

**Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Imunologie



**Bc. Hana Pilná**

Vliv interferon regulujícího faktoru 3 na imunitní odpověď proti viru vakcínie v atopickém organismu

Effects of the Interferon regulatory factor 3 on immune responses to vaccinia virus in the atopic organism

Diplomová práce

Školitel: MUDr. Zora Mělková, Ph.D.

Praha 2019

**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, 2. ledna 2019

Podpis

Ráda bych v první řadě poděkovala své školitelce Dr. Mělkové za pomoc, vedení, cenné rady a trpělivost, kterými mě v průběhu práce zahrnovala. Dále bych chtěla poděkovat Dr. Hájkové za nemalou pomoc s prací s myšmi a za duchovní podporu. Také děkuji naší laborantce Monice Kaplanové za pomoc a udržování v dobré náladě.

Dále děkuji Mirku Votrubovi a Dr. Hodaňové z Laboratoře pro výzkum vzácných onemocnění Kliniky dětského a dorostového lékařství VFN a 1. LF UK za pomoc s plasmidy.

A nakonec bych chtěla poděkovat Michaelle Madleňákové z naší laboratoře a celému týmu doc. Holady za rady a vytvoření příjemného pracovního prostředí.

## Abstrakt

Virus vakcínie (VACV) je obalený DNA virus z čeledi *Orthopoxviridae*. Velikost genomu VACV se pohybuje kolem 200 kpb. Velká kapacita genomu umožňuje VACV kódovat řadu faktorů, které jsou postradatelné pro replikaci a šíření viru in vitro, avšak interferují s imunitní odpovědí hostitele. I přesto je VACV silně imunogenní. Buněčná i humorální imunitní odpověď u atopiků je do značné míry deregulována, což s sebou v případě infekce nebo při aplikaci vakcín na bázi replikace schopných virů přináší komplikace, jako např. *eczema vaccinatum* způsobený VACV. Vliv VACV na imunitní odpověď spočívá mimo jiné v inhibici exprese interferonu (IFN) typu I, a to na mnoha úrovních – například dochází ke specifické inhibici fosforylace interferon regulujícího faktoru-3 (IRF-3), a to prostřednictvím inhibice aktivity TANK-binding kinázy 1 (TBK 1), která za normálních okolností fosforyluje IRF-3. Fosforylace vede k translokaci IRF-3 do jádra, kde iniciuje transkripci IFN $\beta$  a následně indukuje expresi IFN $\alpha$  a interferonem inducibilních genů. Při inhibici fosforylace a translokace IRF-3 k expresi těchto genů nedochází. Pro překonání tohoto bloku byl připraven rekombinantní VACV exprimující myší IRF-3 pod kontrolou VACV promotoru p7.5 (WR-IRF3). Již dříve bylo ověřeno, že exprese tohoto uměle vloženého IRF-3 vede k navození exprese IFN $\beta$ . Cílem této práce je charakterizovat efekt WR-IRF3 a kontrolního VACV exprimujícího luciferázu (WR-Luc) na imunitní odpověď spontánně atopického organismu, myší kmene Nc/Nga, a normálního organismu, myší kmene Balb/c. Dle získaných výsledků exprese rekombinantního IRF-3 ovlivňuje především produkci IFN $\beta$  a IL-1 $\beta$  v buněčných liniích a moduluje expresi řady cytokinů v kůžích obou pozorovaných myších kmenů. Imunizace pomocí WR-IRF3 rovněž vede k navození lepší protektivní imunity proti letální poxvirové infekci.

**Klíčová slova:** virus vakcínie, atopická dermatitida, interferon regulující faktor-3, interferon  $\beta$ , interleukin-1 $\beta$ , myší kmene Nc/Nga, myší kmene Balb/c

## Abstract

Vaccinia virus (VACV) is an enveloped DNA virus, member of the *Orthopoxviridae* genus. VACV genome size is about 200 kbp. This huge genome capacity allows VACV to encode a set of factors that are non-essential for virus replication and spread *in vitro*. While these factors are needed for interfering with host immune responses, VACV remains strongly immunogenic. Cell-mediated and humoral immune responses in atopic disorders are deregulated to a certain extent, leading to complications in case of infection or vaccination with vaccines based on replicating viruses, such as *eczema vaccinatum* caused by VACV. VACV effects on immune responses consist among others in the inhibition of expression of type I interferon (IFN) at various levels – for example in a specific inhibition of phosphorylation of the interferon regulatory factor-3 (IRF-3) via inhibition of the activity of TANK-binding kinase 1 (TBK 1) that normally phosphorylates IRF-3. Phosphorylation allows IRF-3 to translocate into the nucleus where it initiates transcription of IFN $\beta$  followed by induction of expression of IFN $\alpha$  and interferon stimulated genes. Expression of these genes is shut down when IRF-3 activity is inhibited. To overcome this block, a recombinant VACV expressing murine IRF-3 under VACV p7.5 promotor (WR-IRF3) was generated. Previously, it was confirmed that the expression of recombinant IRF-3 leads to expression of IFN $\beta$ . The aim of this thesis is to characterize the effects of WR-IRF3 and control VACV expressing luciferase (WR-Luc) in a spontaneously atopic organism, Nc/Nga mice, and in a normal one, Balb/c mice. The presented results indicate that expression of the recombinant IRF-3 increases expression of IFN $\beta$  and IL-1 $\beta$  in tissue cultures and modulates expression of various cytokines in the skin of both mouse strains used. Further, immunization with WR-IRF3 induces higher protective immunity against a lethal poxviral infection.

**Key words:** vaccinia virus, atopic dermatitis, interferon regulatory factor-3, interferon  $\beta$ , interleukin-1 $\beta$ , Nc/Nga mice, Balb/c mice

## Obsah

1	Úvod .....	10
2	Cíle práce.....	11
3	Literární přehled.....	12
3.1	Virus vakcínie .....	12
3.1.1	Replikační cyklus VACV.....	12
3.1.1.1	Vstup do buňky .....	12
3.1.1.2	Expese virových genů.....	12
3.1.1.3	Morfogeneze nových virionů .....	13
3.1.2	Očkování.....	14
3.2	Imunitní odpověď proti poxvirům.....	15
3.2.1	TLR (toll-like receptory).....	15
3.2.2	Cytosolické DNA senzory.....	15
3.2.3	Interferony .....	17
3.2.4	Interleukin-1 $\beta$ a IL-18 .....	18
3.2.5	Th1 cytokiny .....	18
3.2.6	Th2 cytokiny .....	19
3.2.7	Th17 cytokiny .....	19
3.2.8	Regulační T lymfocyty a jimi produkováné cytokiny .....	19
3.3	Obrana VACV proti imunitnímu systému.....	20
3.3.1	Únik před interferony.....	20
3.3.2	Únik před cytokiny .....	23
3.3.3	Inhibice apoptózy .....	23
3.3.4	Únik před NK buňkami .....	24
3.3.5	Další viroceptory (= virem kódované solubilní receptory pro cytokiny) a virokiny.....	24
3.4	Atopická dermatitida .....	24
3.4.1	Odchyly ve vrozené imunitě spojené s AD .....	25
3.4.2	Odchyly ve funkci T lymfocytů a dendritických buněk.....	26
3.4.3	Nc/Nga myší kmen jako model lidské AD .....	26
3.4.4	Viry způsobené komplikace u atopiků .....	27
4	Materiál a metody.....	28
4.1	Materiál.....	28
4.1.1	Chemikálie a roztoky .....	28
4.1.1.1	Chemikálie.....	28
4.1.1.2	Roztoky.....	29
4.1.2	Kultivační média a přísady pro bakterie.....	30
4.1.3	Kultivační média a přísady pro tkáňové kultury.....	30
4.1.4	Kity.....	30

4.1.5	Plasmidy a bakterie .....	31
4.1.6	Viry .....	31
4.1.7	Buněčné linie.....	31
4.1.8	Myší kmeny .....	32
4.1.9	Počítačové programy .....	32
4.2	Metody.....	32
4.2.1	Metody <i>in vitro</i> .....	32
4.2.1.1	Pasážování buněk.....	32
4.2.1.2	Počítání buněk.....	33
4.2.1.3	Nasetí buněk .....	33
4.2.1.4	Stimulace makrofágů .....	33
4.2.1.5	Infekce buněčných linií.....	33
4.2.1.6	Sklízení buněk.....	34
4.2.1.7	Příprava vzorků z buněčných linií.....	34
4.2.1.7.1	Vzorky pro titraci viru vakcínie.....	34
4.2.1.7.2	Vzorky pro izolaci RNA a proteinů pomocí RNA Blue.....	35
4.2.1.7.3	Vzorky pro western blot analýzu .....	35
4.2.1.8	Charakterizace růstu viru v buněčných liniích dilučním ředěním a titrací.....	35
4.2.1.9	Pomnožení a purifikace plazmidů .....	35
4.2.1.9.1	Transformace kompetentních buněk <i>E.coli</i> tepelným šokem .....	36
4.2.1.9.2	Izolace plazmidu pomocí Mini Prep kitu .....	36
4.2.1.9.3	Pomnožení a izolace plazmidu pomocí Maxi Prep kitu.....	36
4.2.1.10	Restrikční analýza.....	37
4.2.1.11	Transfekce buněčné linie NIH 3T3.....	38
4.2.1.12	Stanovení koncentrace nitritů Griessovou metodou .....	38
4.2.1.13	Precipitace proteinů z kultivačního média.....	38
4.2.2	Metody <i>in vivo</i> .....	39
4.2.2.1	Infekce myší.....	39
4.2.2.1.1	Příprava myší na infekci .....	39
4.2.2.1.2	Příprava virového inokula .....	39
4.2.2.2	Usmrcení .....	40
4.2.2.3	Příprava vzorků.....	40
4.2.2.3.1	Příprava kůží a částí GIT pro PCR.....	40
4.2.2.3.2	Příprava splenocytů pro stanovení produkce cytokinů .....	40
4.2.2.4	Protektivní pokusy.....	40
4.2.3	Analytické metody .....	41
4.2.3.1	Kvantitativní řetězová polymerázová reakce (qPCR) .....	41
4.2.3.1.1	Izolace DNA .....	41

4.2.3.1.2	Izolace RNA .....	41
4.2.3.1.3	Ošetření RNA Dnázou.....	41
4.2.3.1.4	Stanovení exprese cytokinů pomocí jedнокrokové RT-qPCR .....	42
4.2.3.1.5	Stanovení DNA viru vakcínie pomocí qPCR.....	43
4.2.3.2	Western blot analýza .....	43
4.2.3.2.1	Příprava vzorků v Laemmliho redukujícím vzorkovém pufru .....	43
4.2.3.2.2	Izolace proteinů z RNA Blue .....	44
4.2.3.2.3	SDS-PAGE .....	44
4.2.3.2.4	Transblot .....	44
4.2.3.2.5	Imunoblot.....	45
4.2.3.3	Detekce proteinů pomocí CBA (cytokine beads assay).....	46
4.2.4	Statistické zpracování dat .....	47
5	Výsledky .....	48
5.1	Pokusy na buněčných liniích .....	48
5.1.1	Ověření exprese myšního IRF-3 rekombinantním virem WR-IRF3 v buněčné linii NIH 3T3 .....	48
5.1.2	Ověření fosforylace IRF-3.....	49
5.1.3	Charakteristika růstu rekombinantního viru WR-IRF3 v buněčných liniích NIH 3T3 a BSC-40.....	49
5.1.4	Charakteristika exprese cytokinů a AIM2 v buněčné linii NIH 3T3 po infekci WR-Luc a WR-IRF3.....	50
5.1.5	Vliv exprese IRF-3 na produkci IL-1 $\beta$ bez přítomnosti viru.....	52
5.1.6	Vliv exprese IRF-3 na indukci apoptózy v buněčných liniích NIH 3T3 a BSC-40 .....	54
5.1.7	Charakterizace vlivu infekce rekombinantními viry na buněčnou linii J774.G8 .....	61
5.1.8	Vliv exprese rekombinantního IRF-3 na produkci IL-1 $\beta$ .....	62
5.1.9	Produkce NO infikovanými makrofágy.....	64
5.2	Pokusy na myších .....	66
5.2.1	Charakteristika exprese cytokinů v kůžích intradermálně infikovaných myší Balb/c a Nc/Nga po infekci WR-Luc a WR-IRF3 .....	66
5.2.2	Stanovení titru viru v kůžích Balb/c a Nc/Nga po inokulaci WR-Luc a WR-IRF3 .....	74
5.2.3	Detekce cytokinů ve slezinách intranasálně infikovaných myší na úrovni mRNA .....	75
5.2.4	Detekce cytokinů v supernatantech splenocytů intranasálně infikovaných myší na úrovni proteinů .....	76
5.2.5	Protektivní pokusy.....	77
6	Diskuze .....	81
7	Závěr.....	89
8	Přehled použité literatury .....	90



## Seznam zkratek

Zkratka	Význam anglicky	Význam česky
-	Negative	Negativní
+	Positive	Pozitivní
AD	atopic dermatitis	atopická dermatitida
AIM2	absent in melanoma 2	chybějící v melanomu
CEV	cell-associated enveloped virus	s buňkou spojený obalený virus
d.p.i.	days post infection	dny po infekci
DB	dendritic cells	dendritické buňky
DMEM	Dulbecco's modification of Eagle medium	Eaglovo modifikované medium
Ds	duble stranded	Dvojláknová
EEV	extracellular enveloped virus	extracelulární obalený virus
eIF	eukaryotic initiation factor	eukaryotický iniciační faktor
FBS	fetal bovine serum	fetální hovězí sérum
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase	glyceraldehyd-3-fosfát-dehydrogenáza
h.p.i.	hours post infection	hodiny po infekci
i.d.	Intradermal	Intradermální
i.n.	Intranasal	Intranasální
IEV	intracellular enveloped virus	intracelulární obalený virus
IFN	Interferon	Interferon
IL	Interleukin	Interleukin
IMV	intracellular mature virus	intracelulární zralý virus
iNOS	inducible NO-synthase	inducibilní NO syntáza
IRAK	interleukin-1 receptor-associated kinase	kináza asociovaná s receptorem pro IL-1
IRF	interferon regulatory factor	interferony regulující faktor
ISG	interferon stimulated genes	geny stimulované interferony
M.O.I.	multiplicity of infection	multiplicita infekce
MHC	major histocompatibility complex	hlavní histokompatibilní komplex
MyD88	myeloid differentiation primary response 88	primární odpověď myeloidní diferenciacce 88
NCS	newborn calf serum	sérum z novorozených telat
NF-κB	nuclear factor κB	jaderný faktor κB
NK	natural killer	přírození "zabijáci"
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu
PFU	plaque-forming unit	částice tvořící plak
PBS	phosphate buffered saline	fyzilogický roztok pufrovaný fosfátem
pDB	plasmacytoid dendritic cells	plasmacytoidní dendritické buňky
PRR	pattern recognition receptor	receptor pro molekulární vzory
RPMI	Roswell Park Memorial Institute	Institut Roswell Park Memorial
RSB	reducing sample buffer	redukující vzorkový pufr
SDS	sodium dodecylsulphate	dodecylsírán sodný
STAT	signal transducer and activator of transcription	přenašeč signálu a aktivátor transkripce
TBE	Tris-borate-EDTA buffer	Tris-borát-EDTA pufr

<b>Zkratka</b>	<b>Význam anglicky</b>	<b>Význam česky</b>
TBK1	TANK binding kinase 1	TANK-vážíací kináza 1
TGF	transforming growth factor	transformující růstový faktor
Th	T helper	T pomocný
TLR	Toll-like receptor	receptor podobný toll
TNF	tumor necrosis factor	faktor nádorové nekrózy
TRAF	TNF receptor associated factor	faktor asociovaný s receptorem pro TNF
TRIF	TIR domain-containing adaptor-inducing IFN- $\beta$	adaptér obsahující TIR doménu indukující IFN $\beta$
VACV	vaccinia virus	virus vakcínie
VCP	vaccinia virus complement-control protein	vakcíniový protein kontrolující komplement
WR	Western Reserve	Western Reserve

# 1 Úvod

Virus vakcínie (VACV) je obalený DNA virus z rodu *Orthopoxviridae*. Zástupci tohoto rodu jsou si antigenně velmi podobní, což umožňuje imunizaci virem vakcínie proti dalším orthopoxvirovým infekcím. Tohoto bylo využito při eradikaci pravých neštovic způsobených virem varioly. I když byla tato choroba z lidské populace úspěšně vymýcena, především proto, že člověk je jediným hostitelem, zásoby viru pravých neštovic nebyly nikdy zcela zničeny a přetrvávají obavy, že by mohlo dojít ke zneužití tohoto viru jako biologické zbraně. Z tohoto důvodu bylo zejména v USA po 11. září 2001 znovu přistoupeno k vakcinaci vybraného vojenského a zdravotnického personálu. Osoby s atopickou dermatitidou a jejich blízcí příbuzní však byli z očkování živou vakcínou vyčleněni kvůli riziku značných komplikací jako je *eczema vaccinatum* nebo generalizovaná vakcínie. Bylo tedy třeba začít s vývojem bezpečnější vakcíny.

U pacientů s atopickou dermatitidou dochází k deregulaci řady imunitních procesů. Mimo jiné dochází ke snižování schopnosti plasmacytoidních dendritických buněk (pDB) vycestovávat do kůže. To snižuje schopnost organismu se bránit proti virovým infekcím, jelikož tyto buňky fungují jako silní producenti interferonu (IFN) typu I. Zároveň VACV exprimuje celou řadu proteinů, které narušují syntézu interferonů a dalších obranných molekul. Jde například o protein A46, který blokuje signalizaci toll-like receptorů vazbou na Myd88 a TRIF. Dále VACV exprimuje protein C6, který se váže na TANK-binding kinázu 1 (TBK1) a znemožňuje tak fosforylaci interferon regulujícího faktoru 3 (IRF-3), která je nutná pro translokaci tohoto transkripčního faktoru do jádra, dále například protein N2, který inhibuje funkci IRF-3 po jeho translokaci do jádra.

V laboratoři MUDr. Zory Mělkové, Ph.D byl navržen a zkonstruován rekombinantní virus vakcínie kmene Western Reserve (WR) exprimující myši IRF-3 (WR-IRF3); na tkáňových kulturách bylo ukázáno, že u myších fibroblastů infikovaných tímto rekombinantním virem dochází k obejití bloku exprese IFN $\beta$ . Důvodem pro tyto experimenty byl předpoklad, že exprese interferonu typu I, normálně blokováná VACV, povede k adekvátnější antivirové odpovědi, a tím také k větší bezpečnosti vakcinačního vektoru, eventuálně k lepší ochraně atopického organismu před poxvirovými infekcemi, než je tomu při imunizaci divokými kmeny VACV.

Dle našich dosavadních výsledků vykazují atopické myši po imunizaci pomocí WR-IRF3 odlišný fenotyp než myši imunizované kontrolním virem exprimujícím luciferázu (WR-Luc). V této práci je prezentována částečná charakterizace efektu WR-IRF3, avšak přesnější charakterizace vlivu rekombinantního IRF-3 a mechanismu jeho účinku na atopický organismus zůstává předmětem dalšího zkoumání.

## 2 Cíle práce

Cílem této práce je charakterizovat vliv exprese myšního IRF-3 rekombinantní VACV (WR-IRF3) v buněčných liniích a na myším atopickém modelu, a to s použitím rekombinantní VACV exprimující luciferázu jako kontroly.

