespecifická“ imunitní odpověď, která se projeví indukcí exprese IFN typu I a zánětlivých cytokinů a aktivací komplementu a NK buněk (přirozeně zabíječské buňky). Virus vakcínie tedy vyvinul mnoho strategií, jak zamezit signalizaci vedoucí k expresi IFN přes dráhy začínající aktivací PRR.

Virus vakcínie inhibuje jak klasickou, tak i alternativní cestu aktivace komplementu pomocí secernovaného proteinu VCP (Vaccinia virus complement control protein), jehož část sekvence je analogická s buněčným regulačním proteinem komplementu C4b vázající protein, který je buněčným regulátorem komplementu. VCP váže C3 a C4 podjednotky komplementu (Kotwal a Moss, 1988, Howard et al., 1998).. Stejnou analogii vykazuje také protein membrány EEV, u něhož však nebyla tato schopnost nalezena.

2.5. VACV inhibitory imunitní odpovědi

2.5.1. Inhibitory interferonů

Jednou z hlavních zbraní vakcínie je regulace produkce interferonu typu I (IFN α/β) a II (IFN γ). Vakcínie kóduje analog buněčného receptoru IFN γ (IFN γ R). Tento produkt vakcínie byl identifikován jako B8R otevřený čtecí rámec (ORF) u kmene Western Reserve (WR). Ukázalo se, že tento protein je homologní s extracelulární doménou IFN γ R, ale neobsahuje membránovou kotvu ani cytoplasmatickou doménu, tudíž je tento protein funkční v solubilní formě. Na rozdíl od buněčného IFN γ R je virový analog méně druhově specifický a inhibuje biologickou funkci IFN γ u lidí, prasat a krys, nikoliv však u myší. Protein B8L tedy brání interakci IFN γ a jeho receptoru neutralizací IFN γ , jednoho z klíčových regulátorů zánětu a imunitní odpovědi při infekci vakcíní. Důsledkem je

omezená či chybějící signalizace přes tento cytokin. Tento virový homolog je vysoce konzervovaný, a tudíž hraje v patogenezi orthopoxvirů významnou roli (Alcamí a Smith, 1995).

Další virový protein váže IFN α s vysokou afinitou, proto je označován jako jeden z faktorů virulence. Tento protein B18L je vysoce homologní s jak humánní, tak s myší a bovinní podjednotkou α receptoru pro IFN. B18L tedy váže IFN α 2 a brání transmembránové signalizaci. Protein B18L je svým způsobem unikátní, jelikož působí jako rozpustný extracelulární mediátor i povrchový protein na buněčné membráně, a tudíž efektivně blokuje autokrinní i parakrinní funkce IFN (Colamonici *et al.*, 1995).

Intracelulární inhibici IFN-zprostředkované odpovědi zajišťují virové proteiny E3L a K3L. VACV je z těchto důvodů *in vitro* rezistentní k IFN signalizaci.

E3L je multifunkční virový modulátor buněčné imunitní odpovědi. Tento protein má dsRNA vazebnou aktivitu a inhibuje tak dsRNA-aktivované IFN-inducibilní enzymy PKR a systém 2'-5' OAS/RNáza L (Chang *et al.*, 1992, Rivas *et al.*, 1998). E3L protein je exprimován v časně fázi infekce VACV, a je tedy přítomen před pozdní transkripcí, kdy je syntetizována většina dsRNA (Colby *et al.*, 1971). E3L dále inhibuje aktivaci adenosin deamináz A až I a blokuje expresi IFN inhibičních faktorů IRF-3 a IRF-7 (Smith *et al.*, 2001)

Aktivace PKR i systému 2'-5' OAS/RNáza L vedou k inhibici proteosyntézy; PKR přes inhibici eIF-2 α , 2'-5' OAS/RNáza L přes degradaci RNA (García *et al.*, 2006). E3L tak inhibicí aktivace těchto enzymů reguluje přechod buňky do apoptózy; též byla zaznamenána jeho onkogenní aktivita *in vitro* v buňkách NIH 3T3 (García *et al.*, 2002). Jednou z dalších mnoha doposud nalezených funkcí E3L je potlačení exprese řady různých cytokinů z rodiny IFN, TNF, TGF a interleukinů. Hlavní signalizace indukce exprese cytokinů vede přes PKR, IRF-3 a NF- κ B (Myskiw *et al.*, 2009).

K3L protein kóduje nefunkční homolog eIF-2 α (α podjednotka eIF2), čímž brání fosforylaci eIF-2 α pomocí PKR a nedochází tak k bloku proteosyntézy. K3L je také exprimován v časně fázi infekce vakcíníí a *in vitro* se přímo váže na PKR (Davies *et al.*, 1992).

2.5.2. Inhibitory interleukinů a dalších cytokinů

Jednou z velmi účinných zbraní poxvirů jsou virové homology cytokinových receptorů (receptory pro IL-1 typu II, TNF typu II, IFN typu I a II). Tímto způsobem VACV brání jejich akceschopnosti.

Aktivaci NK buněk a polarizaci směrem k Th1 imunitní odpovědi brání homolog receptoru pro IL-18. Tento poxvirový protein vyvazuje IL-18 místo buněčného receptoru IL-18R a inhibuje tak jeho funkci *in vitro* i *in vivo* (Born *et al.*, 2000). IL-18 indukuje cytotoxicitu NK buněk, aktivuje produkci IFN γ a prozánětlivou signalizaci přes NF- κ B. Pokud je gen pro tento protein ve vakcínii deletován, je ovlivněna její virulence stejně jako u modulátorů interferonové odpovědi (B18L). Tento protein nesdílí žádnou homologii s buněčným IL-18R, ale naopak sdílí shody v sekvenci pro buněčný IL-18 vázající protein. U vakcínie byl nalezen jako ORF D7R. Funkční protein byl nalezen u kmenů WR, Lister a MVA (Modified vaccinia virus Ankara), ale chybí např. u kmene Copenhagen (Smith *et al.*, 2000). Stejnou funkci zastává i virový protein C12L u myši, který má také vliv na IL-12-indukovanou produkci IFN γ . Původně se hledal inhibitor IL-12, který vede k produkci IFN γ . Zjistilo se však, že je tento protein homologní s IL-18 vázajícím proteinem a že inhibuje IL-18 (Symons *et al.*, 2002).

Další způsob, jak vakcínie moduluje imunitní odpověď, je pomocí membránově vázaného nebo solubilního homologu TNF (Tumor necrosis factor) receptoru, což brání aktivaci zánětlivé odpovědi v reakci na virovou infekci. Solubilní TNF α a LT α (Lymphotoxin α) jsou funkční jako trimery, které se váží na dva druhy receptorů pro TNF. Vazba způsobí jejich oligomerizaci a aktivaci intracelulárních signalizačních kaskád. Tento virový homolog byl nalezen u kmene Lister, Evans a USSR a pojmenován jako VACV CrmE (Cytokine response modifier E); váže jak lidský, tak i myší a krysí TNF α , ale nikoli lidský LT α (Reading *et al.*, 2002).

Tomuto typu protivirové odpovědi brání mimo jiné také solubilní homolog IL-1 receptoru (IL-1R), který brání signalizaci IL-1 β . Tento poxvirový receptor váže IL-1 β s vysokou afinitou a naopak neinteraguje s IL-1 α nebo s IL-1ra (Receptor antagonist), který je přirozeným buněčným regulátorem tohoto cytokinu. Homolog IL-1R je ve vakcínii kódován genem B15R. Delece tohoto genu a aplikace *in vivo* na myším modelu způsobí zvýšený výskyt symptomů infekce a akceleraci imunitní odpovědi akutní fáze, čili tato

delece modifikuje závažnost onemocnění způsobeného infekcí orthopoxviru (Alcami a Smith, 1992).

Aktivaci a migraci leukocytů zabraňují virové inhibitory chemokinů. Poxviry exprimují proteiny, které vyvazují tyto chemokiny, a tím blokují jejich funkci. Tyto inhibitory mohou sdílet určitou sekvenční podobnost s buněčnými chemokiny nebo jsou virově specifické. Jedním z nich je virový protein, který váže chemokiny typu CC, čímž blokuje chemokiny indukované zvýšením hladiny vápníku v buňce a migraci imunitních buněk. Tento protein nesdílí žádnou homologii s buněčnými receptory pro chemokiny (Alcami *et al.*, 1998).

2.5.3. Inhibitory apoptózy

Virus vakcínie si vyvinul různé strategie, jak modifikovat buněčnou signalizaci vedoucí k apoptické smrti infikované buňky. Jednou z nich je N1L protein, který sdílí strukturní podobnost s buněčným Bcl-2 anti-apoptickým proteinem, ale nesdílí sekvenční homologii. Za fyziologických podmínek se Bcl-2 protein váže na BH3 motiv proapoptických proteinů, a tak inhibuje proapoptickou signalizaci skrze narušení integrity mitochondriální membrány a vyloučení cytochromu c do cytosolu, který by následně aktivoval kaspázy (Cooray *et al.*, 2007). Má také další vlastnosti, a to že inhibuje signalizaci přes NF- κ B a IRF-3. N1L brání aktivaci těchto transkripčních faktorů asociací s I- κ B kinázovým komplexem, který právě tyto faktory reguluje (DiPerna *et al.*, 2004).

Dalším vakcíniovým proteinem modifikujícím apoptickou signalizaci je F1L. Tento protein také váže BH3 proteiny (Fischer *et al.*, 2006), ale oproti N1L proteinu má prodlouženou C terminální doménu a je ukotven v mitochondriální membráně (Stewart *et al.*, 2005).

V neposlední řadě jsou zbraní vakcínie také analogy buněčných serpinů SPI-1/2 (Serine protease inhibitor 1 a 2) a CrmA, jejichž funkce zahrnují kontrolu koagulace krve, aktivaci komplementu a prozánětlivé odpovědi (Kotwal, 1989). Serpiny regulují aktivované proteinázy, a tím také apoptózu. Tyto analogy serpinů inhibují i kaspázovou aktivitu. CrmA například inhibuje štěpení prekurzorů cytokinů na jejich funkční formu pomocí inhibice kaspázy 1. Tento protein také inhibuje další proteinázy, a tím potlačuje apoptózu zprostředkovanou Fas, TNF nebo TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) (Bird, 1998).

VACV dále nespecificky brání apoptóze expresí dalších proteinů, které stimulují buněčný metabolismus a delší přežití buňky, aby mohlo dojít k dostatečnému pomnožení viru.

2.5.4. Inhibitory drah NF- κ B a IRF-3

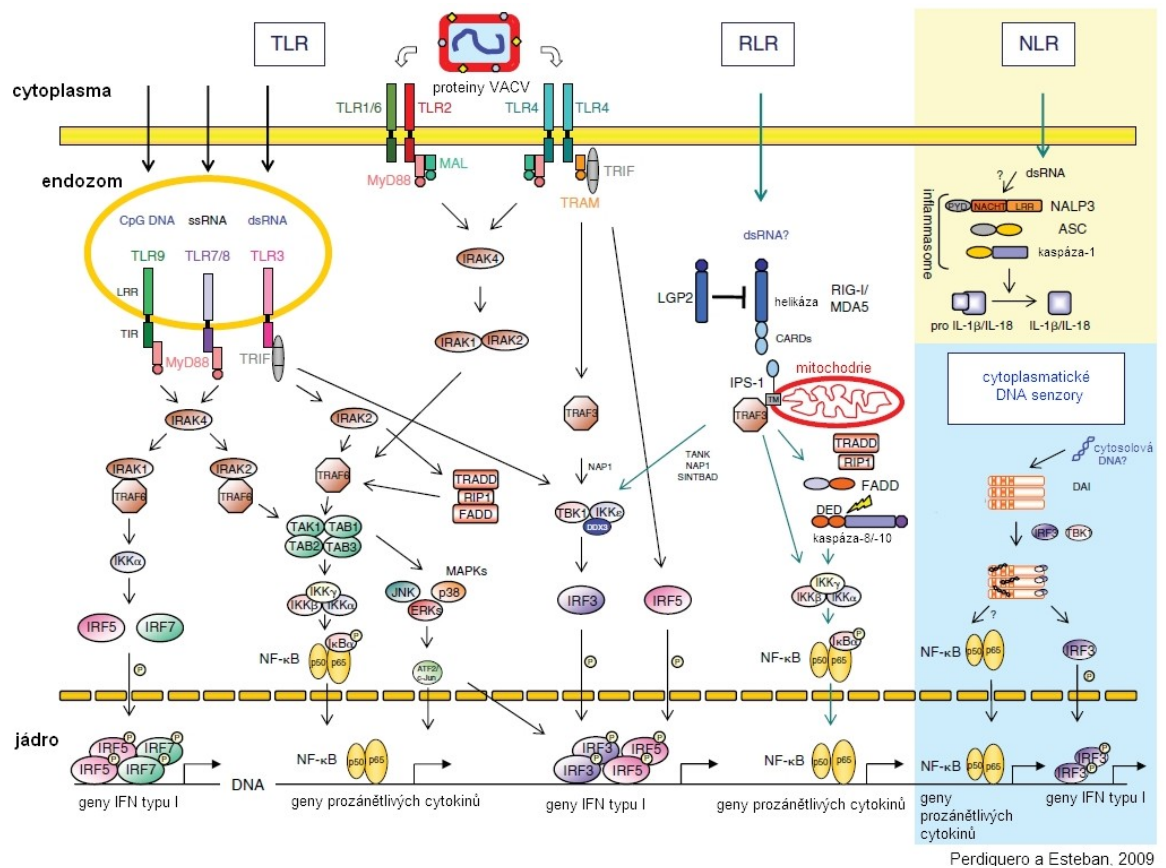
Vakcínie také kóduje mnoho proteinů, které modifikují PRR signalizaci. Jejím cílem je inhibovat signální dráhy, které vedou k fosforylaci a následné aktivaci transkripčních faktorů NF- κ B a IRF-3. NF- κ B a IRF-3 jsou totiž induktory exprese prozánětlivých cytokinů a interferonů typu I, což jsou hlavní faktory v okamžité, nespecifické imunitní odpovědi buňky na virovou infekci (Ye a Maniatis, 2011).

Širokospektrými inhibitory jsou produkty genů A46R a A52R. Tyto vakcíniové geny sdílí homologii s TIR doménou TLR receptorů. A46L protein blokuje adaptorové proteiny (MyD88, TRIF, TRAM) obsahující TIR doménu a transdukcii signálu dovnitř buňky. A52L protein interaguje s TRAF6 a IRAK-2 kinázou, které hrají roli v aktivaci NF- κ B (Bowie *et al.*, 2000).

K7L protein se sekvenčně podobá A52L. Tento protein inhibuje dráhu aktivace IRF-3 a IRF-7 vedoucí přes IKK ϵ a TBK1. K7L konkrétně cílí na buněčný protein DDX3 (DEAD box protein 3). Tímto způsobem inhibuje produkci IFN β (Schroder *et al.*, 2008).

B14L protein interaguje s kinázovým komplexem IKK, který je klíčovým regulátorem signální transdukce vedoucí k produkci prozánětlivých cytokinů přes NF- κ B, a inhibuje tak jeho enzymatickou aktivitu. B14L se konkrétně váže na IKK β (Chen *et al.*, 2008).

Zde zmíněné inhibitory jsou znázorněny na obrázku 5.



Obr. 5: Schéma proteinů vakcinie signálních drah vedoucích od PRR. Proteiny VACV jsou vyobrazeny v červených čtvercích, jde o E3, N1, B14, K7, A46, A52 a CrmA (Perdiguero a Esteban, 2009).

2.6. Atopická dermatitida

Atopická dermatitida (AD) je neinfekční chronické zánětlivé onemocnění kůže. Vyskytuje se většinou u dětí, ale může přecházet i do dospělosti. Klinická manifestace je velmi variabilní, charakterizují ji tři základní projevy: dermatitida (zánět kůže), xeróza (suchost kůže) a pruritus (svědění kůže).

Atopie je genetická predispozice k produkci IgE protilátkové odpovědi na běžně se vyskytující environmentální a potravinové antigeny (tzv. "extrinsic" AD), ale existuje asi 20% AD bez zvýšení IgE (tzv. "intrinsic" AD). AD se člení do třech kategorií podle doby, kdy se v životě člověka objeví - na kojeneckou, dětskou a dospělou formu.

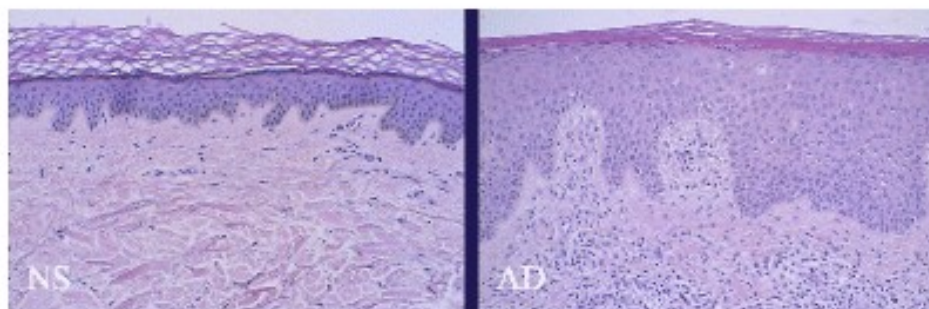
Prevalence AD je celosvětově 3 až 5 % u dětí do pěti let, z toho 49 až 75 % postižených vyvine AD do 6. měsíce věku a 80 až 90 % do 5. roku věku. V dospělé populaci se prevalence pohybuje od 2 do 10 %. V celosvětovém měřítku trpí atopickou dermatitidou 15 až 30 % populace, ve střední Evropě se prevalence udává okolo 10 %. V České republice je AD pozitivních 16 % dětí do jednoho roku života, 12 % dětí do 15 let

a 3 % nad 16 let. Výskyt AD koreluje s civilizační vyspělostí jednotlivých zemí. V současnosti stoupá životní úroveň, a tudíž stoupá i rozšíření AD.

Tím, že je u AD jedinců narušena kožní bariéra, je větší riziko infekce kůže různými patogeny. Nejčastější je bakteriální infekce *Staphylococcus aureus* a virová infekce *Herpes simplex virus* způsobující *eczema herpeticum*. K méně častým infekcím patří zanesení *Vaccinia virus* při očkování proti černým neštovicím nebo při náhodném kontaktu s čerstvě očkovanou osobou, což je příčinou vzniku *eczema vaccinatum* (Jiráková *et al.*, 2010).

Atopická dermatitida je charakteristická změněnou cytokinovou odpovědí. U pacientů s akutní atopickou dermatitidou převažuje Th2 imunitní odpověď. Th2 imunitní odpověď je typická nadprodukcí IL-4, IL-5 a IL-13, zvýšenými hladinami IgE a eosinofilů periferní krve, což je následkem snížené produkce IL-18. Tato situace potlačuje efekty Th1 imunitní odpovědi. Byla též pozorována snížená exprese antimikrobiálních peptidů, jako je lidský cathelicidin LL-37, což vede ke snížené odolnosti vůči kožním infekcím. U chronických lézí je tomu však naopak a převažuje Th1 imunitní odpověď. V lichenifikované kožní tkáni chronických lézí je zvýšená infiltrace makrofágů a eosinofilů, které produkují reaktivní molekuly a prozánětlivé cytokiny (Leung *et al.*, 2004).

AD je multifaktoriální a polygenní onemocnění. Je porušena kožní povrchová bariéra a je zde hyperproliferace buněk dermis a epidermis - u AD se vyskytují mutace v genech pro filagrin, který váže keratin v epiteliárních buňkách, a v genech pro lorikrin a involucrin, které jsou signálem k produkci keratinu a zastavení buněčného dělení. Tím je narušena maturace keratinocytů, a tudíž i kožní bariéra. U AD je změněný profil ceramidů, což vede ke zhoršené funkci intercelulárních lipidů, a také zvýšený podíl serinových proteáz v kůži, což má za následek předčasnou ztrátu soudržnosti keratinocytů a deskvamaci (Jiráková *et al.*, 2010). Rozdíly mezi zdravou a atopickou pokožkou jsou znázorněny na histologickém řezu na obrázku 6.



Obr. 6: Histologický preparát řezu zdravé a atopické kůže. NS znázorňující zdravou tkáň ukazuje tenkou, ale funkční vrstvu pokožky, nízké ztráty vlhkosti a dostatečnou hladinu sekrece lipidů. AD znázorňující atopickou tkáň ukazuje tlustou nefunkční vrstvu pokožky, vysoké ztráty vlhkosti a nízkou sekreci mazu. NS, normal skin - zdravá kůže; AD, atopic dermatitis - atopická kůže (Wollenberg a Klein, 2007).

AD je dědičná, geneticky velmi komplexní choroba. Bylo identifikováno několik důležitých genů, jejichž modifikace vede právě k AD. Tyto geny jsou na chromozomu 5, dále se týkají polymorfismu promotoru pro IL-4 a receptoru pro IL-4. Pozměněný byl nalezen i gen pro IL-13. a geny na chromozomu 11, kódující receptor pro IgE (Leung a Bieber, 2003). Byla zjištěna snížená exprese IFN γ a jeho receptoru. V těchto genech byly nalezeny SNP (Single nucleotide polymorphism) (Leung *et al.*, 2011). Ty byly také nalezeny v genech pro IL-18 a pro IL-18R. V důsledku toho je u lidí trpících AD snížena exprese IL-18 a jeho receptoru (Wittmann *et al.*, 2009). Byla také zaznamenána zvýšená produkce IL-33 a ST2, IL-33 receptoru ve vzorku biopsie kůže lidí s AD, kteří byli iritováni alergenem enterotoxinem B produkovaným bakterií *Staphylococcus aureus* (Savinko *et al.*, 2012).

AD se vyznačuje pozměněnou buněčnou imunitní odpovědí. U atopické dermatitidy je zvýšen výskyt T buněk typu Th17. Produkce IL-17 je závislá na produkci IFN γ . Společně zvyšují adhezivitu keratinocytů k T buňkám, což způsobí cytotoxicitu a apoptózu keratinocytů zprostředkovanou T buňkami (Cavani *et al.*, 2012).

V lézích atopiků převažuje zánětlivý epidermální typ dendritických buněk, který se diferencuje v závislosti na prostředí se zvýšenou hladinou IgE protilátek a v přítomnosti IL-4 a IL-13. Toto prostředí je pro atopickou dermatitidu typické (Wollenberg *et al.*, 2010). Naopak výskyt plasmocytoidního typu dendritických buněk, který se především vyznačuje produkcí IFN typu I, je v kůži lidí trpících atopickou dermatitidou snížen, což přispívá k větší náchylnosti ke kožním infekcím. Hladina plasmocytoidních dendritických buněk cirkulujících v krevním řečišti však může být u atopiků zvýšena (Wollenberg *et al.*, 2002). Výskyt NK buněk v krevním řečišti je naopak u atopiků snížen a NK jsou

koncentrovány v atopické kůži. NK buňky se stávají terčem pro kontakt s monocyty a přecházejí do apoptózy. Tím, že neprodukují cytokiny, které jsou charakteristické pro Th1 typ imunitní odpovědi, přispívají k Th2 fenotypu imunitní odpovědi (Katsuta *et al.*, 2006).

2.7. Očkování VACV a postvakcinační komplikace

2.7.1. Očkování VACV

Virus vakcínie patří do čeledi *Poxviridae* stejně jako její blízký příbuzný variola virus, původce černých neštovic.

Díky zkřížené protilátkové reaktivitě je virus vakcínie využíván jako očkovací kmen proti variole. V roce 1966 zahájila WHO (World Health Organisation) eradikační kampaň, v roce 1977 byl registrován poslední pacient s černými neštovicemi v Somálsku a v roce 1980 byl virus varioly prohlášen za vymýcený. Celoplošné očkování bylo proto zcela zrušeno.

V současnosti se v určitých oblastech opět začalo s očkováním zejména armádních zaměstnanců a zdravotnického personálu kvůli hrozbě použití viru varioly jako bioteroristické zbraně. Očkování kmenem Dryvax (Wyeth Laboratories), ať už dříve pěstovaným na telatech (vakcína 1. generace) nebo nově na tkáňových kulturách ACAM2000 (vakcína 2. generace), nebo některými atenuovanými kmeny však s sebou nese riziko různých postvakcinačních komplikací (Artenstein, 2009). Aktuálně se vyvíjí vakcína třetí generace IMVAMUNE (TM) založená na kmeni vakcínie Modified vaccinia virus Ankara (MVA). Tento kmen má mnohočetné delece a je schopen replikace na kuřecích embryonálních fibroblastech, ale nikoliv v savčích buňkách, v nichž je schopen jen exprese některých proteinů, čímž indukuje imunitní odpověď (MacNeil *et al.*, 2009) Z tohoto pohledu je uvedený kmen bezpečný i pro očkování atopiků, avšak z etických důvodů nelze s jistotou ověřit, zda je u nich vytvořena dostatečná protektivní imunita proti černým neštovicím.

Očkování živým virem vakcínie u imunokompromitovaných, imunosuprimovaných i u zdánlivě zdravých lidí způsobuje postvakcinační komplikace, a to generalizovanou vakcínii, (*vaccinia generalisatum*), progresivní vakcínii (*vaccinia necrosum*) nebo rozsev vakcínie v kůži (*eczema vaccinatum*). Očkování může způsobit i další komplikace, jako je postinfekční encefalitida, meningioencefalitida, myokarditida, trombocytopenie, artritida,

perikarditida a jiné (Remichkova, 2010). Proto se vyvíjí vakcína 3. generace, tvořená nereplikujícím se MVA.

2.7.2. *Eczema vaccinatum*

Eczema vaccinatum je onemocnění, ke kterému může dojít u lidí trpících atopickou dermatitidou a zároveň očkovaných či vystavených jinému kontaktu s virem vakcínie. Předpokládá se, že vývoj *eczema vaccinatum* u lidí s AD souvisí s poruchami přirozené imunitní odpovědi v kůži. Doposud není znám přesný mechanismus ani faktory vedoucí k rozvoji *eczema vaccinatum*.

Nicméně byla identifikována skupina genů přirozené imunity, která je spojována s poruchami imunitní odpovědi na virus vakcínie u AD. Jsou to geny asociované s ochranou organismu, odpovědí na zranění a s imunitní odpovědí. Exprese všech těchto genů byla snížena (Grigoryev *et al.*, 2009).

Jedinci s atopickou dermatitidou jsou tak vyloučeni ze všech preventivních i post-expozičních vakcinačních schémat. V důsledku očkování hrozí po aplikaci přenos VACV na blízké kontakty očkovaných, což nevylučuje jedince trpící atopickou dermatitidou. Je známo několik takových případů (McLaughlin *et al.*, 2007, Muzny *et al.*, 2009). Zejména to byl případ nakažení dítěte otcem, který byl krátce předtím očkován proti černým neštovicím virem vakcínie, kdy došlo k rozvoji život ohrožujícího *eczema vaccinatum* (Marcinak *et al.*, 2007).

3. Materiál a metody

3.1. Materiál

3.1.1. Chemikálie a roztoky

V této kapitole jsou uvedeny jen speciální chemikálie a roztoky. Ostatní běžné chemikálie pochází od firmy Sigma (Švýcarsko) nebo Penta (Česká republika). V metodách jsou uvedeny všechny roztoky. Ty byly připraveny v MilliQ vodě (18,2 Ω , 25 °C) nebo pro práci s DNA a RNA v aqua pro injectione. Roztoky pro tkáňové kultury a práci s myšmi byly sterilizovány autoklávováním nebo filtrovány (0,22 μ m filter - Techno Plastic Products, Švýcarsko).