Díličí cíle práce:

- charakterizovat růst viru v buněčných liniích
- charakterizovat vliv infekce na expresi cytokinů a dalších faktorů v buněčných liniích myších fibroblastů a makrofágů
- charakterizovat vliv infekce na indukci apoptózy v buněčných liniích
- ověřit fosforylaci IRF-3 v infikovaných buněčných liniích
- charakterizovat expresi cytokinů v kůžích a slezinách infikovaných myší
- u intranasálně a intradermálně imunizovaných myší charakterizovat navození protektivní imunity proti letální infekci wt-WR

## **3 Literární přehled**

### **3.1 Virus vakcínie**

Virus vakcínie (VACV) je člen rodu Orthopoxviridae a slouží jako modelový virus pro studium poxvirů. Jde o obalený virus s dvouvláknovou lineární DNA o velikosti průměrně 200 kbp. Přestože se jedná o DNA virus, celý jeho replikační cyklus probíhá v cytoplasmě hostitelské buňky.

#### **3.1.1 Replikační cyklus VACV**

##### **3.1.1.1 Vstup do buňky**

Replikační cyklus VACV je komplexní a stále ne zcela prozkoumaný proces. Existují čtyři typy infekčních virionů. O přesném počtu a původu membrán obalujících virion se stále polemizuje (Smith et al. 2002). Intracelulární zralý virus (IMV), vzniká ve viroplazmě a je obalen jednou membránou; je nejčtenější a uvolňuje se z buňky po její lýze. Intracelulární obalený virus (IEV) získává další dva obaly z trans-Golgiho aparátu a časného endosomu. Je přechodem k CEV (obalený virus asociovaný s buňkou) a extracelulárnímu obalenému viru (EEV), které mají o jeden obal méně. Zatímco IMV se považuje za důležitý pro přenos infekce mezi jednotlivými hostiteli, CEV indukuje tvorbu typických aktinových komet a zprostředkovává šíření z buňky do buňky; EEV je zodpovědný za diseminaci viru na větší vzdálenosti v tkáňových kulturách a po těle. Při infekci EEV nejspíš dochází nejprve k rozpadu vnější membrány (Carter 2005) a až po té ke vstupu do buňky. Buněčný receptor pro VACV nebyl doposud identifikován. Nicméně bylo pozorováno, že ke vstupu do buňky jsou potřebné minimálně tři proteiny tvořící fúzní komplex (Lin et al. 2000). Je ale možné, že vstup VACV do buňky je ovlivněn konkrétním kmenem VACV a typem hostitelské buňky. Další studie ukázala, že VACV využívá ke vstupu apoptotické mimikry a vstupuje prostřednictvím makropinocytózy. Byl pozorován vznik struktur podobných apoptotickým tělískům a zamezení jejich tvorby vedlo k výraznému snížení infekce. Tato strategie umožňuje VACV vstupovat do většiny buněčných typů, jelikož schopnost likvidace apoptotického materiálu je vlastní mnoha buněčným typům (Mercer and Helenius 2008).

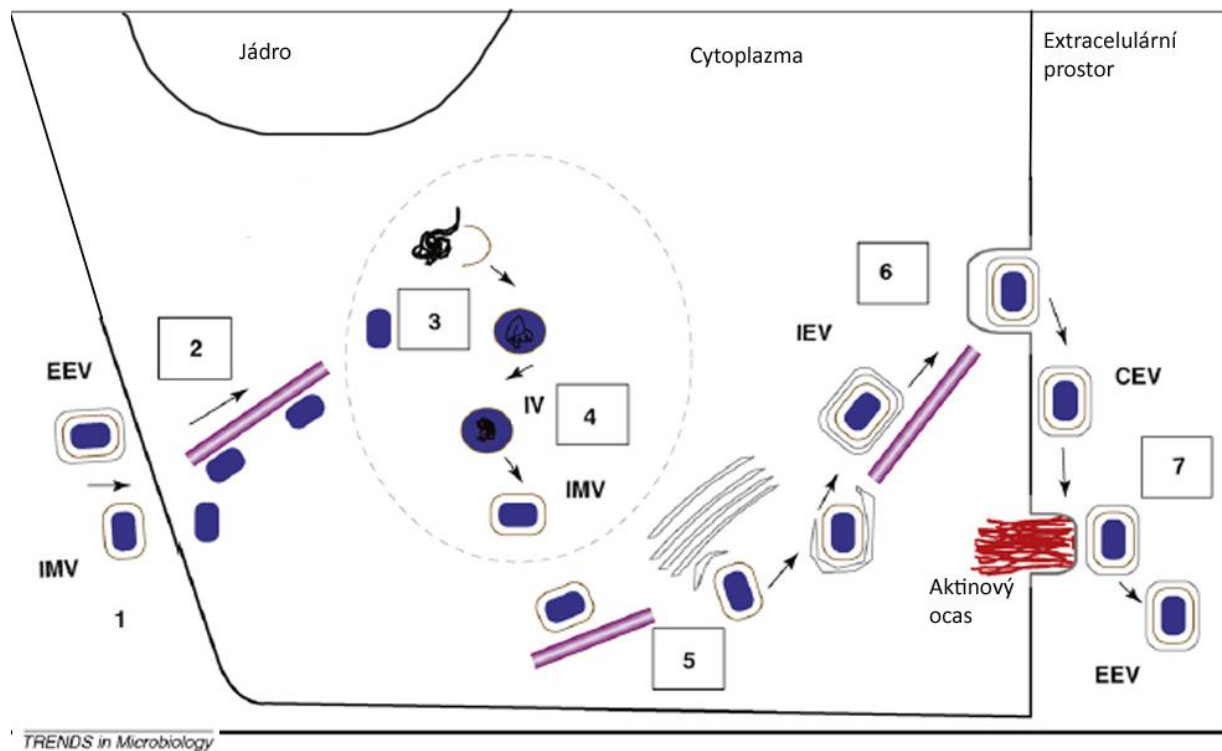
##### **3.1.1.2 Exprese virových genů**

Geny VACV se dají rozdělit do tří skupin dle toho, kdy jsou v rámci replikačního cyklu exprimovány, a to na časně, intermediární a pozdní. K transkripci časných genů dochází během prvních min po vstupu viru do buňky. Součástí virionu jsou veškeré komponenty potřebné pro časnou transkripci, což umožňuje syntézu virové mRNA v bezpečí virionu. Mimo jiné jsou přítomny i enzymy pro úpravu mRNA, která tak mimikuje hostitelskou mRNA (Broyles 2003). V rámci časné transkripce je přepisována a translatována zhruba polovina vakcíniových genů, mezi nimiž jsou geny potřebné

pro zahájení intermediární transkripce, replikaci DNA a většina genů, jejichž produkty ovlivňují imunitní odpověď hostitele (Oda and Joklik 1967; Smith et al. 2013). Exprese časných genů je následovaná replikací virové DNA, která předchází intermediární a pozdní transkripci (Roberts and Smith 2008). V rámci intermediární exprese dochází k expresi genů potřebných pro zahájení pozdní fáze transkripce. V té dochází k expresi většiny virových proteinů nutných pro sestavení nových virových částic (Broyles 2003).

### **3.1.1.3 Morfogeneze nových virionů**

Morfogeneze nových virionů začíná ve viroplazmě, ze které je vytlačena většina hostitelských organel. Jako první se tvoří tzv. nezralý virion (IV), což je oválná či kruhovitá struktura, do níž je následně nasunuta nově nasyntetizovaná virová DNA, čímž vzniká zralý intracelulární virion (IMV). IMV je struktura cihlovitého tvaru obalená jednou fosfolipidovou membránou, která je uvolněna z hostitelské buňky lýzí (Roberts and Smith 2008). Některé IMV jsou prostřednictvím mikrotubulů transportovány do blízkosti endoplasmatického retikula a Golgiho aparátu. Virion je pak obalen membránou odvozenou od těchto organel a stává se intracelulárním obaleným virionem (IEV) (Schmelz et al. 1994). IEV je následně opět prostřednictvím mikrotubulů dopraven k cytoplazmatické membráně, kde dochází k odpojení od mikrotubulů, reorganizaci kortexového aktinu a fúzi cytoplazmatické membrány s vnější membránou IEV (Arakawa et al. 2007). Virion pak zůstává připojen k cytoplazmatické membráně z vnější strany. V průběhu fúze membrán dochází k tomu, že protein A36 zůstává v cytoplazmatické membráně pod virionem a poté, co je fosforylován, startuje signalizační kaskádu, která vede k polymeraci aktinu a k tvorbě pro poxviry typického aktinového ocasu (Frischknecht et al. 1999). V konečné fázi dochází k oddělení virionu od buňky a vzniká tak obalený extracelulární virion (EEV) (Payne 1979). EEV může vzniknout též exocytózou IMV (Roberts and Smith 2008). Schéma replikačního cyklu VACV je znázorněno na obrázku č. 1.



Obrázek č. 1: Schéma replikačního cyklu VACV. 1) Vstup viru do buňky. Dochází ke vstupu neobaleného jádra virionu. 2) Jádro virionu je transportováno prostřednictvím mikrotubulů dál do buňky. 3) Transkripce časných mRNA a následná syntéza DNA. 4) Vznik IV ve virových továrnách a následná tvorba IMV. 5) Transport některých IMV k endoplasmatickému retikulu a vznik IEV (6). 7) Vnější membrána IEV fúzuje s cytoplazmatickou membránou a CEV se tak dostává na buněčný povrch. Pomocí aktinového ocasu se CEV dostává k sousedním buňkám, popřípadě je uvolněn jakožto EEV. Upraveno dle (Roberts and Smith 2008)

### 3.1.2 Očkování

Poxviry si jsou vzájemně velmi podobné, což umožňuje imunizaci pomocí VACV proti dalším poxvirovým infekcím. Tohoto bylo využito při eradikaci pravých neštovic, za něž je zodpovědný virus varioly (VARV). Ani po vymýcení této smrtící choroby v roce 1980 ale zájem o VACV neupadl. Jednak zásoby VARV nebyly nikdy zcela zničeny a přetrvávají obavy z bioteroristického útoku (Henderson 2014), jednak v přírodním rezervoáru existují další poxvirové infekce nebezpečné pro člověka, jako například virus opičích neštovic (Sklenovská and Van Ranst 2018). V neposlední řadě se v důsledku globálních klimatických změn a tání permafrostu vynořují poxviry infikované pozůstatky lidí i zvířat (Stone 2002). Vakcín na bázi VACV byla vyvinuta celá řada. V dnešní době je k dispozici Acam 2000, což je vakcína druhé generace na bázi kmene NYCBH (New York City Board of Health). Jedná se o tzv. živou vakcínu, která nemůže být bezpečně použita u imunokompromitovaných osob a atopiků (Wharton et al. 2003). Proto byla vyvinuta vakcína na bázi MVA (modifikovaného viru vakcínie Ankara). MVA není schopen v savčích buňkách dát vznik infekčním virionům a uvolnit se z primárně infikované buňky, ale zůstává dostatečně imunogenní. Tato vakcína byla v Evropské unii schválena

v roce 2015 (“WHO | Global Advisory Committee on Vaccine Safety, <br>2–3 December 2015” n.d. [online]).

## **3.2 Imunitní odpověď proti poxvirům**

Jak již bylo zmíněno, poxviry včetně VACV jsou DNA viry replikující se v cytoplazmě, se schopností infikovat většinu hostitelských buněk. Klíčovým krokem k navození imunitní odpovědi je tedy rozpoznání virové DNA v cytoplazmě, exprese interferonů a jimi indukovaných genů a následná aktivace adaptivní složky imunitního systému. Poxviry mohou být přenášeny jak vzduchem přes dýchací soustavu, tak přímým kontaktem přes kůži. V obou případech dochází k vyvolání silné imunitní reakce s tím rozdílem, že likvidace viru závisí v prvním případě na CD8+ T lymfocytech a v případě kožní infekce více na CD4+ T lymfocytech a produkci protilátek (Goulding et al. 2012).

### **3.2.1 TLR (toll-like receptory)**

TLR jsou jednou ze skupin receptorů pro molekulární vzory asociované s patogeny (PRR). Jsou exprimované především buňkami imunitního systému, ale mohou se nacházet mimo jiné též na endoteliálních buňkách. Pro detekci VACV jsou zásadní dva. V první řadě TLR-2, který se nachází na cytoplazmatické membráně a je asociovaný s adaptorovými molekulami Myd88. Aktivace těchto receptorů vede k aktivaci NF- $\kappa$ B a následné expresi prozánětlivých cytokinů (Zhu et al. 2007). Dalším receptorem, který je schopen detegovat přítomnost VACV v buňce je TLR3, který se nachází na endozomální membráně a je aktivován dsRNA. TLR-3 spouští signální kaskádu vedoucí k aktivaci IRF-3, potažmo IRF-7 (Hutchens et al. 2008).

### **3.2.2 Cytosolické DNA senzory**

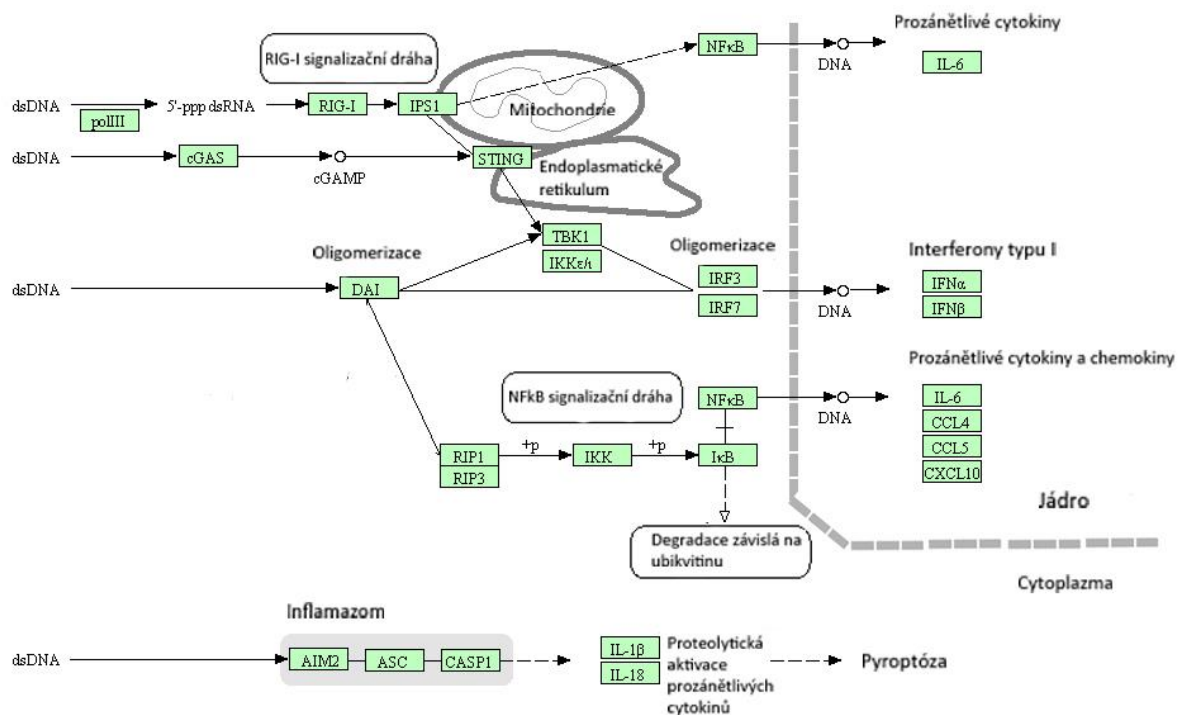
Vakcíniová DNA a v průběhu replikačního cyklu vznikající dsRNA mohou být detekovány hned několika cytosolickými PRR. Jedním z nich je RNA polymeráza III, která je schopna detegovat DNA v cytosolu a přepsat ji do RNA, na jejímž 5' konci je navázaný trifosfát. Takové molekuly RNA aktivují RIG-I receptory a následnou signalizační kaskádu (Chiu et al. 2009). Dalším senzorem pro cytosolickou DNA je cGAMP-syntáza (cGAS), která je aktivována po vazbě dsDNA. Vznikající cyklický GAMP (guanosin monofosfát-adenosin monofosfát) funguje jako druhý posel pro aktivaci dalších signálních molekul (Sun et al. 2013). Dalším cytosolickým senzorem pro dsDNA je IFI16 (interferonem y indukibilní protein) (Almine et al. 2017). Signální dráhy od těchto receptorů se sbíhají na molekulách MAVS (někdy též IPS-1) asociovaných s mitochondriální membránou. Následně dochází k aktivaci STING, který rekrutuje TBK1 kinázu, která fosforyluje IRF-3 a umožňuje tak jeho dimerizaci a translokaci do jádra (S. Liu et al. 2015).

IRF-3 reguluje expresi celé plejády genů, a to hlavně IFN typu I, ale i typu II a III a následně i IFN-indukovaných genů jako například ISG15, jehož produkt mimikuje ubikvitin a brání degradaci IRF-



3 (Hiscott 2007) nebo ISG56, z něhož vznikající protein váže eIF-3c a vypíná tak hostitelskou translaci (Terenzi et al. 2005). Aktivace IRF-3 přispívá k obraně proti virovým infekcím i dalším způsobem. Bylo pozorováno, že přes RIG-I aktivovaný IRF-3 přímo interaguje s proapoptotickým Bax proteinem v mitochondriální membráně a iniciuje tak uvolnění cytochromu c do cytosolu a aktivaci vnitřní apoptotické dráhy (Chattopadhyay et al. 2010). Dalším receptorem, který aktivuje TBK1 kinázu je DAI (aktivátor interferon regulujících faktorů závislý na DNA). Signalizace přes tento receptor vede i k aktivaci NF-κB, a tím k produkci prozánětlivých cytokinů (Takaoka et al. 2007). K aktivaci NF-κB vede i signalizace přes Rad50-CARD komplex. Rad50 je v jádře součástí opravného systému pro poškozenou DNA. Nicméně v cytosolu se podílí na detekci DNA a následné indukci exprese prozánětlivých cytokinů, a to hlavně IL-1β (Roth et al. 2014).

Dalším typem cytosolického receptoru pro dsDNA je AIM2, jehož aktivace vede k oligomerizaci adapterových proteinů a tvorbě inflamasomu, který proteolyticky aktivuje kaspázu-1. Tento enzym štěpí neaktivní formu IL-1β a IL-18 (pro-IL-1β, pro-IL-18) na aktivní (Rathinam et al. 2010). Aktivace AIM2 v kožních kmenových buňkách prý vede k rozvoji určitého typu zánětlivé paměti, která umožňuje při dalším setkání s patogenem rychlejší nástup zánětlivé odpovědi (Naik et al. 2017). Schéma detekce DNA v cytosolu je znázorněno na obrázku č. 2.



04623 12/16/13  
(c) Kanelusa Laboratories

Obrázek č. 2: Schématické znázornění některých cytosolických DNA senzorů, signálních kaskád a efektorových molekul, které jsou produkovány po aktivaci těchto senzorů. Upraveno dle [www.genome.jp](http://www.genome.jp).

### 3.2.3 Interferony

Interferony jsou cytokiny s antivirovými účinky produkované v závislosti na aktivaci výše zmíněných receptorů. Byly popsány tři třídy interferonů. Všechny tři se svým způsobem podílejí na imunitní odpovědi proti VACV (Smith et al. 2013).

Do skupiny IFN typu I patří IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  a dále IFN $\epsilon$ , IFN $\omega$  a IFN $\tau$ . Pro IFN $\alpha$  existuje 14 různých genů, které kódují řadu izoform tohoto cytokinu. IFN $\alpha$  je produkován hlavně imunitními buňkami. Silným producentem jsou aktivované plasmacytoidní dendritické buňky. Pro IFN $\beta$  byl identifikován pouze jeden gen. IFN $\beta$  je produkován rovněž imunitními buňkami, ale též celou řadou dalších buněčných typů jako fibroblasty nebo hepatocyty a další (Ivashkiv and Donlin 2014).

Expese a následná sekrece IFN typu I z buněk vede k navození antivirového stavu v buňkách exprimujících receptory pro tyto cytokiny. Po aktivaci receptorů (IFNAR) dochází k jejich dimerizaci a následné aktivaci intracelulárních kináz JAK1 a Tyk2. Tyto fosforylační aktivované kinázy rekrutují STAT (signal transducer and aktivator of transcription), tento faktor následně dimerizuje a je translokován do jádra. V závislosti na typu STAT dochází k aktivaci různých genů. STAT1 a STAT2 tvoří komplex s IRF-9, který se váže na ISRE (interferon stimulated response element) sekvenci a spouští tak transkripci ISGs (IFN stimulated genes), z nichž některé jsou popsány níže. Dále může STAT1 tvořit homodimer, který se váže na GAS (gamma activated sequence) a indukuje produkci prozánětlivých genů (Ivashkiv and Donlin 2014).

Jedním z hlavních IFN-stimulovaných proteinů je například protein kináza R (PKR). Aktivita této kinázy je závislá na přítomnosti dsRNA (Thomis and Samuel 1993). Po aktivaci (vazbě dsRNA) dochází autofosforylaci PKR a následné fosforylaci eukaryotického translačního faktoru eIF2 $\alpha$ , čímž je inhibována jeho aktivita a následně dochází k útlumu translace hostitelských proteinů. Dalším faktorem přispívajícím k antivirové obraně je 2'-5'-oligoadenylát syntáza. Opět je nutná její aktivace prostřednictvím dsRNA. Tento enzym pak syntetizuje oligoribonukleotidy propojené přes 2'-5' diesterovou vazbu. Tyto RNA následně aktivují RNázu L, která štěpí RNA přítomnou v cytosolu, tedy virovou i hostitelské buňky. Jde rovněž o mechanismus podílející se na regulaci hladin hostitelských RNA (Lohöfener et al. 2015). Aktivace PKR i systému 2'-5'-oligoadenylát syntáza/RNáza L vede k inhibici proteosyntézy a apoptóze virem infikovaných buněk (Díaz-Guerra et al. 1997).

IFN typu I působí na celé spektrum buněk. Jednak to jsou NK buňky, u kterých signalizace IFN typu I vede ke zvýšené produkci IFN $\gamma$  a vyšší míře cytotoxické aktivity (Nguyen et al. 2002). U antigenprezentujících buněk zvyšují expresi kostimulačních molekul a MHC molekul, a tak zvyšují jejich schopnost aktivovat naivní T lymfocyty. V dalších somatických buňkách navozují výše popsaným způsobem antivirový stav, který brání dalšímu šíření viru; v neposlední řadě IFN typu I mohou indukovat apoptózu (Apelbaum et al. 2013).

IFN $\gamma$  jako IFN typu II je produkován především NK buňkami a následně aktivovanými T lymfocyty. Jde o jeden z hlavních induktorů Th1 imunitní odpovědi. Mimo jiné zvyšuje expresi MHC I a II. Dalším efektem IFN $\gamma$  je stimulace exprese indukovatelné NO-syntázy (iNOS) a následná produkce NO. NO inhibuje replikaci VACV na úrovni DNA syntézy (Mělková and Esteban 1995), a to inhibicí virové ribonukleotid reduktázy (Fujikura et al. 2009). IFN $\gamma$  se ukázal jako nepostradatelný při eliminaci VACV infekce, jak bylo ukázáno na myším modelu s nefunkčním IFN $\gamma$ , popřípadě jeho receptorem (Goulding et al. 2014). IFN $\gamma$  je rovněž potřebný pro aktivaci indukovanou smrt T lymfocytů (Refaeli et al. 2002) a bylo též pozorováno, že má přímý vliv na zvýšenou míru apoptózy u keratinocytů v kůži atopiků (Rebane et al. 2012).

Dalšími cytokiny s antivirovou aktivitou jsou IFN typu III. Do této skupiny patří například IFN $\lambda$ , IL-28 a IL-29. U těchto IFN byla pozorována antivirová aktivita podobná IFN typu I (Ank et al. 2006).

### **3.2.4 Interleukin-1 $\beta$ a IL-18**

IL-1 $\beta$  je spolu s TNF $\alpha$  a IL-6 jedním z prvních prozánětlivých cytokinů, které amplifikují časnou protivirovou odpověď. IL-1 $\beta$  je stejně jako další členové IL-1 rodiny syntetizován v podobě prekurzoru o velikosti 35kDa a následně je prostřednictvím inflammasomu štěpen na aktivní formu o 17kDa. Tímto dvou krokovým mechanismem je zajištěna přísná regulace jeho sekrece (Rathinam et al. 2010). Aktivuje mimo jiné expresi už zmiňované iNOS nebo cyklo-oxygenázy-2 (COX-2). Činností tohoto enzymu vznikají prostaglandiny, jejichž produkcí dochází ke vzniku horečky. IL-1 $\beta$  je tak jedním z hlavních endogenních pyrogenů (Davidson et al. 1990). Produkce tohoto cytokinu je také potřebná pro časnou fázi vývoje Th17 populace T lymfocytů (Chung et al. 2009).

Dalším členem IL-1 rodiny, který se podílí na protivirové obraně je IL-18. Jeho produkce je stimulovaná prostřednictvím IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  a IL-6. Funguje synergicky s IL-12, a tudíž podporuje Th1 populaci, a tím produkci IFN $\gamma$  T lymfocyty i NK buňkami (Dinarello 1999). NK buňky produkující dostatečné množství IFN $\gamma$  byly popsány jako nepostradatelné při likvidaci intranasální infekce VACV (Abboud et al. 2016).

### **3.2.5 Th1 cytokiny**

Do této skupiny patří cytokiny stimulující diferenciaci naivních T lymfocytů na Th1 populaci a cytokiny touto populací buněk následně produkované. Především jde o již zmiňovaný IFN $\gamma$  a IL-12. Do této skupiny bývá řazen i IL-2 a TNF $\alpha$ . Takto polarizovaná imunitní odpověď je namířena proti intracelulárním patogenům, tedy i virům. Tyto cytokiny podporují rozvoj zánětu, vazbou na své receptory mohou vést k apoptóze, jako např. TNF $\alpha$ , a podporují cytotoxickou aktivitu CD8 $^{+}$  T lymfocytů, a tím i likvidaci virové infekce (Raphael et al. 2015).

### 3.2.6 Th2 cytokiny

Tato skupina cytokinů je produkována zejména basofily, eozinofily, žírnými buňkami a následně Th2 populací T lymfocytů. Patří sem IL-4, IL-5 a IL-13. Někdy to této skupiny bývá řazen i IL-10, který je ale rovněž produkován regulačními T lymfocyty (Raphael et al. 2015). Takto polarizovaná imunitní odpověď je namířena především proti extracelulárním mnohobuněčným parazitům. Je doprovázena vylitím sekretorických granul zmiňovaných granulocytů a následnou indukci hojivých procesů. Tato imunitní odpověď nepodporuje likvidaci virových infekcí a bylo pozorováno, že infekce VACV vede ke změně polarizace právě směrem k Th2 (Liu et al. 2005).

### 3.2.7 Th17 cytokiny

Do skupiny Th17 cytokinů patří především šest členů IL-17 rodiny, a sice IL-17A až F. Tyto cytokiny jsou namířeny proti jednobuněčným extracelulárním patogenům, a to hlavně plísním a kvasinkám. Vliv těchto cytokinů je značně prozánětlivý a aberace v jejich expresi vede k celé řadě zánětlivých autoimunitních onemocnění. Pro indukci Th17 populace jsou nutné IL-6, IL-23 a TGF $\beta$ . Bylo pozorováno, že Th17 lymfocyty disponují různými vlastnostmi v závislosti na tom, pod jakým izotypem TGF $\beta$  se vyvíjejí (Lee et al. 2012).

Vyváženost exprese cytokinů je nutná jak pro navození dostatečné odpovědi přirozené složky imunitního systému, tak pro vývoj správné populace T lymfocytů. Cytokiny vzájemně ovlivňují svou produkci. Například IFN typu I negativně ovlivňují expresi IL-1 $\beta$ , přestože se oba podílí na prvotní prozánětlivé reakci na virovou infekci (Guarda et al. 2011). IFN $\gamma$  je jedním z hlavních diferenciačních faktorů potřebných pro rozvoj Th1 odpovědi; rovněž inhibuje polarizaci CD4+ na Th2 a Th17 (Yang et al. 2011) a naopak podporuje expresi IL-1 $\beta$ . Bylo však pozorováno, že tento efekt může být různý u různých organismů. IFN $\gamma$  zvyšuje produkci IL-1 $\beta$  v lidských buňkách, ale u myši může být jeho efekt opačný (Masters et al. 2010). IL-4 zase inhibuje vývoj CD4+ T lymfocytů na Th1 (Wurtz et al. 2004) a interferuje s vývojem i funkcí Th17 (Guenova et al. 2015).

### 3.2.8 Regulační T lymfocyty a jimi produkové cytokiny

Činnost regulačních T lymfocytů je při virové infekci nutná, jelikož v mnoha případech dochází k poškození organismu na základě příliš intenzivní zánětlivé odpovědi spíše než v důsledku pomnožení viru jako takového. Bylo pozorováno, že keratinocyty po stimulaci prostřednictvím IFN $\gamma$  exprimují MHC II, kostimulační molekuly a enzym indolamin-2,3-dioxygenázu. Tímto napomáhají expanzi antigen-specifických regulačních T lymfocytů (Curran et al. 2014). Regulační T lymfocyty jsou též potřebné pro tlumení aktivity cytotoxických CD8+ T lymfocytů, čímž napomáhají ukončení imunitní odpovědi (Dietze et al. 2011). Regulační T lymfocyty tlumí imunitní odpověď hned několika způsoby. Kromě jiného je to i vyvazování IL-2 prostřednictvím vysokoafinitního receptoru pro tento

cytokin, čímž snižují proliferaci dalších populací lymfocytů nebo produkce hojivých cytokinů jako IL-10 a TGF $\beta$  (Bettini and Vignali 2009).

### 3.3 Obrana VACV proti imunitnímu systému

VACV kóduje celou řadu genů postradatelných pro replikaci *in vitro*. Produkty těchto genů slouží zejména k obraně viru proti hostitelskému imunitnímu systému a k modulaci jeho funkcí *in vivo*. Tyto imunomodulační proteiny mohou mít i víc než jednu funkci a jejich delece často vede k atenuaci viru *in vivo* (Smith et al. 2013).

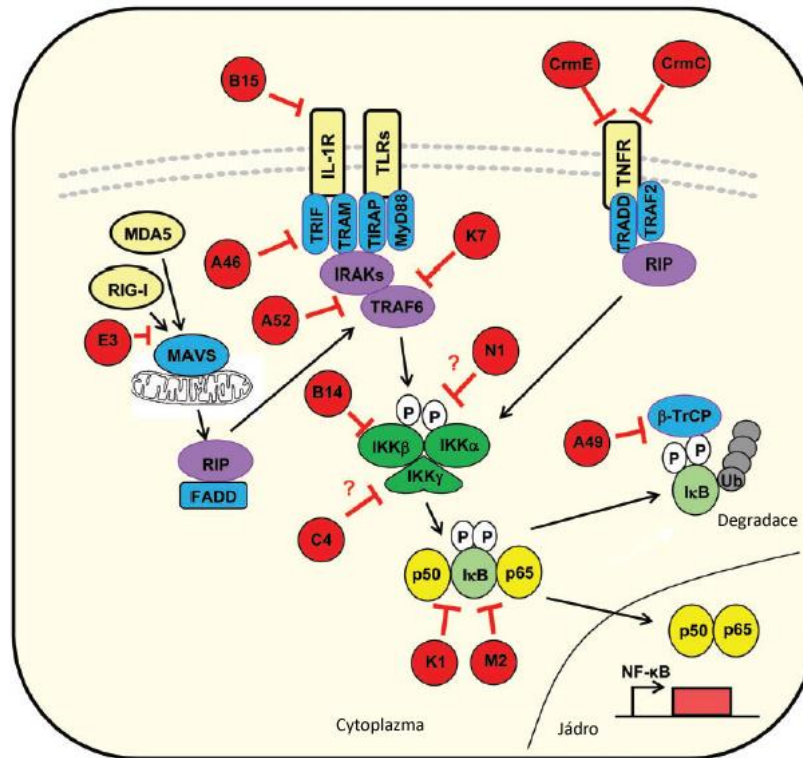
#### 3.3.1 Únik před interferony

Interferony jsou hlavním a prvním obranným mechanismem proti virovým infekcím, a to především v rané fázi infekce. Není tedy překvapivé, že VACV exprimuje škálu proteinů bránících jejich expresi či jejich funkci. V první řadě dochází k transkripci časných genů VACV způsobem, který do určité míry zabráňuje vzniku dsRNA (Broyles 2003), a tím aktivaci signálních drah vedoucí k produkci IFN či aktivaci ISG.

Dalším způsobem, jak zabránit produkci IFN a dalších antivirových faktorů, je redukce syntézy proteinů hostitelské buňky. Protein D10 je hydroláza, která rozpoznává buněčnou mRNA a odštěpuje jejich 5'-methylguanovinovou čepičku, což vede k následné degradaci této mRNA (Moss et al. 2007). Třetím způsobem, jak předejít produkci IFN je omezení rozpoznání PAMP prostřednictvím PRR. VACV exprimuje protein E3, který se svou C-koncovou doménou váže na dsRNA vznikající v pozdní fázi replikace VACV a tím brání aktivaci PKR, či systému 2'-5' OAS/RNáza L (Myskiw et al. 2009) E3 je též schopen vazby na dsDNA, čímž inhibuje činnost RNA polymerázy III, která slouží jako cytosolický receptor dsDNA (Valentine and Smith 2010). Dalším proteinem znemožňujícím detekci dsDNA v cytosolu je protein C16. C16 má afinitu k heterodimeru Ku70/Ku80 DNA-protein kinázy a redukuje schopnost tohoto dimeru vázat se na katalytickou podjednotku (Peters et al. 2013).

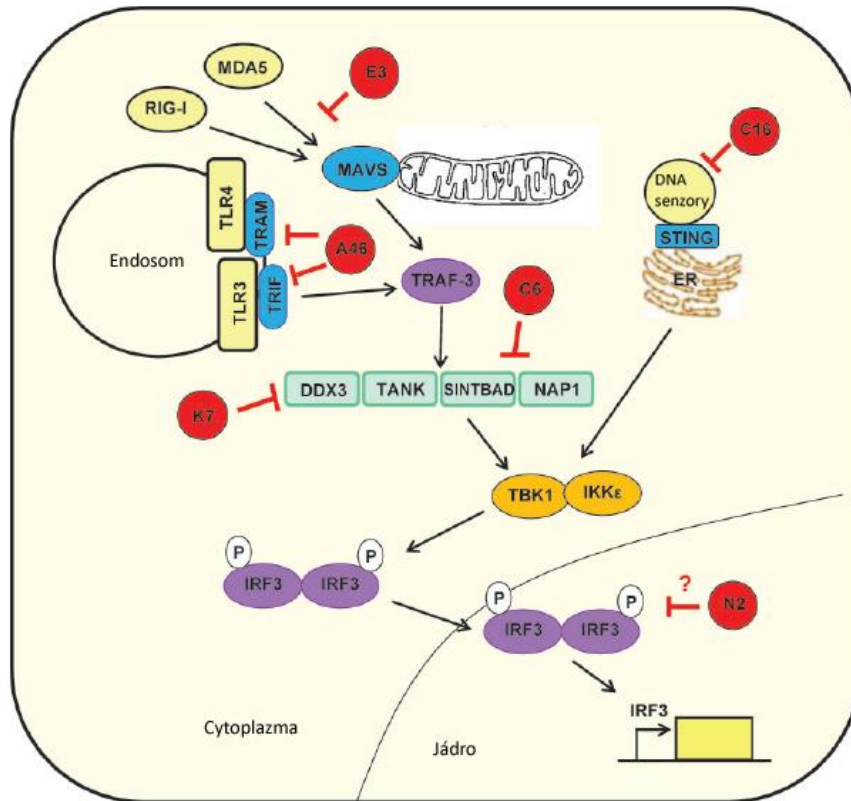
Signální dráhy vedoucí od PRR jsou se svými mnohými komponentami dalším cílem imunomodulačních produktů VACV. VACV potlačuje signalizaci vedoucí jak k aktivaci NF- $\kappa$ B, tak IRF-3. Inhibitory NF- $\kappa$ B signalizace zahrnují mimo jiné proteiny A46, A49, B14, K7, N1 a již zmíněný E3. Protein A46 obsahuje TIR doménu a je schopen interagovat s důležitými složkami signálních drah vedoucích od TLR a receptoru pro IL-1, jako jsou molekuly MyD88, Mal, TRAM a TRIF a tím bránit přenosu signálu (Stack et al. 2005). Podobně funguje i protein K7, který se váže na TRAF6 a IRAK2 (Benfield et al. 2013). Protein A49 mimikuje fosforylovaný I $\kappa$ B $\alpha$  a váže se na E3 ubiquitin ligázu  $\beta$ -TrCP, čímž jí znemožní navázat ubiquitin na fosforylovaný I $\kappa$ B $\alpha$ , což za normálních okolností vede k jeho degradaci a následné aktivaci NF- $\kappa$ B (Mansur et al. 2013). Fosforylaci I $\kappa$ B $\alpha$  zprostředkovává

rovněž fosforylací aktivovaný IKK $\beta$ . Fosforylací této molekuly brání další vakcíniový protein B14 (Chen et al. 2008). Dalším proteinem, jehož funkcí je mimo jiné inhibice aktivace NF- $\kappa$ B je protein N1 (Maluquer de Motes et al. 2011). Inhibitory NF- $\kappa$ B jsou pro přehlednost znázorněny na obrázku č. 3.



Obrázek č. 3: Schématické shrnutí inhibitorů aktivace NF- $\kappa$ B exprimovaných VACV. Upraveno dle (Smith et al. 2013)

Některé z výše zmíněných proteinů inhibují i aktivaci IRF-3. Jedná se o protein K7, který se váže i na DDX3 RNA helikázu, a inhibuje tak aktivaci IRF-3 skrze TBK1/IKK $\epsilon$  (Oda et al. 2009). Stejně tak proteiny C16 s A46 znemožňují aktivaci IRF-3 už na začátku signální dráhy (Peters et al. 2013; Stack et al. 2005). Vakcíniový protein C6 se váže na adaptorové proteiny NAP1, TANK a SINTBAD a zamezuje tak aktivaci IRF-3 a IRF-7 závislé na aktivitě kináz TBK1 a IKK $\epsilon$ , která je závislá na zmíněných adaptorových molekulách (Unterholzner et al. 2011). Dalším proteinem inhibujícím aktivaci IRF-3 je N2, který doposud neobjasněným mechanismem brání činnosti IRF-3 v jádře (Ferguson et al. 2013). Inhibitory aktivace IRF-3 jsou opět pro přehlednost znázorněny na obrázku č. 4.