3.1.1.1. Chemikálie

Agaróza – Biozym, Rakousko

Akrylamid/N,N'-metylenbisakrylamid, 37, 5:1 – Serva Electrophoresis, Německo

Aqua pro injectione – Fresenius Kabi, Německo

Etidium bromid (5 mg/ml) – Boehringer Mannheim, Německo

α -chloronaftol (3 mg/ml) – Sigma, Švýcarsko

Instant Nonfat Dry Milk – Nestlé, USA

Ovoalbumin (1 mg/ml) – Sigma, Švýcarsko

Ponceau červeň – Sigma, Švýcarsko

Primery pro GAPDH, IL-1 β , IL-18, IL-33, IRF-3, IFN β - Integrated DNA Technologies, USA

Random hexamer primers – Fermentas, Kanada

RNA Blue – Top-Bio, Česká republika

RNAlater RNA Stabilization Reagent - Qiagen, Německo

3.1.1.2. Roztoky

Avertin – 0,5 g 2,2,2-tribromethanol + 500 μ l amylalkohol + 2,6 ml PBS (10 x)

0,025% bromfenolová modř ve vodě

10 x elektroforetický pufr A – 1,875 M Tris (pH 8,8) + 0,5% SDS

10 x elektroforetický pufr B – 0,625 M Tris (pH 6,8) + 0,5% SDS

10 x elektroforetický pufr C – 60,6 g Tris (pH 8,8) + 288,2 g glycin do 2 l MilliQ vody

Fosfátový pufr – 100 mM Na₂HPO₄ v aqua pro injectione (pH 9)

Chromogenní substrát pro křenovou peroxidázu – 5ml α-chloronaftol (3 mg/1 ml v DMSO) + 20 ml PBS (1 x) + 15 až 45 μl H₂O₂

Laemmliho vzorkový pufr – 312,5 mM Tris-HCl (pH 6,8) + 10% SDS + 50% glycerol + loading buffer (cyanol:xylen (1:1) + glycerol, 6x koncentrovaný)

5% mléko – 5 g Instant Nonfat Dry Milk ve 100 ml 1 x PBS

PBS (10x) – 8 g NaCl + 0,2 g KCl + 1,44 g Na₂HPO₄ + 0,24 g KH₂PO₄ ve 100 ml MilliQ vody, filtrováno přes 0,22 μm filter

Ponceau červeň – 0,2% Ponceau + 3% kyselina trichloroctová

1 x RSB pro SDS-PAGE – 200 μl 5 x RSB + 800 μl MilliQ vody

5 x RSB pro SDS-PAGE (Reducing sample buffer, redukční vzorkový pufr) – 750 μl 5 x

Laemmliho vzorkový pufr + 250 μl β-merkapt ethanol

TBE (10x) – 54 g Tris báze + 27,5 g kyselina boritá + 7,4 g EDTA do 500 ml MilliQ vody

Transblotovací pufr A – 150 ml Tris báze (1 M) + 100 ml methanol + 250 ml MilliQ voda

Transblotovací pufr B – 12,5 ml Tris báze (1 M) + 100 ml methanol + 387,5 ml MilliQ voda

Trypsin – 2,5 g trypsinu + 0,5 g EDTA + 8 g NaCl + 0,2 g KCl + 1,44 g Na₂HPO₄ + 0,24 g KH₂PO₄ v 1 000 ml MilliQ vody, filtrováno přes 0,2 μm filtr

3.1.2. Kultivační média a přísady

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) s vysokým obsahem glukózy (4.5 g/l) – PAA Laboratories, Rakousko

10% fetální bovinní sérum (FBS) – Gibco/Invitrogen, USA

10% neonatální telecí sérum (NCS) – Gibco/Invitrogen, USA

Penicilin (1×10⁵ U/l) – PAA Laboratories, Rakousko

Streptomycin (100 mg/l) – PAA Laboratories, Rakousko

3.1.3. Protilátky

Králičí polyklonální protilátka proti viru vakcínie (kmen Western Reserve; produkce na zakázku)

Sekundární kozí protilátka proti králíkovi konjugovaná s peroxidázou – Cappel Research Products, Švédsko

3.1.4. Hmotnostní standardy

DNA marker 155-970 coloured – Top-Bio, Česká republika

GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder – Fermentas, Kanada

PageRuler™ Prestained Protein Ladder – Fermentas, Kanada

3.1.5. Kity

RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit – Fermentas, Kanada

RNA Blue RT PCR kit – Top-Bio, Česká republika

3.1.6. Přístroje, nástroje a programy

3.1.6.1. Přístroje

Autokláv Nüve OT 032 – Nüve, Ankara, Turecko

Biophotometer V1.32 – Eppendorf, Německo

Box s laminárním prouděním tř. IIA, Aura 2 000 M.A.C. – BioAir Instruments, Itálie

Box s laminárním prouděním tř. IIA, Forma – Thermo Scientific, USA

Box s laminárním prouděním tř. IIA, Holten Horizontal Laminar Airflow Clean Bench –
Thermo Scientific, USA

Centrifuga BR4i – Jouan, Francie

Centrifuga 5415 C – Eppendorf, Německo

Centrifuga Force 7 – LabNet International, Inc., USA

Centrifuga Gm Clab – Gilson, USA

Centrifuga MiniSpin – Eppendorf, Německo

Cohu High Performance camera 4912- Cohu, USA

Fotoaparát Canon Power Shot A580 – Canon, Japonsko
Fotoaparát Nikon Cool Pix 5 000 – Nikon, Japonsko
Homogenizer ULTRA TURRAX T8 – IKA, Čína
Inkubátor pro tkáňové kultury HERA cell CO₂ – Heraeus, USA
Izolátor pro laboratorní zvířata Independent environmental cabinets A110 – Jouan, Francie
Mastercycler gradient – Eppendorf, Německo
Mikroskop Olympus IX70 – Olympus, Japonsko
Optima LE-80K Ultracentrifuge – Beckman Coulter, USA
Transblot semi-dry transfer cell – BioRad, USA
Ultrasonic processor CPX 750 – Cole Palmer, USA
Ultrasonic homogenizer Series 4710 – Cole Palmer, USA
Váhy Atilon - Acculab Sartorius group, USA
Váhy Scout Pro portable balances - Ohaus, USA
Victor3 fluorescent plate reader 1420 multilabel counter – Perkin Elmer, USA
Zastříhávač vousů – Philips, Nizozemí
Zdroj pro PAGE PowerPac basic – BioRad, USA

3.1.6.2. Nástroje a pomůcky

3.1.6.2.1. Nástroje a pomůcky pro práci s myšmi

Akupunkturní jehly HuanQiu Super – Suzhou Huanqiu Acupuncture Medical Applicance Co. Ltd, Čína
Injekční stříkačky Inject F (0,01 ml až 1 ml) – B/Braun, Německo
Jehly 100 Sterican (0,55 x 25 mm) – B/Braun, Německo
Náplasti Cosmos (8 x 4 cm)- Hartmann, Česká republika
Očkovací razítko vyrobené RNDr. Věrou Hájkovou
Urgo Film transparentní (2,5 cm x 5 m) – Laboratoires Urgo s.a., Francie
Voděodolná foliová náplast (19 x 72 mm) – Tesco, Velká Británie

3.1.6.2.2. Pipety

Automatické pipety (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl) – Eppendorf, Německo
Multikanálové automatické pipety (20 µl, 200 µl) – Eppendorf, Německo

Pipetman Pipet-aid – Drummond Scientific corporation, USA

3.1.6.2.3. Laboratorní plast

Jednorázové pipety (2 ml, 5 ml a 10 ml), Petriho misky (průměr 6 mm), destičky pro tkáňové kultury (6-, 12-, 24- a 96-jamkové), kultivační láhve a plotny pro tkáňové kultury, zkumavky (5 ml, 15 ml a 50 ml) – Techno Plastic Products, TPP, Švýcarsko

„RNase-free“ zkumavky (200 µl) – Biologicals, Česká republika

„RNase-free“ zkumavky (1,5 ml) - Biologicals, Česká republika

Špičky (10 µl) – Biotix, USA

Špičky s filtrem (10 µl, 100 µl, 200 µl a 1000 µl) Top-Line Filtertips – IVD Micropure filter technology, USA

Techno Plastic Products, Švýcarsko

Zkumavky (1,5 ml), špičky (200 µl, 1000 µl) – Sarstedt, Německo

3.1.6.2.4. Ostatní použitý materiál pro molekulárně biologické techniky

Kyvety UVette - Eppendorf, Německo

Nitrocelulózová membrána Nytran 0,45 µm – Schleicher a Schuell, Německo

Whatman 3 MM - Schleider a Schuell, Německo

3.1.6.3. Počítačové programy

Adobe Photoshop – Adobe, USA

OLIGO Primer Analysis Software - Molecular Biology Insights, Inc., USA

Software LUCIA 4.6 – Laboratory Imaging Ltd., ČR

MS Office – Microsoft, USA.

FASTA – EMBL-EBI, European Bioinformatics Institute

EMBOSS-lite – NIH, National Institute of Health

Blast (Basic local alignment tool) – NIH, National Institute of Health

3.1.7. Buněčné linie

Ledvinné buňky kočkodana zeleného BSC-40 pěstované v 10% NCS DMEM; NCS inaktivováno při 65 °C

Myší embryonální fibroblasty NIH 3T3 pěstované v 10% FBS DMEM; FBS inaktivováno při 65 °C

Myší makrofágy J774.G8 pěstované v 10% FBS DMEM; FBS inaktivováno při 65 °C

Buněčné linie byly pěstovány v inkubátoru pro tkáňové kultury (HERA cell CO₂) při 37 °C v atmosféře s 5 % CO₂ a 95% vlhkostí.

3.1.8. Myší kmeny

Nc/Nga (spontánní model atopické dermatitidy) - Riken BioResource Center, Japonsko

Myši byly chovány v izolátoru zajišťujícím sterilní prostředí s autoklávovanými pilinami a krmivem nebo v konvenčním prostředí.

3.1.9. Viry

Pro pokusy byly použity tyto viry:

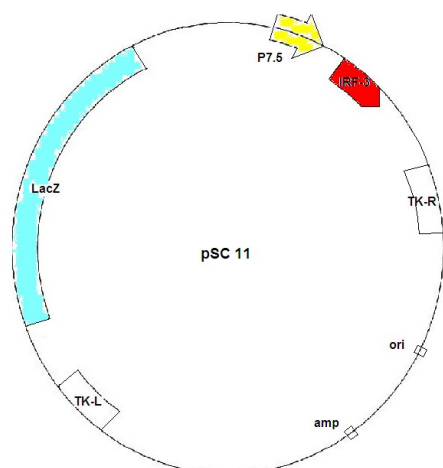
Divoký kmen VACV kmene Western Reserve (WR; wt-WR).

Rekombinantní VACV kmene WR exprimující luciferázu pod kontrolou promotoru p7.5 (WR-Luc; Rodriguez *et al.*, 1988). cDNA luciferázy byla vložena do VACV genu pro thymidin kinázu homologní rekombinací.

Rekombinantní VACV kmene WR exprimující IRF-3 pod kontrolou promotoru p7.5 (Interferon regulatory factor 3; WR-IRF3) byl zkonstruován a selektován Mgr. Jarmilou Knitlovou a Mgr. Janou Liškovou, Ph.D. cDNA pro IRF-3 byla pomocí inzerčního plasmidu pSC11-IRF3 vložena do virového genu pro thymidin kinázu homologní rekombinací.

3.1.10. Plazmidy

Inzerční plazmid pSC11 (Rodriguez *et al.*, 1988) s cDNA pro IRF-3 (pSC11-IRF3) vloženou do SmaI restrikčního místa byl vytvořen Mgr. Jarmilou Knitlovou v laboratoři MUDr. Zory Mělkové, PhD. Na obrázku 7 je zobrazeno schéma konstruovaného plasmidu.



Obr.7: Schéma inzerčního plazmidu s IRF-3 transkripčním faktorem pro homologní rekombinaci do VACV genu pro thymidin kinázu. P7.5, časně pozdní promotor VACV; IRF-3, cDNA transkripčního faktoru IRF-3; TK, gen pro thymidin kinázu; ori, replikační počátek; LacZ, selekční marker, gen pro α -fragment β -galaktosidázy; amp, selekční marker, gen pro ampicilin

3.2. Metody

MUDr. Mělková je držitelkou osvědčení o kvalifikaci pro práci s laboratorními zvířaty a laboratoř má oprávnění nakládat s geneticky modifikovanými organismy kategorie rizika I a II.

3.2.1. Metody *in vitro*

3.2.1.1. Pasážování buněk

Buňky BSC-40 a NIH-3T3 byly pasážovány dvakrát týdně a pěstovány v kultivačních lahvích (75 cm², Techno Plastic Products) ve 20 ml média DMEM s 10% sérem (NCS nebo FBS podle typu buněk) a s přidavkem antibiotik penicilinu (1×10⁵ U/l) a streptomycinu (100 mg/l) (PAA Laboratories). Pokud byly použity kultivační láhve s povrchem 150 cm², bylo použito dvojnásobné množství všech složek. Při pasážování v kultivačních lahvích s povrchem 75 cm² se nejprve z buněk odstranilo staré médium, poté byly buňky opláchnuty 1,5 ml trypsinu, který byl také odstraněn, a následně byl přidán nový trypsin v objemu 2 ml. V něm se buňky inkubovaly přibližně 5 minut v inkubátoru pro tkáňové kultury HERA cell CO₂ (Heraeus). Buňky byly kontrolovány pod mikroskopem, zda se odloučily od povrchu plastu. Trypsin byl inaktivován přidavkem 5 ml

média (10% NCS DMEM nebo 10% FBS DMEM podle typu buněk), v němž byly rozrušeny shluky buněk propipetováním. K 0,5 ml této suspenze buněk v kultivační lahvi bylo doplněno 20 ml nového média (10% NCS DMEM nebo 10% FBS DMEM). Buňky byly následně kultivovány v laboratorním inkubátoru HERA cell CO₂ po 4 dny a poté opět pasážovány.

Makrofágy J774.G8 byly pěstovány v 10% FBS DMEM v kultivačních lahvích s hydrofobním povrchem (25 cm², Sarstedt, Německo) a pasážovány 2-3x týdně cca 1:5.

3.2.1.2. Počítání buněk

Ze suspenze buněk (trypsinizované buňky v celkovém objemu 7 ml) bylo odebráno přibližně 100 µl ke stanovení počtu buněk. K 50 µl směsi buněk bylo přidáno 50 µl 0,1% trypanové modři v 1x PBS, aby byly obarveny vitální buňky. V Neubauerově komůrce byl stanoven počet buněk v 1 ml suspenze.

3.2.1.3. Nasetí buněk

Zbylá suspenze buněk (trypsinizované buňky v celkovém objemu 7 ml) byla naředěna v 10% NCS DMEM nebo 10% FBS DMEM podle typu buněk na požadovanou koncentraci a nasetá na Petriho misky nebo na 6-, 12-, 24- nebo 96-jamkové destičky. Tabulka 1 ukazuje požadovaný objem a koncentraci buněk na jamku.

destička	počet jamek	povrch (cm ²)	BSC-40/NIH 3T3/J774.G8	objem na jamku (ml)
			koncentrace buněk (x 10 ⁶)	
	6	9,4	1,5/0,75/1,5	3
	12	3,83	0,6/0,3/0,6	1,5
	24	1,88	0,3/0,15/0,3	1
	96	0,32	0,05	0,2
Petriho miska	60 x 15 mm	28,27	4,4/2,2/4,4	5

Tabulka 1: Charakter nasetí buněk (počet jamek, povrch, koncentrace a objem nasetých buněk)

3.2.1.4. Příprava hrubého extraktu viru

0,3 x 10⁸ buněk BSC-40 bylo kultivováno v 10% NCS DMEM na kultivační plotně (150 cm²). Po 24 hodinách byly buňky infikovány rekombinantním virem WR-IRF3 nebo WR-Luc s M.O.I. = 0,05, inkubovány 48 hodin ve 2% NCS DMEM v inkubátoru pro

tkáňové kultury HERA cell CO₂ při 37 °C, 5 % CO₂ a 95% vlhkosti. Poté byla suspenze buněk sklizena a stočena (2000 rpm, 5 min, 4 °C) na centrifuze JouanBR4i. Pelet buněk byl dvakrát opláchnut 10 ml DMEM, dále resuspendován ve 2 ml DMEM a sonikován 5 x 5 sekund (Ultrasonic processor CPX 750, 80% amplituda, Cole Palmer). Suspenze byla stočena (4000 rpm, 5 min, 4 °C) na téže centrifuze. Supernatant byl přepipetován do nové zkumavky, pelet byl dále resuspendován v 1 ml DMEM., sonikován a stočen stejným způsobem jako v předešlém kroku. Supernatant byl přidán k již odebranému supernatantu, suspenze byla sonikována 3 x 10 sekund, stočena a zamražena v -80 °C jako hrubý extrakt viru WR-IRF3.

3.2.1.5. Příprava purifikovaného viru

Purifikace byla prováděna podle publikovaného protokolu (Joklik, 1962). $0,3 \times 10^8$ buněk BSC-40 bylo infikováno wt-WR či WR-IRF3 jako pro přípravu hrubého extraktu viru. Následně byly buňky sklizeny odpipetováním do 50ml zkumavek a centrifugací (4000 rpm, 5 min, 4 °C) na centrifuze Jouan BR4i. Purifikace proběhla ultracentrifugací na Optima LE-80K Ultracentrifuge (Beckman Coulter) v sacharózovém gradientu (20 až 45 %).

3.2.1.6. Stanovení infekčního titru hrubého extraktu viru a purifikovaného viru

Stanovení titru bylo prováděno plakovou zkouškou. Buňky BSC-40 o hustotě $0,3 \times 10^6$ byly nasety na 12-jamkovou destičku. Po 24 hodinách byly infikovány příslušným virem v ředění 10^{-2} až 10^{-8} po dobu 42 h. Po 42 hodinách byly infikované buňky fixovány paraformaldehydem (4% v 1x PBS), barveny krystalovou violetí a byl spočítán titr viru WR-IRF3.

3.2.1.7. Infekce buněčných linií

Byly infikovány buňky naseté o 24 hodin dříve na destičky o různém počtu jamek nebo na Petriho misky. Virus pro inokulum byl rozmrazen, vortexován a krátce stočen (Centrifuga Force 7, LabNet International, Inc.) a pak sonikován 3 x 5 sekund (Ultrasonic

procesor, Cole a Palmer). Virus byl poté naředěn na požadovanou MOI. Z buněk bylo odsáto kultivační médium a buňky byly opláchnuty médiem DMEM bez séra; to bylo následně odsáto a bylo připipetováno virové inokulum. Pokud byla použita buněčná linie NIH 3T3, tak se buňky neoplachovaly, jelikož to přispívalo k jejich odloučení ode dna a k znehodnocení pokusu. Objem virového inokula pro určitý typ destiček nebo Petriho misek je uvedeno v tabulce 2.

destička	počet jamek	objem virového inokula (μl)
	6	600
	12	200
	24	200
	96	20
Petriho miska	60x15 mm	1000

Tabulka 2: Objem virového inokula podle typu destičky nebo Petriho misky

Buňky se infikovaly jednu hodinu za občasného promíchání v inkubátoru pro tkáňové kultury HERA cell CO₂, poté bylo virové inokulum nahrazeno 2% NCS nebo 2% FBS DMEM podle typu buněčné linie a takto infikované buňky byly kultivovány v inkubátoru pro tkáňové kultury HERA cell CO₂. U neinfikovaných kontrol byl postup stejný, pouze bylo přidáno po dobu infekce místo virového inokula DMEM bez séra.

3.2.1.8. Sklizení

Infikované buňky i buňky mock infikované se sklízely různým způsobem podle typu dalšího zpracování.

3.2.1.8.1. Sklizení na stanovení infekčního titru viru

Na stanovení infekčního titru byly buňky odpipetovány, špičkou seškrabány a odmyty ode dna jamky a s médiem přeneseny do zkumavky a zamrazeny v -80 °C.

3.2.1.8.2. Sklizení na detekci exprese genů pomocí RT-PCR

Pokud byly infikované buňky použity k detekci exprese požadovaného genu, byly buňky v jamce špičkou resuspendovány, přeneseny do zkumavky o objemu 1,5 ml a

následně zcentrifugovány (1 700 rpm, 5 min, 4 °C) na centrifuze Jouan BR4i. Nadále byly vzorky drženy na ledu. Supernatant byl opatrně odstraněn, pelet byl roztřepán a byl k němu připipetován 1 ml sterilního 1 x PBS. Suspenze byla opět stočena (1700 rpm, 5 min, 4 °C) na stejné centrifuze, supernatant odstraněn, pelet roztřepán a znovu promyt 0,5 ml 1x PBS. Směs se stočila (2 000 rpm, 5 min, 4 °C) a byl odpipetován supernatant. Pelety byly zamrazeny v -80 °C.

3.2.1.8.3. Sklizení na detekci proteinů pomocí western blot analýzy

Infikované buňky určené pro detekci proteinů pomocí western blot analýzy byly seškrabány ze dna jamek, suspenze přenesena do zkumavek (1,5 ml) a stočena (3 000 rpm, 2 min, pokojová teplota) na centrifuze Force 7 (LabNet International, Inc.). Byl odstraněn supernatant, roztřepán pelet a promyt 1 ml 1 x PBS (sterilní). Směs byla stočena na stejné centrifuze (3 000 rpm, 2 min, pokojová teplota), k resuspendovanému peletu bylo připipetováno 0,5 ml 1 x PBS a ten pak stočen (4 000 rpm, 0,5 min, pokojová teplota). K peletu bylo přidáno 80 µl 1 x RSB (Reducing Sample Buffer podle Laemmliho, Laemmli 1970). Směs byla propipetována. Vzorky byly zamrazeny v -80 °C.

3.2.1.9. Stanovení růstu viru plakovou zkouškou

Stanovení růstu viru v pokusech se provádělo na 96-jamkové destičce pomocí plakové zkoušky. Infikované buňky byly 3 x rozmrazeny a 3 x zamrazeny (-80 °C), vortexovány, sonikovány (Ultrasonic Homogenizer Series 4710, Cole a Palmer) a krátce stočeny (Centrifuga Force 7, LabNet International, Inc.). Bylo připraveno ředění virového inokula od 10^{-1} do 10^{-7} . Poté byla k virovému inokulu (20 µl) na 96-jamkové destičce připipetována suspenze buněk BSC-40 (6×10^4 , ve 130 µl na jamku, výsledná koncentrace 2% NCS DMEM). 24 h.p.i. v inkubátoru pro tkáňové kultury HERA cell CO₂ byla provedena fixace a barvení.

3.2.1.10. Western blot analýza

Tato metoda byla v minulosti popsána. Pracovala jsem podle upraveného protokolu (Laemmli, 1970, Harlow a Lane, 1988).

3.2.1.10.1. Příprava vzorku

Vzorky v 1x RSB byly povařeny 3 minuty a zcentrifugovány (14 000 rpm, 10 minut) na centrifuze 5415 C (Eppendorf). Vzorky byly poté nanášeny na gel v množství 10 µl vzorku na jamku. Jako hmotnostní standard byl použit PageRuler (Prestained Protein Ladder, Fermentas).

3.2.1.10.2. SDS-PAGE

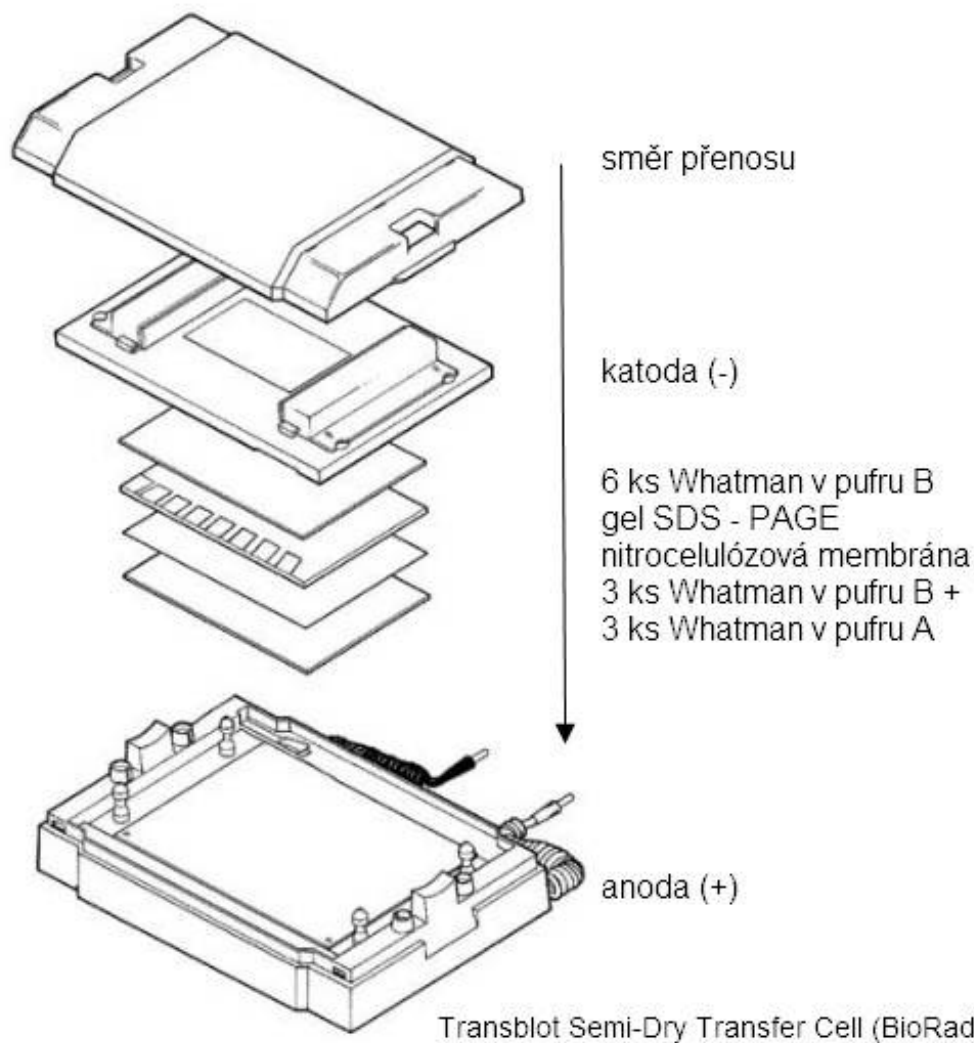
Aparatura pro elektroforézu v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE) byla sestavena podle návodu od výrobce (Mini-Protean 3, BioRad). V tabulce 3 je uvedeno složení obou gelů. SDS-PAGE probíhala v 1 x elektroforetickém pufru C s 1% SDS při napětí 100 V přibližně dvě hodiny.

druh gelu	koncentrace	N´met. bisakryl amid	MilliQ voda	PAGE pufr A	PAGE pufr B	TEMED	10% AP	glycerol
Separáčnı	10%	3,75 ml	4,95 ml	2,18 ml	0 ml	0,0075 ml	0,015 ml	0,3 ml
Zaostřovací	4,10%	0,6 ml	2,85 ml	0 ml	0,9 ml	0,0068 ml	0,0225 ml	0 ml

Tabulka 3: Složení elektroforetických gelů. TEMED a AP se přidávají těsně před nalitím gelu k iniciaci polymerizace gelu. TEMED, tetramethylethylenediamin; AP, persíran amonný

3.2.1.10.3. Transblot

Přenos rozdělených proteinů z gelu na nitrocelózovou membránu byl realizován v aparatuře Trans-Blot Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (BioRad) za stálého proudu 200 mA po dobu 45 minut. Složení blotovacího sendviče je uvedeno na obrázku 8 (http://www.bio-rad.com/prd/en/US/LSR/PDP/b92801aa-76b7-45c9-825e-672589d01b00/Trans-Blot_SD_Semi-Dry_Transfer_Cell)



Obr. 8: Znárodnění posloupnosti jednotlivých vrstev sendviče ve směru přenosu Transblot Semi-Dry Transfer Cell (BioRad).

Sendvič obsahoval směrem od anody nejprve 3 ks filtračního papíru Whatmann 3 MM (Schleicher a Schuell) namočeného v transblotovacím pufru A a na nich 3 ks Whatmann 3 MM namočeného v transblotovacím pufru B. Na ně byla položena nitrocelulózová membrána Nytran 0,45 μm (Schleicher a Schuell), na kterou byl přiložen gel. Na gel se položilo 6 ks Whatmann namočeného v transblotovacím pufru B. Na závěr se přiložilo víko aparatury s katodou. Přenos probíhá směrem od katody (negativní náboj) k anodě (pozitivní náboj). Úspěšnost transblotu byla ověřena barvením proteinů přenesených na nitrocelulózovou membránu pomocí 0,2% Ponceau červeně v 3% TCA (Sigma). Barvivo bylo odmyto inkubací membrány v 1 x PBS (2 x 15 min na třepačce).

3.2.1.10.4. Imunoblot

Pro imunologickou detekci protilátkou byla membrána blokována v 5% mléce (Nestlé) v 1x PBS 20 minut na třepačce. VACV proteiny byly detekovány králičí polyklonální protilátkou proti wt-WR (produkce na zakázku). Tato primární protilátka byla ředěna 1:500 v 5% mléce v 1x PBS a membrána v ní byla inkubována přes noc při 4 °C na třepačce. Druhý den byla membrána promyta v 1x PBS (2 x 15 min na třepačce) a inkubována v kozí sekundární protilátce konjugované s křenovou peroxidázou ředěnou 1:1 000 v 5% mléce v 1x PBS jednu hodinu při pokojové teplotě na třepačce. Membrána byla poté opět promyta v 1 x PBS (6 x 5 min). Proteiny byly vizualizovány pomocí chromogenního substrátu α -chloronaftolu po dobu 1 až 10 minut.

3.2.1.11. Detekce exprese genů pomocí RT-PCR

3.2.1.11.1. Izolace RNA

RNA byla izolována podle protokolu uvedeného u RNA Blue RT PCR kitu (Top-Bio). Vše bylo prováděno na ledu, pokud nebylo uvedeno jinak v originálním protokolu, centrifuga a veškeré roztoky byly předchlazeny na 4 °C. Byly použity zkumavky bez přítomnosti RNáz. K peletu sklizenému na detekci exprese genu byl připipetován 1 ml RNA Blue a vše inkubováno 5 minut při pokojové teplotě. Poté bylo přidáno 200 μ l chloroformu, protřepáno a následně opět inkubováno 5 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci byl vzorek zcentrifugován (12 000 rpm, 10 min, 4 °C) na centrifuze Jouan BR4i. Roztok se vzorkem se rozdělil na horní vodnou fázi obsahující RNA a dolní organickou fázi. Mezi fázemi se vytvořila bílá vrstva obsahující proteiny. Do nové zkumavky (1,5 ml) byla přenesena horní organická fáze s RNA a precipitována pomocí 0,5 ml izopropanolu. Vzorek byl protřepán a inkubován 10 minut při 4 °C a následně opět zcentrifugován (12 000 rpm, 10 min, 4 °C) za vzniku peletu RNA. Supernatant byl odstraněn a pelet promyt 1 ml 75% ethanolu, pak zcentrifugován (12 000 rpm, 5 min, 4 °C) a po odstranění supernatantu sušen na vzduchu. K peletu bylo připipetováno 15 až 50 μ l vody bez RNáz v závislosti na velikosti peletu. Kontrola izolace RNA byla provedena na agarózovém gelu (1,5%, 1x TBE) vizualizací EtBr (0,5 μ l EtBr o konc. 5 mg/ml na 50 ml agarózy). 2 μ l

RNA byly smíchány se 7 μ l vody bez RNáz a 1 μ l 6 x LB pufru (nanášecí pufr). Příprava gelu je uvedena v kapitole 2.3.5.6.. Vzorek byl poté uschován v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.1.11.2. Měření koncentrace RNA

Ke vzorku RNA byl přidán 1 μ l inhibitoru RNáz (výsledná koncentrace 1U/ μ l; Fermentas). Koncentrace RNA byla měřena na spektrofotometru Biophotometer V1.32 (Eppendorf) v ředění 100 x a 200 x. Byly použity kyvety Uvette (Eppendorf), do kterých bylo aplikováno 50 μ l vzorku. Byla měřena absorbance (koncentrace RNA = 40 x A_{260} x faktor ředění). Čistota RNA byla stanovena poměrem $A_{260/280}$. Přídavek inhibitoru RNáz nezměnil spektrofotometrické stanovení koncentrace RNA ve vzorku, což bylo prokázáno hodnotou A_{280} , která zůstala nezměněna. Vzorky byly následně naředěny na stejnou koncentraci, aby mohla být porovnána míra exprese.