Obrázek č. 4: Schématické shrnutí inhibitorů aktivace IRF-3 exprimovaných VACV. Upraveno dle (Smith et al. 2013)

Další strategií, jak zabránit účinku IFN je produkce virem kódovaných cytokinových receptorů secernovaných z nakažené buňky, popřípadě receptorů exprimovaných na jejím povrchu. Tyto faktory jsou někdy souhrnně nazývány viroceptory. VACV exprimuje vlastní receptory pro IFN typu I i II. B18 je solubilní receptor pro hostitelský IFN $\alpha$  s afinitou pro IFN $\alpha$  řady hostitelů, nevyjímaje člověka, myš nebo králíka (Waibler et al. 2009). VACV dále kóduje B8 receptor pro IFN $\gamma$ , který je schopen vázat tento cytokin v celé řadě organismů. U myši je ale jeho funkce značně omezená (Alcami and Smith 1995).

VACV je rovněž schopen inhibovat přenos signálu od receptorů pro interferony. K tomu slouží VH1 fosfatáza, která je jednak potřebná pro replikaci viru a jednak defosforyluje transkripční faktory STAT1 a STAT2 po jejich stimulaci prostřednictvím interferonů (Mann et al. 2008). V konečné fázi je VACV schopen též inhibovat činnost produktů interferony stimulovaných genů. Již zmiňovaný protein E3 je schopen vazby na ubiquitinu podobný protein ISG15 a brání jeho antivirové aktivitě (Guerra et al. 2008). Dalším příkladem je protein K3, který mimikuje eIF2 $\alpha$ , váže se na PKR a brání tak inhibici proteosyntézy (Carroll et al. 1993).

### 3.3.2 Únik před cytokiny

Prozánětlivé cytokiny produkované v rané fázi virové infekce hrají důležitou roli v přirozené i následné adaptivní imunitní odpovědi proti virům. VACV disponuje několika proteiny, které tuto odpověď ovlivňují. Jedním z cytokinů, na jejichž produkci VACV cílí je IL-1 $\beta$ . Protein F1 se váže přímo na NLRP1 inflamasom a redukuje tak množství aktivované kaspázy-1, která je nutná pro produkci aktivního IL-1 $\beta$  (Gerlic et al. 2013). Další protein, který brání produkci aktivního IL-1 $\beta$ , je B13 (někdy též uváděný jako SPI-2). Jde o inhibitor serinových proteáz (serpin), mezi něž patří i zmiňovaná kaspáza-1 (Kettle et al. 1997). Inhibicí proteolytické aktivace kaspázy-1 VACV blokuje signalizaci i od dalších typů inflamasomů jako NLRP3 a AIM2.

Inhibice štěpení pro-IL-1 $\beta$  na aktivní formu funguje pouze intracelulárně v infikovaných buňkách. VACV však kóduje i solubilní virový receptor s afinitou k extracelulárnímu lidskému a myším IL-1 $\beta$  (Antonio Alcamí and Smith 1996). VACV též inhibuje signalizaci vedoucí od receptoru pro IL-1, a to inhibicí aktivace NF- $\kappa$ B, jak již bylo popsáno u interferonů.

Dalším cytokinem, jehož aktivitu VACV ovlivňuje je IL-18. S ohledem na to, že se jedná o člena IL-1 rodiny, lze předpokládat, že i produkce tohoto cytokinu bude narušena aktivitou proteinu B13. Dále VACV kóduje C12, což je solubilní receptor pro IL-18. Snížená hladina IL-18 vede ke snížení aktivity NK buněk a cytotoxických lymfocytů, což má za následek mimo jiné sníženou produkci IFN $\gamma$  (Reading and Smith 2003).

### 3.3.3 Inhibice apoptózy

Indukce apoptózy je dalším způsobem, kterým se vyšší organismy brání proti virovým infekcím; viry proto reagují expresí různých proteinů s antiapoptotickou funkcí. Některé z již zmíněných vakcíniových proteinů tak rovněž mají antiapoptotickou aktivitu. Jedná se o proteiny B13 a F1, které inhibují činnost kaspázy-1 (Gerlic et al. 2013; Kettle et al. 1997). F1 dále obsahuje motiv podobný Bcl-2 buněčným proteinům. Díky tomuto strukturnímu motivu se F1 váže na Bak, čímž brání jeho interakci s Bax a znemožňuje tak aktivaci vnitřní apoptotické dráhy (Kvansakul et al. 2008). Dalším, avšak zdaleka ne jediným proteinem obsahujícím strukturu podobnou Bcl-2 je N1, který se váže na proapoptotické proteiny Bid a Bad, čímž rovněž brání indukci apoptózy (Maluquer de Motes et al. 2011). Dalším způsobem, jak VACV brání apoptóze, je vyvazování dsRNA pomocí E3, která je za normálních okolností stimulem vedoucím k indukci apoptózy skrze aktivaci PKR a systému RNáza L/OAS (García et al. 2002), a tedy skrze aktivaci IRF-3, což je, jak již bylo zmíněno, též proapoptotický faktor.

Infekce VACV vede ve většině buněk k lýzi infikované buňky neboli k nekróze. Tento typ buněčné smrti je na rozdíl od apoptózy vysoce imunogenní. Jednak dochází k expozici virových antigenů a jednak tělu vlastních struktur, které jsou za fyziologického stavu čistě intracelulární.



Ovšem bylo pozorováno, že i v epiteliálních buňkách infikovaných VACV dochází k určité míře aktivace kaspáz a následné buněčné smrti, která je svým průběhem na pomezí mezi nekrózou a apoptózou (Liskova et al. 2011).

VACV je na druhou stranu schopen i indukce apoptózy, a to v různých typech imunitních buněk, čímž dále narušuje efektivní navození imunitní odpovědi. Tento efekt byl pozorován mimo jiné v myších makrofázích a u lidských dendritických buněk (Humlová et al. 2002; Engelmayer et al. 1999).

### **3.3.4 Únik před NK buňkami**

Infekce VACV, podobně jako jinými viry, vede ke snížení exprese MHC I, což je jeden z aktivačních stimulů pro NK buňky. Mezi hlavní zbraně VACV proti NK buňkám patří již zmiňované inhibitory IL-18, čímž VACV snižuje aktivaci NK buněk, a inhibitory IFN a apoptózy, čímž brání efektorovým mechanismům těchto buněk. VACV je ale schopen i přímé infekce NK buněk, čímž snižuje jejich cytotoxickou aktivitu (Kirwan et al. 2006). Dalším způsobem aktivní inhibice NK buněk je exprese virového hemaglutininu na povrchu infikovaných buněk. Hemaglutinin je konzervovaným ligandem pro sadu aktivačních receptorů NK buněk a vazbou na ně snižuje schopnost NK buněk lyzovat buňky napadené VACV (Jarahian et al. 2011).

### **3.3.5 Další viroceptory (virem kódované solubilní receptory pro cytokiny) a virokiny**

VACV exprimuje celou řadu dalších imunomodulačních faktorů. Mimo jiné jde o solubilní a též membránově vázané virové receptory pro hostitelský TNF $\alpha$  (A53 a B28) s afinitou pro lidský, myší a krysí TNF $\alpha$  (Alcami et al. 1999). Další skupinou viroceptorů jsou proteiny vyvazující prozánětlivé chemokiny jako například protein A41 (Bahar et al. 2008). Proti prozánětlivým chemokinům se VACV brání rovněž inhibicí jejich syntézy již popsanou inhibicí aktivace NF- $\kappa$ B a IRF-3. V neposlední řadě VACV exprimuje VCP, který je podobný hostitelským proteinům, které regulují aktivaci komplementu. VCP váže C3b a C4b složky komplementu, čímž znemožňuje aktivaci této proteolytické kaskády klasickou i alternativní cestou a chrání tak extracelulární viriony před lýzí (McKenzie et al. 1992).

## **3.4 Atopická dermatitida**

Atopická dermatitida (AD) je jedním z nejčastějších zánětlivých onemocnění kůže. Prevalence tohoto onemocnění je zhruba 2-10 % u dospělých a 15-30 % u dětí s tím, že distribuce v různých částech světa se značně liší. Existuje několik druhů AD v závislosti na věku, kdy se nemoc poprvé objeví, zvýšené hladině IgE a dalších faktorech (Werfel et al. 2016). Mechanismus vzniku není přesně znám ani u jednoho z nich. Klinicky se však tyto druhy AD projevují do značné míry podobně. Dochází k transepiteliální ztrátě vody, která je spojovaná s mutacemi v genu pro filagrin, ke změnám

diferenciace keratinocytů, epidermální hyperplazii v kožních lézích, vyšší náchylnosti ke kožním infekcím a deregulaci imunitních procesů obecně (Mansouri and Guttman-Yassky 2015). Pediatrická AD může v průběhu života zcela zmizet nebo může dojít k rozvoji tzv. atopického pochodu, kdy je AD následována astmatem a následně potravinovými či pylovými alergiemi. Chronicky přetrvávající AD bývá asociována s vyššími hladinami IgE. AD propuknuvší v dětství je charakterizována jako Th2 polarizovaná choroba (Czarnowicki, Esaki, et al. 2015). V případě, že nemoc přetrvává do dospělosti, bývá asociována s expresí IFN $\gamma$ , tedy jednoho z hlavních Th1 cytokinů (Werfel et al. 1996). Není však zcela jasné na základě jakých faktorů či vlivů dochází k přechodu z akutní do chronické fáze. AD, k jejímuž propuknutí dochází až v adolescentním věku nebo dospělosti, nebývá spojená s dalšími alergiemi (Garmhausen et al. 2013). AD se dá též klasifikovat na alergickou a nealergickou formu s tím, že jejich zastoupení mezi pacienty je zhruba 80 % a 20 %. Alergická forma bývá asociována se zvýšenou hladinou IgE. Nicméně dle některých studií nejde jen o důsledek očekávané Th2 polarizace, jelikož hladiny Th2 cytokinů (IL-4, IL-5, IL-13 a IL-31) byly srovnatelné u obou typů AD (Suárez-Fariñas et al. 2013). Pozitivní korelace mezi expresí těchto cytokinů a závažností AD (definováno pomocí SCORAD) byla však pozorována jen u alergické formy. U nealergické formy byla naopak pozorována pozitivní korelace závažnosti AD s cytokiny Th1 polarizace a IFN (IL-1 $\beta$ , IFN $\alpha$ ) (Suárez-Fariñas et al. 2013).

#### **3.4.1 Odchytky ve vrozené imunitě spojené s AD**

Jednou ze zbraní přirozené imunity jsou antimikrobiální peptidy (AMPs), které jsou v kůži produkovány z velké části keratinocyty. U pacientů s AD bylo však pozorováno snížení jejich produkce, což může být jeden z důvodů pro již dlouho známou zvýšenou kolonizaci atopické kůže bakteriemi *Staphylococcus aureus* (Ong et al. 2002). Bylo pozorováno, že Th2 cytokiny, zejména IL-4, snižují produkci některých AMPs, což může být příčinou zvýšené kolonizace *S. aureus* u dětí s AD (Nomura et al. 2003). Další komponentou vrozené imunity, u které se předpokládá vliv na AD jsou ILC2 (přirozené lymfoidní buňky 2. typu). Akumulace těchto buněk v důsledku zvýšené produkce cytokinů IL-25, IL-33 a TSLP je asociována s atopickými lézemi (Salimi et al. 2013). Další buněčnou složkou přirozené imunity, která se dosud neobjasněným způsobem podílí na patogenezi AD, jsou eozinofily, které se za fyziologických podmínek v kůži nevyskytují. AD je doprovázena zvýšenou hladinou těchto buněk jak v krvi, tak v kůži (de Graauw et al. 2015). Dalším buněčným typem, jehož infiltrace je v atopických kožních lézích zvýšená, jsou žírné buňky. Ani u těchto buněk však není zcela jasné, jakým způsobem se podílejí na rozvoji AD. Některé studie naznačují, že k němu přispívají například produkcí IL-17, který inhibuje vycestování pDB a dalších buněčných typů do kůže (Mashiko et al. 2015).

### 3.4.2 Odchyly ve funkci T lymfocytů a dendritických buněk

Dendritické buňky (DB) jsou nepostradatelným můstkem mezi vrozenou a adaptivní složkou imunitního systému. Jednou z populací DB podílejících se na rozvoji AD jsou Langerhansovy buňky rezidentní v kůži. Tyto buňky exprimují zvýšené množství receptoru pro TSLP, což vede ke zvýšené indukci Th2 odpovědi a s tím spojené produkci antigeně specifických IgE (Nakajima et al. 2012). Další populací, která se u atopiků liší v porovnání se zdravými jedinci, jsou regulační T lymfocyty. Dle některých studií dochází k narušení jejich schopnosti vycestovat do místa zánětlivých lézí (Verhagen et al. 2006), dle dalších k vycestování dochází, ale je narušena jejich aktivita doposud nedefinovaným způsobem. Jednou z možných příčin je anergie navozená působením stafylokokového superantigenu (Ou et al. 2004).

Plasmacytoidní dendritické buňky jsou další populací DB, která má vliv na rozvoj AD. Tyto buňky jsou významnými producenty IFN typu I, tudíž jsou nepostradatelné při boji s virovými infekcemi. Za fyziologických podmínek se tedy v kůži nevyskytují, ale při infekci vycestovávají do kůže. Tato jejich schopnost je ale u pacientů s AD značně redukována. Absence těchto buněk může vést ke snadnějšímu šíření virových infekcí (Wollenberg et al. 2002). Jedním ze znaků AD je přítomnost T lymfocytů v kůži s lézemi, ale i bez nich. Akutní AD je již dlouho charakterizována jako Th2 polarizovaná choroba. Nicméně v posledních letech se ukazuje, že se na patogenezi AD podílejí i další populace jako Th22 (Czarnowicki, Gonzalez, et al. 2015; Gittler et al. 2012). Mezi T lymfocyty přítomnými v kůži je i značné zastoupení CD8+ pozitivních T lymfocytů. Tyto buňky produkují kromě jiných cytokinů i IFN $\gamma$ , což vede k apoptóze keratinocytů. Bylo též zdokumentováno, že keratinocyty pacientů s AD jsou náchylnější k apoptóze indukované IFN $\gamma$  než keratinocyty zdravých jedinců (Rebane et al. 2012).

### 3.4.3 Nc/Nga myší kmen jako model lidské AD

Nc/Nga je spontánně mutovaný inbrední kmen vyšlechtěný v Japonsku na univerzitě v Nagoye.

Lokus kvantitativních znaků (QTL) *derm1* zodpovědný za vznik lézí podobných atopické dermatitidě leží na chromozomu 9. V jeho blízkosti bylo identifikováno sedm genů, o jejichž produktech se předpokládá, že souvisejí s patogenezí atopické dermatitidy. Jde o buněčný antigen thymu  $\theta$  (*Thy1*), CD3 antigen  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  (*Cd3d*, *e*, *g*), podjednotka  $\alpha$  receptoru pro IL-10  $\alpha$  (*Il10ra*), IL-18 a C-koncová Src kináza (*Csk*). Produkty všech těchto genů se podílejí na vývoji T lymfocytů. Konkrétní mutace zodpovědná za vznik lézí podobných atopické dermatitidě u těchto myší nebyla prozatím popsána, nicméně dle Kohary je nejpravděpodobnějším kandidátem Csk kináza (Kohara et al. 2001).

Jsou-li tyto myši chované v konvenčních podmínkách, dochází u nich ke vzniku lézí podobných lézím u pacientů s atopickou dermatitidou. V lézích dochází ke zvýšené infiltraci a

degranulaci žírných buněk a eozinofilů. Též dochází ke zvýšené produkci cytokinů asociovaných s Th2 odpovědí, což vede ke zvýšené hladině IgE (Suto et al. 1999). V expresi cytokinů byl v porovnání s lidskou AD zaznamenán určitý rozdíl. Bylo pozorováno, že exprese IFN $\gamma$  byla značně zvýšená jak v akutních tak chronických lézích, kdežto u člověka bývá zvýšení exprese tohoto cytokinu asociované pouze s chronickou AD (Kim et al. 2014). V kůži těchto myší byla rovněž zaznamenána zvýšená aktivita ceramidázy, a to jak v kůži s lézemi, tak bez nich. Ceramid je lipid, který přispívá ke správné funkci kůže, a snížení jeho hladiny vede ke zvýšené transepiteliální ztrátě vody (Aioi et al. 2001).

#### **3.4.4 Viry způsobené komplikace u atopiků**

Výše popsané defekty v regulaci imunitního systému vedou u atopiků k nedostatečné imunitní odpovědi proti virům a tím i komplikacím spojeným s virovými infekcemi, které se u zdravých jedinců nerozvíjejí. Rozšířeným problémem u atopiků spojeným s infekcí VACV (a tedy i s očkováním) je vznik *eczema vaccinatum* s nekontrolovaným šířením VACV z místa inokulace. Tento jev bývá asociován se sníženou produkcí některých AMP (Ong et al. 2002), zejména cathelicidinu LL-37, u něž byla pozorována schopnost inhibovat VACV (Howell et al. 2004). Dalším faktorem je zvýšená produkce IL-17 v kůži, což vede ke snížení vycestování některých buněčných typů na místo infekce (Mashiko et al. 2015) a dále snížení aktivity NK buněk (Kawakami et al. 2009). K deregulaci imunitních pochodů přispívají i již zmíněné defekty ve funkci regulačních T lymfocytů, což opět napomáhá nekontrolovanému šíření viru. Tyto komplikace nejsou způsobované jen infekcí VACV, ale též například virem herpes simplex. V takovém případě jde o tzv. *eczema herpeticum* (Leung et al. 2011).

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Chemikálie a roztoky

V této kapitole jsou uvedeny použité roztoky a chemikálie.

##### 4.1.1.1 Chemikálie

Při pokusech byly použity následující chemikálie:

- 2-Merkaptoetanol 98% (Sigma)
- Absolutní etanol (Penta)
- Aceton (Penta)
- Agar (Sigma)
- Agaróza (Amresco)
- Akrylamid 40% - akrylamid:N,N'-metylen-bis-akrylamid; 1:5 (BioRad)
- Aqua pro injectione (Ardeapharma)
- CANFAST - transfekční reagens (Canvax)
- Dietyleter (Penta)
- DNáza (Fermentas)
- EDTA (Fermentas)
- Glycin (Sigma)
- Hoechst 33342 (Sigma)
- Chloroform (Penta)
- Instant Nonfat Dry Milk (Nestlé)
- Isopropylalkohol (Penta)
- Kaseinový hydrolyzát (Sigma)
- Kvasnicový extrakt (Fluka)
- Kyselina boritá (Sigma)
- Kyselina fosforečná (Penta)
- Metanol (Penta)
- N-(1-naftyl)etylendiamin dichlorid (Aldrich)
- Ponceau červeň (Sigma)
- Primery pro detekci cytokinů (Integrated DNA Technologies)
- Próba a primery pro detekci VACV (Applied Biosystems)
- Ribolock (Thermo Scientific)
- SDS (sodium dodecyl sulfát) 20% (Bio-Rad)

- Sulfanilamid (Sigma)
- Trizma® base (Sigma)
- Voda bez RNáz (Sigma)

Bližší popis prumerů a próby je uveden v příslušných kapitolách níže. Další chemikálie jako protilátky, séra, média a další jsou pro lepší přehlednost uvedeny až u příslušných metod.