3.2.1.11.3. Ošetření RNA DNázou

Vzorek RNA byl zbaven případných zbytků DNA podle protokolu uvedeného u RevertAid First Strand cDNA Synthesis kitu (Fermentas). RNA byla držena na ledu a veškeré roztoky byly předchlazeny. Ke vzorku (o koncentraci 1 μ g/1 μ l) byl připipetován 1 μ l 10 x pufru s MgCl_2 (25 mM), 1 μ l DNázy (1U/ μ l) a voda bez RNáz do 10 μ l. Vzorek byl inkubován 30 min při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. DNáza byla inaktivována přidávkem EDTA (50 mM) a inkubací 10 minut při $65\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzorky byly v této formě přechovávány v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a dle potřeby dále přepsány reverzní transkripcí.

3.2.1.11.4. Reverzní transkripce

Přepsání izolované RNA probíhalo podle upraveného protokolu u RevertAid First Strand cDNA Synthesis kitu (Fermentas). Práce s RNA probíhala na ledu a byly vychlazeny také chemikálie pro reverzní transkripci. Byl připraven mastermix bez reverzní transkriptázy. RNA byla denaturována inkubací 5 minut při $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ a přidána k mastermixu. Nakonec byla přidána reverzní transkriptáza nebo voda jako negativní kontrola. Vzorek byl inkubován 5 minut při $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 60 min při $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 5 minut při $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ v termocykléru Mastercycler gradient (Eppendorf). Vzorky byly následně zamrazeny v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a dle

potřeby použity k detekci exprese daného genu pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR).

3.2.1.11.5. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Amplifikace cDNA byla prováděna podle protokolu uvedeného u Taq polymerázy (RNA Blue RT PCR kit, Top-Bio). Byl namíchán mastermix, k němuž byla přidána přepsaná cDNA. PCR byla nastavena na 25 nebo 40 cyklů. PCR proběhla při následujících podmínkách: počáteční denaturace 94 °C/3 minuty, denaturace 94 °C/45 sekund, teplota pro annealing pro jednotlivé primery je uvedena zvlášť v tabulce 4, extenze 72 °C/1 minuta a závěrečná extenze 72 °C/10 minut.

primer	zásobní koncentrace	délka (bp)	Ta (°C)
GAPDH	10mM	300	60
IL-1 β	10mM	196	60
IL-18	10mM	492	53,1
IL-33	10mM	362	53,8
IFN β	10mM	332	55,8
IRF-3	10mM	504	50

Tabulka 4: Charakteristika jednotlivých primerů. Tabulka ukazuje teploty "annealingu" jednotlivých genů a jejich velikosti.

V tabulce 5 jsou uvedeny sekvence primerů pro všechny amplifikované geny, tj. GAPDH, IL-1 β , IL-18, IL-33, IRF-3 a IFN β .

primer	pravý primer (5'-3')	levý primer (5'-3')
GAPDH	GGAGACAACCTGGTCCTCAG	ACCCAGAAGACTGTGGATGG
IL-1 β	TCCATTGAGGTGGAGAGCTT	GGATGAGGACATGAGCACCT
IL-18	AGACAACCTTTGGCCGACTTC	CAAACCCTCCCCACCTAACT
IL-33	GAAAGCRGAGGGAGTAGGAG	TTAGTTCCACCCGTGATTG
IFN β	CCTACAGGGCGGACTTCAAG	GACCACCATCCAGGCGTAGC
IRF-3	TAGGCTGGCTGTTGGAGATGT	CCAGGTCTTCCAGCAGACACT

Tabulka 5: Tabulka ukazuje sekvence jednotlivých primerů.

3.2.1.11.6. Elektroforéza

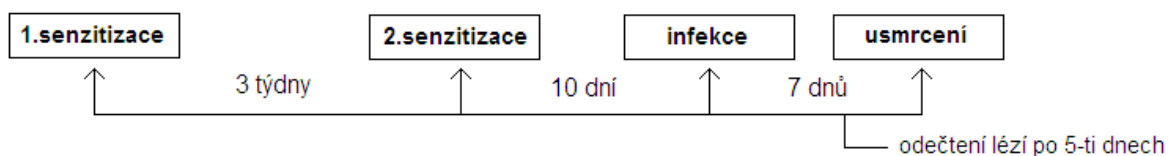
Ke vzorkům PCR byl přidán nanášecí pufr (6x, cyanol:xylen 1:1, glycerol) 10 μ l vzorku bylo separováno pomocí elektroforézy na 2% agarózovém gelu (1x TBE) s přidavkem ethidium bromidu (0,5 μ l EtBr o konc. 5 mg/ml na 50 ml agarózy), a PCR

produkty vizualizovány pod UV světlem. Elektroforéza probíhala při 90 V 20 minut až jednu hodinu. Byly použity dva druhy hmotnostních standardů, DNA marker 155-970 (Top-Bio) a GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas).

3.2.2. Metody *in vivo*

3.2.2.1. Senzitizace myší

Senzitizace myšího kmene Nc/Nga probíhala 2 x, a to od 6 až 7 týdnů stáří myší. Na obrázku 9 je znázorněna časová posloupnost senzitivace myší Nc/Nga, infekce a následné usmrcení.



Obr.9: Časová posloupnost senzitivace myší Nc/Nga, inokulace VACV (infekce) a usmrcení

Myš je před senzitivací a inokulací VACV uspána intraperitoneální (i.p.) aplikací anestetika avertinu. Poté jsou myši oholeny chlupy na pravém boku pomocí zastříhávače vousů (Philips) a třikrát aplikován takzvaný "tapestripping", což je metoda depilace veškerých chlupů a narušení kožní bariery strháváním náplastí z kůže (Hartmann). Na holé místo je aplikováno 100 μ l ovoalbuminu (1 mg/ml) nebo 1x PBS. Místo senzitivace je poté překryto náplastí s polštářkem (Tesco) a neprodyšnou náplastí, tzv. Urgofilmem, (Laboratoires Urgo s.a.). Takto ošetřená myš je na obrázku 10. Myši byla náplast po 7 dnech senzitivace stržena.



Obr. 10: Myš Nc/Nga po anestezii a senzitivaci

3.2.2.2. Infekce myší

3.2.2.2.1. Příprava virového inokula

Virové inokulum bylo před infekcí sonikováno 3 x 5 sekund (Ultrasonic homogenizer Series 4710, Cole Palmer, amplituda 80 %), krátce stočeno, a následně drženo na ledu. V tabulce 6 jsou uvedeny použité viry, jejich titer a objem virového inokula; k inokulu byl přidáván ještě ovoalbumin (1 mg/ml), není-li uvedeno jinak. Použité purifikované viry (WR; WR-Luc; WR-IRF3) byly naředěny na stejný titer (1×10^7 PFU).

virus	infekční titer (v 1 ml)	objem inokula/myš (μl)
WR	$1,75 \times 10^9$	5,71
WR-Luc	$2,40 \times 10^9$	4,16
WR-IRF3	$1,95 \times 10^9$	5,13

Tabulka 6: Tabulka ukazuje objem inokula/myš. Inokulum je naředěno na výslednou koncentraci 1×10^7 , což výsledně dává objem 8,3 μl.

3.2.2.2.2. Aplikace virového inokula na pokožku myši Nc/Nga

Inokulace VACV myším Nc/Nga byla provedena 10 dní po druhé senzitivizaci. Samotná aplikace virového inokula byla prováděna RNDr. Věrou Hájkovou. Myš byla uspána injekcí avertinu do peritoneální dutiny. Místo, kde byla prováděna senzitivizace, bylo 1x "tapestrippováno" a na holou kůži bylo napipetováno příslušné množství virového inokula (8,3 μl, pokud bylo použito razítko; 1 μl, pokud byla použita akupunkturální jehla). Inokulum bylo aplikováno jedním vpichem pomocí razítka nebo opakovanými vpichy akupunkturální jehlou. Razítko či jehla byly dezinfikovány oplachem v roztoku NaOH, ve vodě (MilliQ) a v 1x PBS a vysušeny. Struktura razítka je viditelná na obrázku 11.



Obr. 11: Razítko vyrobené RNDr. Věrou Hájkovou

Místo infekce bylo poté překryto náplastí s polštářkem a urgofilmem jako v případě senzitivace. Infikovaná zvířata byla přechovávána v izolátoru pro laboratorní zvířata Independent environmental cabinets A110 (Jouan) po dobu sedmi dnů. Jako negativní kontrola byl myším Nc/Nga aplikován 1x PBS (spolu s ovoalbuminem) stejným způsobem jako při aplikaci virového inokula. Kontrolní aplikace PBS byla vždy provedena jako první, aby se předešlo kontaminaci VACV. Infekce probíhala v boxu s laminárním prouděním tř. IIA Holten (Thermo Scientific), který byl po infekci různými typy viru vždy vysvícen UV světlem po dobu 20 minut. Vzniklá léze byla vyfotografována 3 nebo 5 dnů po infekci (Fotoaparát Canon Power Shot A580).

3.2.2.3. Usmrcení myši a odběr tkáně

Infikované myši byly usmrceny 24 hodin po infekci pro stanovení exprese cytokinů pomocí RT-PCR, nebo 5 či 7 dní po infekci pro stanovení velikosti léze, růstu viru a pro histologickou analýzu. Usmrcení prováděla RNDr. Věra Hájková v boxu s laminárním prouděním tř. IIA Holten (Thermo Scientific). Myš byla anestetizována a usmrcena nástřihem krční tepny a vykrvácením. Na každou myš byly použity nové, dezinfikované nástroje. Kůže spolu s podkožím v místě infekce byla vystřižena, zvážena (váhy Scout Pro portable balances, Ohaus) a odebrána do 1 ml RNAlater (Qiagen), pokud z ní byly detekovány exprimované cytokiny. Pokud byla kůže použita na stanovení infekčního titru, tak byla zamrzána v -80 °C. Dále byly odebrány, zváženy a uchovány i sleziny, ev. další orgány.

3.2.2.4. Zpracování vzorku tkáně

3.2.2.4.1. Stanovení infekčního titru infikované tkáně

Tkáň odebraná z myši Nc/Nga byla nástřihána na malé kousky (vždy nové sterilní nástroje) a ponořena do 0,5 ml DMEM a homogenizována na ledu pomocí ručního mixeru Homogenizer ULTRA TURRAX T8 (IKA). Následně byl stanoven růst viru v kůži stejně jako v kapitole 3.2.1.9.

3.2.2.4.2. Detekce exprimovaného genu z infikované tkáně

Tkáň uchovaná v RNAlater byla vyjmuta, byl odstřižen vzorek o hmotnosti 50 až 100 mg (váhy Scout Pro portable balances, Ohaus), který byl nastříhán na malé kousky (vždy nové sterilní nástroje) a ponořen do 1 ml RNA Blue (Top-Bio), v němž byl následně homogenizován (Homogenizer ULTRA TURRAX T8, IKA). Dále bylo postupováno podle kapitoly 3.2.1.11.

3.2.2.5. Statistické vyhodnocení

Infekční titr, který byl stanoven plakovou zkouškou, byl statisticky vyhodnocen pomocí dvouvýběrového párového t-testu na střední hodnotu s hladinou významnosti 0,05. Byly porovnány titry u infekce WR-IRF3 s kontrolním virem WR-Luc a stanovena jejich shoda/neshoda.

Rozdíl ve velikosti lézí a v poměrech hmotnosti slezin k váze myši po infekci viry WR-Luc, WR-IRF3 a WR byl vyhodnocen pomocí Standard error of mean (S.E.M.).

4. Výsledky:

Na výsledcích své diplomové práce jsem spolupracovala s kolektivem laboratoře MUDr. Zory Mělkové, konkrétně s paní Monikou Kaplanovou, RNDr. Věrou Hájkovou a s MUDr. Zorou Mělkovou, Ph.D. Pokud není uvedeno jinak, veškeré výsledky jsem zpracovala sama.

Výsledky jsou rozděleny do dvou skupin na *in vitro* a *in vivo* pokusy.

4.1. Experimenty *in vitro*

V následujících experimentech je charakterizován růst rekombinantního viru vakcínie kmene WR, který exprimuje cDNA pro transkripční faktor IRF-3 (WR-IRF3). Tento transkripční faktor hraje důležitou roli v protivirové odpovědi. Aktivace IRF-3 fosforylací, translokace do jádra a jeho dimerizace vedou k expresi IFN typu I (Perdiguero a Esteban, 2009).

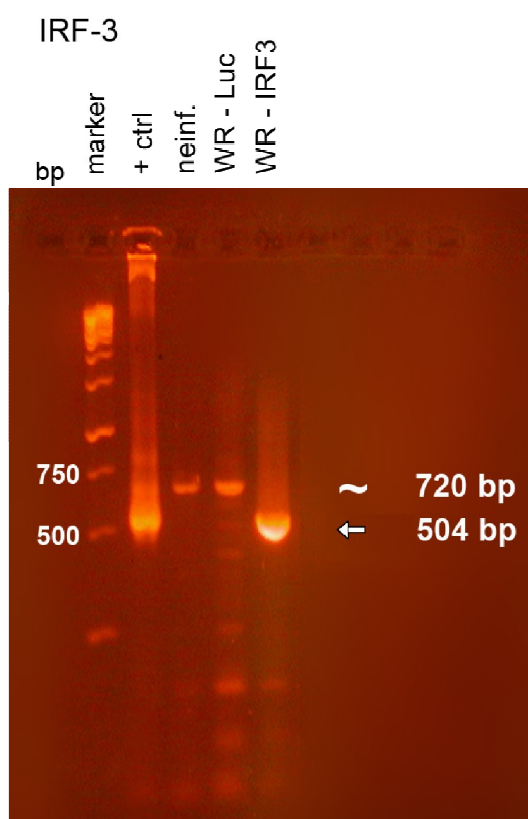
4.1.1. Charakterizace růstu hrubého extraktu viru WR-IRF3 v ledvinných buňkách kočkodana zeleného BSC-40

V této části diplomové práce je charakterizován růst hrubého extraktu viru WR-IRF3 po infekci o různé multiplicitě a časových intervalech na buňkách BSC-40. Jako kontrolní virus byl použit také rekombinantní virus vakcínie kmene WR, a to WR-Luc exprimující luciferázu. Byl stanoven infekční titr, byla ověřena exprese proteinů vakcínie ve vzorku charakterizována exprese IRF-3 rekombinantním virem WR-IRF3.

4.1.1.1. Hrubý extrakt rekombinantního viru WR-IRF3 exprimuje mRNA pro IRF-3 transkripční faktor

Buňky BSC-40 byly nasety na 12-jamkovou destičku, infikovány s M.O.I. = 2 a sklizeny ve 24 hodinách po infekci (h.p.i.). Jako negativní kontrola sloužily buňky, ke kterým bylo místo virového inokula přidáno DMEM (dále jen neinfikované buňky). Po sklizení byla izolována RNA, přepsána na cDNA a amplifikována pomocí PCR se

specifickými primery. Jako pozitivní kontrola pro PCR byl použit plazmid pSC11 s integrovanou cDNA pro IRF-3. Detekce IRF-3 cDNA je patrná na obrázku 12.



Obr.12: Detekce IRF-3 cDNA pomocí PCR. $1,1 \times 10^6$ /ml buněk BSC-40 bylo infikováno hrubým extraktem rekombinantních virů vakcínie WR-Luc a WR-IRF3 s M.O.I. = 2 a sklizeno 24 h.p.i. Při PCR amplifikaci bylo použito 40 cyklů. Amplifikované produkty byly rozděleny ve 2% agarózovém gelu (1 x TBE) a vizualizovány pomocí ethidium bromidu. Předpokládaná velikost produktu je 504 bp. marker, hmotnostní standard; + ctrl, pozitivní kontrola, tj. plazmid pSC11 s integrovanou cDNA pro IRF3 s produktem o velikosti 504 bp; neinf., neinfikované buňky s produktem o přibližné velikosti 720 bp; WR-Luc, buňky infikované kontrolním virem WR-Luc; WR-IRF3, buňky infikované WR-IRF3 s produktem o velikosti 504 bp.

U vzorku buněk infikovaných hrubým extraktem WR-IRF3 byl amplifikován produkt o předpokládané velikosti 504 bp shodující se s velikostí produktu pozitivní kontroly. U neinfikovaných buněk a buněk infikovaných hrubým extraktem WR-Luc byl detekován neznámý produkt o přibližné velikosti 720 bp. Primery byly navrženy pro myšičí mRNA kódující IRF-3, tudíž v opičích buňkách BSC-40 může mít amplifikovaný produkt jinou velikost. Množství produktu v infikovaných buňkách WR-IRF3 bylo vyšší než u produktu kontrolního vzorku buněk infikovaných WR-Luc nebo ve vzorku neinfikovaných buněk.

4.1.1.2. Stanovení růstu hrubého extraktu viru WR-IRF3 v buňkách BSC-40

Buňky BSC-40 byly infikovány hrubým extraktem viru WR-IRF3 a kontrolním virem WR-Luc s M.O.I. = 2 a sklizeny 12 a 24 hodin po infekci. Také byly infikovány s M.O.I. = 0,1 a sklizeny 48 hodin po infekci. Sklizené vzorky byly titrovány plakovou zkouškou na 12-jamkových destičkách. Infekční titr byl stanoven v duplikátech a následně zprůměrován. Tabulka 7 ukazuje výsledný titr jednotlivých virů.

h.p.i.	M.O.I.	rekombinantní virus (h.e.)	titr (v 1 ml)	P(T<=t)
12	2	WR - Luc	$5,775 \times 10^6$	0,245026813
12	2	WR - IRF3	$4,150 \times 10^6$	
24	2	WR - Luc	$23,375 \times 10^6$	0,48849983
24	2	WR - IRF3	$22,625 \times 10^6$	
48	0,1	WR - Luc	$10,875 \times 10^6$	0,285223288
48	0,1	WR - IRF3	$20,875 \times 10^6$	

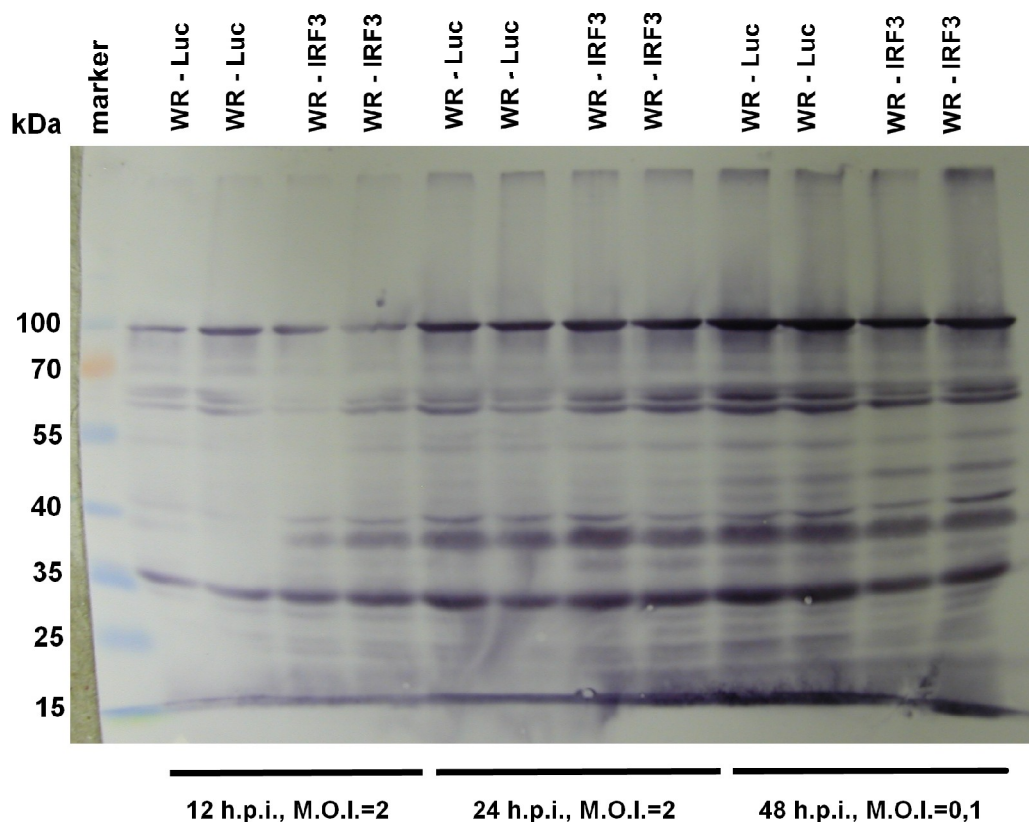
Tabulka 7: Stanovení infekčního titru hrubých extraktů virů WR-Luc a WR-IRF3 na 12-jamkové destičce buněk BSC-40 ($1,1 \times 10^6$ /ml) infikovaných s M.O.I. = 0,1 a 2 a sklizených 12, 24 a 48 hodin po infekci. Data byla vyhodnocena pomocí dvouvýběrového párového t-testu na střední hodnotu o hladině významnosti 0,05. Vzorky byly titrovány v buňkách BSC-40 v duplikátech na 12-jamkové destičce v ředění 1×10^{-2} až 1×10^{-8} a výsledek byl zprůměrován.

K porovnání hodnoty výše uvedených titrů jednotlivých vzorků infikovaných viry WR-Luc a WR-IRF3 byl použit dvouvýběrový párový t-test na střední hodnotu o hladině významnosti 0,05. Nebyla potvrzena neshoda hodnot podle tohoto testu. Z uvedených výsledků tedy vyplývá, že hrubé extrakty rekombinantních virů WR-Luc a WR-IRF3 rostou v buňkách BSC-40 obdobně.

4.1.1.3. Charakterizace exprese VACV proteinů

Kromě stanovení růstu viru pomocí stanovení infekčního titru byla charakterizována exprese VACV proteinů pomocí specifické protilátky.

Buňky BSC-40 byly v duplikátech infikovány hrubými extrakty virů WR-Luc a WR-IRF3 se stejnou multiplicitou infekce a sklizeny ve stejných intervalech (v duplikátech), jako tomu bylo v předešlé kapitole (4.1.1.2.) Proteiny v buněčném lyzátu byly rozděleny pomocí SDS-PAGE a přeneseny na nitrocelulózovou membránu. Proteiny byly detekovány specifickou protilátkou proti vakcínii a sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou. Obrázek 13 ukazuje detekované proteiny VACV.



Obr. 13: Imunodetekce VACV proteinů z buněk BSC-40 ($1,1 \times 10^6/\text{ml}$) infikovaných hrubými extrakty rekombinantních virů s integrovanou cDNA pro luciferázu a IRF-3 transkripční faktor s M.O.I. = 2 a sklizeno 24 h.p.i., s M.O.I. = 0,1 a sklizeno 48 h.p.i. Proteiny vakcínie byly detekovány primární králičí polyklonální protilátkou proti vakcínii a sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou a vizualizovány inkubací v roztoku α -chloronaftolu.

Zleva marker, hmotnostní standard; WR-Luc, M.O.I. = 2 a sklizeno 12 h.p.i.; WR-IRF3, M.O.I. = 2 a sklizeno 12 h.p.i.; uprostřed WR-Luc, M.O.I. = 2 a sklizeno 24 h.p.i.; WR-IRF3, M.O.I. = 2 a sklizeno 24 h.p.i.; a vpravo WR-Luc, M.O.I. = 0,1 a sklizeno 48 h.p.i.; WR-IRF3, M.O.I. = 0,1 a sklizeno 48 h.p.i..

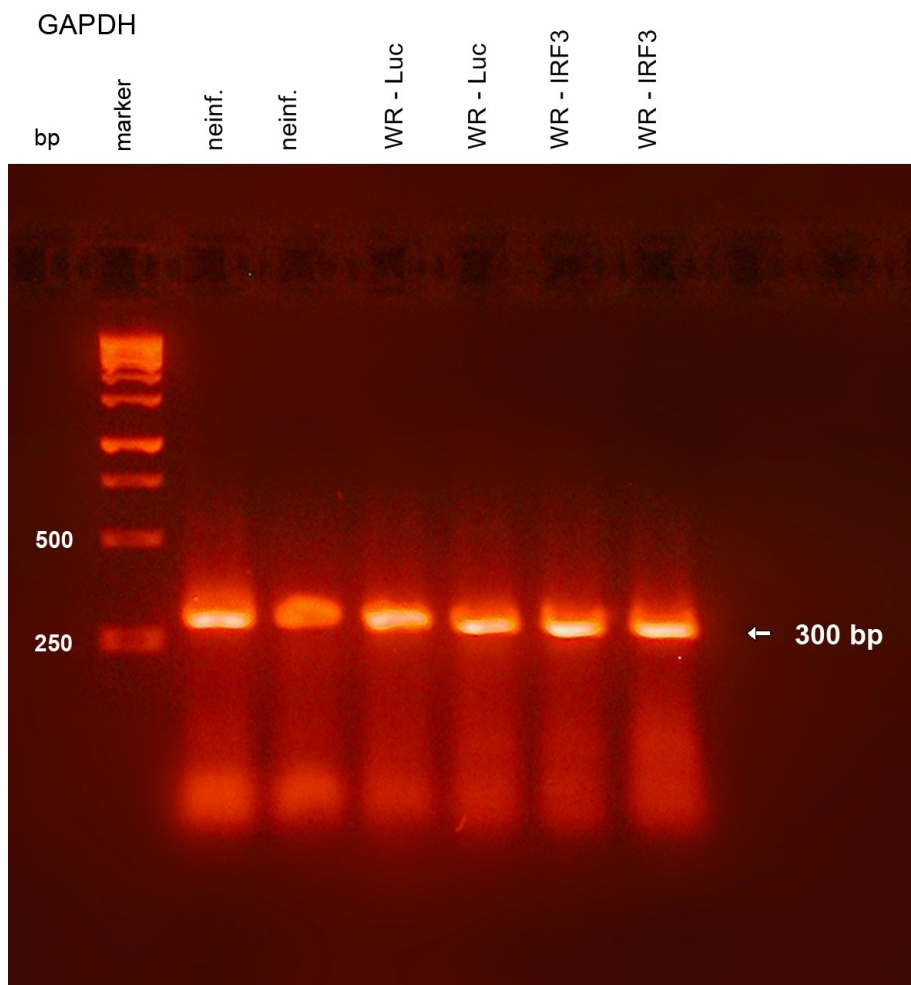
Kinetika exprese virových proteinů v buňkách BSC-40 hrubými extrakty obou rekombinantních virů byla vzestupná v závislosti na čase po infekci. Množství VACV proteinů se zdá být u WR-Luc a WR-IRF3 podobné. Růstové vlastnosti hrubého extraktu rekombinantních virů WR-IRF3 se tedy v buňkách BSC-40 zdají být srovnatelné s hrubým extraktem kontrolního rekombinantního viru WR-Luc.

4.1.2. Charakterizace růstu hrubého extraktu rekombinantního viru WR-IRF3 v buňkách myších embryonálních fibroblastů NIH 3T3

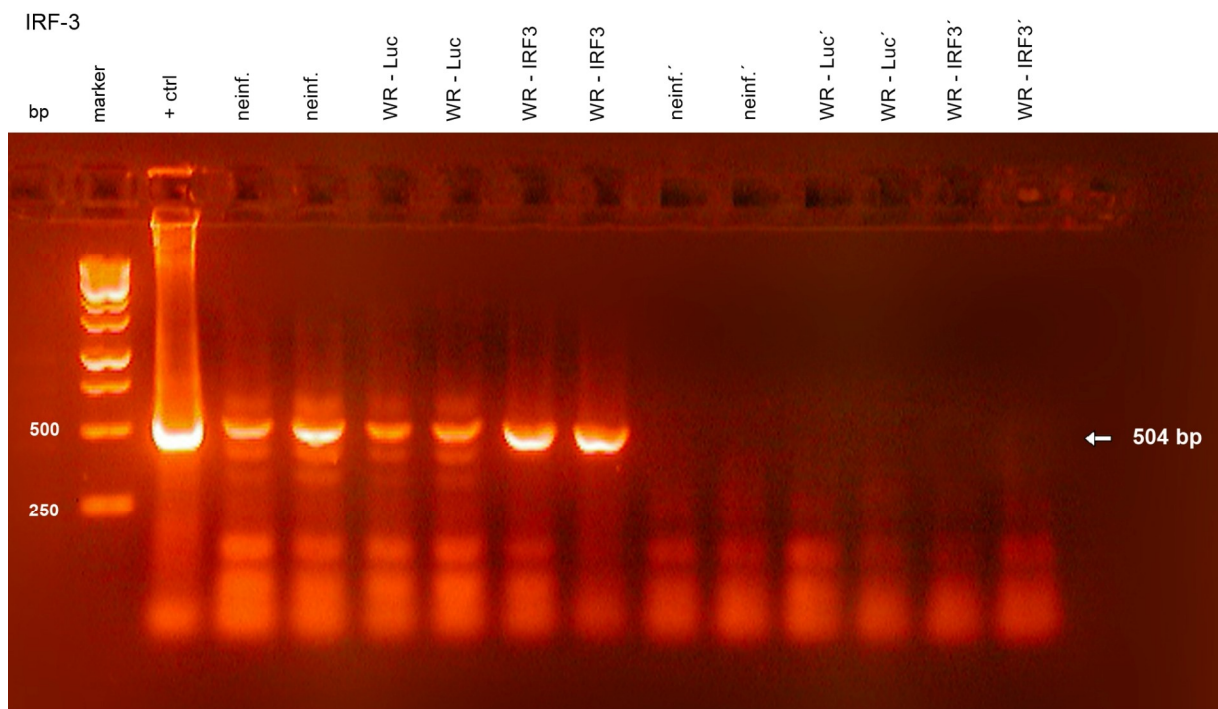
Vzhledem k tomu, že cDNA pro transkripční faktor IRF-3 integrovaná v rekombinantním viru WR-IRF3 je myšního původu, byla další charakterizace tohoto viru prováděna na myších buňkách, a to konkrétně na myších embryonálních fibroblastech NIH 3T3. Stejně jako u experimentů na buňkách BSC-40 byly použity příslušné metody k detekci exprese transkribovaných genů, k detekci proteinů VACV a byl stanoven infekční titr rekombinantního viru pomocí plakové zkoušky.