#### 4.1.1.2 Roztoky

Všechny roztoky pro práci s nukleovými kyselinami byly připravovány ve vodě zbavené RNáz (Sigma), roztoky pro práci s tkáňovými kulturami a pro aplikaci myším byly připravovány v apyrogenní vodě pro injekce (Aqua pro injectione). Ostatní roztoky byly připravovány v MilliQ vodě (25 °C, 18,2 Ω). Roztoky pro práci s myšmi a tkáňovými kulturami byly sterilizovány autoklávováním nebo filtrací přes 0,22μm filtr.

- 10x koncentrovaný PBS (fyziologický roztok pufrovaný fosfátem; ang. phosphate buffered saline) – 1,38M NaCl; 2,7mM KCl; 1,1mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8,1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 10x koncentrovaný TBE (Tris-borát-EDTA pufr) – 0,89M Tris; 0,89M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,04M EDTA 2Na<sup>+</sup>·2H<sub>2</sub>O
- 10x koncentrovaný Blue Juice – 25% ficol, 0,1M Tris, 1mM EDTA, 0,25% bromfenolová modř
- 5x koncentrovaný Laemmliho vzorkový pufr - 312,5 mM Tris-HCl pH 6,8; 10% SDS; 50% glycerol
- 1x koncentrovaný Laemmliho redukující vzorkový pufr - 150 μl 5x koncentrovaného Laemmliho vzorkového pufru, 50 μl 2-merkaptoetanolu, 800 μl milliQ H<sub>2</sub>O
- Avertin – 0,5 g 2,2,2-tribromethanol, 0,5 ml terciárního amylalkoholu (2-methyl-2-butanol), 2,6 ml 10x PBS, 22.75 ml aqua pro injectione
- Elektroforetický pufr A (pro rozdělovací gel) – 1,875M Tris pH 8,8; 0,5% SDS
- Elektroforetický pufr B (pro zaostřovací gel) – 0,625M Tris pH 6,8; 0,5% SDS
- 10x koncentrovaný elektroforetický pufr C (ang. Running buffer) - 0,25M Tris pH8,8; 0,1% SDS; 3,84M glycin
- RNA Blue (Top-Bio)
- Transferový pufr pro western bloty – 0,048M Tris; 0,04% SDS, 20% metanol, 0,04M glycin
- Lyzační pufr pro erythrocyty – pH 7,2; 0,02% Azid; 0,13mM EDTA; 0,012M NaHCO<sub>3</sub>; 0,15M NH<sub>4</sub>Cl
- Roztok I pro Griessovu reakci – 0,1% naftyletylendiamin v H<sub>2</sub>O
- Roztok II pro Griessovu reakci – 1% sulfanilamid v 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

#### 4.1.2 Kultivační média a přísady pro bakterie

Pro kultivaci bakterií bylo použito tekuté LB (Luria Broth) médium obsahující 1% kaseinový hydrolyzát, 0,5% kvasnicového extraktu 0,17M NaCl, 1mM NaOH a ampicilin 50 mg/ml a pevná půda (LB agar) obsahující 1% kaseinový hydrolyzát, 0,5% kvasnicového extraktu, 1,5% agaru, 0,17M NaCl, 1mM NaOH a ampicilin 50 mg/ml.

Pro transformaci kompetentních buněk bylo použito S.O.C. médium (2% trypton; 0,5% kvasnicový extrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM MgSO<sub>4</sub>; 20 mM glukóza) (ThermoFisher) dodávané k daným buňkám.

#### 4.1.3 Kultivační média a přísady pro tkáňové kultury

Pro kultivaci buněk byla používána následující média a séra:

- FBS - fetální bovinní sérum (FBS; Gibco) inaktivované 30 min při 65 °C
- NCS - neonatální telecí sérum (NCS; Gibco) inaktivované 30 min při 65 °C
- DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) s vysokým obsahem glukózy (4,5 g/l), glutaminem a pyruvátém (Sigma) s přídatkem 1·10<sup>5</sup> U/l Penicilinu (Sigma) a 100 mg/l Streptomycinu (Sigma)
  - o 10% FBS-DMEM
  - o 2% FBS-DMEM
  - o 10% NCS-DMEM
  - o 2% NCS-DMEM
- 10% FBS-DMEM bez fenolové červeně
- RPMI - RPMI 1640 s ultraglutaminem 1 (Lonza) - s přídatkem HEPES (PAA Laboratories) o výsledné koncentraci 12,5 mM, Penicilinu (Sigma; 1·10<sup>5</sup> U/l) a Streptomycinu (Sigma; 100 mg/l)
  - o 10% FBS- RPMI
  - o 2% FBS-RPMI

Pro pasážování přisedlých buněčných kultur byl používán trypsin (0,25% roztok + 0,05% EDTA v 1x PBS).

#### 4.1.4 Kity

Pro izolaci nukleových kyselin a pro jejich následnou analýzu byly použity následující komerční kity:

- DEP-25 DNA Extraction Kit (Top-Bio)
- FastPlasmid Mini Kit (5PRIME)
- ZymoPURE™ Plasmid Maxiprep Kit (ZYMO RESEARCH)

- qPCR 2x Blue Master Mix + ROX 500 (Top-Bio)
- SensiFAST™ SYBR® Hi-ROX One-Step Kit (Bioline)

Pro stanovení exprese cytokinů na úrovni proteinu byl použit BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (BD Biosciences).

#### 4.1.5 Plasmidy a bakterie

- pcDNA3-IRF3 (připraven Mgr. Knitlovou; nepublikované výsledky)
- pcDNA3-Luc (připraven Dr. Mělkovou; nepublikované výsledky)
- pEGFP-N1 (Clontech)

Pomnožení plasmidů pro transfekci bylo provedeno v kompetentních buňkách One Shot™ TOP10 Chemically Competent *E. coli* (ThermoFisher), které byly laskavě poskytnuty Laboratoří pro výzkum vzácných onemocnění Kliniky dětského a dorostového lékařství, VFN a 1. LF UK.

#### 4.1.6 Viry

Pro pokusy byly použity následující viry. Jako model pravých neštovic pro protektivní pokusy byl použit divoký typ viru vakcínie (VACV) kmene Western Reserve (wt-WR). Pro další pokusy byly použity rekombinantní VACV téhož kmene s rekombinantním genem vsazeným pomocí homologní rekombinace do genu pro thymidin kinázu (tj. TK-deficientní viry), a to rekombinantní VACV exprimující cDNA pro interferon regulující faktor-3 (WR-IRF3) pod časně-pozdním promotorem p7.5 a kontrolní rekombinantní VACV exprimující luciferázu (WR-Luc) rovněž pod promotorem p7.5 (Rodriguez et al. 1988).

WR-IRF3 byl připraven a selektován Mgr. Jarmilou Knitlovou a Mgr. Janou Liškovou, Ph.D. Připravená cDNA pro myší IRF-3 byla vložena do plasmidu pcDNA3 (pcDNA3-IRF3), osekvenována a subklonována do inserčního vektoru pSC11 (Mackett, Smith, and Moss 1984). Inzerční vektor pSC11-IRF3 byl použit pro transfekci a homologní rekombinaci IRF-3 cDNA do VACV genu pro thymidin kinázu. Inserce IRF-3 cDNA byla ověřena Southern blot analýzou (nepublikované výsledky). Tento virus byl částečně charakterizován v diplomové práci Mgr. Jany Elsterové (<https://is.cuni.cz/webapps/zp/detail/100402/?lang=cs>)

#### 4.1.7 Buněčné linie

Pokusy *in vitro* byly prováděny v buněčných liniích ledvinných epiteliálních buněk kočkodana zeleného BSC-40, v myších embryonálních fibroblastech NIH 3T3 a v monocyto/makrofágové linii J774.G8 odvozené z myšího kmene BALB/c. BSC-40 byly kultivovány v 10% NCS-DMEM. NIH 3T3 a J774.G8 byly kultivovány v 10% FBS-DMEM. Buněčné linie byly pěstovány v inkubátoru pro tkáňové kultury HERA cell CO<sub>2</sub> (Heraeus) při 37 °C v atmosféře s 5% CO<sub>2</sub> a 95% vlhkostí.



#### **4.1.8 Myší kmeny**

Pokusy *in vivo* byly prováděny na myších kmenech Nc/Nga a Balb/c. Kmen Nc/Nga byl použit jako spontánní model atopické dermatitidy. Byl laskavě poskytnut a dovezen z Riken BioResource Center, Japonsko. Kmen Balb/c byl použit jako kontrolní organismus.

#### **4.1.9 Počítačové programy**

Pro pořízení, analýzu a další zpracování výsledků byly použity následující programy:

- NIS Elements AR verze 4.20.00
- GraphPad Prism 8
- Adobe Photoshop Elements 6.0
- ImageJ2

## **4.2 Metody**

Virologická laboratoř Ústavu imunologie a mikrobiologie 1. LF UK vedená Dr. Mělkovou má oprávnění nakládat s geneticky modifikovanými organismy kategorie rizika I a II a s infekčními agens kategorie rizika BSL2. Dr. Mělková je rovněž držitelkou osvědčení o kvalifikaci pro práci s laboratorními zvířaty.

### **4.2.1 Metody *in vitro***

#### **4.2.1.1 Pasážování buněk**

Buňky BSC-40 a NIH 3T3 byly pasážovány dvakrát týdně. Pěstovány byly v kultivačních lahvích (75 cm<sup>2</sup>, Techno Plastic Products) ve 20 ml média DMEM s 10% sérem (NCS v případě BSC-40 a FBS v případě NIH 3T3).

Při pasážování bylo nejprve odstraněno staré medium. Buňky byly opláchnuty 1,5 ml trypsinu, který byl následně také odstraněn. Dále byly přidány 2 ml nového trypsinu, se kterým byly buňky inkubovány po dobu přibližně 3 min v inkubátoru pro tkáňové kultury. Po uplynutí této doby byly buňky vizuálně zkontrolovány, zdali se odloučily od povrchu plastu. Trypsin byl následně inaktivován přidáním 5 ml media s 10% sérem adekvátním k danému typu buněk. Buněčné shluky byly v tomto objemu rozvolněny pomocí pipetování. Tato suspenze byla v objemu 0,5 ml pro BSC-40 a 1 ml pro NIH 3T3 ponechána v kultivační lahvi a doplněna 20 ml nového media s 10% sérem.

Buňky byly následně kultivovány po dobu 3 nebo 4 dnů a následně znovu pasážovány.

Makrofágy J774.G8 byly pěstovány v kultivačních lahvích s hydrofobním povrchem (25 cm<sup>2</sup>, Sarstedt) v DMEM médiu s 10% FBS a pasážovány dvakrát týdně v poměru 1 : 7 (buněčná suspenze ku čistému médiu).

#### 4.2.1.2 Počítání buněk

Bylo odebráno 50 µl trypsinizované suspenze buněk (z celkového objemu 7 ml). K tomuto objemu bylo přidáno 50 µl 0,1% trypanové modři v 1x koncentrovaném PBS; mrtvé buňky se zbarvily modře. Počet buněk v 1 ml byl stanoven spočítáním buněk v Neubauerově komůrce v 8 velkých čtvercích, každém o ploše 1 mm<sup>2</sup> a výšce 0,1 mm, podle vzorce:

$$\text{počet buněk (10}^6\text{/ml)} = \frac{(\text{spočítané buňky} \div 8) \times 2}{100}$$

#### 4.2.1.3 Nasetí buněk

Trypsinizovaná suspenze buněk byla naředěna médiem s 10% sérem adekvátním typu buněk na požadovanou koncentraci a nasetá na 6-, 12- nebo 24-jamkové plotny. Příslušné koncentrace a objemy jsou pro přehlednost uvedeny v tabulce č. 1.

Počet jamek na plotně	Povrch 1 jamky (cm <sup>2</sup> )	Počet buněk na jamku (x10 <sup>6</sup> )	Objem na jamku (ml)
6	9,4	1,5	3
6 (pro transfekci)	9,4	0,2	3
12	3,83	0,6	1,5
12 (pro titraci)	3,83	0,3	1
24	1,88	0,3	1

Tabulka č. 1: Koncentrace buněk a objem média pro nasetí na plotny.

Makrofágy byly před pokusem naředěny v poměru 1 : 1 na Petriho misce pro bakteriální kultury v čerstvém DMEM s 10% FBS (v celkovém objemu 24 ml) 24 h před vyšetím na 6-jamkové plotny. Makrofágy byly nasety v koncentraci 0,5·10<sup>6</sup> buněk/ml v celkovém objemu 3,5 ml/jamka.

#### 4.2.1.4 Stimulace makrofágů

Makrofágy J774.G8 naseté na 6-jamkové plotně byly stimulovány IFN $\gamma$  o koncentraci 100 U/ml a LPS o koncentraci 1 µg/ml, a to samostatně nebo v kombinaci. Buňky byly kultivovány 18 – 20 h a následně sklizeny nebo dále infikovány.

#### 4.2.1.5 Infekce buněčných linií

Buňky byly nasety na plotny o potřebném množství jamek 24 h před infekcí. Virus pro inokulum byl rozmražen, zvortexován, sonikován po dobu 3 s na sonikátoru Ultrasonic homogenizer

4710 Series (Cole-Parmer Instruments) při 100% amplitudě a krátce zcentrifugován na centrifuze MiniSpin (Eppendorf). Inokulum bylo připraveno v různých multiplicitách infekce dle konkrétního pokusu, a sice 0,1, 1 nebo 5 PFU/buňku.

Z jamek s nasetými buňkami bylo nejprve odsáto kultivační medium. Buňky byly následně opláchnuty čerstvým DMEM bez séra, to bylo odsáto a bylo přidáno virové inokulum rovněž v DMEM bez séra. Buňky byly inkubovány po dobu 1 h, v průběhu které s nimi bylo po 15 min pravidelně zakýváno, aby buňky neoschly a inokulum bylo rovnoměrně rozptýleno. Po inkubaci bylo inokulum odsáto a buňky byly opětovně opláchnuty DMEM bez séra. Následně bylo přidáno médium s 2% NCS pro linii BSC-40 a s 2% FBS pro linii NIH 3T3 a J774.G8. Příslušné objemy použitého media a inokul jsou uvedeny v tabulce č. 2.

S neinfikovanými buňkami bylo zacházeno totožně, ale při inkubaci bylo namísto virového inokula použito čisté DMEM bez séra (tzv. mock infekce). Buňky byly kultivovány v inkubátoru pro buněčné kultury HERA Cell CO<sub>2</sub> po dobu dalších 24 nebo 48 h.

Počet jamek na plotně	Objem media pro oplach (ml)	Objem virového inokula (ml)	Objem kultivačního media
6	1	0,6	3
12	0,5	0,2	1,5
12 (titrace)	0,5	0,2	1
24	0,5	0,2	1

Tabulka č. 2: Objemy inokul a média pro infekci buněčných kultur.

#### 4.2.1.6 Sklizení buněk

Buňky byly v daném časovém intervalu (1, 24 nebo 48 h po infekci, h.p.i.) sklizeny pomocí pipetování automatickou pipetou tak, že byly mechanicky důkladně odloučeny od povrchu plastu a rozpipetovány v kultivačním mediu. S touto suspenzí bylo následně naloženo dle příslušného pokusu.

#### 4.2.1.7 Příprava vzorků z buněčných linií

##### 4.2.1.7.1 Vzorky pro titraci viru vakcínie

Pro titraci byly infikované buňky sklizeny odpipetováním v 1, 24 a 48 h.p.i. a následně zamraženy v -80 °C.

#### **4.2.1.7.2 Vzorky pro izolaci RNA a proteinů pomocí RNA Blue**

Sklizené buňky byly nejprve centrifugovány na centrifuze Jouan C3i (Trigon-plus) při 200 g po dobu 4 min. V případě makrofágů byly buňky centrifugovány při 200 g po dobu 5 min při pokojové teplotě. Poté byl odstraněn supernatant a buněčný pelet byl zlyzován v 1 ml RNA Blue (Top-Bio), ve kterém byly následně zamraženy v -80 °C.

#### **4.2.1.7.3 Vzorky pro western blot analýzu**

Sklizené buňky byly centrifugovány na centrifuze Jouan C3i při 200 g po dobu 3 min při pokojové teplotě. Byla odstraněna většina supernatantu. Ve zbylém objemu supernatantu byl pelet rozvolněn a k tomu byl přidán 1 ml 1x koncentrovaného PBS. Takto propláchnuté buňky byly opět zcentrifugovány a byl odsát supernatant. K peletu bylo přidáno 80  $\mu$ l 1x koncentrovaného redukujícího vzorkového pufru (RSB) - připraven dle Laemmliho (1980). Pelet byl zlyzován pipetováním a vzorky byly zamraženy v -20 °C. Pro detekci fosforylovaného IRF-3 byl do 1x RSB přidán 10mM NaF jako inhibitor fosfatáz.

#### **4.2.1.8 Charakterizace růstu viru v buněčných liniích dilučním ředěním a titrací**

Zamražená buněčná suspenze byla po rozmrazení zvortexována a znovu zmražena, celý cyklus 3x. Poté byly vzorky krátce zcentrifugovány na centrifuze MiniSpin (Eppendorf) a sonikovány po dobu 3 s na sonikátoru Ultrasonic homogenizer 4710 Series (Cole-Parmer Instruments) při 100% amplitudě. Dále byly vzorky naředěny v řadě od  $10^{-1}$  až do  $10^{-6}$  v DMEM bez séra.

Titrace byla prováděna na buněčné linii BSC-40. Tyto buňky byly nasety na 12-jamkové plotny 24 h před titrací (viz kapitola 4.2.1.3). Průběh infekce buněk je popsán v kapitole 4.2.1.5. Jediným rozdílem v postupu bylo vynechání oplachu po inkubaci s inokulem.

Buňky byly inkubovány po dobu 36 h. Ke kultivačnímu mediu bylo poté přidáno 0,5 ml 4% paraformaldehydu v H<sub>2</sub>O. Obsah jamek byl odsát a buňky byly obarveny 2% krystalovou violetí v 1% paraformaldehydu. Barvivo bylo odsáto, celá plotna i s víčkem byla ponořena do vodní lázně s 1% formaldehydem, opláchnuta vodou a usušena. V jednotlivých jamkách byly spočítány plaky a růst viru vyjádřen jako počet PFU/ml.

#### **4.2.1.9 Pomnožení a purifikace plazmidů**

Pro pozorování vlivu exprese IRF-3 na produkci IL-1 $\beta$  bez přítomnosti VACV byla použita transientní transfekce plazmidu pcDNA3 (Invitrogen) s vloženou cDNA pro myši IRF-3 (připraven Mgr. Knitlovou; nepublikované výsledky). Jako kontrolní plazmid byl použit stejný plazmid s genem pro luciferázu (připraven Dr. Mělkovou; nepublikované výsledky). Transformace a následné pomnožení plazmidů byla provedena v Laboratoři pro výzkum vzácných onemocnění Kliniky dětského a

dorostového lékařství VFN a 1. LF UK za laskavé asistence Mirka Votruby pod dohledem Ing. Kateřiny Hodaňové, Ph.D.

#### **4.2.1.9.1 Transformace kompetentních buněk *E.coli* tepelným šokem**

Kompetentní buňky One Shot™ TOP10 Chemically Competent *E. coli* byly vyjmuty z – 80 °C a rozmrazeny na ledu. Do celého objemu buněk, tedy 150 µl suspenze, bylo přidáno po 1 µl plazmidu. Směs byla inkubována na ledu 30 min. Následně byly zkumavky vloženy do vodní lázně o teplotě 42 °C na dobu 42 s a pak zpět na led, kde byly inkubovány 2 min. K buňkám bylo přidáno 125 µl SOC média temperovaného na 37 °C. Suspenze byla inkubována 1 h na třepačce při 37 °C. Po té bylo 100 a 50 µl suspenze nanášeno na agarové plotny s ampicilinem o koncentraci 50 mg/ml a pomocí skleněné hokejky rozetřeno do sucha. Bakterie na plotnách byly přes noc inkubovány dnem vzhůru.

#### **4.2.1.9.2 Izolace plazmidu pomocí Mini Prep kitu**

Pro oba plazmidy bylo druhý den vybráno pět izolovaných kolonií, které byly pomocí sterilního párátko přeneseny na novou agarovou plotnu s ampicilinem. Párátka pak byla vhozena do zkumavky s 5 ml LB kultivačního média s ampicilinem o koncentraci 50 mg/ml (popsáno v kapitole 4.1.2). Buňky byly kultivovány na třepačce Schoeller ISS 40705R (Schoeller instruments) při 220 rpm přes noc při 37 °C. Následující den bylo odebráno 1,5 ml narostlé buněčné suspenze. Následně bylo postupováno dle protokolu k FastPlasmid Mini Kitu. Princip izolace spočívá v alkalické lýze bakterií a izolaci plasmidové DNA na kolonci. 1,5 ml suspenze bylo zcentrifugováno při 21 000 g na centrifuze Eppendorf™ 5424. Supernatant byl odstraněn a k peletu bylo přidáno 400 µl vychlazeného lyzačního pufru Complete Lysis Solution. Směs byla důkladně vortexována 30 s. Vzniklý lyzát byl přepipetován do zkumavky s inzertem vážícím DNA a centrifugován 1 min při pokojové teplotě a 21 000 g. Inzert byl vyjmut ze zkumavky, pufr, který jím protekl, byl odstraněn a inzert byl do zkumavky vrácen zpět. Takto byl opět centrifugován 1 min při 21 000 g. Inzert byl poté přenesen do nové sběrné zkumavky a bylo přidáno 50 µl sterilní H<sub>2</sub>O. Sběrné zkumavky s inzertem byly opět centrifugovány při 21 000 g 1 min. Koncentrace a čistota DNA ve vodném roztoku byla stanovena na základě absorbance při 260 a 280 nm změřené na spektrofotometru NanoDrop ND-1000 (Nanodrop technologies). S touto DNA byla provedena restriční analýza pro ověření přítomnosti plazmidů s inzercí příslušné DNA.

#### **4.2.1.9.3 Pomnožení a izolace plazmidu pomocí Maxi Prep kitu**

Na základě miniprepů byly vybrány kolonie, u nichž byla potvrzena přítomnost požadovaného plazmidu. Tyto kolonie byly vyočkovány opět pomocí sterilního párátko do 300 ml kultivačního média s ampicilinem o koncentraci 50 mg/ml a inkubovány přes noc na třepačce ve 37 °C. Při izolaci plasmidové DNA bylo postupováno dle protokolu pro ZymoPURE™ Plasmid Maxiprep Kit. Princip

izolace spočívá v modifikované alkalické lýze bakterií a izolaci plasmidové DNA na koloně. Následující den byl celý objem buněčné suspenze centrifugován 15 min při 5500 g na cetrifuze Sigma 4k15. Byl odstraněn supernatant a k peletu bylo přidáno 14 ml ZymoPURE™ roztoku P1 a pelet byl resuspendován. Dále bylo přidáno 14 ml ZymoPURE™ roztoku P2 a směs byla promíchána několikerým převrácením zkumavky. Směs byla inkubována 3 min při pokojové teplotě. Následně bylo přidáno 14 ml ZymoPURE™ roztoku P3 a obsah zkumavek byl opět šetrně a důkladně promíchán. Suspenze byla přenesena do zkumavky s pístem ZymoPURE™ Syringe Filter a pomocí té přes filtr protlačena do nové zkumavky. K takto získanému lyzátu bylo přidáno 14 ml ZymoPURE™ Binding Buffer a celá směs byla opět promíchána několikrát opakovanou inverzí zkumavky. Zkumavka s inzertem Zymo-Spin™ V-P Column Assembly byla připojena k vakuu. Lyzát byl přenesen na inzerť a pomocí vakua přefiltrován. Následně bylo přidáno 5 ml ZymoPURE™ Wash 1 a pomocí vakua byl tento roztok přefiltrován přes inzerť. Pak bylo stejným způsobem dvakrát přidáno 5 ml ZymoPURE™ Wash 2 a opět přefiltrováno. Následně byl inzerť Zymo-Spin™ V-P Column Assembly vyjmut a přenesen do čisté sběrné zkumavky a centrifugován při 10 000 g 1 min, aby se odstranily zbytky promývacího pufru. Nakonec byl inzerť přenesen do 1,5ml zkumavky a bylo přidáno 200 µl sterilní vody. Takto byla zkumavka centrifugována při 10 000 g 1 min. Po této eluci byla opět spektrofotometricky stanovena koncentrace a čistota DNA a byla provedena restrikční analýza.

#### 4.2.1.10 Restrikční analýza

Restrikční analýza byla prováděna pro oba izolované plazmidy. Byl připraven roztok o následujícím složení: 15µl H<sub>2</sub>O, 2 µl příslušného 10x koncentrovaného pufru, 2 µl DNA a 1 µl restrikčního enzymu (10 U/µl) (enzymy a příslušné pufrы jsou uvedeny v tabulce č. 3). Byla provedena inkubace 1 h při 37 °C. Následně byly ke každému vzorku přidány 2,2 µl 10x koncentrovaného vzorkového pufru Blue Juice a 10 µl ze vzorku bylo naneseno na agarózový 0,8% gel v 1x TBE s přidaným EtBr (0,5 µg/ml). Jako velikostní standard byl použit 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). Elektroforéza probíhala v 1x koncentrovaném TBE, při konstantních 80 V po dobu přibližně 15-45 min podle velikosti očekávaného fragmentu. Gel byl vyfotografován na přístroji Azure Biosystems c600 (Azure Biosystems).

Enzym	Hind III	BamH I	EcoR V
Pufr	R (Fermentas)	3 (Invitrogen)	R (Fermentas)
Výrobce	Fermentas	Invitrogen	BRL
Štěpený plasmid	pcDNA3-IRF3	pcDNA3-Luc	pcDNA3-IRF3, pcDNA3-Luc

Tabulka č. 3: Přehled použitých restrikčních enzymů a příslušných pufrů.

#### **4.2.1.11 Transfekce buněčné linie NIH 3T3**

Pro transfekci byly myší fibroblasty nasety na 6-jamkové plotny v koncentraci  $0,2 \times 10^6$ /jamka 24 h před transfekcí. Kultivační médium bylo před transfekcí odsáto a nahrazeno 2,5 ml nového 10% FBS-DMEM. Byla připravena reakční směs o složení 2,5  $\mu$ g DNA a 15  $\mu$ l transfekčního činidla CANFAST ve sterilním PBS. Poměr DNA a transfekčního činidla byl předem otestován a použitý poměr byl vybrán jako nejúčinnější. Celkový objem směsi byl 250  $\mu$ l. Tato směs byla zrotexována, krátce zcentrifugována a inkubována při pokojové teplotě 20 min. Následně byla směs po kapkách nanášena na buňky na plotnách. Transfekované buňky byly sklizeny 24 a 48 h po transfekci. Sklizené buňky byly zlyzovány v 0,5 ml RNA Blue. Pro kontrolu účinnosti transfekce byly 2 jamky transfekovány plazmidem exprimujícím EGFP (pEGFP-N1 Clontech; plasmid purifikovaný pomocí kitu ToxOut™ Endofree Plasmid Mini Kit byl laskavě poskytnut Mgr. Václavem Vopálenským, Ph.D.). K těmto buňkám bylo přidáno 10% FBS-DMEM bez fenolové červeně. Kontrolně transfekované buňky byly ošetřeny výše popsaným způsobem, ale transfekční směs neobsahovala DNA.

#### **4.2.1.12 Stanovení koncentrace nitritů Griessovou metodou**

Koncentrace nitritů byla stanovena v supernatantech buněk odebraných 24 h po stimulaci, nebo po stimulaci a následné infekci makrofágů J774.G8. 0,1% roztok naftyletylendiaminu v H<sub>2</sub>O a 1% roztok sulfanylamidu v 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> byly smíchány v poměru 1:1. Tato směs byla přidána v objemu 100  $\mu$ l ke 100  $\mu$ l vzorku na 96-jamkové destičce. Koncentrace diazoniových solí vznikajících z nitritů byla stanovena na základě měření absorbance při vlnové délce 560 nm na spektrofotometru VICTOR<sup>3</sup>™ (PerkinElmer). Kalibrační křivka byla stanovena na základě měření absorbance standardu roztoku NaNO<sub>2</sub> v rozmezí 1,56  $\mu$ M – 200  $\mu$ M.

#### **4.2.1.13 Precipitace proteinů z kultivačního média**

Precipitace proteinů z kultivačního média byla prováděna pomocí acetonu na základě modifikovaného protokolu (Nejadi et al. 2014). Z jamky s napěstovanými buňkami byly odebrány 2 ml média. Bylo přidáno 8 ml 100% chlazeného acetonu. Vzorek byl 30 s vortexován a přes noc uchován v – 20 °C. Druhý den byly vzorky centrifugovány 20 min při 4 °C a 15 000 g. Byl odebrán supernatant a přidáno 8 ml 50% acetonu. Vzorky byly opět 30 sekund vortexovány a centrifugovány za stejných podmínek jako před tím. Vzorky byly opláchnuty 8 ml 50% acetonu a centrifugovány znovu za stejných podmínek. Byl odstraněn supernatant a pelety byly vysušeny na vzduchu. Následně byly rozpuštěny ve 40  $\mu$ l 1x RSB a 5 min povařeny ve vodní lázni.

#### **4.2.2 Metody *in vivo***

Pokusy na myších byly prováděny ve spolupráci s RNDr. Věrou Hájkovou. Dr. Hájková prováděla intradermální inokulaci a odběr kůží pro další analýzu, v části pokusů i intranazální inokulaci a ve všech případech usmrcování myší. Dr. Hájková dále zpracovávala veškerý infekční materiál s wt-WR.

Práce s myšmi byla prováděna v souladu s vyhláškou Evropské unie pro transport, chov a péči o laboratorní zvířata (směrnice 2010/63/EU o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely) a se schválenými projekty pokusů na zvířatech GA UK 100307 – 208/06, 0021620806 MSM, P302/10/0083 – 298/09. Myši byly chovány v zařízení akreditovaném Ministerstvem zemědělství ČR a denně kontrolovány. Veškeré pokusy s infekčními agens byly prováděny v laboratoři schválené pro práci s GMO kategorie rizika II a s biologickým rizikem II. stupně s podtlakem, v boxech s laminárním prouděním tř. IIA (Biohazard).

##### **4.2.2.1 Infekce myší**

Myši byly imunizovány intradermální (i.d.) nebo intranazální (i.n.) inokulací viru vakcínie. Intradermální inokulace byla prováděna akupunkturními jehlami HuanQiu Super (Suzhou Huanqiu Acupuncture Medical Appliance; Čína) opakovaným zaškrabáváním 1  $\mu$ l inokula do kůže. V případě i.n. inokulace bylo inokulum o objemu 5  $\mu$ l vpraveno do 1 nozdry pomocí automatické pipety.

V případě letální infekce bylo inokulum o objemu 30  $\mu$ l podáno též i.n.

##### **4.2.2.1.1 Příprava myší na infekci**

24 h před i.d. inokulací byla kůže myší v místě inokulace oholena a zbylé chlupy strhnuty pomocí leukoplasti. V případě obou typů inokulace byly myši nejprve anestetizovány intraperitoneální (i.p.) aplikací roztoku avertinu v 1x PBS. Objem roztoku avertinu byl pro každou myš spočítán dle následujícího vzorce: objem avertinu ( $\mu$ l) = hmotnost myši (g) x 10 x 1,5.

##### **4.2.2.1.2 Příprava virového inokula**

Alikvót purifikovaného viru byl rozmražen, zvortexován, krátce stočen a následně sonikován 3 s. Při i.n. inokulaci byl virus naředěn v PBS ve finálním objemu 5  $\mu$ l/myš a dávce  $10^3$  –  $10^5$  PFU/myš dle příslušného pokusu. Při i.d. inokulaci bylo inokulum připraveno v objemu 1  $\mu$ l/myš. V případě letální infekce při protektivních pokusech byla infekční dávka wt-WR  $10^5$  PFU v objemu 30  $\mu$ l/myš.



#### **4.2.2.2 Usmrcení**

Myši byly usmrcovány RNDr. Věrou Hájkovou nástřihem jugulární vény a vykrvením v inhalační anestezii diethyléterem.

#### **4.2.2.3 Příprava vzorků**

##### **4.2.2.3.1 Příprava kůží a částí GIT pro PCR**

Vzorky kůží byly odebírány v případě i.d. infekce a vzorky GIT po i.n. infekci. Z GIT byly odebírány vzorky duodena, jejunu a apendixu. Jelikož se jednalo o i.n. infekci, byly odebírány i čenichy. Ve všech případech byly tkáně odebírány sterilními nástroji a následně homogenizovány homogenizátorem Tissue master 125 (Omni International) v 1 ml RNA Blue (Top-Bio).

##### **4.2.2.3.2 Příprava splenocytů pro stanovení produkce cytokinů**

Sleziny byly odebrány myším 3 dny po i.n. infekci. Všechny operace s odebranými slezinami byly prováděny na ledu. Suspenze splenocytů byly připraveny protlačením kousků slezin přes inzerty BD Falcon s velikostí pórů 40  $\mu\text{m}$  v celkovém objemu 6 ml RPMI bez séra. Suspenze byla centrifugována 5 min při 4 °C a 600 g. Byl odsát supernatant a pelet byl resuspendován v 1 ml pufru na lýzu erytrocytů, se kterým byly buňky inkubovány 10 min na ledu. Suspenze byla dvakrát promyta 10 ml RPMI bez séra; nakonec byly splenocyty resuspendovány ve 2 ml RPMI s 10% FBS a spočítány na hemocytometru Advia.

Suspenze splenocytů byla naředěna na koncentraci  $10 \times 10^6$  buněk/ml a vyseta na 24-jamkové plotny po 1 ml na jamku. Buňky byly takto inkubovány 24 h.

Buňky byly sklizeny odpipetováním, centrifugovány 5 min při 4 °C a 600 g. Supernatant byl následně odebrán a filtrován přes filtr MILLEX®-VV 0,2 $\mu\text{m}$  (MILLIPORE). Přefiltrované supernatanty byly zamraženy v – 80 °C pro další analýzu.

#### **4.2.2.4 Protektivní pokusy**

Myši byly imunizovány rekombinantními viry WR-IRF3 nebo WR-Luc 24 dní před letální infekcí wt-WR. V následujících 14 dnech po inokulaci letální dávky byly myši každý den váženy a byl pozorován jejich celkový zdravotní stav. V případě, že myši nepodlehly infekci, byly 14. den po aplikaci letální dávky utraceny. V případě, že jejich váha klesla pod 75% výchozí váhy nebo byly nepohyblivé, byly rovněž utraceny.

### **4.2.3 Analytické metody**

#### **4.2.3.1 Kvantitativní řetězová polymerázová reakce (qPCR)**

qPCR byla využita pro detekci exprese cytokinů na úrovni mRNA a pro detekci VACV DNA.

##### **4.2.3.1.1 Izolace DNA**

Vzorky tkání zhomogenizované v 1 ml RNA Blue (Top-Bio) byly zcentrifugovány na centrifuze Jouan C3i po dobu 10 min při 10 000 g při 4 °C a supernatant byl přenesen do nových zkumavek. Tím byly odstraněny zbytky nezlyzovaných tkání. V případě vzorků z buněčných kultur byl tento krok přeskočen a pokračovalo se dle pokynů výrobce. Bylo přidáno 0,2 ml chloroformu a se zkumavkou bylo intenzivně třepáno po dobu 15 s. Vzorky byly inkubovány 5 min při pokojové teplotě. Následně byla provedena fázová separace. Vzorky byly centrifugovány při 12 000 g a 4 °C po dobu 10 min. Vodní fáze byla odebrána a DNA byla z organické fáze precipitována přidáním 0,3 ml 100% etanolu. Obsah zkumavek byl promíchán jejich inverzí a následně ponechán v klidu 3 min při pokojové teplotě. Precipitovaná DNA byla sedimentována centrifugací při 2 000 g a 4 °C po dobu 5 min. Supernatant byl odstraněn a k peletu byl přidán 1 ml 75% etanolu. Pelet byl resuspendován, inkubován 15 min při pokojové teplotě a následně zcentrifugován při 2 000 g a 4 °C po dobu 5 min. Supernatant byl odstraněn a pelet byl rozpuštěn v 50 µl DEP-25 START-Blue (Top-Bio). Vzorek byl inkubován 20 min v termobloku při 95 °C, ochlazen na pokojovou teplotu a poté bylo přidáno 50 µl DEP-25 STOP. DNA byla naředěna 1:5 a byla změřena její koncentrace na spektrofotometru BioSpectrometer kinetic (Eppendorf).

##### **4.2.3.1.2 Izolace RNA**

Přípravné kroky a fázová separace byly provedeny stejně jako v případě izolace DNA. Vodní fáze byla přenesena do nových zkumavek a bylo přidáno 0,5 ml isopropylalkoholu. Vzorky byly inkubovány 5 min při 4 °C a následně centrifugovány při 12 000 g a 4 °C po dobu 10 min. Supernatant byl odstraněn a k sedimentu přidán 1 ml 75% etanolu. Vzorky byly opět centrifugovány 10 min při 4 °C a 14 000 g. Supernatant byl odstraněn, RNA pelet byl vysušen na vzduchu a rozpuštěn ve vodě bez RNáz. Alikvoty vzorků byly následně naředěny 1:5 ve vodě bez RNáz pro stanovení koncentrace a čistoty pomocí absorbance při 260 a 280 nm na spektrofotometru BioSpectrometer kinetic (Eppendorf).

##### **4.2.3.1.3 Ošetření RNA DNázou**

Případné zbytky DNA byly odstraněny inkubací s DNázou (Fermentas). Vzorky RNA byly při přípravě drženy na ledu. Nejprve byly naředěny na koncentraci RNA 0,3 µg/µl a z toho bylo 6 µl přidáno ke 2 µl 10x koncentrovaného pufru s MgCl<sub>2</sub> (25mM), 0,5 µl RiboLocku (40U/µl), 2 µl DNázy

(1U/μl) a 9,5 μl vody bez RNáz. Vzorky byly následně inkubovány 30 min při teplotě 37 °C v inkubátoru Dry Bath Incubator (Major Science). Po inkubaci byly ke vzorkům přidány 2 μl EDTA (50 mM) a DNasa byla inaktivována při 65 °C 10 min. Po vyjmutí byly vzorky doplněny vodou bez RNáz na objem 100 μl a výslednou koncentrací 2 ng/μl.