4.1.2.1. Hrubý extrakt rekombinantního viru WR-IRF3 exprimuje IRF-3 v buňkách NIH 3T3

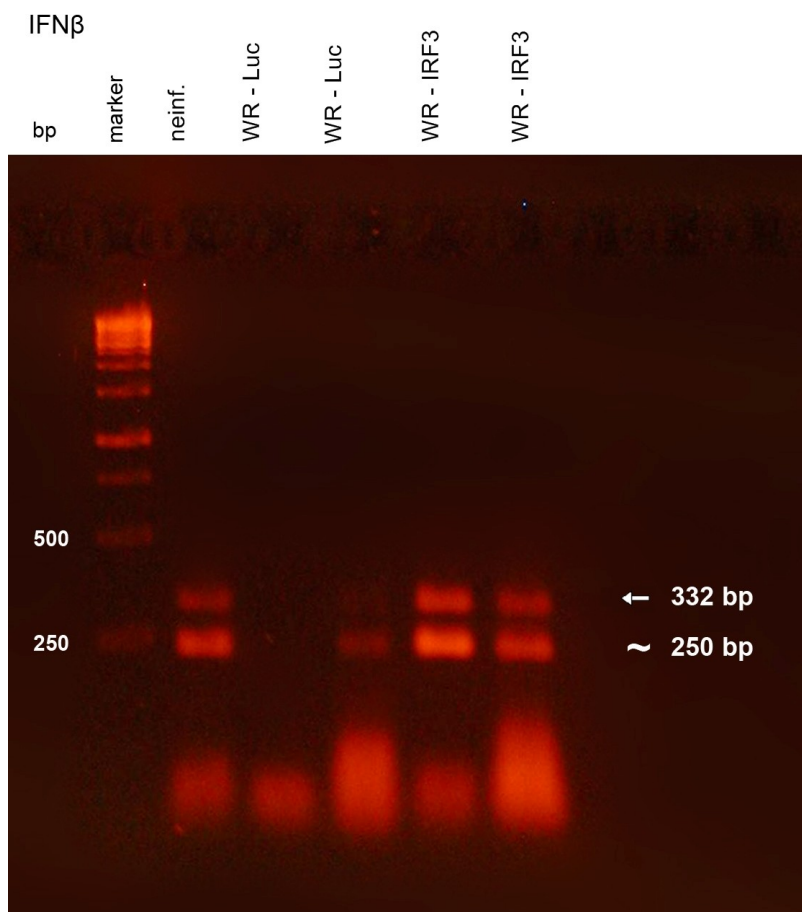
Buňky NIH 3T3 byly nasety na 6-jamkovou destičku, infikovány hrubými extrakty virů WR-Luc a WR-IRF3 s M.O.I. = 2. Jako negativní kontrola byly použity neinfikované buňky NIN 3T3. Buňky byly sklizeny 24 hodin po infekci. Byla izolována RNA, která byla naředěna na stejnou koncentraci pro všechny vzorky, ošetřena DNázou a přepsána na cDNA. Jako negativní kontrola byly použity vzorky bez reverzní transkriptázy, aby se ověřilo, zda se nedetekuje také genomová DNA. Dále byla amplifikována cDNA pro GAPDH (glyceraldehyd trifosfát dehydrogenáza) jako tzv. housekeeping gen (obrázek 14). Vzhledem k tomu, že IRF-3 transkripční faktor iniciuje expresi IFN β jako odpověď na virovou infekci (Perdiguero a Esteban, 2009), byla detekce cDNA pro IFN β (obrázek 16) použita jako funkční esej sloužící k průkazu funkčního proteinu IRF-3. VACV inhibuje aktivaci IRF-3 a následně expresi IFN β , ale nadměrná exprese IRF-3 rekombinantním virem vakcínie WR-IRF3 by mohla tuto inhibici zvrátit (obrázek 15).



Obr. 14: Detekce GAPDH cDNA pomocí PCR. $0,75 \times 10^6$ /ml buněk NIH 3T3 bylo infikováno hrubým extraktem rekombinantních kmenů viru vakcínie WR-Luc a WR-IRF3 s M.O.I. = 2 a sklizeno 24 h.p.i. Při PCR amplifikaci bylo použito 40 cyklů. Amplifikované produkty byly rozděleny ve 2% agarózovém gelu (1 x TBE) a vizualizovány pomocí ethidium bromidu. Předpokládaná velikost produktu je 300 bp. marker, hmotnostní standard; neinf., neinfikované buňky; WR-Luc, buňky infikované kontrolním virem WR-Luc; WR-IRF3, buňky infikované WR-IRF3.



Obr. 15: Detekce IRF-3 cDNA pomocí PCR. $0,75 \times 10^6$ /ml buněk NIH 3T3 bylo infikováno hrubým extraktem rekombinantních kmenů viru vakcínie WR-Luc a WR-IRF3 s M.O.I. = 2 a sklizeno 24 h.p.i. Při PCR amplifikaci bylo použito 40 cyklů. Amplifikované produkty byly rozděleny ve 2% agarózovém gelu (1 x TBE) a vizualizovány pomocí ethidium bromidu. Předpokládaná velikost produktu je 504 bp. marker, hmotnostní standard; + ctrl, pozitivní kontrola, plazmid pSC11 s integrovanou cDNA pro IRF-3; neinf., neinfikované buňky; WR-Luc, buňky infikované kontrolním virem WR-Luc; WR-IRF3, buňky infikované WR-IRF3. Vzorky označené apostrofem jsou negativní kontrolou, detekce proběhla na vzorcích bez přidání reverzní transkriptázy.



Obr. 16: Detekce IFN β cDNA pomocí PCR. $0,75 \times 10^6$ /ml buněk NIH 3T3 bylo infikováno hrubým extraktem rekombinantních virů vakcínie WR-Luc a WR-IRF3 s M.O.I. = 2 a sklizeno 24 h.p.i.. Při PCR amplifikaci bylo použito 40 cyklů. Amplifikované produkty byly rozděleny ve 2% agarózovém gelu (1 x TBE) a vizualizovány pomocí ethidium bromidu. Předpokládaná velikost produktu je 332 bp. marker, hmotnostní standard; neinf., neinfikované buňky; WR-Luc, buňky infikované kontrolním virem WR-Luc; WR-IRF3, buňky infikované WR-IRF3.

Množství detekované GAPDH cDNA se zdálo být u vzorků infikovaných a neinfikovaných buněk NIH 3T3 stejná (obrázek 14).

Vyšší množství IRF-3 cDNA byla zaznamenáno u neinfikovaných buněk NIH 3T3 a u WR-IRF3 infikovaných buněk (obrázek 15). Infekce WR-Luc způsobila pokles detekované IRF-3 cDNA.

PCR pro IFN β cDNA detekovalo dva produkty. Produkt IFN β má předpokládanou velikost 332 bp, druhý neznámý produkt má velikost přibližně 250 bp (obrázek 16). IFN β cDNA byla u buněk NIH 3T3 infikovaných WR-Luc detekována pouze minimálně. Tyto výsledky naznačují, že exprimovaný IRF-3 je funkční a je schopen obejít inhibici aktivity a translokace do jádra způsobenou VACV a indukovat expresi IFN β .

4.1.2.2. Stanovení růstu hrubého extraktu rekombinantního viru WR-IRF3 v buňkách myších embryonálních fibroblastů NIH 3T3

Bylo nutné ověřit, zda se liší charakter růstu obou hrubých extraktů rekombinantních virů WR-Luc a WR-IRF3. U obou virů byl stanoven infekční titr a detekovány proteiny VACV.

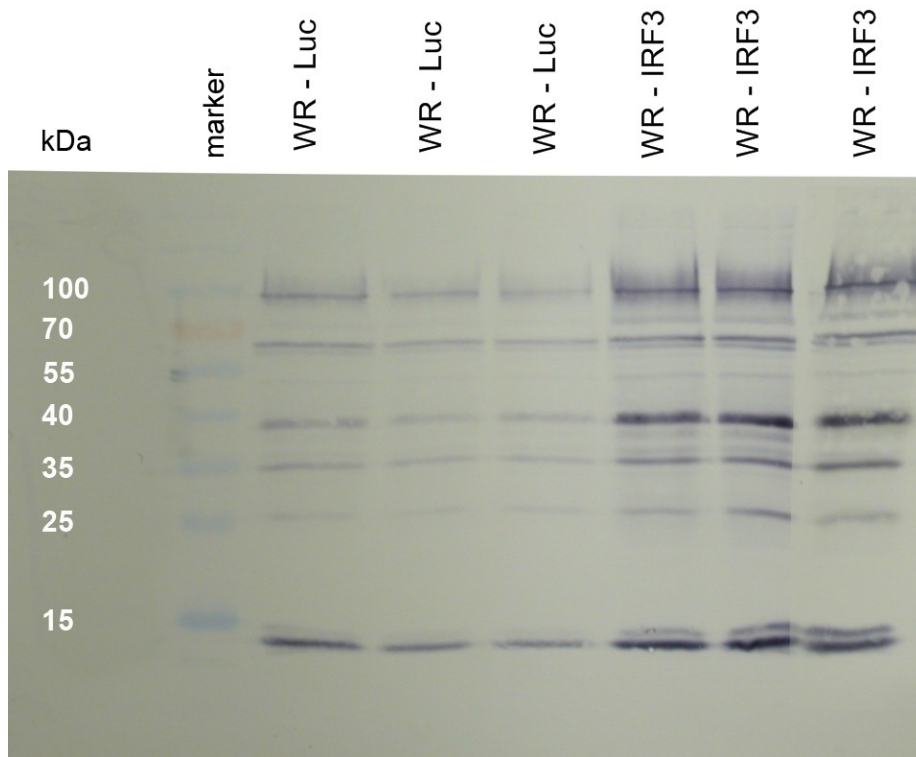
Buňky NIH 3T3 byly nasety na 12-jamkovou destičku, infikovány kontrolním virem WR-Luc a virem WR-IRF3 s M.O.I. = 0,1 a 1 a sklizeny 48 h.p.i. Z každého vzorku bylo odebráno 1,2 ml na detekci proteinů a zbytek byl použit pro stanovení infekčního titru obou virů. Tabulka 8 ukazuje titry sklizených infikovaných vzorků .

h.p.i.	M.O.I.	rekombinantní virus	titr (v 1 ml)	P(T<=t)
0	0,1	WR - Luc	-	0,032119
		WR - IRF3	-	
48		WR - Luc	$1,00 \times 10^3$	
		WR - IRF3	$1,65 \times 10^3$	
0	1	WR - Luc	$4,45 \times 10^6$	0,130821
		WR - IRF3	$3,05 \times 10^6$	
48		WR - Luc	$1,12 \times 10^6$	
		WR - IRF3	$1,70 \times 10^6$	

Tabulka 8: Stanovení infekčního titru hrubých extraktů virů WR-Luc a WR-IRF3 po infekci buněk NIH 3T3 ($0,3 \times 10^6$ /ml) s M.O.I = 0,1 a 1 a sklizených 48 h.p.i. Data byla vyhodnocena pomocí dvouvýběrového párového t-testu na střední hodnotu o hladině významnosti 0,05. Vzorky byly titrovány v buňkách BSC-40 v triplicátech na 96-jamkové destičce v ředění 1×10^{-1} až 1×10^{-8} a výsledek byl zprůměrován.

Z výsledků stanovení infekčního titru vyplývá, že růst obou rekombinantních virů WR-Luc a WR-IRF3 v buňkách NIH 3T3 se zdá být srovnatelný. Tento závěr byl ověřen použitím dvouvýběrového párového t-testu na střední hodnotu o hladině významnosti 0,05.

Růst hrubého extraktu kontrolního viru WR-Luc a viru WR-IRF3 byl dále ověřen detekcí VACV proteinů, což ukazuje obrázek 17. Vzhledem k tomu, že byl infekční titr při infekci buněk NIH 3T3 s M.O.I.= 0,1 velice nízký, byly VACV proteiny detekovány pouze u vzorků s M.O.I. = 1.



Obr. 17: Imunodetekce VACV proteinů specifickou polyklonální protilátkou proti vakcínii. $0,6 \times 10^6$ /ml buněk NIH 3T3 bylo infikováno hrubým extraktem rekombinantních kmenů virů vakcínie s integrovanou cDNA WR-Luc a WR-IRF3 s M.O.I. = 1 a sklizeno 24 h.p.i. Proteiny vakcínie byly detekovány primární králičí polyklonální protilátkou proti vakcínii a sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou a vizualizovány inkubací v roztoku α -chloronaftolu. marker, hmotnostní standard; WR-Luc, buňky infikované kontrolním virem WR-Luc; WR-IRF3, buňky infikované WR-IRF3.

Spektrum proteinů vakcínie detekovaných u obou rekombinantních virů WR-Luc a WR-IRF3 v buňkách infikovaných NIH 3T3 je totožné, rozdílné je však jejich množství.

Po 48 hodinách od doby infekce byly infikované buňky kontrolovány pod mikroskopem. Buňky infikované WR-Luc byly morfologicky odlišné od průběhu infekce WR-IRF3 s M.O.I. = 1. Signalizace přes IRF-3 transkripční faktor může vést k apoptóze (Ferrer et al., 2011), což by odpovídalo morfologii buněk infikovaných WR-IRF3. Vzhledem k tomu, že byl používán hrubý extrakt viru, je však také možné, že zbytky buněk indukovaly apoptózu.

4.1.3. Charakterizace růstu purifikovaného rekombinantního viru WR-IRF3 v buňkách NIH 3T3

K zpřesnění charakterizace rekombinantního viru s integrovanou cDNA pro transkripční faktor IRF-3 byly dále používány pouze purifikované viry. Stejně viry byly použity i při *in vivo* pokusech.

4.1.3.1. Příprava purifikovaného rekombinantního viru WR-IRF3

Buňky BSC-40 byly nasety a infikovány s M.O.I. = 0,01 Monikou Kaplanovou. Samotná purifikace viru WR-IRF3 byla prováděna MUDr. Zorou Mělkovou, Ph.D. Purifikovaný virus byl titrován mnou pomocí plakové zkoušky.

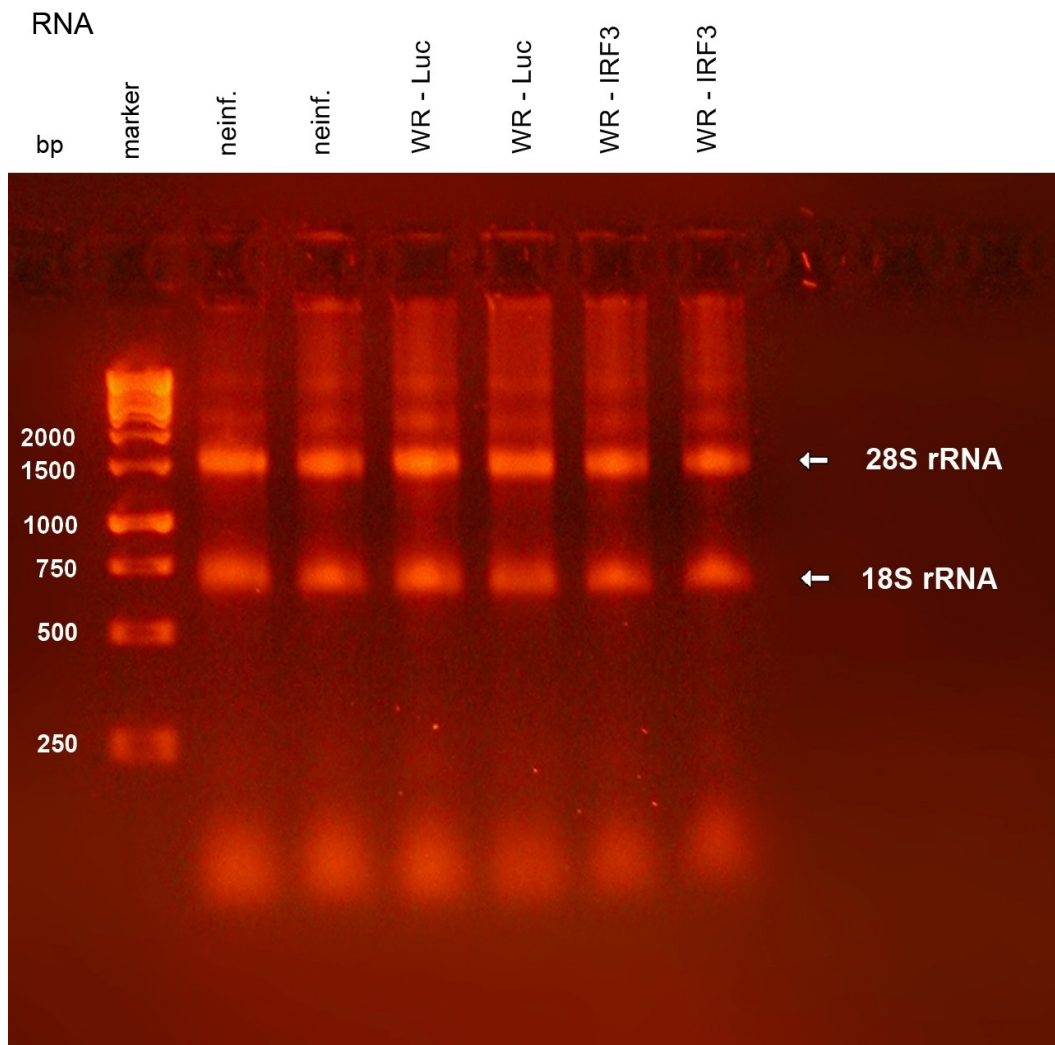
Buňky BSC-40 byly nasety na 12-jamkové destičky a infikovány purifikovanými viry WR, WR-Luc a WR-IRF3 v ředění 1×10^{-2} až 1×10^{-8} . Viry byly titrovány současně, aby byly zaručeny stejné podmínky plakové zkoušky a stanovené titry byly srovnatelné pro další experimenty. Virus WR a WR-Luc byl purifikován také MUDr. Zorou Mělkovou, Ph.D. V tabulce 9 jsou shrnuty titry všech tří virů.

virus (p.)	titr (v 1 ml)
WR	$1,75 \times 10^9$
WR - Luc	$2,40 \times 10^9$
WR - IRF3	$1,95 \times 10^9$

Tabulka 9: Stanovení infekčního titru purifikovaných virů WR, WR-Luc a WR-IRF3 na 12-jamkové destičce infekcí buněk BSC-40 ($0,6 \times 10^6/1$ ml) v ředění 1×10^{-2} až 1×10^{-8} a fixovaných a obarvených 42 h.p.i. Vzorky byly titrovány v duplikátech a výsledek zprůměrován.

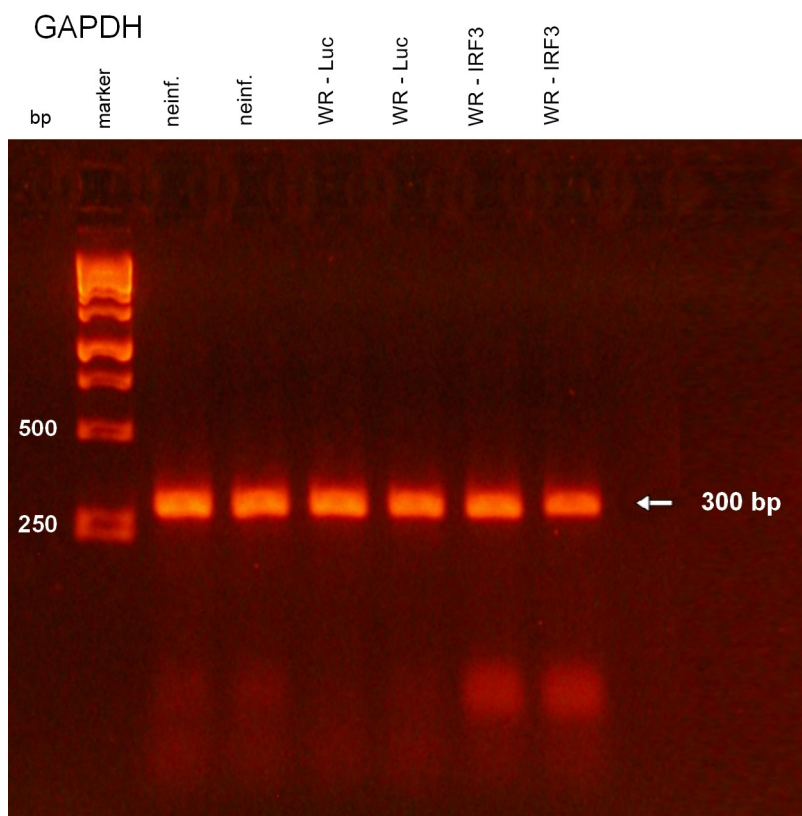
4.1.3.2. Purifikovaný rekombinantní virus WR-IRF3 exprimuje IRF-3

Buňky NIH 3T3 byly následně infikovány purifikovanými rekombinantními viry WR-Luc a WR-IRF3 s M.O.I. = 2 a sklizeny 18 hodin po infekci. Titrace byla provedena na 96-jamkové destičce. Ze vzorku neinfikovaných a WR-Luc a WR-IRF3 infikovaných buněk byla izolována RNA, která byla vizualizována na gelu (obrázek 18).



Obr. 18: Vizualizace izolované RNA. $0,3 \times 10^6$ /ml buněk NIH 3T3 bylo infikováno purifikovanými rekombinačními kmeny virů vakcínie WR-Luc a WR-IRF3 s M.O.I. = 2 a sklizeno 18 h.p.i. Izolovaná RNA byla rozdělena v 1,5% agarózovém gelu (1 x TBE) a vizualizována pomocí ethidium bromidu. Produkt dvou detekovaných proužků odpovídá pozicím 18S rRNA a 28S rRNA. marker, hmotnostní standard; neinf., neinfikované buňky; WR-Luc, buňky infikované kontrolním virem WR-Luc; WR-IRF3, buňky infikované rekombinantním virem WR-IRF3.

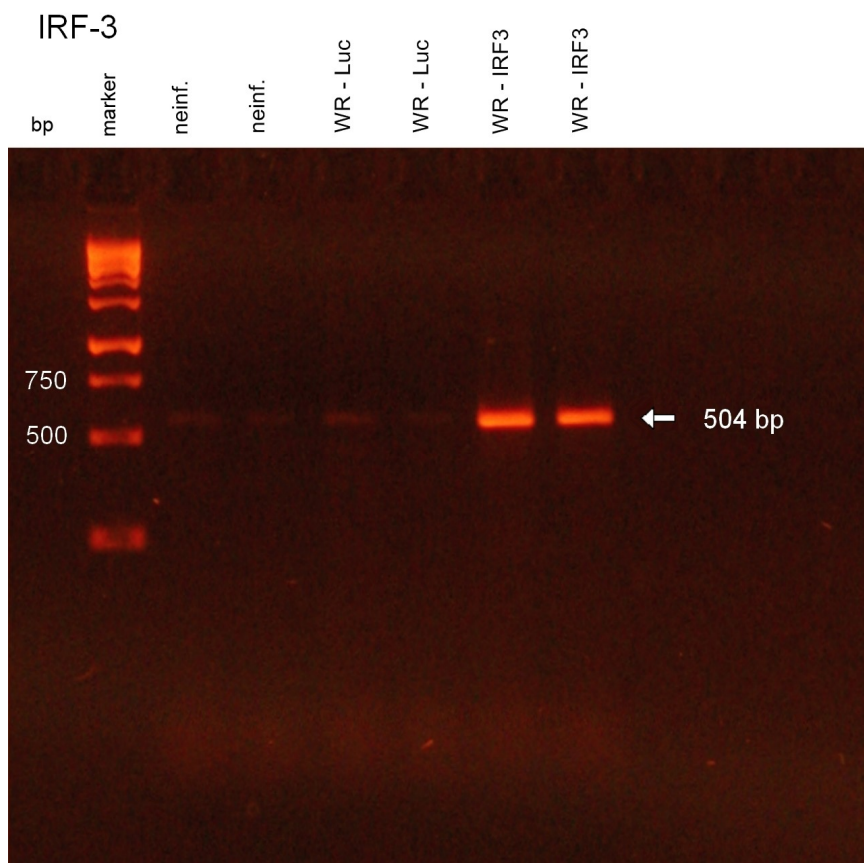
Dále byla změřena koncentrace izolované RNA, a ta poté naředěna na stejnou koncentraci u všech vzorků. RNA byla ošetřena DNázou a přepsána na cDNA. cDNA pro kontrolní gen GAPDH (obrázek 19) a IRF-3 transkripční faktor (obrázek 20) byla amplifikována pomocí PCR.



Obr. 19: Detekce GAPDH cDNA pomocí PCR. $0,3 \times 10^6$ /ml buněk NIH 3T3 bylo infikováno purifikovanými rekombinantními kmeny viru vakcínie WR-Luc a WR-IRF3 s M.O.I. = 2 a sklizeno 18 h.p.i. Při PCR amplifikaci bylo použito 40 cyklů. Předpokládaná velikost produktu je 300 bp. Amplifikované produkty byly rozděleny ve 2% agarózovém gelu (1 x TBE) a vizualizovány pomocí ethidium bromidu.

marker, hmotnostní standard; neinf., neinfikované buňky; WR-Luc, buňky infikované kontrolním virem WR-Luc; WR-IRF3, buňky infikované WR-IRF3.

Z obrázku 19 vyplývá, že GAPDH cDNA byla detekována přibližně ve stejné míře ve všech vzorcích.



Obr. 20: Detekce IRF-3 cDNA pomocí PCR. $0,3 \times 10^6$ /ml buněk NIH 3T3 bylo infikováno purifikovanými rekombinantními kmeny viru vakcínie WR-Luc a WR-IRF3 s M.O.I. = 2 a sklizeno 18 h.p.i. Při PCR amplifikaci bylo použito 25 cyklů. Předpokládaná velikost produktu je 504 bp. Amplifikované produkty byly rozděleny ve 2% agarózovém gelu (1 x TBE) a vizualizovány pomocí ethidium bromidu.

marker, hmotnostní standard; neinf., neinfikované buňky; WR-Luc, buňky infikované kontrolním virem WR-Luc; WR-IRF3, buňky infikované WR-IRF3.

IRF-3 cDNA byla amplifikována pomocí PCR. V tomto případě bylo použito 25 cyklů, aby byly více patrné kvantitativní rozdíly mezi vzorky. V tomto experimentu byl produkt IRF-3 nalezen zejména u vzorků buněk infikovaných WR-IRF3. U neinfikovaných vzorků a vzorků infikovaných WR-Luc byla zaznamenána pouze slabá produkce IRF-3.

Detekce IFN β cDNA pomocí PCR reakce se nezdařila. Data proto nejsou znázorněna.

4.1.3.3. Stanovení růstu purifikovaného rekombinantního viru WR-IRF3

K potvrzení, zda není detekce cDNA IRF3 ovlivněna růstem jednotlivých virů, byl stanoven infekční titer purifikovaných rekombinantních virů.

Rekombinantní viry byly testovány na obou buněčných liniích NIH 3T3 a BSC-40. Buňky byly infikovány virem WR-IRF3 a WR-Luc s M.O.I. = 0,1 a 2. Infikované buňky byly sklizeny v intervalu 48 h.p.i., respektive 24 h.p.i. Výsledný růst jednotlivých virů v různých buněčných liniích je shrnut v tabulce 10.

h.p.i.	M.O.I.	buňky	rekombinantní virus	titr (v 1 ml)	P(T<=t)
1	0,1	BSC-40	WR - Luc	$5,38 \times 10^2$	0,25
			WR - IRF3	$4,88 \times 10^2$	
1	2	BSC-40	WR - Luc	$8,90 \times 10^3$	0,153588
			WR - IRF3	$7,59 \times 10^3$	
1	0,1	NIH 3T3	WR - Luc	$7,00 \times 10^2$	0,430395
			WR - IRF3	$8,00 \times 10^2$	
1	2	NIH 3T3	WR - Luc	$1,33 \times 10^4$	0,133281
			WR - IRF3	$1,05 \times 10^4$	
24	2	BSC-40	WR - Luc	$3,07 \times 10^8$	0,377561
			WR - IRF3	$2,58 \times 10^8$	
24	2	NIH 3T3	WR - Luc	$3,82 \times 10^6$	0,093056
			WR - IRF3	$3,07 \times 10^6$	
48	0,1	BSC-40	WR - Luc	$4,40 \times 10^8$	0,245244
			WR - IRF3	$3,75 \times 10^8$	
48	0,1	NIH 3T3	WR - Luc	$2,38 \times 10^5$	0,124277
			WR - IRF3	$3,82 \times 10^5$	

Tabulka 10: Stanovení infekčního titru ve vzorcích buněk BSC-40 ($0,3 \times 10^6/1$ ml) a NIH 3T3 ($0,15 \times 10^6/1$ ml) nasetých na 24-jamkovou destičku, infikovaných purifikovanými rekombinantními viry WR-Luc a WR-IRF3 s M.O.I. = 0,1 a 2 sklizených 48 h.p.i. respektive 24 h.p.i. Data byla vyhodnocena pomocí dvouvýběrového párového t-testu na střední hodnotu o hladině významnosti 0,05. Vzorky byly titrovány v duplikátech infekcí buněk BSC-40 na 96-jamkové destičce v ředění 1×10^0 až 1×10^{-7} a výsledek byl průměrován.

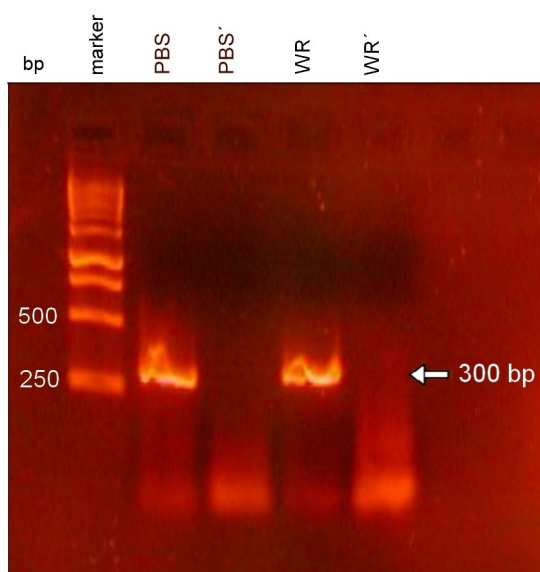
Po srovnání výsledků stanovení infekčního titru vzorků buněk infikovaných purifikovanými rekombinantními viry WR-Luc a WR-IRF3 byl použit dvouvýběrový párový t-test na střední hodnotu o hladině významnosti 0,05. Z výsledků testu byl vyhodnocen růst obou virů v buňkách BSC-40 a NIH 3T3 jako srovnatelný, a to jak při M.O.I. = 2, tak i při M.O.I. = 0,1.

4.1.4. Pozitivní kontrola pro detekci cytokinů - myši makrofágy J774.G8 infikované virem VACV kmene WR

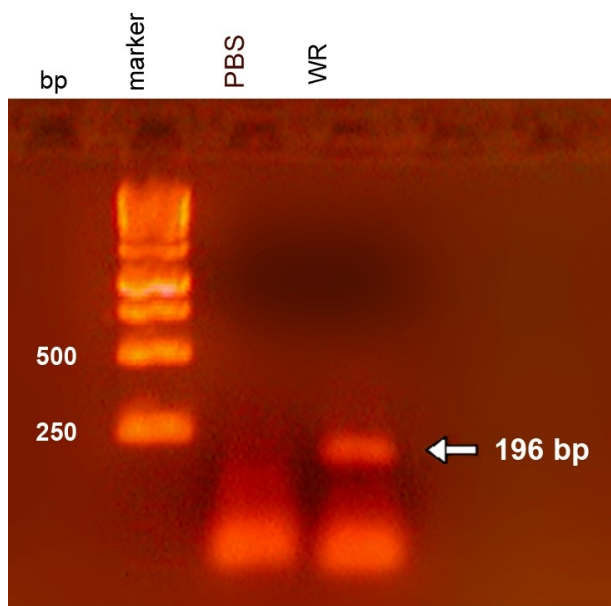
Pro detekci cytokinů *in vivo* z kůže myši Nc/Nga bylo nutné ověřit tuto detekci nejprve *in vitro* na buňkách makrofágů, aby se zjistilo, zda je funkční.

Buňky makrofágů J774.G8 byly infikovány purifikovaným virem vakcínie kmene Western Reserve (WR) s M.O.I. = 5 a sklizeny 1 hodinu po infekci. Ze vzorku byla izolována RNA, která byla přepsána na cDNA. Jako negativní kontrola byla provedena reverzní transkripce bez reverzní transkriptázy. Z cDNA pak byly pomocí PCR amplifikovány GAPDH, IL-1 β a IL-18. Touto metodou nebyl zachycen IL-33, proto k němu není vytvořena kontrola. Na obrázku 21 jsou znázorněny všechny detekované produkty.

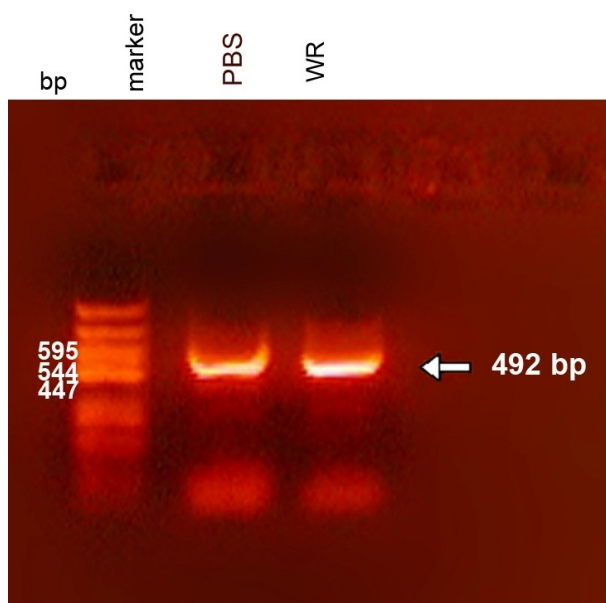
A. GAPDH



B. IL-1 β



C. IL-18



Obr. 21: Detekce cDNA pro GAPDH, IL-1 β , IL-18 pomocí PCR. Buňky makrofágů J774.G8 byly infikovány purifikovaným virem vakcínie kmene WR s M.O.I. = 5 a sklizeny 1 h.p.i. Při PCR amplifikaci bylo použito 40 cyklů. Amplifikované produkty byly rozděleny ve 2% agarózovém gelu (1 x TBE) a vizualizovány pomocí ethidium bromidu.

A. Detekce GAPDH cDNA. Předpokládaná velikost produktu je 300 bp. Apostrofy jsou označeny vzorky negativní kontroly bez reverzní transkriptázy. B. Detekce IL-1 β cDNA. Předpokládaná velikost produktu je 196 bp. C. Detekce IL-18 cDNA. Předpokládaná velikost produktu je 492 bp. marker, hmotnostní standard; neinf., neinfikované buňky; WR, buňky infikované vakcíní kmenem WR.

Produkty GAPDH a IL-18 byly detekovány v neinfikovaných a v WR infikovaných mikrofázích, a to na rozdíl od IL-1 β , který byl detekován pouze v WR infikovaných buňkách.

Makrofágy J774.G8 infikované WR s M.O.I. = 5 byly sklizeny také v intervalech 4, 6 a 12 h.p.i. U těchto pozdějších intervalů sklizení byl zaznamenán odlišný profil detekce cDNA pro GAPDH, IL-1 β a IL-18. Pro použití jako kontroly byly však nejvhodnější vzorky sklizené 1 h.p.i.

Při detekci cDNA u neinfikovaných a WR infikovaných makrofágů byl optimalizován esej pro detekci cytokinů v kůži myši Nc/Nga. U GAPDH bylo nutno upravit koncentraci iontů Mg²⁺ na 0,75 mM, u cytokinů zůstaly koncentrace nezměněny a tyto cDNA byly amplifikovány při koncentraci Mg²⁺ 1,5 mM.

4.2. Experimenty *in vivo*

K *in vivo* experimentům byl použit myši kmen Nc/Nga. Tento kmen pochází z Japonska (Riken BioResource center Japan) a je to spontánní model atopické dermatitidy, kterou vyvine mezi šestým a sedmým týdnem života.

Na tomto kmenu myši jsem charakterizovala expresi cytokinů jako odpověď na inokulaci viru vakcínie. Tyto experimenty navazují na disertační práci Mgr. Jarmily Knitlové, která porovnává myši kmeny Nc/Nga, Balb/c a C57Bl/6 z hlediska odpovědi na očkování virem vakcínie (Knitková et al, rukopis v přípravě).

Veškerou práci s infikovanými zvířaty prováděla RNDr. Věra Hájková (samotná infekce a usmrcení infikovaného zvířete). Vzorky určené na titraci byly také homogenizovány RNDr. Věrou Hájkovou. Ostatní práce byla provedena mnou (senzitivace ve spolupráci s RNDr. Hájkovou, anestezie i.p. injekcí avertinu, zpracování a vyhodnocení odebraných vzorků).

4.2.1. Charakterizace vlivu různého ošetření místa senzitivace a infekce myši Nc/Nga na expresi cytokinů

Před senzitivací a infekcí kůže myši Nc/Nga byl nejprve použit tzv. „tapestripping“, kterým se narušila povrchová ochranná vrstva kůže, kam byl poté aplikován alergen

(ovoalbumin) při senzitivaci nebo virové inokulum VACV v případě infekce. Místo bylo poté přelepeno neprodyšnou náplastí.

Všechny tyto postupy mohou mít vliv na zánětlivou reakci a expresi cytokinů a následnou patogenezí eczema vaccinatum, proto byly *in vivo* experimenty rozděleny na senzitivované a nesenzitivované myši Nc/Nga a bylo vyzkoušeno, jaký vliv má „tapestripping“ a přelepení náplastí na lokální produkci cytokinů v místě aplikace virového inokula.

4.2.1.1. Vliv aplikace náplasti a „tapestrippingu“ na charakter exprese cytokinů u myši Nc/Nga bez senzitivace

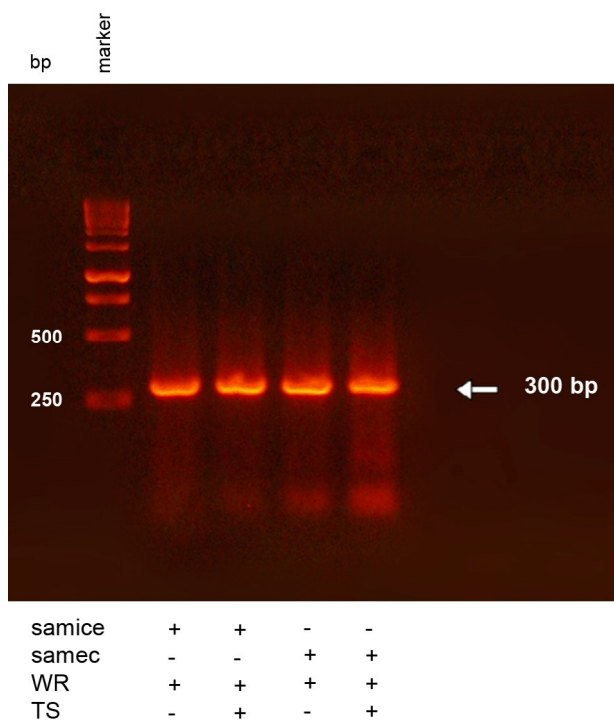
Myši Nc/Nga ve věku 6 až 7 týdnů nebyly senzitivovány, ale rovnou inokulovány purifikovaným virem vakcínie (kmen Western Reverse) nebo jim byl stejným způsobem aplikován stejný objem sterilního PBS, aby byl patrný vliv infekce na expresi cytokinů oproti vlivu samotné aplikace u kontrol. Myši Nc/Nga byly anestetizovány podáním avertinu a následně inokulovány virem WR nebo PBS, které byly do kůže aplikovány s použitím očkovačích razítek. Myši byly usmrceny 24 hodin po infekci a byla z nich odebrána kůže v místě inokulace. Odebraná kůže byla homogenizována a byla z ní izolována celková RNA. Ta byla ošetřena DNázou, naředěna na stejnou koncentraci u všech vzorků a přepsána reverzní transkripcí na cDNA. Dále byla tato cDNA amplifikována pomocí PCR s primery specifickými pro jednotlivé cytokiny.

Byla detekována cDNA pro GAPDH, což je housekeeping gen, který sloužil jako pozitivní kontrola. Dále byla detekována cDNA pro IL-1 β prozánětlivý cytokin, jehož expresi moduluje virus vakcínie, a cDNA pro IL-18, jehož efekty jsou také inhibovány VACV. Oba tyto cytokiny směřují imunitní odpověď k Th1 typu. Dalším cytokinem, který byl detekován, je IL-33, jehož exprese směřuje imunitní odpověď k Th2 typu.

Samcům Nc/Nga chovaným v konvenčních podmínkách byl aplikován sterilní PBS (8,3 μ l) očkovačím razítkem. U jednotlivých kusů byly použity různé varianty aplikace náplasti a „tapestrippingu“. U takto ošetřených myši byla detekována cDNA cytokinů pomocí PCR.

Pro kontrolu měla být u PBS myši detekována cDNA pro GAPDH. Z důvodu nedostatku cDNA k tomu však nedošlo. Amplifikace GAPDH cDNA byla provedena pouze u vzorků myši infikovaných WR (obrázek 22).

GAPDH, Nc/Nga bez senzitivace



Obr. 22: Detekce GAPDH cDNA pomocí PCR. Samci a samice Nc/Nga byli chováni v konvenčních podmínkách, byli infikováni purifikovaným virem WR dávkou 8,3 μ l (1×10^7 PFU) a usmrceni 24 h.p.i. Při PCR amplifikaci bylo použito 40 cyklů. Předpokládaná velikost produktu je 300 bp.

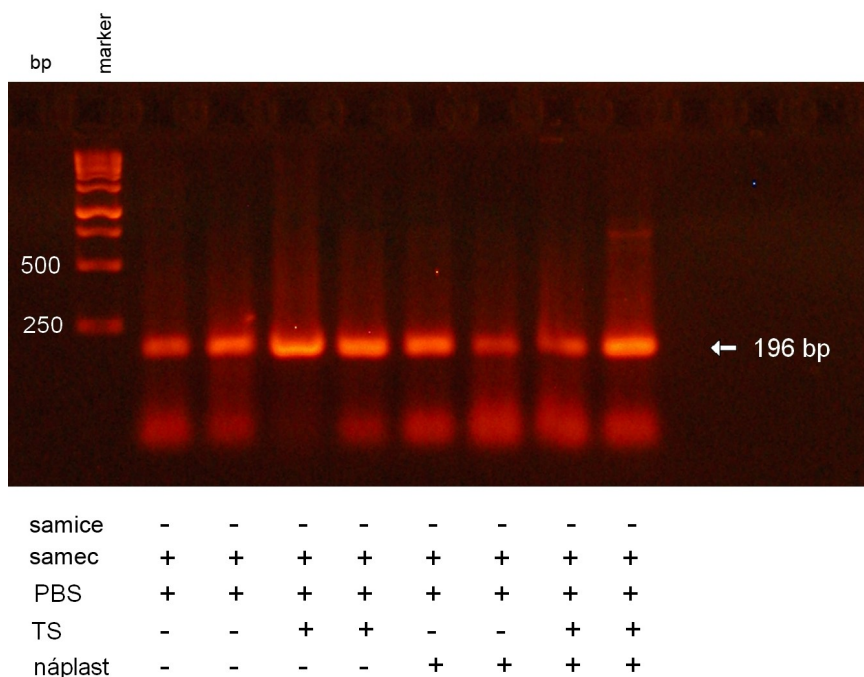
Amplifikované produkty byly rozděleny ve 2% agarózovém gelu (1 x TBE) a vizualizovány pomocí ethidium bromidu.

marker, hmotnostní standard; samice bez tapestrippingu (TS), samice s TS, samec bez TS; samec s TS

cDNA pro GAPDH byla detekována ve všech vzorcích v přibližně stejné míře.

Obrázky 23 až 32 ukazují detekci cytokinů ve vzorcích kůže myši Nc/Nga inokulovaných PBS a VACV kmene WR. Prvním detekovaným cytokinem byla IL-1 β cDNA (obrázek 23).

IL-1 β , Nc/Nga bez senzitivace



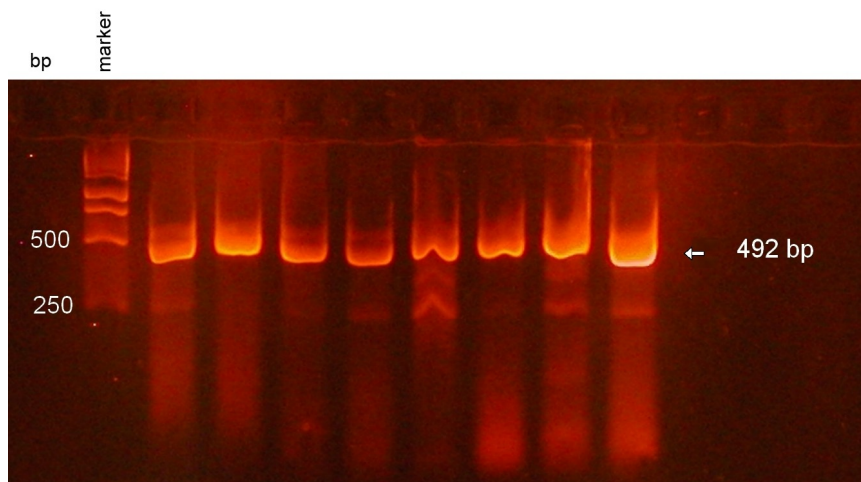
Obr. 23: Detekce IL-1 β cDNA pomocí PCR. Samci Nc/Nga byli chováni v konvenčních podmínkách. Byli inokulováni stejnou dávkou sterilního PBS (8,3 μ l) a usmrceni 24 hodin po infekci. Při PCR amplifikaci bylo použito 40 cyklů. Předpokládaná velikost produktu je 196 bp. Amplifikované produkty byly rozděleny ve 2% agarózovém gelu (1 x TBE) a vizualizovány pomocí ethidium bromidu. marker, hmotnostní standard; samec bez náplasti, bez TS; samec bez náplasti, bez TS; samec bez náplasti, s TS; samec bez náplasti s TS; samec s náplastí, bez TS+ samec s náplastí, bez TS, samec s náplastí, s TS; samec s náplastí a TS.

Produkt o velikosti odpovídající cytokinu IL-1 β cDNA byl detekován u všech vzorků a typů ošetření kůže. Podle obrázku 23 se zdá, že aplikace náplasti neměla na expresi IL-1 β žádný vliv oproti „tapestrippingu“, kde byla míra detekce cDNA IL-1 β mírně zvýšena. Toto zvýšení je ale nutné potvrdit kvantitativními metodami. Z tohoto experimentu lze tedy pouze vyvodit přítomnost produktu odpovídajícímu velikosti IL-1 β ve všech vzorcích kůže.

Vzhledem k tomu, že aplikace náplasti neměla žádný vliv na expresi cytokinu, byla tato varianta u myší infikovaných VACV kmenem WR vyloučena z dalších experimentů.

Samci a samice Nc/Nga chováni v konvenčních podmínkách byli infikováni kmenem WR viru VACV a usmrceni 24 hodin po infekci. Vzorky kůže byly zpracovány stejným způsobem jako v případě inokulace PBS. Poté byla amplifikována cDNA pomocí PCR pro IL-1 β (obrázek 24).

IL-18, Nc/Nga bez senzitivace



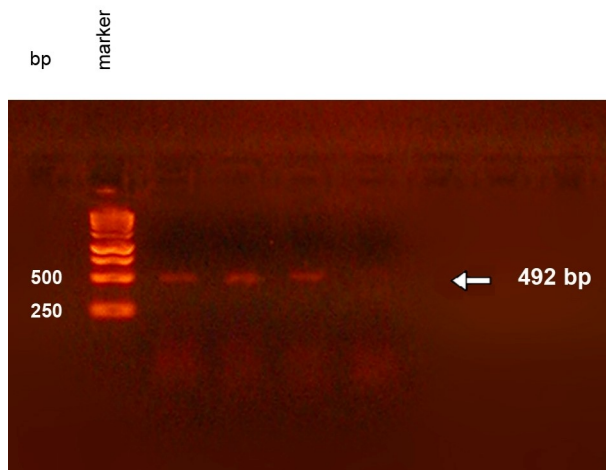
samice	-	-	-	-	-	-	-	-
samec	+	+	+	+	+	+	+	+
PBS	+	+	+	+	+	+	+	+
TS	-	-	+	+	-	-	+	+
náplast	-	-	-	-	+	+	+	+

Obr. 25: Detekce IL-18 cDNA pomocí PCR. Samci Nc/Nga byli chováni v konvenčních podmínkách, byli inokulováni dávkou sterilního PBS (8,3 μ l) a usmrceni 24 h.p.i. Při PCR amplifikaci bylo použito 40 cyklů. Předpokládaná velikost produktu je 492 bp. Amplifikované produkty byly rozděleny ve 2% agarózovém gelu (1 x TBE) a vizualizovány pomocí ethidium bromidu.

marker, hmotnostní standard; samec bez náplasti, bez TS; samec bez náplasti, bez TS; samec bez náplasti, s TS; samec bez náplasti s TS; samec s náplastí, bez TS; samec s náplastí, bez TS; samec s náplastí, s TS; samec s náplastí a TS.

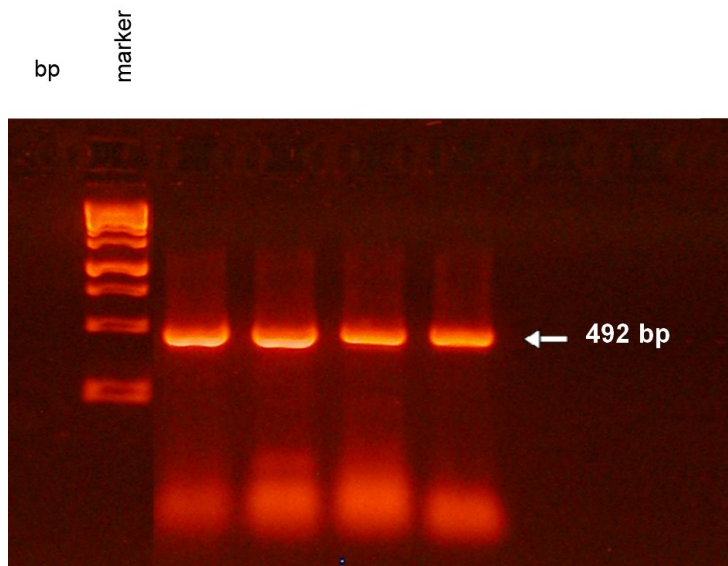
IL-18 cDNA byla zachycena ve všech případech vzorků kůže myši inokulovaných PBS bez zjevných rozdílů. Detekce tohoto interleukinu byla patrná také ve vzorcích myši Nc/Nga infikovaných WR (obrázek 26).

IL-18, Nc/Nga bez senzitivace



samice	+	+	-	-
samec	-	-	+	+
WR	+	+	+	+
TS	-	+	-	+

IL-18, Nc/Nga bez seztizace



samice	+	+	-	-
samec	-	-	+	+
WR	+	+	+	+
TS	-	+	-	+

Obr. 26: Detekce IL-18 cDNA pomocí PCR. Samci a samice Nc/Nga chovaní v konvenčních podmínkách byli infikováni purifikovaným WR dávkou 8,3 μ l (1×10^7 PFU) a usmrceni 24 h.p.i. Při PCR amplifikaci bylo použito 25 cyklů (horní panel) a 40 cyklů (dolní panel). Předpokládaná velikost produktu je 492 bp.

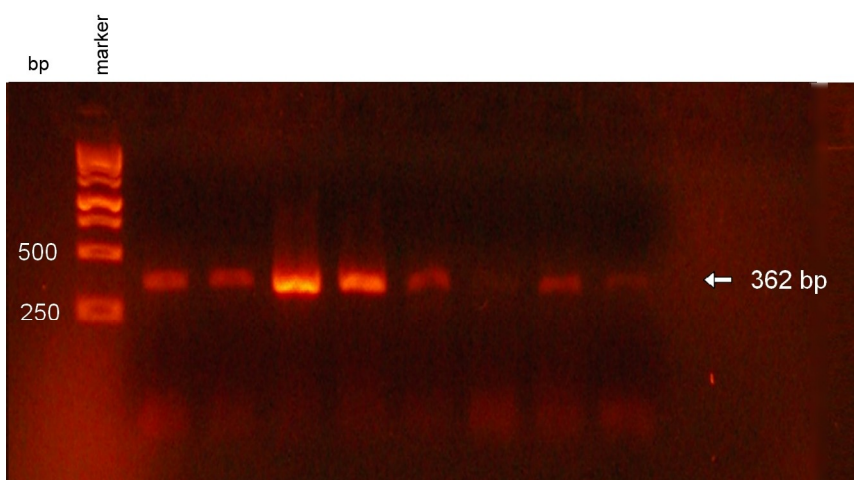
Amplifikované produkty byly rozděleny ve 2% agarózovém gelu (1 x TBE) a vizualizovány pomocí ethidium bromidu.

marker, hmotnostní standard; samice bez TS, samice s TS, samec bez TS; samec s TS.

cDNA byla amplifikována při 25 a 40 cyklech. Při 40 cyklech byla cDNA IL-18 amplifikována ve všech vzorcích. U vzorků kůže samic se zdá být signál amplifikované cDNA silnější než u samců. Detekce cDNA IL-18 při 25 cyklech nebyla zachycena u posledního vzorku WR infikovaného samce, jehož kůže byla ošetřena „tapestrippingem“ a náplastí. Míra detekce IL-18 u WR infikovaných myší byla při 40 cyklech srovnatelná s detekcí IL-18 u PBS inokulovaných myší. Z těchto výsledků lze vyvodit, že virus vakcínie neovlivnil expresi tohoto cytokinu u kmene myši Nc/Nga.

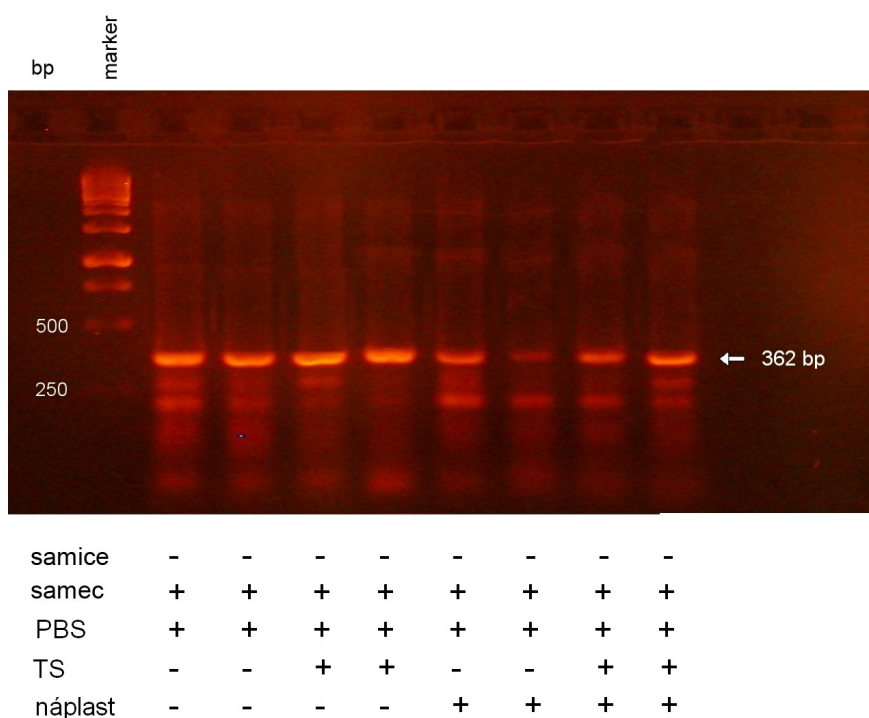
Posledním z detekovaných cytokinů je IL-33 cDNA (obrázek 27).

IL-33, Nc/Nga bez senzitivace



samice	-	-	-	-	-	-	-	-
samec	+	+	+	+	+	+	+	+
PBS	+	+	+	+	+	+	+	+
TS	-	-	+	+	-	-	+	+
náplast	-	-	-	-	+	+	+	+

IL-33, Nc/Nga bez senzitivace

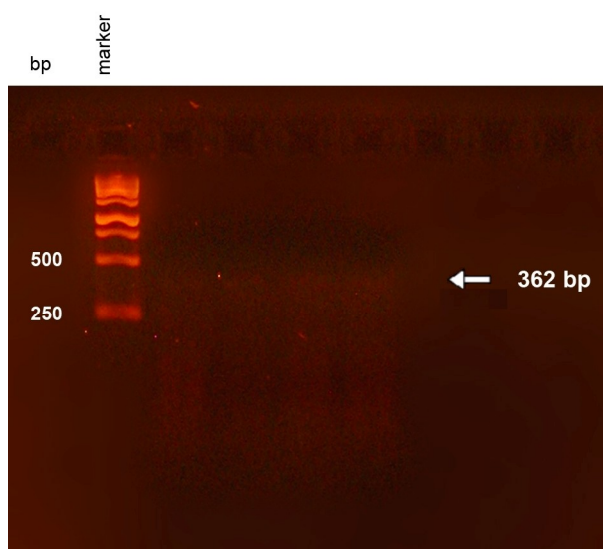


Obr. 27: Detekce cDNA IL-33 pomocí PCR. Samci Nc/Nga chovaní v konvenčních podmínkách byli inokulováni dávkou sterilního PBS (8,3 μ l) a usmrceni 24 h.p.i. Při PCR amplifikaci bylo použito 25 cyklů (horní panel) a 40 cyklů (dolní panel). Předpokládaná velikost produktu je 362 bp. Amplifikované produkty byly rozděleny ve 2% agarózovém gelu (1 x TBE) a vizualizovány pomocí ethidium bromidu. marker, hmotnostní standard; samec bez náplasti, bez TS; samec bez náplasti, bez TS; samec bez náplasti, s TS; samec bez náplasti s TS; samec s náplasti, bez TS+ samec s náplasti, bez TS, samec s náplasti, s TS; samec s náplasti a TS.

IL-33 cDNA byla detekována ve všech vzorcích při 40 cyklech. Při 25 cyklech nebyl produkt detekován pouze v případně kůže samce bez aplikace „tapestrippingu“ překryté náplastí. V ostatních vzorcích kůže byl produkt detekován. Z obou gelů s různým počtem cyklů se zdá, že je IL-33 detekován ve větší míře u vzorku kůží, kde byl aplikován „tapestripping“. Ke zhodnocení, zda se tato závislost vyskytuje obecně u všech myší, tedy i u samic, by bylo vhodné zvýšit počet myší v experimentu nebo jej vícekrát opakovat.

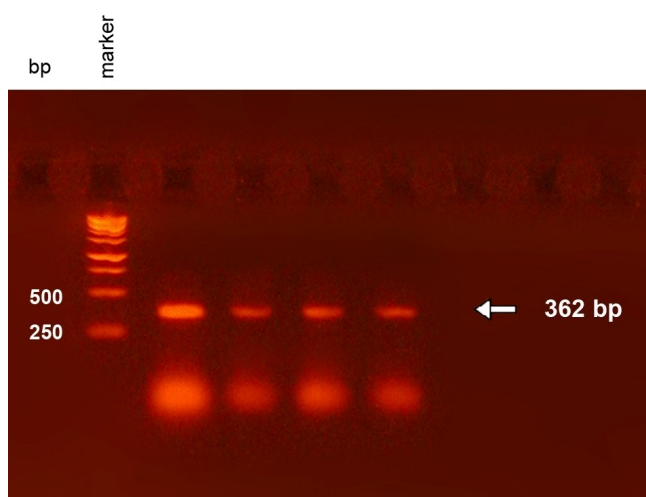
Následně byla detekována amplifikovaná IL-33 cDNA u myší infikovaných WR.