#### 4.2.3.1.4 Stanovení exprese cytokinů pomocí jedнокrokové RT-qPCR

Jednokroková kvantitativní PCR s reverzní transkripcí (RT-qPCR) byla prováděna s kitem SensiFAST™ SYBR® Hi-ROX One-Step Kit (Bioline) dle příslušného protokolu v celkovém objemu 10 μl. Do reakční směsi připravené dle pokynů výrobce (2 μl H<sub>2</sub>O, 5 μl 2x SensiFAST™ SYBR® Hi-ROX One-Step Mix, 0,1 μl reverzní transkriptázy a 0,2 μl inhibitoru RNáz (10 U/ul) na jeden vzorek) byly přidány příslušné primery ve výsledné koncentraci 200 nM. Reakční směs byla rozpipetována do reakčních zkumavek a následně bylo přidáno 5 ng RNA ošetřené DNázou v objemu 2,5 μl (viz předchozí kapitola). Použité primery jsou uvedeny v tabulce č. 4. Byly převzaty z literatury nebo navrženy pomocí programu Primer-BLAST tak, aby detegovaly jen sestřižený RNA produkt (kromě IFN $\alpha$  a IFN $\beta$ , které neobsahují intron). Primery byly testovány, aby nedetegovaly sekvence viru vakcínie. Všechny primery byly syntetizovány firmou Integrated DNA Technologies.

RT-qPCR probíhala na přístroji Applied Biosystems 7300 Real-time PCR System při následujících podmínkách: reverzní transkripce 30 min při 45 °C, počáteční denaturace 10 min při 95 °C, 40 nebo 45 cyklů denaturace 15 s při 95 °C, nasedání a extenze 1 min při 60 °C, a nakonec stanovení disociační křivky.

Primer	Přímý primer 5'-3'	Zpětný primer 5'-3'
Mu GAPDH	CGG TGC TGA GTA TGT CGT GGA	GGC AGA AGG GGC GGA GAT GA
Mu IFN $\alpha$	GCA ACC CTC CTA GAC TCA TTC T	CCA GCA GGG CGT CTT CCT
Mu IFN $\beta$	GCA CTG GGT GGA ATG AGA CT	AGT GGA GAG CAG TTG AGG ACA
Mu IFN $\gamma$	TGG CAT AGA TGT GGA AGA AAA GAG	TGC AGG ATT TTC ATG TCA CCA
Mu IL-1 $\beta$	TCC ATT GAG GTG GAG AGC TT	GGA TGA GGA CAT GAG CAC CT
Mu IL-12	TGT CAA TCA CGC TAC CTC CTC	GTC CAG AGA CTG GAA TGA CCC
Mu IL-17A	GGA CTC TCC ACC GCA ATG AA	TTT CCC TCC GCA TTG ACA CA
Mu IL-4	CTT GGA AGC CCT ACA GAC GAG	GGA GAT GGA TGT GCC AAA CG
Mu IL-10	AGG CGC TGT CAT CGA TTT CTC	GCC TTG TAG ACA CCT TGG TCT T
Mu TGF $\beta$ 1	CAC TGA TAC GCC TGA GTG GC	TCG AAA GCC CTG TAT TCC GT
Mu TGF $\beta$ 3	GCA AGA ATC TGC CCA CAA GG	CCA TTG GGC TGA AAG GTG TG
Mu TNF $\alpha$	GAT CGG TCC CCA AAG GGA TG	TGA GGG TCT GGG CCA TAG AA

Mu AIM2	AGG CAG TGG GAA CAA GAC AG	GAA ACC TTC CTG ACG CCA CC
Mu iNOS	ACG AGA CGG ATA GGC AGA GA	GCA CAT GCA AGG AAG GGA AC
Mu IRF-3	TAG GCT GGC TGT TGG AGA TGT	CCA GGT CTT CCA GCA GAC ACT

Tabulka č. 4: Sekvence použitých primerů

Primery pro iNOS byly navrženy tak, aby zachytily všechny tři transkripční varianty iNOS. Primery pro IL-12 jsou specifické pro podjednotku p35. Použité primery pro IFN $\alpha$  (Castellaneta et al. 2014) zachycují produkty genů *Ifna1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, B*.

#### 4.2.3.1.5 Stanovení DNA viru vakcínie pomocí qPCR

Kvantitativní PCR pro detekci VACV DNA byla prováděna za použití qPCR 2x Blue Master Mix + ROX 500 (Top-Bio). Primery a próba Custom TaqMan® Gene Expression Assay byly syntetizovány firmou Applied Biosystems. Sekvence jsou uvedeny v tabulce č. 5. Reakční směs byla připravena dle protokolu: 2,75  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 5  $\mu$ l qPCR 2x Blue Master Mix + ROX 500, 0,25  $\mu$ l roztoku primerů a próby na 1 vzorek. Reakční směs byla rozpipetována do reakčních zkumavek po 8  $\mu$ l a byly přidány 2  $\mu$ l DNA (o koncentraci 1  $\mu$ g/ $\mu$ l). PCR o 45 cyklech probíhala za stejných podmínek jako RT-qPCR avšak s vynecháním počátečních 30 min pro reverzní transkripci a koncového stanovení disociační křivky.

	Sekvence 5'-3'
Přímý primer	CGT ATC ACA CTA TTG AGA CAG AAA AAG AAG A
Zpětný primer	GAC ACT ATA TTC CGG TTT GCA AAA CA
Próba	TCG CGA GAG GTA ACT TTT TGT GA

Tabulka č. 5: Sekvence primerů a próby pro detekci VACV DNA

#### 4.2.3.2 Western blot analýza

Western blot analýza byla prováděna podle upraveného protokolu dle Laemmliho (1980) a Harlow a Lanea (1988).

##### 4.2.3.2.1 Příprava vzorků v Laemmliho redukujícím vzorkovém pufu

Postup sklizení buněk pro analýzu western blot byl popsán v kapitole 4.2.1.7.3 Vzorky zlyzované v Laemmliho 1x RSB byly 3 min povařeny a následně zvortexovány a zcentrifugovány na centrifuze 5415 C (Eppendorf) při pokojové teplotě, 15 000 g po dobu 4 min.

#### 4.2.3.2.2 Izolace proteinů z RNA Blue

Izolace proteinů ze vzorků homogenizovaných v RNA Blue (Top-Bio) byla prováděna dle příslušného protokolu. Po precipitaci DNA v etanolu (viz kapitola 4.2.3.1) bylo k supernatantu přidáno 1,5 ml isopropylalkoholu a vzorky byly inkubovány při pokojové teplotě 10 min. Následně byly centrifugovány při 12 000 g a 4 °C po dobu 10 min. Supernatant byl odstraněn a proteinový pelet byl promyt ve 2 ml roztoku 0,3M guanidin hydrochloridu v 97% etanolu. Vzorky byly inkubovány 20 min při pokojové teplotě a centrifugovány 5 min při 7 500 g a 4 °C. Tento promývací krok byl třikrát opakován. Poté byly k peletu přidány 2 ml 100% etanolu, vzorky byly zvortexovány a centrifugovány při 7 500 g a 4 °C po dobu 5 min. Supernatant byl odstraněn a proteiny byly rozpuštěny ve 40 µl 1x RSB. Vzorky byly zahřáty na 50 °C po dobu 5 min a následně zamrazeny v – 20 °C. Tato metoda se však v průběhu práce ukázala jako nespolehlivá a bylo od ní následně upuštěno.

#### 4.2.3.2.3 SDS-PAGE

Elektroforéza byla prováděna v aparatuře Mini-Protean 3 (BioRad). Gely byly připravovány dle rozpisu uvedeného v tabulce č. 6. Vzorky připravené oběma výše popsanými metodami byly nanášeny na gel v objemu 10 µl. Jako standard molekulových hmotností byl použit PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo SCIENTIFIC). Elektroforéza probíhala v přítomnosti dodecylsírany sodného, při konstantním napětí 80 V v 1x koncentrovaném pufru C po dobu cca 1,5 h.

Druh gelu	Rozdělovací	Rozdělovací	Rozdělovací	Zaostřovací
Koncentrace	8 %	10 %	12 %	4,1 %
40% akrylamid:N-Met-bis-akrylamid	3,00	3,75	4,50	0,6
MiliQ voda	5,70	4,95	4,20	2,85
Pufr A	2,18	2,18	2,18	0
Pufr B	0	0	0	0,9
TEMED	0,0075	0,0075	0,0075	0,0068
10% amonium persulfát	0,015	0,015	0,015	0,0225
Glycerol	0,3	0,3	0,3	0

Tabulka č. 6: Složení gelů pro SDS-PAGE. Objemy uváděné v ml.

#### 4.2.3.2.4 Transblot

Přenos proteinů z gelu na PVDF membránu (Immun-Blot® PVDF Membrane For Protein Blotting; vazebná kapacita 150-160 µg/cm<sup>2</sup>; high-binding; BioRad), popřípadě na PVDF membránu Low Fluorescence PVDF (Azure Biosystems), byl prováděn v aparatuře Trans-Blot Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (BioRad). Přenos probíhal při konstantním proudu 0,18 A/gel po dobu 75 min.

Složení sendviče pro přenos bylo následující (směrem od anody, umístěné dole): 5 listů filtračního papíru Whatmann 3 MM namočených v transferovém pufru, ve 100% metanolu předem namočená PVDF membrána, gel a opět 5 listů filtračního papíru namočených v transferovém pufru. Přenos proteinů byl ověřen obarvením membrány v roztoku 0,2% Ponceau červeně v 3% TCA (Sigma). Barvivo bylo odstraněno oplachem v 1x PBS a v MiliQ vodě.

#### **4.2.3.2.5 Imunoblot**

Membrána byla oplachována v 1x PBS dvakrát 15 min na horizontální třepačce. Poté byla 20 min blokována 5% mlékem (Nestlé) v PBS. Inkubace s primární protilátkou v 5% mléce probíhala přes noc ve 4 °C za stálého kývání. Použité koncentrace primárních protilátek jsou uvedeny v tabulce č. 7. Po inkubaci s primární protilátkou byla membrána opět oplachována v PBS 2x 15 min. Následně byla inkubována se sekundární protilátkou 1 h při pokojové teplotě. Seznam používaných sekundárních protilátek je uveden v tabulce č. 7. Po té byla membrána znovu dvakrát opláchnuta v PBS. Pro chemiluminiscenční detekci u sekundárních protilátek konjugovaných s křenovou peroxidázou byl použit SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo SCIENTIFIC). Pro detekci IL-1 $\beta$  a fosforylovaného IRF-3 byly použity sekundární protilátky konjugované s infra red fluorochromem. Proces inkubace s protilátkami byl totožný jako v případě chemiluminiscence s tím rozdílem, že membrány byly blokovány a primární protilátky ředěny v blokovacím pufru (Azure Biosystems) a oplachovány v oplachovacím pufru (Azure Biosystems). Sekundární protilátky byly též ředěny v blokovacím pufru (Azure Biosystems). Signál na membránách byl zachycen pomocí CCD kamery v přístroji Azure Biosystems c600.

Pro opakované značení dalšími protilátkami byly staré protilátky z membrány odstraněny pomocí Restore™ Plus Western Blot Stripping Buffer (BioRad). Membrána se 4 ml tohoto pufru byla na 10 min umístěna na třepačku. Následné značení primární protilátkou probíhalo dle popisu výše.

Protilátka	IRF-3	P-IRF-3	IL-1 $\beta$	Aktin	PARP-1
Původ	Myš	Králík	králík	králík	králík
Typ protilátky	Monoklonální	Monoklonální	Polyklonální	Polyklonální	polyklonální
Výrobce	BioLegend	Cell Signaling Technology	Peprtech	Abcam	Santa Cruz Biotechnology
Zásobní koncentrace	0,5 mg/ml	0,2 mg/ml	0,2 mg/ml	0,2 mg/ml	0,2 mg/ml
Použité ředění	1:1 000	1:250	1:500	1:2 500	1:500
Sekundární protilátka	Koza x myš PO	Koza x králík IR 700	Koza x králík IR 700	Koza x králík PO	Koza x králík PO
Ředění Sekundární protilátky	1:10 000	1:10 000	1:10 000	1:10 000	1:10 000

Tabulka č. 7: Přehled použitých primárních a sekundárních protilátek (PO – konjugovaná peroxidáza, IR 700 – infra red fluorochrom)

#### 4.2.3.3 Detekce proteinů pomocí CBA (cytokine beads assay)

Pro detekci cytokinů v homogenátech slezin infikovaných myší byl použit BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (BD Biosciences). Tento kit funguje na principu kuliček s rozlišitelnou intenzitou fluorescence s navázanou protilátkou vždy proti jednomu cytokinu (jmenovitě proti IL-2, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-4, IL-10, IL-17A a IL-6). Po navázání cytokinu na protilátku je tato interakce detegována pomocí sekundární protilátky s konjugovaným fykoerythrinem (PE) na průtokovém cytometru.

Při přípravě vzorků pro analýzu bylo postupováno dle protokolu výrobce. Nejprve byla připravena suspence kuliček s navázanými protilátkami proti jednotlivým cytokinům v objemu 5  $\mu$ l každého typu kuliček na vzorek. Tato směs byla rozpipetována po 25  $\mu$ l na vzorek. Následně bylo přidáno 25  $\mu$ l supernatantu z kultivovaných splenocytů (příprava popsána v kapitole 4.2.2.3.2), popřípadě 25  $\mu$ l standardu v ředící řadě 1 – 1/256 pro kalibrační křivku. Následně bylo ke každému vzorku přidáno 25  $\mu$ l detekční protilátky s konjugovaným PE. Vzorky byly inkubovány 2 h při pokojové teplotě. Poté byl přidán 0,5 ml promývacího pufru (součást kitu), vzorky byly zcentrifugovány při 200 g po dobu 5 min při pokojové teplotě. Supernatant byl opatrně odsát a pelet byl resuspendován ve 150  $\mu$ l promývacího pufru. Takto připravené vzorky byly analyzovány na průtokovém cytometru BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson) se 2 lasery emitujícími ve 488 a 633 nm, a se 6 detectory. Měření i následná analýza byly provedeny s využitím Diva 6 software (Becton Dickinson). Nastavení cytometru

bylo provedeno dle protokolu ke kitu pomocí kalibračních kuliček (Cytometr Setup Beads), které byly též součástí kitu, a vzorky byly analyzovány v dot plotu PE-A x APC-A. Výsledky byly vyhodnocovány na základě kalibrační křivky.

#### **4.2.4 Statistické zpracování dat**

Pro data z RT-qPCR jsou hodnoty v grafech prezentovány jako geometrický průměr se standardní odchylkou pro geometrický průměr. Data z ostatních pokusů jsou v grafech prezentována jako průměry se SEM (standard error of mean). Pro statistické vyhodnocení dat byl použitý nepárový t-test s hladinou statistické významnosti  $p = 0,05$ .

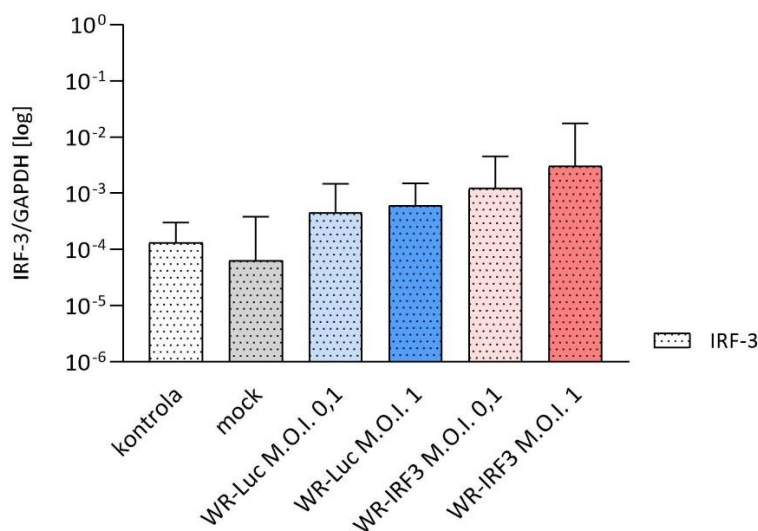


## 5 Výsledky

### 5.1 Pokusy na buněčných liniích

#### 5.1.1 Ověření exprese myšního IRF-3 rekombinantním virem WR-IRF3 v buněčné linii NIH 3T3

Pro ověření exprese myšního rekombinantního IRF-3 na úrovni RNA byly myší fibroblasty NIH 3T3 infikovány viry WR-Luc a WR-IRF3 v multiplicitě infekce (M.O.I.) 0,1 a 1 (obr. č. 5). Buňky byly sklizeny ve 24 h po infekci a z nich byla vyizolována RNA pro RT-qPCR analýzu. Jako referenční gen byla použita GAPDH (glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza). Hladiny mRNA pro IRF-3 byly v buňkách infikovaných WR-IRF3 v porovnání s buňkami infikovanými WR-Luc vyšší cca 3x u M.O.I. 0,1 a cca 5x v případě M.O.I. 1. Tyto rozdíly však nebyly statisticky významné. Při porovnání s neinfikovanými buňkami byly tyto hladiny zvýšeny u obou virů. V případě WR-Luc bylo toto zvýšení srovnatelné u obou multiplicit infekce, a sice 7x v případě M.O.I. 0,1 a 9,5x v případě M.O.I. 1. V případě WR-IRF3 byla exprese zvýšena cca 20x v případě M.O.I. 0,1 a cca 50x v případě M.O.I. 1. Ani zde však nešlo o statisticky významný rozdíl. Relativní změny detekovaných hladin mRNA vůči neinfikovaným buňkám jsou pro přehlednost uvedeny v tabulce č. 8.

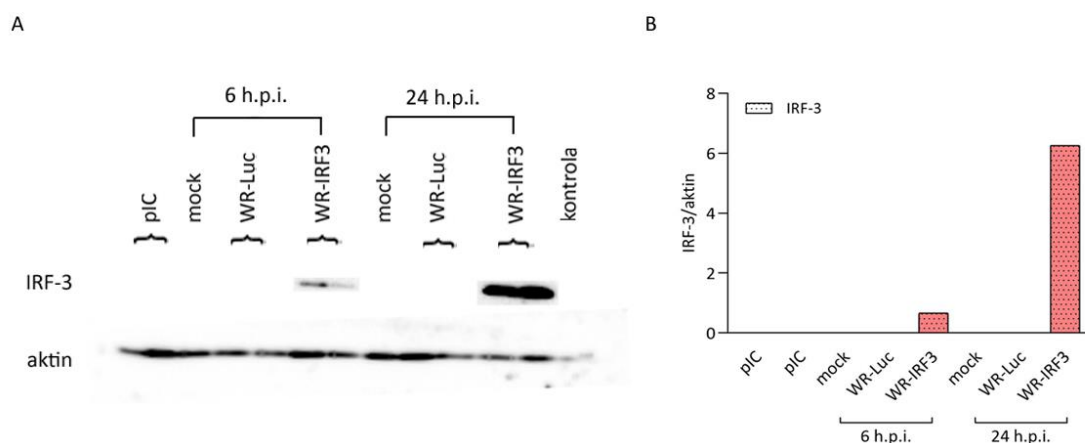


Obrázek č. 5: Expese IRF-3 na úrovni mRNA v buněčné linii NIH 3T3 24 h po infekci WR-Luc a WR-IRF3. Hodnoty normalizované na GAPDH mRNA. Výsledky ze dvou pokusů provedených v duplikátech (n = 4). Kontrola – čas 0; mock – neinfikované buňky; M.O.I. – multiplicita infekce. Chybové úsečky – standardní odchylka pro geometrický průměr.