IL-33, Nc/Nga bez senzitivace



marker				
bp				
500				
250				
← 362 bp				
samice	+	+	-	-
samec	-	-	+	+
WR	+	+	+	+
TS	-	+	-	+

IL-33, Nc/Nga bez senzitivace



marker				
bp				
500				
250				
← 362 bp				
samice	+	+	-	-
samec	-	-	+	+
WR	+	+	+	+
TS	-	+	-	+

Obr. 28: Detekce IL-33 cDNA pomocí PCR. Samci a samice Nc/Nga chovaní v konvenčních podmínkách byli infikováni purifikovaným WR dávkou 8,3 μ l (1×10^7 PFU) a usmrceni 24 h.p.i. Při PCR amplifikaci bylo použito 25 cyklů (horní panel) a 40 cyklů (dolní panel). Předpokládaná velikost produktu je 362 bp. Amplifikované produkty byly rozděleny ve 2% agarózovém gelu (1 x TBE) a vizualizovány pomocí ethidium bromidu.

marker, hmotnostní standard; samice bez TS, samice s TS, samec bez TS; samec s TS.

Mezi jednotlivými vzorky myši se detekce IL-33 cDNA v zásadě nelišila, kromě zvýšené detekce u vzorku kůže samice, u které nebyl použit „tapestripping“ při infekci. U

WR infikovaných myší se detekce cDNA IL-33 lišila od PBS infikovaných myší. Překvapivě nebyl IL-33 detekován při 25 cyklech ani při opakované amplifikaci pomocí PCR. Při 40 cyklech byl tento cytokin detekován, ale zdá se, že v menší míře než u PBS infikovaných myší. Důvodem může být regulace IL-33 pomocí IRF-3 transkripčního faktoru, jehož signalizaci VACV v mnoha směrech inhibuje. Z tohoto důvodu byla testována detekce daného cytokinu na myších Nc/Nga infikovaných rekombinantním virem vakcínie WR-IRF3 (viz dále v kapitole 4.2.2.2.).

4.2.1.2. Vliv aplikace náplasti a „tapestrippingu“ na charakter exprese cytokinů u myší Nc/Nga senzitivovaných OVA

Dále bylo studováno, zda podobné závěry jako u nesenzitivovaných myší Nc/Nga platí také u myší dvakrát senzitivovaných ovoalbuminem (100 μ l, 1 mg/ml) na ošetřenou kůži a zda má u senzitivovaných myší vliv aplikace tapestrippingu nebo razítka při infekci VACV na expresi cytokinů. V tomto experimentu byli použiti samci i samice, kteří pocházeli z konvenčního prostředí a byli inokulováni WR (7×10^7 PFU) nebo sterilním PBS ve stejném objemu jako virové inokulum. Vzorky odebraných kůží byly opět homogenizovány a byla z nich izolována RNA. Vzhledem k tomu, že v tomto experimentu bylo analyzováno mnoho vzorků, byla RNA izolována u samic a samečů zvlášť, tak aby bylo možno dodržet inkubační doby při izolaci RNA. Další postup byl shodný s provedením v kapitole 4.2.2.1. Pomocí PCR byla amplifikována cDNA pro GAPDH, IL-1 β , IL-18 a IL-33.

Na obrázku 29 je znázorněna detekce GAPDH.

bez použití razítka; WR infikované samice s/bez TS 3:2 z toho jedna bez použití razítka; WR infikovaní samci s/bez TS 4:2 z toho dva bez použití razítka. Pokud nebylo použito razítko byl vždy použit TS.

GAPDH cDNA byla detekována u všech vzorků myší Nc/Nga. Dále byla testována přítomnost IL-1 β cDNA. Výsledek je znázorněn na obrázku 30.

Z obrázku 30 vyplývá, že u samců byl tento gen nalezen u všech kromě jednoho PBS inokulovaného jedince, u kterého nebylo použito razítko. U samic se naopak hladina detekce IL-1 β cDNA jeví nižší až na jedinou samici infikovanou WR, u které byl použit tapestripping. Pro přesný průkaz tohoto trendu by bylo zapotřebí kvantifikovat produkt pomocí PCR v reálném čase.

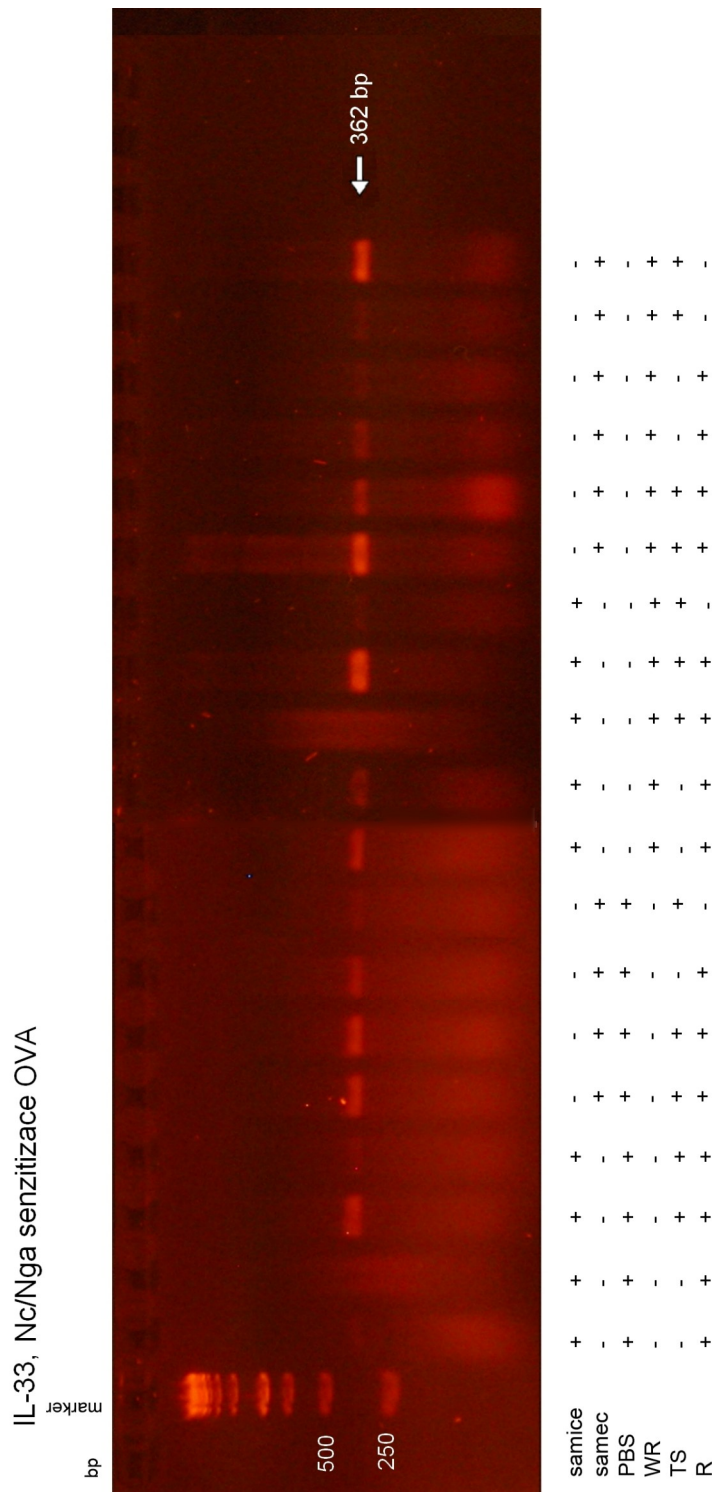
Vzhledem k tomu, že u senzitivovaných myší Nc/Nga je IL-1 β cDNA detekována amplifikací s odlišným počtem cyklů než u nesenzitivovaných myší Nc/Nga, nelze tyto dva experimenty porovnat.

Dalším cytokinem, který byl nalezen v tomto pokusu u senzitivovaných myší, byl IL-18, což je znázorněno na obrázku 31.

Z obrázku 31 se zdá, že jak u PBS inokulované samice bez aplikace razítka, tak u WR infikovaných samců je detekce IL-18 cDNA slabší než u ostatních myší v tomto experimentu. U všech ostatních myší Nc/Nga obou pohlaví byla IL-18 cDNA detekována v silnější míře. Kvalitativně se však v tomto experimentu pravděpodobně neliší míra detekce cDNA tohoto interleukinu mezi samci a samicemi.

Tyto výsledky lze shrnout tak, že na detekci IL-18 může mít vliv senzitivace ovoalbuminem a že infekce VACV (WR) nemá vliv na expresi IL-18, což koreluje také s výsledky myší Nc/Nga bez senzitivace (4.2.2.1.).

Posledním cytokinem, u něhož byla detekovaná amplifikace pomocí PCR, je IL-33 (obrázek 32).



Obr. 32: Detekce cDNA IL-33 pomocí PCR. Samci a samice Nc/Nga chovaní v konvenčních podmínkách byli inokulováni PBS nebo purifikovaným WR dávkou 8,3 μ l (1×10^7 PFU) a usmrceni 24 h.p.i. Při PCR amplifikaci bylo použito 25 cyklů. Předpokládaná velikost produktu je 362 bp. Amplifikované produkty byly rozděleny ve 2% agarózovém gelu (1 x TBE) a vizualizovány pomocí ethidium bromidu.

marker, hmotnostní standard; čtyři samci a čtyřisamice byli infikováni PBS. Pět samic a šest samců bylo infikováno VACV kmene WR. PBS inf. samice s/bez TS 2:2; PBS inf. samci s/bez TS 3:1 z toho jeden bez použití razítka; WR infikované samice s/bez TS 3:2 z toho jedna bez použití razítka; WR infikovaní samci s/bez TS 4:2 z toho dva bez použití razítka. Pokud nebylo použito razítka byl vždy použit TS.

Z obrázku gelu se zdá, že cDNA IL-33 byla detekována pouze v některých vzorcích. Z detekce nevyplývá žádná závislost na aplikaci tapestrippingu, náplasti nebo inokulaci WR či PBS. Nebyla nalezena žádná shoda ani po porovnání detekce IL-33 u OVA senzitivovaných myší s experimenty myší Nc/Nga bez senzitivace. U samců nebyl patrný rozdíl mezi aplikací „tapestrippingu“ a bez „tapestrippingu“ jako v případě experimentu bez senzitivace. U myší senzitivovaných ovoalbuminem také nebyl nalezen trend snížené hladiny exprese IL-33 u WR infikovaných myší oproti PBS inokulovaným myším Nc/Nga.

Vliv „tapestrippingu“ nebo aplikace náplasti, případně použití razítka, nebyl u detekce cytokinů v těchto experimentech jednoznačně prokázán. Kontrolní GAPDH byla detekována ve všech *in vivo* experimentech kromě jednoho experimentu na myších inokulovaných PBS bez senzitivace, kde byl nedostatek zdrojové cDNA.

U ostatních detekovaných produktů interleukinů nelze vyvodit jednoznačné závěry, poněvadž by k tomu bylo potřeba kvantifikovat příslušné produkty a zvětšit počet vzorků, v na kterých byly tyto interleukiny testovány. Detekce amplifikované cDNA jednotlivých cytokinů má pouze informativní charakter pro další výzkum této problematiky. Ze získaných výsledků lze tedy usoudit, že se vyskytl rozdíl mezi detekcí IL-1 β cDNA u ovoalbuminem senzitivovaných samců a samic. U interleukinu 18 byla nalezena úměrnost s použitím nebo nepoužitím razítka při infekci u senzitivovaných myší Nc/Nga. Inokulace myší, ať už PBS nebo WR, u které nebylo použito razítko, jevila sníženou detekci IL-18 cDNA. Různá detekce IL-33 byla pozorována u PBS a WR inokulovaných myší, které nebyly senzitivovány. Tento trend se u senzitivovaných myší nepotvrdil, tudíž na detekci IL-33 má vliv, zda je myš naivní nebo senzitivovaná ovoalbuminem.

4.2.2. Vliv infekce purifikovaného rekombinantního viru WR-IRF3 *in vivo*

4.2.2.1. Detekce cytokinů v kůži myší Nc/Nga inokulovaných WR-IRF3

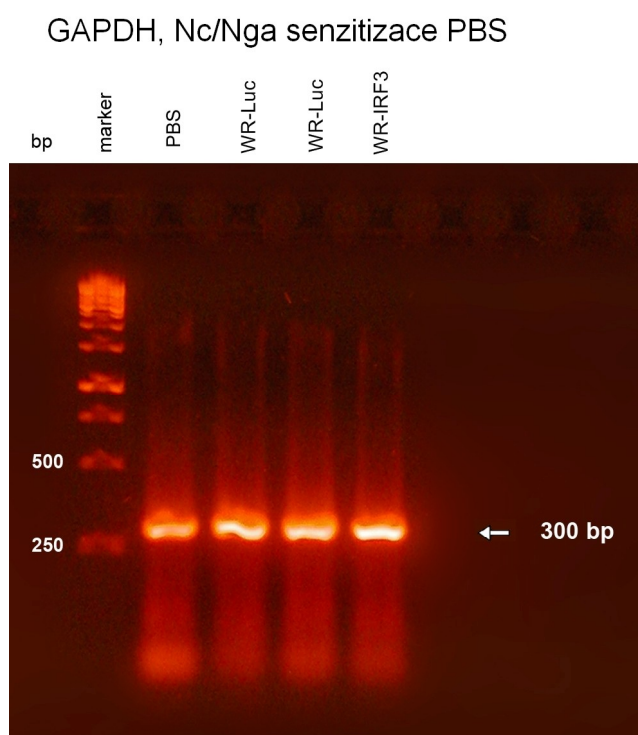
Vzhledem k tomu, že expresi IL-33 reguluje IRF-3 transkripční faktor a laboratoř MUDr. Mělkové zkonstruovala rekombinantní virus WR-IRF3 (viz kapitola 4.1.4.2), byla exprese tohoto i dalších cytokinů charakterizována *in vivo* na myších Nc/Nga inokulovaných WR-IRF3. Jako kontrola sloužily PBS a WR-Luc infikované myši Nc/Nga.

Pro tento typ experimentů byly použity myši Nc/Nga pocházející z izolátoru. Tyto myši byly dvakrát senzitivovány sterilním PBS s aplikací "tapestrippingu" a náplasti.

Týden před první senzitivací a následně byly myši přechovávány v konvenčním prostředí. Tyto myši hůře snášely přechod do jiného prostředí a senzitivaci, a tudíž již během senzitivace bylo zaznamenáno zvýšené procento jejich uhynutí oproti myším z konvenčního prostředí.

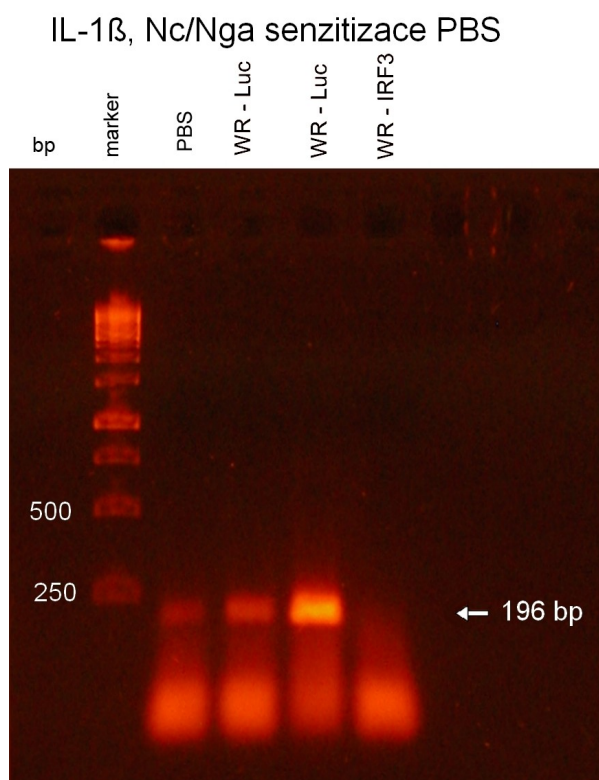
Samci Nc/Nga byli inokulováni PBS, kontrolním rekombinantním virem WR-Luc (7×10^7 PFU) a rekombinantním virem WR-IRF3 (7×10^7 PFU) ve stejném objemu inokula s využitím razítka. Tito samci byli usmrceni 24 hodin po infekci a testováni na přítomnost cytokinů stejným způsobem, jako tomu bylo v kapitolách 4.2.2. Z odebrané homogenizované kůže byla izolována RNA, u které bylo stanoveno množství. RNA byla ošetřena DNázou a přepsána reverzní transkripcí. Pomocí PCR reakce byly amplifikovány cDNA pro jednotlivé cytokiny.

Jako kontrola byla u těchto myší amplifikována cDNA pro GAPDH, což je znázorněno na obrázku 33.



Obr. 33: Detekce GAPDH cDNA pomocí PCR. Samci Nc/Nga původně chováni v izolátoru, byli po adaptaci v konvenci inokulováni PBS či purifikovanými rekombinantními viry vakcínie WR-Luc a WR-IRF3 dávkou $8,3 \mu\text{l}$ (1×10^7 PFU) a usmrceni 24 h.p.i. Při PCR amplifikaci bylo použito 40 cyklů. Předpokládaná velikost produktu je 300 bp. Amplifikované produkty byly rozděleny ve 2% agarózovém gelu ($1 \times$ TBE) a vizualizovány pomocí ethidium bromidu. marker, hmotnostní standard; PBS, PBS infikovaný samec; WR-Luc, samec infikovaný kontrolním virem WR-Luc (2 ks); WR-IRF3, samec infikovaný WR-IRF3.

cDNA pro GAPDH byla nalezena u všech testovaných myší N/Nga, tudíž se mohlo přistoupit k detekci ostatních cytokinů. Jako první byl detekován IL-1 β , který je znázorněn na obrázku 34.

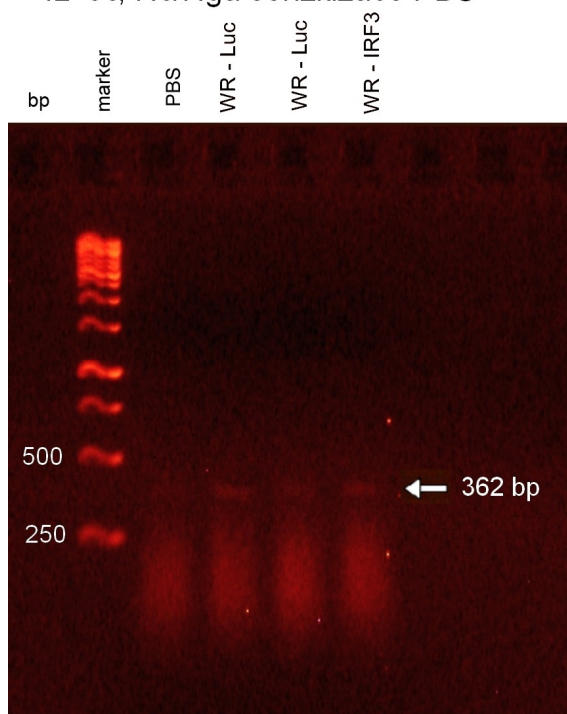


Obr. 34: Detekce cDNA IL-1 β pomocí PCR. Samci Nc/Nga původně chováni v izolátoru, byli po adaptaci v konvenci inokulováni PBS či purifikovanými rekombinantními viry vakcínie WR-Luc a WR-IRF3 dávkou 8,3 μ l (1×10^7 PFU) a usmrceni 24 h.p.i. Při PCR amplifikaci bylo použito 40 cyklů. Předpokládaná velikost produktu je 196 bp. Amplifikované produkty byly rozdělány ve 2% agarózovém gelu ($1 \times$ TBE) a vizualizovány pomocí ethidium bromidu. marker, hmotnostní standard; PBS, PBS infikovaný samec; WR-Luc, samec infikovaný kontrolním virem WR-Luc (2 ks); WR-IRF3, samec infikovaný WR-IRF3.

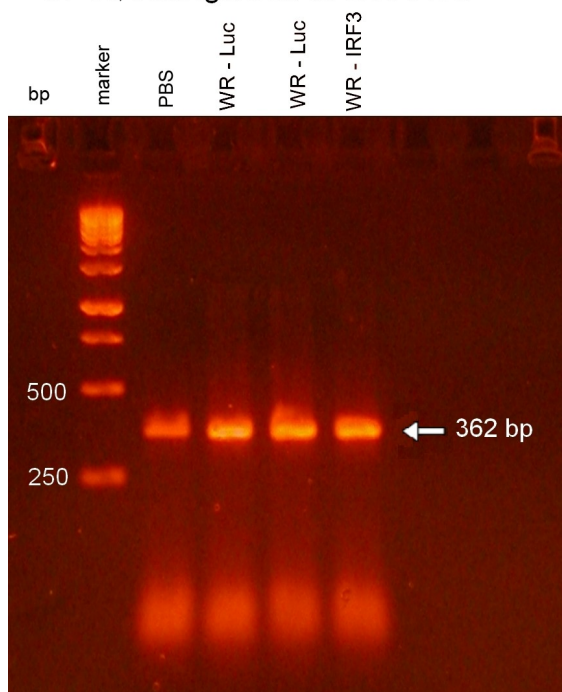
Při 25 cyklech nebyla IL-1 β cDNA zachycena (data neuvedena), proto byla detekce opakována při 40 cyklech. S ohledem na výsledky se zdá, že u vzorku WR-IRF3 infikované myši nebyla cDNA IL-1 β detekována narozdíl od vzorků kontrol (PBS a WR-Luc), kde byla tato cDNA přítomna.

Jelikož jsou k tomuto experimentu použiti pouze samci, nelze sledovat trend v rozdílnosti detekce IL-1 β u samců a samic, jako tomu bylo v kapitole 4.2.2.2. u myší senzitivovaných ovoalbuminem a infikovaných PBS nebo WR. K přesnějším závěrům by bylo potřeba opakovat tento experiment s použitím většího počtu vzorků a kvantifikovat amplifikovaný produkt.

IL-33, Nc/Nga senzitivace PBS



IL-33, Nc/Nga senzitivace PBS

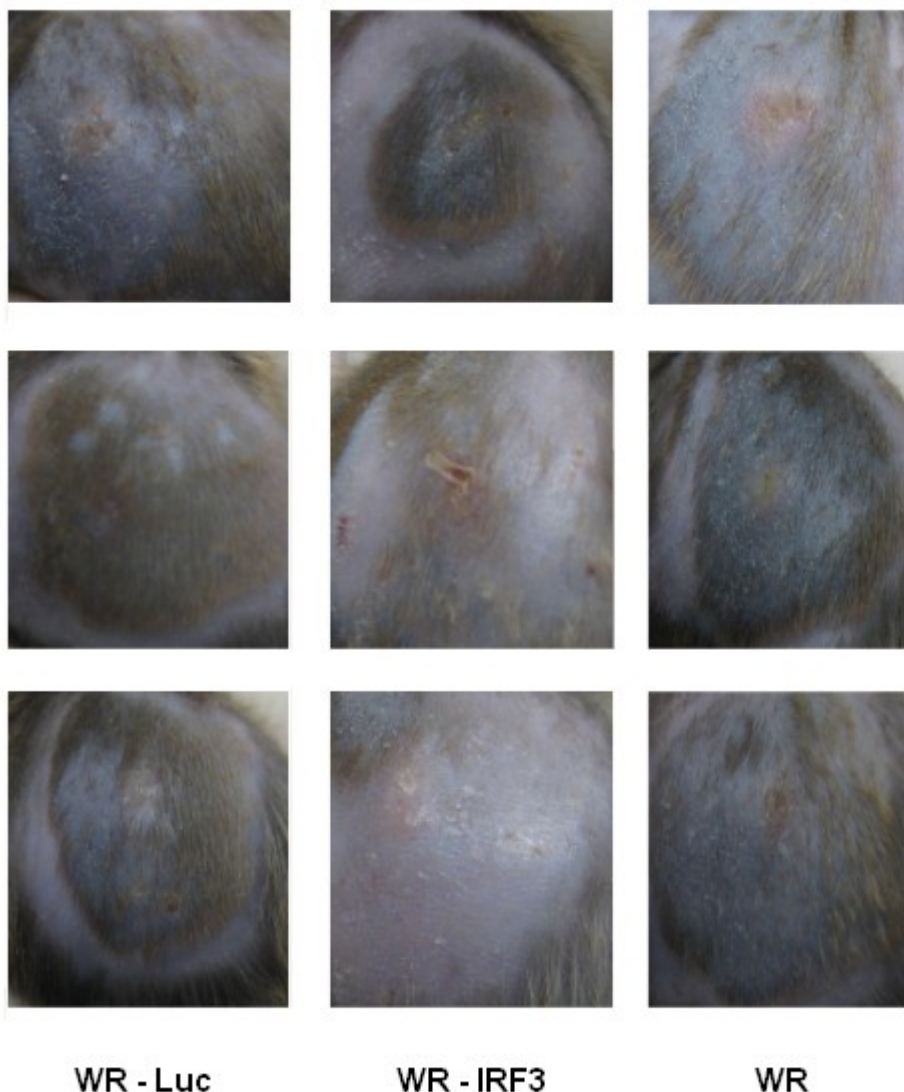


Obr. 36: Detekce IL-33 cDNA pomocí PCR. Samci Nc/Nga původně chovaní v izolátoru, byli po adaptaci v konvenci inokulováni PBS či purifikovanými rekombinantními viry vakcínie WR-Luc a WR-IRF3 dávkou $8,3 \mu\text{l}$ (1×10^7 PFU) a usmrceni 24 h.p.i. Při PCR amplifikaci bylo použito 25 cyklů (horní panel) a 40 cyklů (dolní panel). Předpokládaná velikost produktu je 362 bp. Amplifikované produkty byly rozděleny ve 2% agarózovém gelu (1 x TBE) a vizualizovány pomocí ethidium bromidu. marker, hmotnostní standard; PBS, PBS infikovaný samec; WR-Luc, samec infikovaný kontrolním virem WR-Luc (2 ks); WR-IRF3, samec infikovaný WR-IRF3.

Při detekci IL-33 nebyl nalezen rozdíl mezi vzorky myši inokulovaných PBS a rekombinantními viry WR-Luc a WR-IRF3 ani mezi rekombinantními viry samotnými. Tyto výsledky, ovšem získané jen na malém počtu myši, nepotvrdily hypotézu o regulaci exprese tohoto cytokinu pomocí IRF-3 transkripčního faktoru v kůži myši Nc/Nga infikovaných WR-IRF3. Z tohoto důvodu byly provedeny další pokusy testování obecnějších rozdílů mezi rekombinantními kmeny *in vivo*.

4.2.2.2. Charakterizace vlivu rekombinantního viru WR-IRF3 na patogenezi u myši Nc/Nga

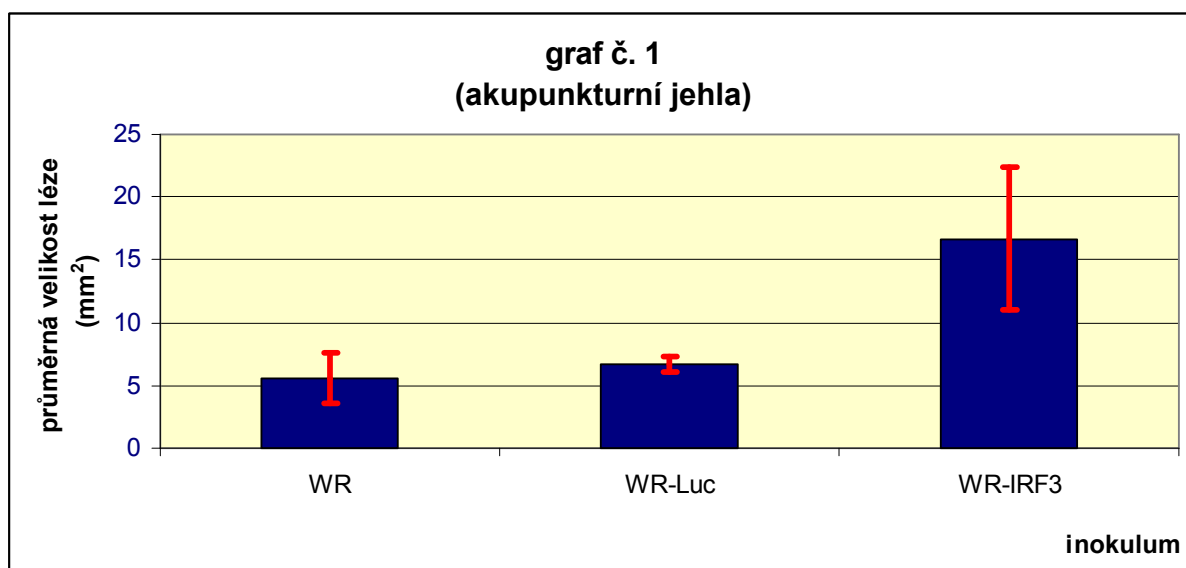
Ke zjištění, zda se rekombinantní virus vakcínie WR-IRF3 liší v patogenezi od kontrolního viru WR-Luc, byly provedeny *in vivo* experimenty na myších Nc/Nga. Pro tento typ experimentu byli použiti samci Nc/Nga, pocházející z konvenčního prostředí. Jako pozitivní kontrola byl použit virus vakcínie WR. Tyto myši byly senzitivovány PBS a posléze infikovány purifikovaným virem WR či purifikovanými rekombinantními viry WR-Luc a WR-IRF3. Infekce byla provedena shodným počtem vpichů akupunkturní jehlou. Třetí den po infekci byly léze infikovaných myši zdokumentovány (obrázek 37).



Obr. 37: Fotografie kůží myší Nc/Nga s lézemi. Samci Nc/Nga byli infikováni virem WR-Luc, WR-IRF3 a WR dávkou 1 μ l (1×10^7 PFU). Infikovaná část kůže byla ošetřena stejným počtem vpichů pomocí akupunkturní jehly. Místo infekce bylo zdokumentováno 3 dny po infekci (d.p.i.). WR-Luc, samci infikovaní kontrolním purifikovaným rekombinantním virem vakcínie WR-Luc; WR-IRF3, samci infikovaní purifikovaným rekombinantním virem vakcínie WR-IRF3; WR, samci infikovaní purifikovaným virem vakcínie kmene WR.

Z fotografií kůží z infikovaných myší je patrné, že se u všech myší infikovaných všemi třemi typy virů vyvinula léze v místě infekce. Velikost těchto lézí byla různá.

Pátý den po infekci byly myši zváženy, usmrceny, byla jim odečtena velikost lézí, ty odebrány, a následně stanoven jejich infekční titer. V grafu 1 jsou porovnány velikosti lézí a je stanovena chybová úsečka znázorňující potenciální velikost chyby v datové řadě.



Graf 1: Zobrazení průměrné velikosti léze v mm² po infekci akupunkturní jehlou purifikovanými viry vakcínie WR-IRF3, WR-Luc a WR pomocí měřené 5 d.p.i. Naměřené velikosti lézí byly zprůměrovány. Pro všechna měření velikosti lézí u jednotlivých virových inokul (3 myši v každé skupině) byla stanovena chybová úsečka.

Z grafu 1 lze vyčíst, že průměrná velikost léze se neliší u virů WR-Luc a WR. Oproti tomu je detekována větší průměrná velikost lézí u viru WR-IRF3. K potvrzení tohoto závěru je nutné experiment opakovat s větším počtem myší Nc/Nga vzhledem k vyhodnocení pomocí SEM.

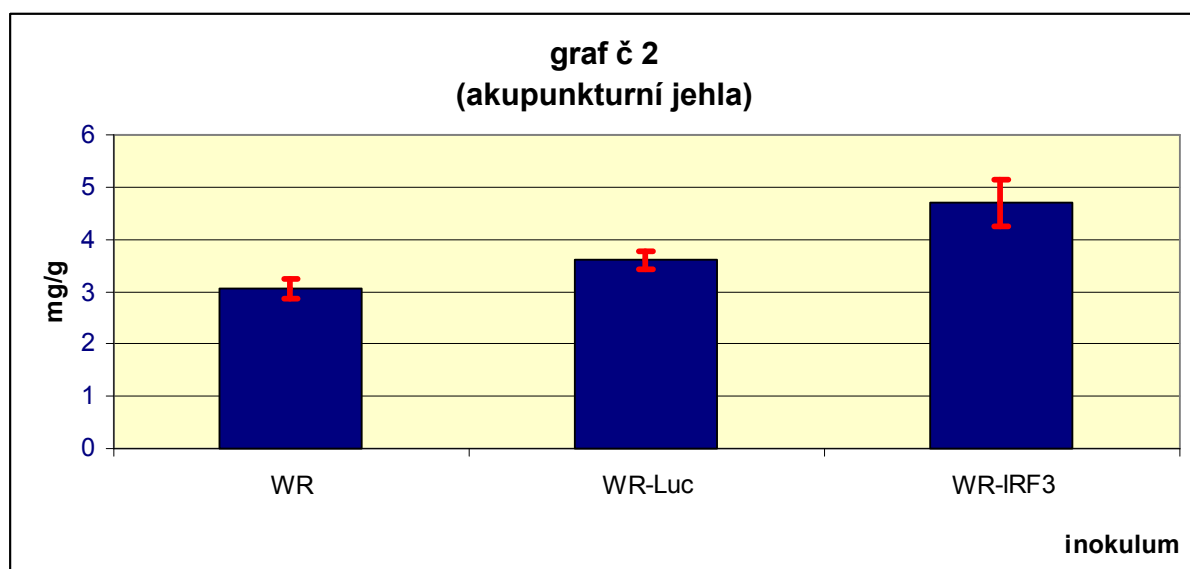
Pro stanovení infekčního titru byl vzorek s lézí zhomogenizován v 0,5 ml sterilního DMEM a tímto homogenátem byly infikovány buňky BSC-40. V tabulce 12 je uveden titr stanovený u všech tří typů virů. Dále byly porovnány hodnoty růstu viru v jednotlivých vzorcích infikovaných těmito třemi typy virů. K tomu byl použit dvouvýběrový párový t-test na střední hodnotu s hladinou významnosti 0,05. V tomto testu byla porovnána hladina infekčního titru ze vzorků kůží u myší Nc/Nga infikovaných virem WR-IRF3 a virem WR-Luc, dále pak byly porovnány hladiny infekčního titru u myší infikovaných WR-IRF3 a WR. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 12. Tímto testem se mělo prokázat či neprokázat neshodu mezi stanovenými hodnotami infekčního titru viru WR-IRF3 a kontrolními viry WR-Luc a WR.

d.p.i.	inokulum (PFU)	virus (p.)	titr (v 1 ml)	P(T<=t)
5	1×10^7	WR - Luc	$0,461 \times 10^6$	0,063592
5	1×10^7	WR - IRF3	$1,008 \times 10^6$	
5	1×10^7	WR	$1,192 \times 10^7$	0,112406

Tabulka 12: Stanovení infekčního titru ze vzorků kůží infikovaných WR-IRF3, WR-Luc a WR dávkou 1 μ l (1×10^7 PFU). Vzorky kůže byly odebrány 5 d.p.i. Vzorky byly titrovány infekcí buněk BSC-40 na 96-jamkové destičce v ředění 1×10^0 až 1×10^{-7} . Dále byla data vyhodnocena pomocí dvouvýběrového párového t-testu na střední hodnotu o hladině významnosti 0,05. Byl porovnán infekční titr mezi vzorky infikovanými WR-IRF3 a WR-Luc, příp. WR-IRF3 a WR. Pro kontrolu byl porovnán infekční titr virů WR-Luc a WR jehož hodnota byla $P(T \leq t) = 0,109483$.

Z porovnání hodnot infekčního titru mezi jednotlivými typy virů vyplývá, že nebyla nalezena neshoda mezi titry na hladině významnosti 0,05.

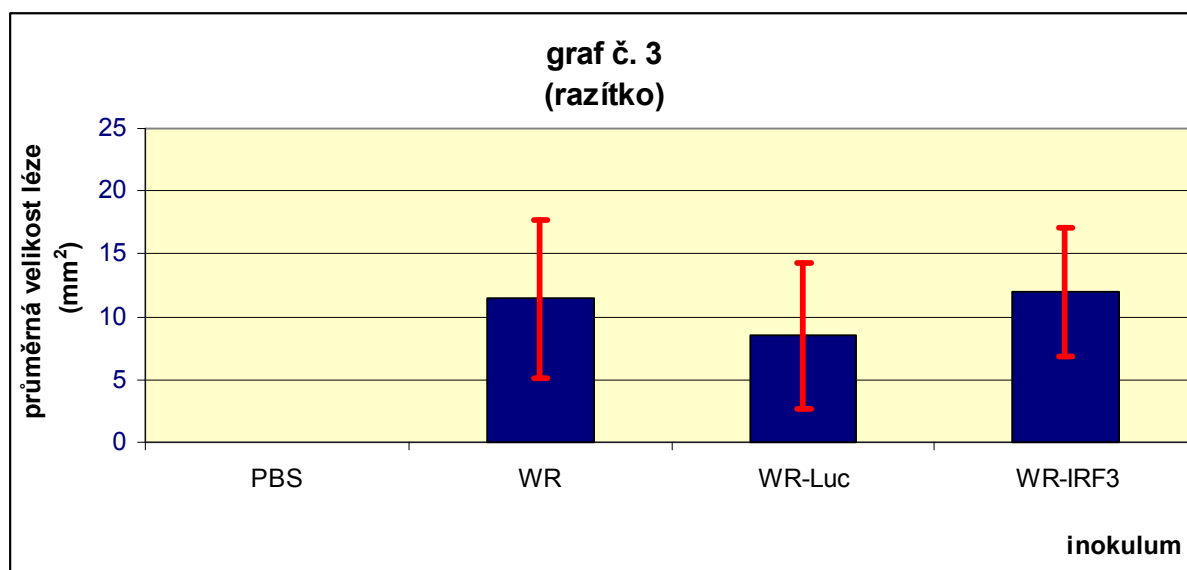
Myším Nc/Nga byla také odebrána a zvážena slezina jako obecný ukazatel imunitní odpovědi na infekci. V grafu 2 je stanoven poměr hmotnosti léze k váze myši a stanovena chybová úsečka.



Graf 2: Zobrazení poměru hmotnosti sleziny (mg) k váze myši (g) infikované akupunkturální jehlou virem WR-IRF3, WR-Luc a WR měřené 5 d.p.i. Poměr vážených slezin ku váze myši byl u jednotlivých typů infekcí zprůměrován. Pro všechny poměry vážení u jednotlivých virových inokul byla stanovena chybová úsečka.

K potvrzení těchto výsledků byl proveden další experiment detekující rozdíly mezi virem WR-IRF3, kontrolním virem WR-Luc a virem VACV kmene WR. Samci Nc/Nga nebyli senzitivizováni, ale rovnou inokulováni PBS a výše zmíněnými viry ve stejné dávce s aplikací jednoho vpichu razítka. Pět dní po infekci byly tyto myši zváženy, usmrceny, byla jim změřena velikost léze a byla jim zvážena slezina. Vyhodnocení rozdílu ve

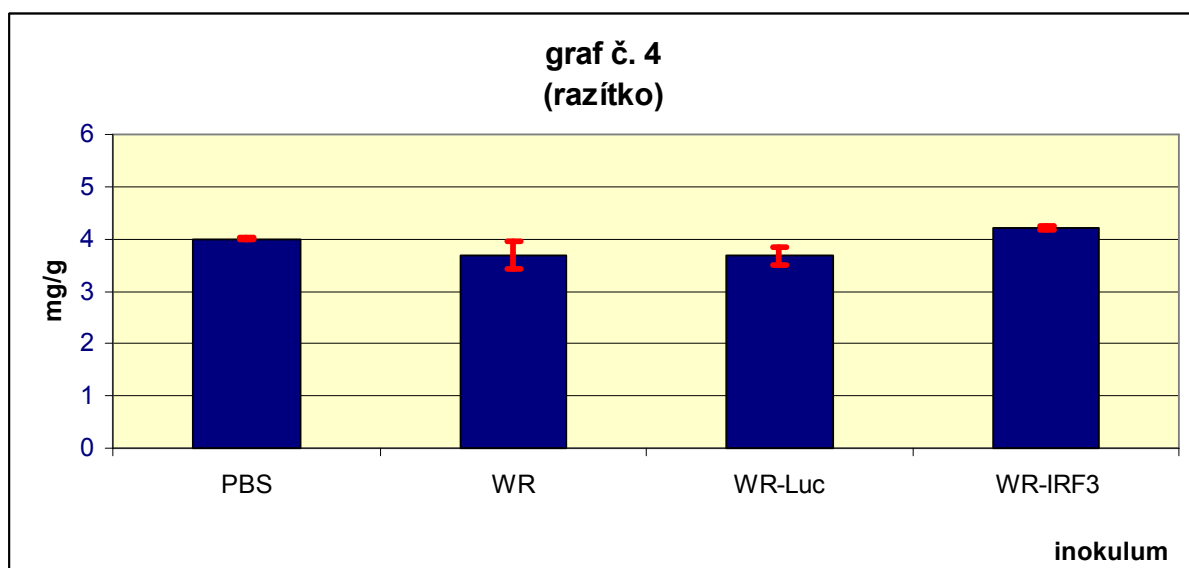
velikosti lézí je uvedeno v grafu 3, kde byla též vypočtena chybová úsečka (vyhodnocení SEM).



Graf 3: Zobrazení průměrné velikosti léze v mm² po inokulaci pomocí očkovacího razítka sterilního PBS či purifikovaných virů vakcínie WR-IRF3, WR-Luc a WR měřené 5 d.p.i. Naměřené velikosti lézí pro jednotlivé viry byly zprůměrovány. Pro všechna měření velikosti lézí u jednotlivých virových inokul byla stanovena chybová úsečka.

Průměrná velikost léze při infekci PBS, WR-IRF3, WR-Luc a WR se neliší mezi jednotlivými inokuly. Velikost lézí v rámci jednoho inokula byla odlišná, což je znázorněno chybovou úsečkou.

Dále byl porovnán poměr hmotnosti sleziny ku váze myši, což znázorňuje graf 4.



Graf 4: Zobrazení poměru váhy sleziny (mg) k váze myši (g) infikované virem WR – IRF3, WR – Luc a WR měřené 5 d.p.i. Poměr vážených slezin ku váze myši byl u jednotlivých typů infekcí zprůměrován a vyhodnocen ve sloupcovém grafu. Pro všechny poměry vážení u jednotlivých virových inokul byla stanovena chybová úsečka.

Z grafu 4 vyplývá, že poměr hmotností sleziny a myši je zvýšen pouze u myši infikovaných virem WR-IRF3 v porovnání s negativní kontrolou (PBS inokulované myši), což značí vyšší reakci imunitní odpovědi oproti kontrole. Poměr hmotnosti sleziny ku váze myši byl srovnatelný u infekce WR-Luc a WR. Obě hodnoty u těchto virů byly nižší, než je hodnota poměru u infekce PBS jako negativní kontroly. Chybové úsečky pro jednotlivé hodnoty byly velmi malé, tudíž se poměry u infekcí jednotlivými viry a PBS příliš nelišily.

5. Diskuse

Svou diplomovou prací navazuji na výzkum laboratoře MUDr. Zory Mělkové, PhD, která se dlouhodobě zabývá studiem interakcí viru vakcínie s hostitelem a patogeneze eczema vaccinatum, což je komplikace očkování vierm vakcínie proti černým neštovicím.

Diplomová práce je rozdělena do dvou částí - na studium vakcínie *in vitro* a na experimenty zabývající se imunopatogenezí viru vakcínie *in vivo*.

5.1. Charakterizace WR-IRF3

Mým prvním úkolem bylo provést základní charakterizaci rekombinantního viru vakcínie s integrovaným genem pro IRF-3 transkripční faktor (WR-IRF3), který byl vytvořen Mgr. Jarmilou Knitlovou a Mgr. Janou Liškovou, Ph.D. Růst tohoto viru byl charakterizován ve dvou buněčných liniích, v ledvinných buňkách kočkodana zeleného BSC-40 a v myších embryonálních fibroblastech NIH 3T3. Kontrolním virem pro porovnání růstu WR-IRF3 byl rekombinantní virus WR-Luc, který exprimuje cDNA pro luciferázu pod kontrolou stejného promotoru jako studovaný WR-IRF3.

Z literatury je známo, že transkripční faktor IRF-3 hraje důležitou roli v indukci buněčné protivirové imunitní odpovědi. Velmi časnou odpovědí na virovou infekci buňky je produkce interferonů typu I a prozánětlivých cytokinů nebo následně aktivace exprese interferonem indukovaných genů, jejichž produkty inhibují virovou replikaci, transkripci a jiné procesy důležité pro přežití a multiplikaci viru. Interferony typu I také aktivují buňky přirozené imunity k mobilizaci proti patogenu. IFN typu I hrají důležitou roli při maturaci dendritických buněk a B buněk a při proliferaci cytotoxických T buněk (Boo a Yang, 2010). Buňka identifikuje patogen takzvanými PRR receptory (pattern recognition receptor). Buňka rozpoznává jednotlivé komponenty a produkty viru podle toho, o jaký typ PRR se jedná. Dráhy, které jsou indukovány vazbou virové molekuly na TLR nebo RLR receptory, jejichž signálizace je dále vedena přes adaptivní molekuly MyD88 nebo TRIF, vedou přes aktivaci kináz k fosforylaci IRF-3, IRF-5 a IRF-7 transkripčních faktorů nebo k aktivaci NF- κ B. Aktivovaný transkripční faktor IRF-3 je translokován do jádra, kde dimerizuje a indukuje expresi IFN typu I (Perdiguero a Esteban, 2009).

Virus vakcínie si vytvořil řadu mechanismů, jak překonat tuto protivirovou obranu, a to produkcí mnoha proteinů modifikujících mj. signalizaci vedoucí k aktivaci IRF-3.

Nejdůležitější virové produkty jsou uvedeny v kapitole 2.4. a nebudou zde proto již opakovány.

U zkonstruovaného rekombinantního viru vakcínie WR-IRF3, který nadměrně exprimuje IRF-3, lze předpokládat, že by mohlo být možné uniknout vakcínií zprostředkované inhibici fosforylace IRF-3 a jeho translokace do jádra. Může tak být sledován vliv IRF-3 transkripčního faktoru na expresi IFN typu I a na infekci virem vakcínie.

Při selekci WR-IRF3 byla Mgr. Janou Liškovou, Ph.D. ověřována pouze správnost inserce a orientace IRF-3 cDNA Southern blotem. Bylo proto nutné zjistit, zda je IRF-3 skutečně exprimován. Z tohoto důvodu bylo provedeno RT-PCR pro IRF-3 pomocí specifických primerů u buněk BSC-40 a NIH 3T3 infikovaných WR-IRF3 nebo kontrolním virem. Z výsledků je patrné, že buňky BSC-40 i NIH 3T3 infikované rekombinantním virem WR-IRF3 exprimovaly mRNA pro IRF-3 transkripční faktor.

Při detekci cDNA IRF-3 ve vzorcích buněk BSC-40 infikovaných WR-IRF3 a WR-Luc a kontrolních neinfikovaných buněk bylo zjištěno, že cDNA o předpokládané velikosti 504 bp byla patrná pouze u vzorku buněk infikovaných WR-IRF3. U neinfikovaných a WR-Luc infikovaných vzorků buněk však byl detekován produkt o jiné velikosti, a to přibližně 720 bp. Buněčná linie BSC-40 pochází z ledvin kočkodana zeleného, zatímco primery byly navrženy pro myši mRNA IRF-3 transkripčního faktoru. Z toho důvodu lze předpokládat detekci produktů IRF-3 na opičích buňkách BSC-40 o jiné velikosti, případně mohl být amplifikován jiný produkt než cDNA pro IRF-3. To by bylo možné jednoznačně rozlišit pomocí sekvenace nebo Southern blotu se specifickou próbou, které jsem nedělala. Sekvence exprimovaného genu však byla porovnána lokálním přiřazením v programu FASTA (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta/nucleotide.html>). mRNA pro myši IRF-3 je s určitým procentem homologie podobná sekvencím mRNA člověka i primáta makak rhesus (*Macaca mulatta*). Podrobnější popis je shrnut v tabulce 13. Sekvence použitého primeru pro IRF-3 s homologními geny pro mRNA IRF-3 vyhledanými pomocí programu FASTA byla vzájemně porovnána v programu EMBOSS-Lite pomocí Needleman-Wunschova algoritmu (<http://helixweb.nih.gov/emboss-lite/compare.html>), kde byla také spočítána velikost možného amplifikovaného produktu. V programu Blast (Basic local alignment search tool) (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome) byla dále potvrzena identita sekvence s názvem vyhledaného genu. V programu Blast pro

vyhledávání nukleotidových sekvencí bylo využito nejvyšší možné přesnosti vyhledávání pomocí optimalizace megablast.

identifikační kód	název genu	emboss homologie (%)	produkt o velikosti (bp)	blast homologie (%)
EM_EST:CV813416	<i>Mus musculus</i> cDNA klon (IMAGE:5339908), chimerický klon	94,5	483	100
EM_TSA:JU485987	<i>Macaca mulatta</i> Mamu_362317 mRNA	71,6	185	100
EM_TSA:JV600278	<i>Macaca mulatta</i> Mamu_208614 mRNA	71,6	129	100

Tabulka 13: Tabulka genů s podobnou sekvencí se sekvencí cDNA IRF-3. Gen CV813416 pro chimerický klon. Myši s homologií 94,5 %. odpovídal nalezené sekvenci se 100% homologií srovnané v databázi blast. Gen JU485987 primáta *macaca mulatta* s homologií 71,6 % odpovídal nalezené sekvenci se 100% homologií srovnané v databázi blast. Gen JV600287 primáta *macaca mulatta* s homologií 71,6 % odpovídal nalezené sekvenci se 100% homologií srovnané v databázi blast.

Z tabulky 13 vyplývá, že nalezené geny, které byly homologní s genem pro IRF-3, se nemohly amplifikovat pomocí PCR reakce jako produkt o velikosti přibližně 720 bp, nalezený v našem eseji. Oba geny primáta makaka rhesus podobné sekvenci IRF-3 vyhodnocené z bioinformatických dat by po amplifikaci dávaly produkt o přibližné velikosti 100 až 200 bp. Třetí homologní gen se ukázal být chimerickým klonem, kdy byl insert lidského genu (cDNA původ) vložený do myšího genomu. Velikost tohoto chimerického klonu odpovídá velikosti našeho produktu, ale vzhledem k tomu, že je to chimerický klon, nevyskytuje se u buněčné linie BSC-40.

V buňkách BSC-40 nebyl tedy nalezen adekvátní exprimovaný gen o hledané velikosti přibližně 720 bp, který by byl amplifikován navrženými IRF-3 specifickými primery. Vzhledem k absenci endogenního produktu se buněčná linie BSC-40 se ukázala jako vhodná kontrola pro průkaz exprese rekombinantního IRF-3 na úrovni mRNA.

Dále jsme expresi rekombinantního IRF-3 testovali na myších fibroblastech NIH 3T3. Z výsledků je patrné, že endogenní exprese myšího IRF-3 nalezená v neinfikovaných vzorcích je inhibována v buňkách infikovaných WR-Luc, pravděpodobně v důsledku "shut-off" fenomenu a cytopatického efektu infekce. Naproti tomu byla cDNA pro IRF-3 detekována ve větší míře u buněk NIH 3T3 infikovaných WR-IRF3 v porovnání s kontrolním rekombinantním virem WR-Luc. Detekovaná cDNA IRF-3 transkripčního faktoru u buněk infikovaných WR-IRF3 je tedy pravděpodobně virového původu.

U neinfikovaných buněk NIH 3T3 a buněk infikovaných hrubými extrakty rekombinantních virů WR-Luc a WR-IRF3 byla také detekována exprese kontrolního genu

pro GAPDH (Glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza), a to pomocí specifických primerů. Primery pro GAPDH byly navrženy tak, aby detegovaly sekvence mRNA i v exonech, aby bylo možné podle velikosti produktu odlišit případnou kontaminaci genomovou DNA. Dále jsem se snažila zjistit, zda je detekovaná IRF-3 cDNA translatována na funkční protein a zda je díky nadměrné expresi tento transkripční faktor schopen uniknout inhibici aktivace způsobené virem vakcínie. Vzhledem k tomu, že protivirová signalizace přes IRF-3 transkripční faktor vede k expresi IFN β , byla i tato exprese detekována pomocí specifických primerů.

Amplifikace IFN β cDNA pomocí PCR vedla kromě produktu o předpokládané velikosti opět ke vzniku ještě vedlejšího produktu o přibližné velikosti 250 bp. Po srovnání homologie s myším IFN β byla sekvence tohoto genu porovnána s ostatními myšími exprimovanými geny. Pro tuto analýzu byl použit program tblastx (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=tblastx&BLAST_PROGRAMS=tblastx&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome).

V tabulce 2 jsou uvedeny geny, které nesou určitou shodu v sekvenci s genem pro IFN β . Bylo také nutné zjistit, zda na tyto geny nasedají primery specifické pro IFN β a zda se amplifikuje produkt o stejné velikosti jako nalezený vedlejší produkt detekce exprese IFN β . Pro tento postup bylo zvoleno porovnání shody sekvence primerů se sekvencemi genů, které jsou potenciálně vedlejším produktem amplifikace IFN β , pomocí programu EMBOSS-Lite, kde byla stanovena velikost možného amplifikovaného genu jako vedlejšího produktu.

identifikační kód	název genu	původ	homologie (%)	velikost produktu (bp)
NM_177348.2	Mus musculus interferon epsilon	mRNA	42	80
NM_206871.1	Mus musculus interferon alpha 6	mRNA	41	75

Tabulka 14: Tabulka genů s podobnou sekvencí se sekvencí cDNA IFN β .

Z tabulky 14 vyplývá, že druhým detekovaným genem mohl být myší interferon epsilon, jehož produkt určený v databázi blast podle specifických primerů pro myší IFN β měl předpokládanou velikost neznámého produktu v eseji pro detekci IFN β cDNA.

Z výsledků je zřejmé, že se detekce IFN β cDNA jeví u vzorků buněk NIH 3T3 infikovaných virem WR-IRF3 vyšší oproti kontrolnímu rekombinantnímu viru WR-Luc.

To může znamenat, že byl exprimovaný gen translatován a tvoří funkční produkt, který je schopen uniknout inhibici virem vakcínie a aktivovat expresi IFN β . Tyto závěry je však nutné ověřit na úrovni proteinu western blot analýzou se specifickou protilátkou.

Dále bylo nutné zjistit, zda není detekce IRF-3 a IFN β cDNA ovlivněna infektivitou a vitalitou obou rekombinantních virů, a proto byl charakterizován růst obou rekombinantních virů a detekována exprese proteinů VACV u těchto virů.

U buněk BSC-40 infikovaných oběma rekombinantními viry byly jak infekční titr, tak míra detekce proteinů vakcínie srovnatelné. Rozdíly v růstu obou virů byly také testovány pomocí statistické analýzy, a to s negativním výsledkem, tj. růst obou virů se v buňkách BSC-40 neliší.

Stejně závěry lze vyvodit také z charakterizace růstu hrubých extraktů obou rekombinantních virů v buňkách NIH 3T3, nicméně u některých pokusů bylo použito nižší inokulum viru WR-Luc (prokázáno následnou titrací konkrétního virového inokula), a proto se při Western blot analýze jevila exprese virových proteinů vyšší v buňkách infikovaných WR-IRF3 než v WR-Luc. V totožném experimentu však jevíly buňky infikované WR-IRF3 odlišnou morfologii a také u nich byla zjištěna odlišná míra detekce proteinů vakcínie. Tento výsledek naznačuje, že oproti infekci buněk NIH 3T3 kontrolním virem vakcínie, kdy převažuje nekróza infikovaných buněk, se v případě WR-IRF3 objevoval typ apoptické smrti. Příčinou mohl být právě exprimovaný IRF-3 transkripční faktor, jehož signalizace vede přes produkci interferonů k expresi interferonem indukovaných genů. Jedním z takových genů je PKR (protein kináza R), jejíž funkcí je mimo jiné směřování infikované buňky k apoptické smrti. Tato vlastnost je však závislá na typu virové infekce (Balachandran *et al.*, 2000). U poxvirů (testováno na MVA) byl prokázán vliv IFN β na indukci apoptózy. Apoptózu ovlivňovala přítomnost IRF-3 transkripčního faktoru, IFN β jako jeho produktu signalizace a Noxa proteinu. Noxa je proapoptický protein obsahující BH3 doménu, lokalizovaný v mitochondriální membráně (Oda *et al.*, 2000). Regulace indukce Noxa není závislá na IRF-3, ale pravděpodobně vede přes interferonem indukované STAT transkripční faktory. Z těchto informací lze tedy soudit, že IRF-3 ovlivňuje indukci apoptózy spíše nepřímo přes produkci IFN typu I (Ferrer *et al.*, 2011). Z výše uvedených důvodů byly provedeny testy pomocí fluorescenčního barvení na přítomnost apoptózy u buněk NIH 3T3 a BSC-40 infikovaných purifikovanými rekombinantními viry WR-IRF3 a WR-Luc (předběžné výsledky). Byly použity purifikované rekombinantní viry místo hrubého extraktu, aby se předešlo ovlivnění

indukce apoptózy zbytky buněk přítomných v hrubém extraktu viru. V těchto předběžných experimentech však zatím nebyly pozorovány jednoznačné rozdíly v morfologii buněk infikovaných viry WR-Luc a WR-IRF3.

U těchto purifikovaných rekombinantních virů byla také charakterizována exprese transkripčního faktoru IRF-3. Detekce IRF-3 cDNA byla výrazně vyšší u rekombinantního viru WR-IRF3 oproti neinfikovaným nebo WR-Luc infikovaným buňkám NIH 3T3.

Závěrem lze shrnout, že v provedených experimentech *in vitro* byl růst rekombinantních virů WR-IRF3 a kontrolního WR-Luc je srovnatelný.

5.2. Charakterizace odpovědi myši Nc/Nga na imunizaci virem vakcínie

Před samotnou detekcí exprese cytokinů v kůži myši Nc/Nga byl optimalizován esej pro detekci cytokinů v neinfikovaných makrofázích J774.G8 a v makrofázích infikovaných VACV kmene WR. U těchto makrofágů byla detekovaná cDNA pro GAPDH, IL-1 β a IL-18, a tímto byla vytvořena kontrola pro detekci cytokinů. Nelze však srovnávat detekci jednotlivých cytokinů v buněčné linii, jako jsou makrofágy, a detekci cytokinů v kůži myši, kde se v místě infekce vyskytuje směs infikovaných a neinfikovaných buněk různých typů.

In vivo experimenty byly rozděleny na dvě části. V první řadě bylo nutné zjistit, zda a jaký vliv má různý způsob senzitivace a inokulace viru wt-WR na detekci cytokinů. K tomu byly použity myši Nc/Nga jako model atopické dermatitidy (Kawakami *et al.*, 2007), na kterých je studován rozvoj *eczema vaccinatum* (Tomimori *et al.*, 2011; Knitlová *et al.*, rukopis v přípravě). Dalším úkolem bylo zjistit, jak se liší imunitní odpověď na infekci rekombinantním virem vakcínie WR-IRF3.

5.2.1. Vliv různého způsobu senzitivace a infekce na detekci cDNA jednotlivých cytokinů

Bylo testováno několik variant senzitivace myši Nc/Nga ovoalbuminem a různé způsoby inokulace VACV, které by mohly mít vliv na expresi cytokinů. Jednak byl sledován rozdíl v detekci interleukinů u nesenzitivovaných a u ovoalbuminem senzitivovaných myši Nc/Nga, jednak vliv „tapestrippingu“ před vlastní inokulací VACV.

K inokulaci bylo navíc použito očkovací razítko, vyrobené Dr. Hájkovou z akupunkturních jehel, nebo samotná akupunkturní jehla, přičemž množství viru i jeho objem byly různé. Relevantní možnosti aplikace wt-WR byly porovnávány s kontrolními myšmi, kterým byl aplikován PBS.

Před senzitivací nebo inokulací VACV nesenzitivovaným anestezovaným myším byly vždy vyholeny chlupy zastříhávačem vousů. „Tapestripping“ byl prováděn vždy před senzitivací a ve specifikovaných případech před inokulací VACV. Na velikost léze či expresi cytokinů mohlo mít vliv i překrytí senzitivovaného místa neprodyšnou náplastí, což bylo v minulosti popsáno.

Bylo zjištěno, že metody použité k senzitivaci a k inokulaci VACV vedly k různým výsledkům v rámci detekce jednotlivých cytokinů a že není přímá souvislost mezi typem ošetření myši a expresí cytokinů.

Na expresi IL-1 β nemá výrazný vliv aplikace náplasti ani "tapestrippingu" u nesenzitivovaných myší. U těchto myší byl však patrný rozdíl mezi kontrolními myšmi s aplikací PBS a VACV infikovanými myšmi. U všech myší s PBS byla nalezena exprese IL-1 β . Naproti tomu u WR-infikovaných nesenzitivovaných myší byla detekce IL-1 β snížena, ale ne zcela inhibována. Nicméně lze na základě imunohistochemické analýzy kůže v místě inokula předpokládat, že v analyzovaném vzorku kůže nebyly infikovány všechny buněčné elementy (Knitlová *et al.*, rukopis v přípravě) a že detekovaná IL-1 β mRNA mohla pocházet z neinfikovaných buněk. Lze tedy usuzovat, že virus vakcínie potlačuje produkci tohoto interleukinu u předem specificky nesenzitivovaných myší (v konvenčním zvěřinci jsou však myši vystaveny obecně všem okolním antigenům a mohou jimi být senzitivovány nespecificky). Tomto případě, tedy u myší předem specificky nesenzitivovaných, by se tak mělo jednat o akutní fázi atopické dermatitidy u myší Nc/Nga s převahou Th2 imunitní odpovědi. U atopické dermatitidy je obecně v akutní fázi potlačena exprese cytokinů Th1 imunitní odpovědi, v této práci jsme však neporovnávali výsledky na myším modelu atopické dermatitidy Nc/Nga a na jiném kmeni myší, které nevykazují znaky atopické dermatitidy.

Oproti výsledkům na nesenzitivovaných myších nebyl u ovoalbuminem senzitivovaných myší patrný rozdíl v expresi IL-1 β mezi VACV infikovanými a kontrolními myšmi s PBS. Zde naopak hrálo roli pohlaví myší. Exprese IL-1 β byla zvýšena u samců oproti samicím, kteří také vykazovali makroskopicky výrazné změny vzhledu kůže. Tento interleukin jako prozánětlivý cytokin byl pravděpodobně exprimován

v kůži samců jako následek pokousání, které je důsledkem bojovného chování samců, navíc umocněného svěděním kůže po senzitivaci. IL-1 β byl s menší intenzitou detekován také u senzitivovaných samic, respektive u jedné samice, což mohlo být způsobeno reakcí na lokální mechanické poškození pokožky, když se myš snažila zbavit náplasti po infekci. Nutno zdůraznit, že v případě senzitivovaných myší už mohla AD v místě senzitivace a inokulace VACV přejít do chronického stadia, které je charakteristické spíše Th1 odpovědí.

Dalším detekovaným cytokinem je IL-18. Byl nalezen jak u nesenzitivovaných, tak u ovoalbuminem senzitivovaných myší bez ohledu na aplikaci "tapestrippingu" nebo náplasti. Jediný rozdíl byl zaznamenán u senzitivovaných myší bez použití razítka při inokulaci VACV, tj. pouze nanesením inokula na ošetřenou kůži. Zde byla hladina tohoto cytokinu snižena oproti ostatním senzitivovaným myším s použitím razítka při infekci. V tomto případě mohl být podíl infikovaných buněk v odebraném kousku kůže relativně malý.

Z dostupné literatury je známo, že atopická dermatitida (AD) ovlivňuje expresi některých cytokinů. U AD bývá snížena exprese IL-18, protože se v genech pro IL-18 a jeho receptor vyskytují SNP (Single nucleotide polymorphism) (Wittmann *et al.*, 2009). Naproti tomu je účinek IL-18 inhibován také vakcínou, která kóduje virový vázací protein pro tento cytokin (Born *et al.*, 2000), což by mohlo být důvodem, proč je u zdravých lidí exprese tohoto interleukinu snížena (Kennedy *et al.*, 2012). V našem případě byl tento cytokin detekován ve všech vzorcích myších kůží, což znamená, že inhibice tohoto interleukinu VACV produkty nemá stejný účinek. Důvodem by mohla být např. pozměněná sekvence IL-18 u AD, která brání vazbě na virový IL-18 vázací protein. Tuto možnost je ale nutné ověřit. IL-18 spolu s IL-12 indukuje expresi IFN γ některými T buňkami a NK buňkami. Z tohoto důvodu by bylo dále vhodné detekovat expresi genu pro IFN γ .

Posledním cytokinem, který byl v těchto experimentech detekován, je IL-33. Ten byl u myší bez senzitivace detekován v menší míře u VACV infikovaných myší než u kontrolních PBS myší. Vzhledem k tomu, že IL-33 je regulován pomocí IRF-3 transkripčního faktoru (Polumuri *et al.*, 2012), jehož signalizace je vakcínou inhibována (Perdiguero a Esteban, 2009), může mít tato inhibice vliv na expresi IL-33 u myší infikovaných vakcínou. Tento trend se objevil opět pouze u nesenzitivovaných myší, tedy u modelu akutní formy atopické dermatitidy.

U myši senzitivovaných ovoalbuminem byl IL-33 detekován bez zjevné korelace s aplikací VACV, ani nebyl nalezen rozdíl mezi PBS a jedinci infikovanými vakcínou .

Na rozdíl od nesenzitivovaných myši Nc/Nga se zdá, že předchozí senzitivace spíše zabránila změnám v expresi sledovaných cytokinů v odpověď na inokulaci VACV. Předchozí senzitivace myši před aplikací virového inokula pravděpodobně může ovlivnit typ imunitní odpovědi u myši Nc/Nga obdobně jako u atopické dermatitidy u lidí. Výsledky detekce cytokinů u předem specificky senzitivovaných myši by mohly odpovídat spíše Th1 typu imunitní odpovědi, která se vyskytuje u chronické formy atopické dermatitidy. Předem nesenzitivované myši Nc/Nga by mohly naopak vykazovat spíše Th2 typ imunitní odpovědi, což odpovídá akutní formě atopické dermatitidy (Leung *et al.*, 2004). Tato situace by mohla být analogická situaci u lidí. Jedinci s aktivním ekzémem se nikdy neočkovali ani v minulosti. Naopak je známo, že se eczema *vaccinatum* objevoval po aplikaci VACV i do zdánlivě zdravé kůže atopických jedinců. Tudíž, pokud by inokulace VACV více ovlivňovala produkci prozánětlivých cytokinů u zdánlivě zdravé kůže, mohla by být větší pravděpodobnost rozvoje *eczema vaccinatum* v důsledku snížené produkce IL-1 β a alarminu IL-33.

Detekci cDNA jednotlivých cytokinů dále ovlivňuje rozsah, ve kterém je celý vzorek kůže infikován. Ke stanovení míry infekce v kůži by proto bylo vhodné pomocí kvantitativních metod detekovat nejen mRNA pro cytokiny, ale také VACV DNA, ev. mRNA v kůži. Nicméně vzhledem k různé afinitě VACV k buňkám různého embryonálního původu by byla vhodnější imunohistochemická analýza, která by ukázala rozdíly na úrovni jednotlivých buněčných elementů.

5.2.2. Charakterizace odpovědi na imunizaci myši Nc/Nga rekombinantním virem WR-IRF3

Druhým záměrem diplomové práce v *in vivo* experimentech byla detekce cytokinů u myši Nc/Nga infikovaných rekombinantním virem vakcínou WR-IRF3.

Z literatury je známo, že některé cytokiny jsou regulovány transkripčním faktorem IRF-3. Jedním z nich je i IL-33 (Polumuri *et al.*, 2012). Dále bylo zjištěno, že buněčné linie mikrogliových buněk po transdukcii adenovirovým vektorem s integrovaným genem pro IRF-3 vykazují protizánětlivý fenotyp, kdy byla zaznamenána snížená produkce prozánětlivých cytokinů jako IL-1 α a IL-1 β a naopak zvýšená produkce IL-1ra (IL-1 receptor antagonist) jako buněčného regulátoru IL-1 (Tarassishin *et al.*, 2011).

Orientační experimenty s inokulací myši Nc/Nga rekombinantním virem vakcínie WR-IRF3 provedené na malém počtu myši (navíc se z jednoho vzorku infikovaného WR-IRF3 nepodařilo vyizolovat RNA) nenaznačují, že by exprese IL-33 byla odlišná u myši infikovaných WR-Luc a WR-IRF3. Naopak exprese IL-1 β nebyla v kůži myši infikované rekombinantním virem WR-IRF3 pozorována, což se shoduje se závěry studie s adenovirovým vektorem exprimujícím IRF-3 (Tarassishin *et al.*, 2011).

Detekce IL-18 cDNA u myši Nc/Nga infikovaných WR-IRF3 jako prozánětlivého cytokinu se zdála vyšší než u myši infikovaných kontrolním rekombinantním virem WR-Luc. V dostupné literatuře však nebyla nalezena souvislost mezi IRF-3 transkripčním faktorem a expresí IL-18. Nicméně IL-18 stimuluje expresi IFN γ , čímž by mohl ovlivnit imunitní odpověď myši Nc/Nga. Bylo by proto vhodné stanovit expresi tohoto cytokinu i u těchto vzorků.

Pro obecnou charakterizaci možných odlišností v odpovědi na infekci mezi rekombinantním virem WR-IRF3 a kontrolním virem WR-Luc nebo wt-WR byla porovnána jednak velikost lézí a a jednak poměr hmotnosti sleziny ku váze myši jako ukazatele míry imunitní odpovědi na infekci.

Předchozí výsledky Mgr. Jarmily Knitlové naznačily souvislost mezi velikostí lézí po inokulaci viru vakcínie a mírou specifické imunitní odpovědi, charakterizované hladinou protilátek (Knitlová *et al.*, rukopis v přípravě). Výsledky mé diplomové práce naznačují možnost vyslovení obdobných závěrů, a to, že s velikostí léze po inokulu koreluje velikost sleziny jakožto ukazatel imunitní odpovědi. Zejména však z těchto výsledků vyplývá, že myši infikované rekombinantním virem WR-IRF3 vykazovaly větší velikost lézí po inokulu (u aplikace akupunkturní jehlou) i větší velikost sleziny (u obou způsobů aplikace) ve srovnání s kontrolní inokulací virem WR-Luc a a wt-WR . Tyto výsledky však byly získány jen na malém počtu myši a je nutno je ověřit na větší skupině. Další experimenty by měly u inokulace WR-IRF3 detailně charakterizovat jednak produkci ostatních cytokinů, jednak indukci specifické, zejména protektivní imunitní odpovědi.

6. Shrnutí

In vitro experimenty:

1. Byl charakterizován růst rekombinantního viru vakcínie WR-IRF3 s integrovanou cDNA pro transkripční faktor IRF-3 v buňkách BSC-40 a NIH 3T3.
2. Byla potvrzena exprese IRF-3 virem WR-IRF3 na úrovni mRNA pomocí RT-PCR i na úrovni proteinu a jeho aktivace virovou infekcí pomocí funkčního eseje detekujícího expresi IFN β .

In vivo experimenty:

1. Byl analyzován vliv různého způsobu senzitivace a inokulace VACV kmene WR na expresi cytokinů IL-1 β , IL-18 a IL-33 v kůži atopických myší Nc/Nga pomocí RT-PCR.
2. Byla charakterizována exprese těchto cytokinů u myší Nc/Nga inokulovaných rekombinantním virem WR-IRF3.
3. Byla předběžně charakterizována míra imunitní odpovědi u myší Nc/Nga inokulovaných rekombinantním virem WR-IRF3.

7. Seznam literatury

- Alcamí, A. a Smith, G. L. (1995). Vaccinia, cowpox, and camelpox viruses encode soluble gamma interferon receptors with novel broad species specificity. *Journal of virology*, 69(8), 4633–9.
- Alcamí, A., Symons, J. A., Collins, P. D., Williams, T. J. a Smith, G. L. (1998). Blockade of chemokine activity by a soluble chemokine binding protein from vaccinia virus. *Journal of immunology*, 160(2), 624–33.
- Arend, W. P. (2002). The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. *Cytokine & growth factor reviews*, 13(4-5), 323–40.
- Arend, W. P., Palmer, G. a Gabay, C. (2008). IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunological reviews*, 223, 20–38.
- Artenstein, A. W. (2009). Vaccines for military use. *Vaccine*, 27(4), 16–22.
- Balachandran, S. Roberts, P. C., Kipperman, T., Bhalla, K. N., Compans, R. W., Archer, D. R. a Barber, G. N. 2000. Alpha / Beta Interferons Potentiate Virus-Induced Apoptosis through Activation of the FADD / Caspase-8 Death Signaling Pathway. *Journal of Virology*, 74(3), 1513–1523.
- Bonilla, W. V., Fröhlich, A., Senn, K., Kallert, S., Fernandez, M., Johnson, S., Kreutzfeldt, M., Hegazy, A. N., Schrick, C., Fallon, P. G., Klemenz, R., Nakae, S., Adler, H., Merkler, D., Löhning, M. a Pinschewer, D. D. (2012). The alarmin interleukin-33 drives protective antiviral CD8⁺ T cell responses. *Science*, 335(6071), 984-9.
- Boo, K. H. a Yang, J. S., 2010. Intrinsic cellular defenses against virus infection by antiviral type I interferon. *Yonsei medical journal*, 51(1), 9–17.
- Born, T. L., Morrison, L. A., Esteban, D. J., VandenBos, T., Thebeau, L. G., Chen, N., Spriggs, M. K., et al. (2000). A poxvirus protein that binds to and inactivates IL-18, and inhibits NK cell response. *Journal of immunology*, 164(6), 3246–54.
- Bowie, A., Kiss-Toth, E., Symons, J. A., Smith, G. L., Dower, S. K.. a O’Neill, L. A. (2000). A46R and A52R from vaccinia virus are antagonists of host IL-1 and toll-like receptor signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(18), 10162–7.
- Broyles, S. S. (2003). Vaccinia virus transcription. *Journal of General Virology*, 84(9), 2293–2303.
- Buller, R. M., a Palumbo, G. J. (1991). Poxvirus pathogenesis. *Microbiological reviews*, 55(1), 80–122.
- Chaix, J., Tessmer, M. S., Hoebe, K., Fuséri, N., Ryffel, B., Dalod, M., Alexopoulou, L., Beutler, B., Brossay, L., Vivier, E. a Walzer, T. (2008). Cutting edge: Priming of NK cells by IL-18. *Journal of immunology*, 181(3), 1627–31.

- Chang, H., Watson, J. C. a Jacobst, B. L. (1992). The E3L gene of vaccinia virus encodes an inhibitor of the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(11), 4825-9.
- Chen, R. A-J., Ryzhakov, G., Cooray, S., Randow, F. a Smith, G. L. (2008). Inhibition of IkkappaB kinase by vaccinia virus virulence factor B14. *PLoS pathogens*, 4(2), e22.
- Chung, C. S., Hsiao, J. C., Chang, Y. S. a Chang, W. (1998). A27L protein mediates vaccinia virus interaction with cell surface heparan sulfate. *Journal of virology*, 72(2), 1577-85.
- Colamonici, O. R., Domanski, P., Sweitzer, S. M., Larner, A. a Buller, R. M. (1995). Vaccinia virus B18R gene encodes a type I interferon-binding protein that blocks interferon alpha transmembrane signaling. *The Journal of biological chemistry*, 270(27), 15974-8.
- Colby, C., Jurale, C. a Kates, J. R. (1971). Mechanism of synthesis of vaccinia virus double-stranded ribonucleic acid in vivo and in vitro. *Journal of virology*, 7(1), 71-6.
- Cooray, S., Bahar, M. W., Abrescia, N. G. A, McVey, C. E., Bartlett, N. W., Chen, R. A-J., Stuart, D. I., Grimes, J. M. a Smith G. L. (2007). Functional and structural studies of the vaccinia virus virulence factor N1 reveal a Bcl-2-like anti-apoptotic protein. *The Journal of general virology*, 88(6), 1656-66.
- Davies, M. V., Elroy-Stein, O., Jagus, R., Moss, B. a Kaufman, R. J. (1992). The vaccinia virus K3L gene product potentiates translation by inhibiting double-stranded-RNA-activated protein kinase and phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2. *Journal of virology*, 66(4), 1943-50.
- Dubochet, J., Adrian, M., Richter, K., Garces, J. a Wittek, R. (1994). Structure of intracellular mature vaccinia virus observed by cryoelectron microscopy. *Journal of virology*, 68(3), 1935-41.
- Eisenächer, K. a Krug, A. (2012). Regulation of RLR-mediated innate immune signaling-- it is all about keeping the balance. *European journal of cell biology*, 91(1), 36-47.
- Ferrer, P. E. Potthoff, S., Kirschnek, S., Gasteiger, G., Kastenmüller, W., Ludwig, H., Paschen, S. A., Villunger, A., Sutter, G., Drexler, I. a Häcker, G. 2011. Induction of Noxa-mediated apoptosis by modified vaccinia virus Ankara depends on viral recognition by cytosolic helicases, leading to IRF-3/IFN- β -dependent induction of pro-apoptotic Noxa. *PLoS pathogens*, 7(6), e1002083.
- Fischer, S. F., Ludwig, H., Holzapfel, J., Kvansakul, M., Chen, L., Huang, D. C. S., Sutter, G., Knese, M. a Häcker, G. (2006). Modified vaccinia virus Ankara protein F1L is a novel BH3-domain-binding protein and acts together with the early viral protein E3L to block virus-associated apoptosis. *Cell death and differentiation*, 13(1), 109-18.

- García, M. A., Guerra, S., Gil, J., Jimenez, V. a Esteban, M. (2002). Anti-apoptotic and oncogenic properties of the dsRNA-binding protein of vaccinia virus, E3L. *Oncogene*, 21(55), 8379–87.
- García, M. A., Gil, J., Ventoso, I., Guerra, S., Domingo, E., Rivas, C. a Esteban, M. (2006). Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiology and molecular biology reviews*, 70(4), 1032–60.
- Guo, L., Wei, G., Zhu, J., Liao, W., Leonard, W. J., Zhao, K. a Paul, W. (2009). IL-1 family members and STAT activators induce cytokine production by Th2, Th17, and Th1 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(32), 13463–8.
- Harrison, S. C., Alberts, B., Ehrenfeld, E., Enquist, L., Fineberg, H., McKnight, S. L., Moss, B., O'Donnell, M., Ploegh, H., Schmid, S. L., Walter, K. P. a Theriot, J. (2004). Discovery of antivirals against smallpox. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(31), 11178–92.
- Howard, J., Justus, D. E., Totmenin, A. V., Shchelkunov, S. a Kotwal, G. J. (1998). Molecular mimicry of the inflammation modulatory proteins (IMPs) of poxviruses: evasion of the inflammatory response to preserve viral habitat. *Journal of leukocyte biology*, 64(1), 68–71.
- Hsiao, J. C., Chung, C. S. a Chang, W. (1999). Vaccinia virus envelope D8L protein binds to cell surface chondroitin sulfate and mediates the adsorption of intracellular mature virions to cells. *Journal of virology*, 73(10), 8750–61.
- Jungwirth, C. a Launer, J. (1968). Effect of poxvirus infection on host cell deoxyribonucleic acid synthesis. *Journal of virology*, 2(5), 401–8.
- Kadowaki, N., Ho, S., Antonenko, S., Malefyt, R. W., Kastelein, R. A., Bazan, F. a Liu, Y. J. (2001). Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *The Journal of experimental medicine*, 194(6), 863–9.
- Katsuta, M., Takigawa, Y., Kimishima, M., Inaoka, M., Takahashi, R. a Shiohara, T. (2006). NK cells and gamma delta+ T cells are phenotypically and functionally defective due to preferential apoptosis in patients with atopic dermatitis. *Journal of immunology*, 176(12), 7736–44.
- Kawakami, Y., Yumoto, K. a Kawakami, T. 2007. An improved mouse model of atopic dermatitis and suppression of skin lesions by an inhibitor of Tec family kinases. *Allergy International*, 16(1), 67-75.
- Kennedy, R. B., Ovsyannikova, I. G., Pankratz, V. S., Haralambieva, I. H., Vierkant, R. A. a Poland, G. A. 2012. Genome-wide analysis of polymorphisms associated with cytokine responses in smallpox vaccine recipients. *Human genetics*, 131(9), 1403–21.

- Kotwal, G. J. a Moss, B. (1989). Vaccinia virus encodes two proteins that are structurally related to members of the plasma serine protease inhibitor superfamily. *Journal of virology*, 63(2), 600–6.
- Law, M., Carter, G. C., Roberts, K. L., Hollinshead, M. a Smith, G. L. (2006). Ligand-induced and nonfusogenic dissolution of a viral membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(15), 5989–94.
- Leung, D. Y. M. a Bieber, T. (2003). Atopic dermatitis. *Lancet*, 361(9352), 151–60.
- Leung, D. Y. M., Boguniewicz, M., Howell, M. D., Nomura, I. a Hamid, Q. A. (2004). New insights into atopic dermatitis. *The Journal of Clinical Investigation*, 113(5), 651-7.
- Leung, D. Y. M., Gao, P.-S., Grigoryev, D. N., Rafaels, N. M., Streib, J. E., Howell, M. D., Taylor, P. A., Boguniewicz, M., Canniff, J., Armstrong, B., Zaccaro, D. J., Schneider, L. C., Hata, T. R., Hanifin, J. M., Beck, L. A., Weinberg, A. a Barnes, K. C. (2011). Human atopic dermatitis complicated by eczema herpeticum is associated with abnormalities in IFN- γ response. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 127(4), 965-73.
- Löhning, M., Stroehmann, A., Coyle, A. J., Grogan, J. L., Lin, S., Gutierrez-Ramos, J. C., Levinson, D., Radbruch, A. a Kamradt, T. (1998). T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells, independent of interleukin 4, interleukin 5, and interleukin 10, and important for Th2 effector function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(12), 6930–5.
- MacNeil, A., Reynolds, M. G. a Damon, I. K. (2009). Risks associated with vaccinia virus in the laboratory. *Virology*, 385(1), 1–4.
- Marcinak, J., Vora, S., Weber, S., Thomson, K., Garcia-Houchins, S., Nawrocki, J., Hunt, K., Panares, R., Suter, B., Siegfried, K., Teclaw, R., Graves, C., Staggs, W., Allen, D., Buffin, K., Pontones, P., Fulginiti, V., Scott, D., Patel, P., Chan-Tack, K., DiGiacinto, J., Damon, I., Reynolds, M., Regnery, R., Belay, E., Karem, K., Olson, V., Li, Y., Smith, S., Braden, Z., Hughes, C., Fleischauer, A., Diaz, P., Rotz, L., Pesik, N., Barson, J., Bower, W., Openshaw, J., Miramontes, R. a Lederman, E. (2007). Household transmission of vaccinia virus from contact with a military smallpox vaccinee--Illinois and Indiana. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 56(19), 478-81.
- McLaughlin, J., Schmidt, T., Westcott, M., Baumbach, J., Lofgren, J. P., Gerber J., Panares, R., Staggs, W., Collins, L., Li, Y., Ruone, S., Anderson, L., Reynolds, M., Trindade, G., Olson, V., Damon, I., Fagan, R. a Lederman, E. (2007). Vulvar vaccinia infection after sexual contact with a military smallpox vaccinee--Alaska. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 56(17), 417-9.
- Miller, A. M. (2011). Role of IL-33 in inflammation and disease. *Journal of Inflammation*, 8(1), 22

- Muzio, M. a Mantovani, A. (2000). Toll-like receptors. *Microbes and infection*, 2(3), 251–5.
- Muzny, C. A., King, H., Byers, P., Currier, M., Nolan, R. a Mena, L. (2009). Vulvar vaccinia infection after sexual contact with a smallpox vaccinee. *The American Journal of the Medical Sciences*, 337(4), 289-91.
- Myskiw, C., Arsenio, J., van Bruggen, R., Deschambault, Y. a Cao, J. (2009). Vaccinia virus E3 suppresses expression of diverse cytokines through inhibition of the PKR, NF-kappaB, and IRF3 pathways. *Journal of virology*, 83(13), 6757–68.
- Oda, E. Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T. a Tanaka, N. 2000. Noxa, a BH3-Only Member of the Bcl-2 Family and Candidate Mediator of p53-Induced Apoptosis. *Science*, 288(5468), 1053–1058.
- Ohashi, K., Ikeda, M., & Kurimoto, M. (1998). 18 IN A MOUSE MODEL OF VACCINIA VIRUS INFECTION, 593–599.
- O'Neill, L. A. J. (2006). How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Current opinion in immunology*, 18(1), 3–9.
- Perdiguero, B. a Esteban, M. (2009). The interferon system and vaccinia virus evasion mechanisms. *Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 29(9), 581–98.
- Polumuri, S. K., Jayakar, G. G., Shirey, K. A., Roberts, Z. J., Perkins, D. J., Pitha, P. M. a Vogel, S. N. (2012). Transcriptional Regulation of Murine IL-33 by TLR and Non-TLR Agonists. *Journal of immunology*, 189(1), 50–60.
- Reading, P. C., Khanna, A. a Smith, G. L. (2002). Vaccinia virus CrmE encodes a soluble and cell surface tumor necrosis factor receptor that contributes to virus virulence. *Virology*, 292(2), 285–98.
- Remichkova, M. (2010). Poxviruses: smallpox vaccine, its complications and chemotherapy. *Virus Adaptation and Treatment*, Dove Medical Press Ltd., 41-46.
- Rivas, C., Gil, J., Mělková, Z., Esteban, M. a Díaz-Guerra, M. (1998). Vaccinia virus E3L protein is an inhibitor of the interferon (i.f.n.)-induced 2-5A synthetase enzyme. *Virology*, 243(2), 406-14.
- Rodriguez, J. F., Rodriguez, D., Rodriguez, J. R., McGowan, E. B. a Esteban, M. (1988). Expression of the firefly luciferase gene in vaccinia virus: a highly sensitive gene marker to follow virus dissemination in tissues of infected animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(5), 1667–71.
- Savinko, T., Matikainen, S., Saarialho-Kere, U., Lehto, M., Wang, G., Lehtimäki, S., Karisola, P., Reunala, T., Wolff, H., Lauerma, A. a Alenius, H. (2012). IL-33 and ST2 in atopic dermatitis: expression profiles and modulation by triggering factors. *The Journal of investigative dermatology*, 132(5), 1392–400.

- Schmitz, J., Owyang, A., Oldham, E., Song, Y., Murphy, E., McClanahan, T. K., Zurawski, G., Moshrefi, M., Qin, J., Li, X., Gorman, D. M., Bazan, J. F. & Kastelein, R. A. (2005). IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*, 23(5), 479–90.
- Schröder, M., Baran, M. & Bowie, A. G. (2008). Viral targeting of DEAD box protein 3 reveals its role in TBK1/IKKepsilon-mediated IRF activation. *The EMBO journal*, 27(15), 2147–57.
- Senkevich, T. G., Ojeda, S., Townsley, A., Nelson, G. E. & Moss, B. (2005). Poxvirus multiprotein entry-fusion complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(51), 18572–7.
- Smith, E. J., Marié, I., Prakash, a, García-Sastre, A. & Levy, D. E. (2001). IRF3 and IRF7 phosphorylation in virus-infected cells does not require double-stranded RNA-dependent protein kinase R or Ikappa B kinase but is blocked by Vaccinia virus E3L protein. *The Journal of biological chemistry*, 276(12), 8951–7.
- Smith, G. L., Vanderplasschen, A. & Law, M. (2002). The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. *The Journal of general virology*, 83(12), 2915–31.
- Smith, V. P., Bryant, N. A. & Alcamí, A. (2000). Ectromelia, vaccinia and cowpox viruses encode secreted interleukin-18-binding proteins. *Journal of General Virology*, 81(5):1223-30.
- Stewart, T. L., Wasilenko, S. T. & Barry, M. (2005). Vaccinia Virus F1L Protein Is a Tail-Anchored Protein That Functions at the Mitochondria To Inhibit Apoptosis, 79(2), 1084–1098.
- Symons, J. A., Adams, E., Tschärke, D. C., Reading, P. C., Waldmann, H. & Smith, G. L. (2002). The vaccinia virus C12L protein inhibits mouse IL-18 and promotes virus virulence in the murine intranasal model. *The Journal of general virology*, 83(11), 2833–44.
- Szajner, P., Weisberg, A. S., Lebowitz, J., Heuser, J. & Moss, B. (2005). External scaffold of spherical immature poxvirus particles is made of protein trimers, forming a honeycomb lattice. *The Journal of cell biology*, 170(6), 971–81.
- Takaoka, A. & Yanai, H. (2006). Interferon signalling network in innate defence. *Cellular microbiology*, 8(6), 907–22.
- Tarassishin, L., Suh, H.S. & Lee, S. C. 2011. Interferon regulatory factor 3 plays an anti-inflammatory role in microglia by activating the PI3K/Akt pathway. *Journal of neuroinflammation*, 8(1), 187.
- Tomimori, Y., Kawakami, Y., McCausland, M. M., Ando, T., Koriazova, L., Kato, S., Kawakami, T. & Crotty, S. 2011. Protective murine and human monoclonal antibodies against eczema vaccinatum. *Antiviral therapy*, 16(1), 67–75.

- Townsley, A. C., Weisberg, A. S., Wagenaar, T. R. a Moss, B. (2006). Vaccinia virus entry into cells via a low-pH-dependent endosomal pathway. *Journal of virology*, 80(18), 8899–908.
- Wang, B. X. a Fish, E. N. (2012). The yin and yang of viruses and interferons. *Trends in immunology*, 33(4), 190–7.
- Wittmann, M., Macdonald, A. a Renne, J. (2009). IL-18 and skin inflammation. *Autoimmunity reviews*, 9(1), 45–8.
- Wollenberg, A. a Klein, E. (2007). Current aspects of innate and adaptive immunity in atopic dermatitis. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 33(1-2), 35–44.
- Ye, J. a Maniatis, T. (2011). Negative regulation of interferon- β gene expression during acute and persistent virus infections. *PloS one*, 6(6), e20681.