M.O.I.	0,1	1
WR-Luc	7,02	9,53
WR-IRF3	19,33	47,65

Tabulka č. 8: Relativní změna exprese IRF-3 na úrovni mRNA vztážená k neinfikovaným buňkám. Výsledky ze dvou pokusů provedených v duplikátech (n = 4).

Expresi rekombinantního IRF-3 byla ověřena i na úrovni proteinu pomocí western blot analýzy (obr. č. 6). Fibroblasty byly infikovány oběma viry s M.O.I. 1. Buňky byly sklizeny v 6 a 24 h po infekci (h.p.i.) a zlyzovány v Laemmliho vzorkovém pufru. Jako referenční gen byl použit  $\beta$ -aktin. Rekombinantní IRF-3 byl detekován v buňkách infikovaných WR-IRF3, zatímco endogenní IRF-3 detekován nebyl. Hladiny IRF-3 byly ve 24 h.p.i. cca 9x vyšší než v 6 h.p.i.



Obrázek č. 6: A) Detekce rekombinantního IRF-3 v buněčné linii NIH 3T3 pomocí western blot analýzy po infekci WR-Luc a WR-IRF3 v intervalech 6 a 24 h.p.i. M.O.I. = 1. Proteiny byly rozděleny pomocí 10% SDS-PAGE a hladiny IRF-3 a  $\beta$ -aktinu byly charakterizovány pomocí western blot analýzy a chemiluminiscence, s použitím monoklonální protilátky proti myším IRF-3 a polyklonální protilátky proti  $\beta$ -aktinu. B) Kvantifikace hladin IRF-3 vůči  $\beta$ -aktinu z panelu A, n = 2.

### 5.1.2 Ověření fosforylace IRF-3

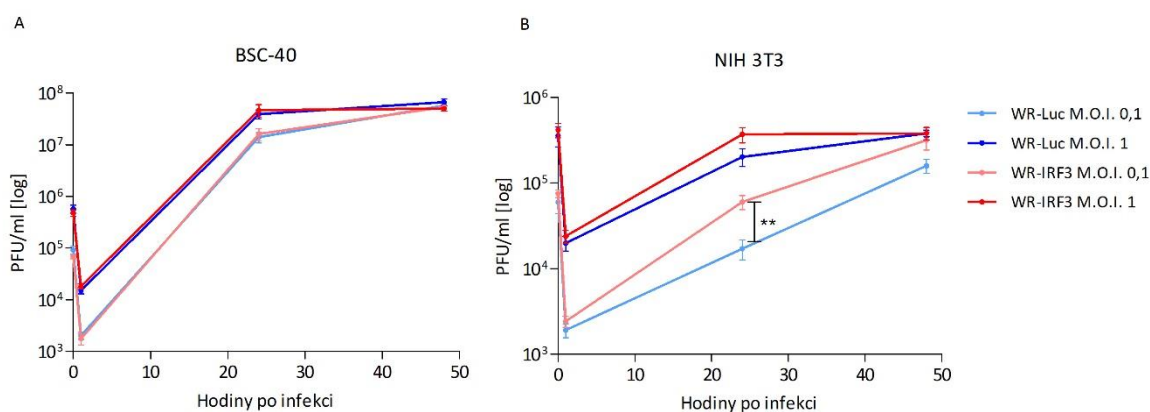
IRF-3 se nachází v cytoplasmě a při stimulaci pomocí dsRNA by mělo dojít k jeho fosforylaci pomocí TBK1 a translokaci do jádra, kde by měl indukovat expresi zejména IFN $\beta$  (Servant et al. 2001). Nicméně VACV tuto funkci IRF-3 inhibuje na různých úrovních. Pro ověření fosforylace IRF-3 exprimovaného WR-IRF3 byly fibroblasty NIH 3T3 infikovány oběma rekombinantními viry s M.O.I. 0,1 a 1 a sklizeny 7 a 24 h po infekci. Vzorky byly zlyzovány v Laemmliho vzorkovém pufru s přidávkem 10 mM NaF, inhibitorem fosfatáz. Jako pozitivní kontrola byly použity buňky transfekované poly I:C (10  $\mu$ g/ml). Fosforylace byla charakterizována pomocí western blot analýzy s použitím primární monoklonální protilátky proti fosforylovanému IRF-3 (fosforylace na Ser396) a sekundární protilátky s IR fluorochromem. Fosforylovaný IRF-3 se nicméně nepodařilo detekovat v žádném ze vzorků, a to ani ve vzorcích, které měly sloužit jako pozitivní kontrola.

### 5.1.3 Charakteristika růstu rekombinantního viru WR-IRF3 v buněčných liniích NIH 3T3 a BSC-40

Za účelem charakterizace efektu exprese myšního IRF-3 na růst rekombinantního VACV byly myší fibroblastová linie NIH 3T3 a opičí epitelální linie BSC-40 infikovány viry WR-Luc a WR-IRF3 s M.O.I. 0,1 a 1. Buňky byly následně sklizeny v intervalech 1, 24 a 48 h po infekci. Sklizené buňky byly

uschovány v  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  a následně byl ve vzorcích stanoven titr viru. Titr viru byl stanoven i v inokulu použitém k infekci.

Dle těchto pokusů exprese myšního IRF-3 rekombinantním VACV neovlivňuje růst viru v opičí buněčné linii BSC-40; růst obou rekombinantních virů je v této linii srovnatelný (Viz obr. č. 7 – A). V myší linii NIH 3T3 dosahují oba rekombinantní viry celkově nižších títů a růst je expresí IRF-3 mírně ovlivněn – WR-IRF3 dosahuje vyššího titru než WR-Luc. Efekt je nejlépe pozorovatelný při M.O.I. 0,1 ve 24 h.p.i., kde se jedná o statisticky významný rozdíl ( $p = 0,005$ ) (Viz obr. č. 7 - B). P-hodnoty t-testu pro intervaly 24 a 48 h.p.i. jsou pro lepší přehlednost uvedeny v tabulce č. 9.



Obrázek č. 7: Růstové křivky rekombinantních virů WR-Luc a WR-IRF3, M.O.I. 1 a 0,1, v buněčných liniích A) BSC-40 a B) NIH 3T3 v intervalech 0, 1, 24 a 48 h po infekci. Pro obě buněčné linie byl pokus třikrát opakován a prováděn v duplikátech ( $n = 6$ ). Chybové úsečky – SEM. \*\* statisticky významný rozdíl ( $p < 0,01$ )

	BSC-40		NIH 3T3	
M.O.I.	0,1	1	0,1	1
24 h.p.i.	0,696	0,635	0,005	0,086
48 h.p.i.	0,408	0,155	0,076	0,996

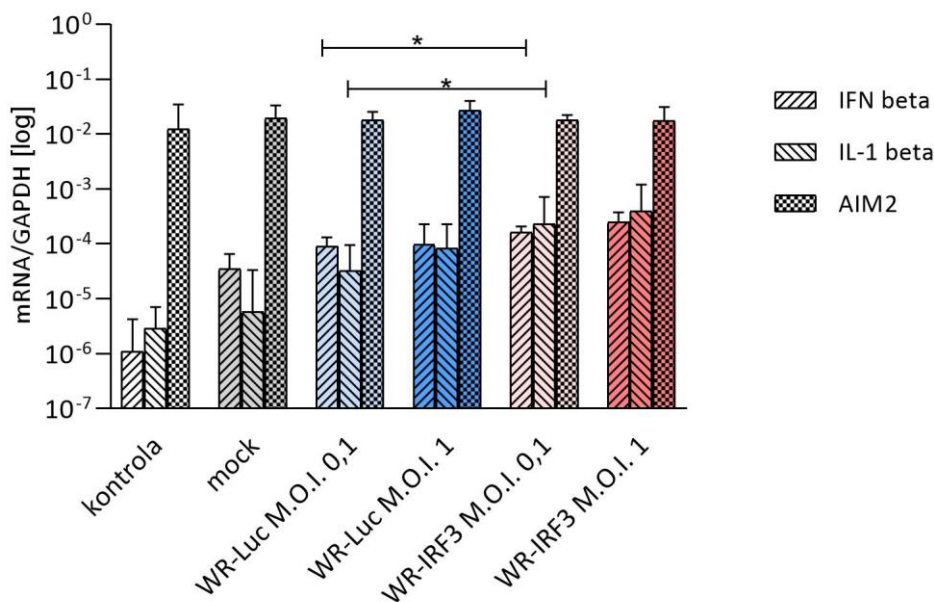
Tabulka č. 9: p-hodnoty t-testu pro titry viru v buněčných liniích BSC-40 a NIH 3T3 v intervalech 24 a 48 h.p.i.

#### 5.1.4 Charakteristika exprese cytokinů a AIM2 v buněčné linii NIH 3T3 po infekci WR-Luc a WR-IRF3

Důvodem k vytvoření WR-IRF3 byl předpoklad, že zvýšená exprese IRF-3 může vést k obejití bloku exprese  $\text{IFN}\beta$ , a tedy lepší imunitní odpovědi na rekombinantní VACV. V linii myších fibroblastů byla proto charakterizována exprese  $\text{IFN}\beta$  a  $\text{IL-1}\beta$  na úrovni mRNA (obr. č. 8). Buňky byly infikovány s M.O.I. 1 a sklizeny 24 h.p.i. Vyizolovaná RNA byla použita pro RT-qPCR analýzu. Hladiny  $\text{IFN}\beta$  mRNA byly po infekci oběma rekombinantními viry zvýšeny, přičemž infekce WR-IRF3 vedla k většímu zvýšení  $\text{IFN}\beta$  mRNA (cca 5x u M.O.I. 0,1 a cca 7x u M.O.I. 1 proti neinfikovaným buňkám) než infekce WR-Luc (cca 3x u obou M.O.I. proti neinfikovaným buňkám), a to v obou multiplicitách infekce.

Obdobný, avšak o něco vyšší efekt byl pozorován i u exprese IL-1 $\beta$  (v případě WR-IRF3 cca 40x u M.O.I. 0,1 a cca 70x u M.O.I. 1 a v případě WR-Luc cca 6x u M.O.I. 0,1 a cca 14x u M.O.I. 1 proti neinfikovaným buňkám). Relativní změny v expresi těchto cytokinů i AIM2 vůči neinfikovaným buňkám jsou pro přehlednost uvedeny v tabulce č. 10. Rozdíl v hladinách mRNA pro IFN $\beta$  i IL-1 $\beta$  mezi WR-Luc a IRF-3 byl statisticky významný ( $p < 0,5$ ) v případě M.O.I. 0,1.

Vzhledem k tomu, že VACV je rozpoznávána m.j. cytoplazmatickým receptorem pro dsDNA AIM2 (Rathinam et al. 2010), po jehož aktivaci dochází k tvorbě inflamasomu a aktivaci kaspázy-1, která normálně štěpí protein pro-IL-1 $\beta$  na IL-1 $\beta$  (a IL-18), byla zkoumána i exprese AIM2 (obr. č. 8). Na rozdíl od IFN $\beta$  a IL-1 $\beta$  však hladiny mRNA pro AIM2 nebyly v buňkách NIH 3T3 infekcí nijak výrazně ovlivněny – byly srovnatelné v kontrolních buňkách v čase  $t = 0$ , v neinfikovaných buňkách i v buňkách infikovaných oběma viry.



Obrázek č. 8: Změny hladin mRNA pro IFN $\beta$ , IL-1 $\beta$  a AIM2 po infekci WR-Luc a WR-IRF3 v buněčné linii NIH 3T3 v intervalu 24 h.p.i. Hodnoty normalizované na GAPDH mRNA. Výsledky ze 2 pokusů provedených v duplikátech ( $n = 4$ ). Mock – neinfikované buňky; kontrola – čas 0. Chybové úsečky – standardní odchylka pro geometrický průměr. \* statisticky významný rozdíl ( $p < 0,1$ )

	M.O.I.	0,1	1
IFN $\beta$	WR-Luc	2,62	2,79
	WR-IRF3	4,69	7,14
IL-1 $\beta$	WR-Luc	5,66	14,28
	WR-IRF3	39,83	68,70
AIM2	WR-Luc	0,93	1,39
	WR-IRF3	0,93	0,90

Tabulka č. 10: Relativní změny hladin mRNA pro IFN $\beta$ , IL-1 $\beta$  a AIM2 vztažené k neinfikovaným buňkám NIH 3T3. Výsledky ze 2 pokusů provedených v duplikátech ( $n = 4$ ).

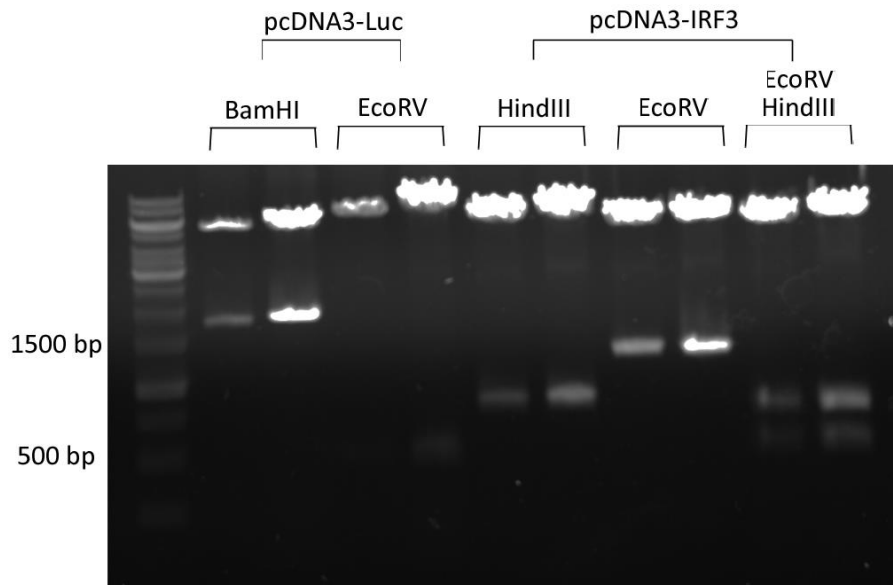
V linii myších fibroblastů byla snaha detekovat IL-1 $\beta$  i na úrovni proteinu pomocí western blot analýzy s využitím sekundárních protilátek značených IR fluorochromem, avšak IL-1 $\beta$  se takto detekovat nepodařilo.

#### **5.1.5 Vliv exprese IRF-3 na produkci IL-1 $\beta$ bez přítomnosti viru**

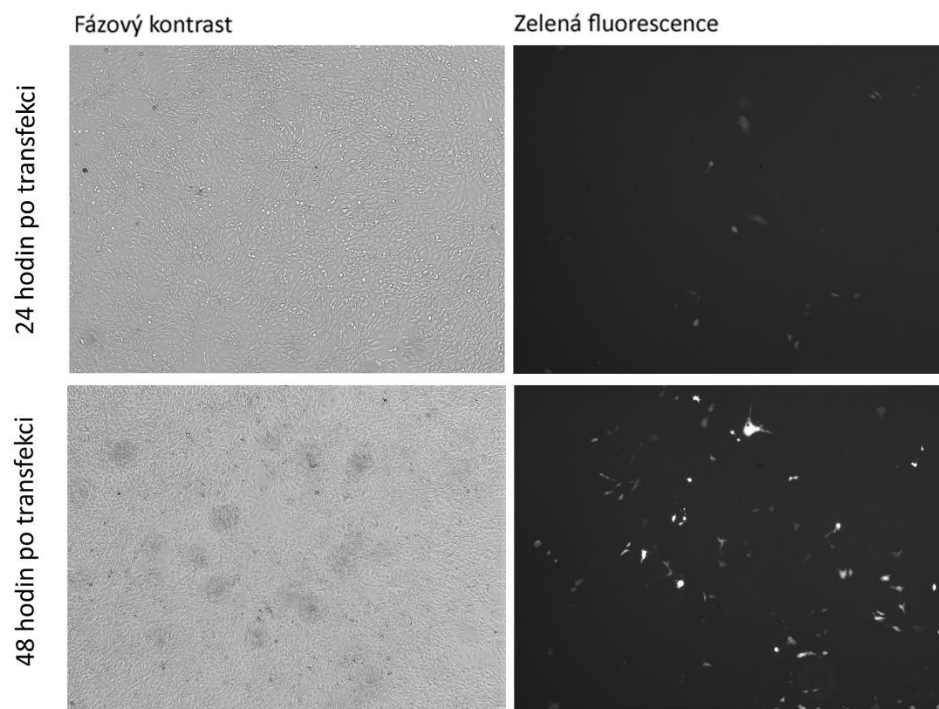
Z pokusů na myších fibroblastech NIH 3T3, myších makrofázích J774.G8 (viz kapitoly 4.1.4 a 4.1.8) i na myších Balb/c (viz níže – kapitola 4.2.1) bylo patrné, že exprese IRF-3 rekombinantním VACV ovlivňuje hladiny IL-1 $\beta$  mRNA. Aby bylo možné posoudit vliv zvýšené exprese IRF-3 na produkci tohoto cytokinu bez přítomnosti VACV, byla využita transientní transfekce a exprese IRF-3 plazmidem pcDNA3 s vloženou cDNA pro IRF-3 (pcDNA3-IRF3). Jako kontrolní plazmid byl použit totožný plazmid s vloženou sekvencí pro luciferázu (pcDNA3-Luc). Oba plazmidy byly pomnoženy v *E. coli* One Shot™ TOP10 Chemically Competent a izolovány. Koncentrace a čistota byly stanoveny spektrofotometricky a přítomnost inzertu v plazmidu po pomnožení byla ověřena restriční analýzou (obr. č. 9). Pro kontrolu účinnosti transfekce byly buňky transfekovány plazmidem pEGFP-N1 a exprese byla charakterizována pomocí zelené fluorescence EGFP ve fluorescenčním mikroskopu (obr. č. 10).

Fibroblasty NIH 3T3 byly 24 a 48 h po transfekci plazmidy sklizeny, byla z nich vyzolována RNA, a ta použita pro RT-qPCR analýzu exprese genů pro IRF-3, IL-1 $\beta$  a IFN $\beta$  (obr. č. 11). Hladiny IRF-3 mRNA normalizovány na GAPDH mRNA byly v případě transfekce pcDNA3-IRF3 v obou časových intervalech o řád vyšší než v případě transfekce s pcDNA3-Luc, kdy byl detekován pouze endogenní IRF-3. U buněk transfekovaných samotným transfekčním činidlem došlo nejprve ve 24 h ke snížení o řád oproti výchozím hodnotám v čase 0 a poté ke zvýšení exprese IRF-3 v intervalu 48 h oproti 24 h o dva řády. IFN $\beta$  byl detekován až ve 48 h a jeho exprese byla srovnatelná u obou plazmidů. Expresi IL-1 $\beta$  se detekovat nepodařilo.

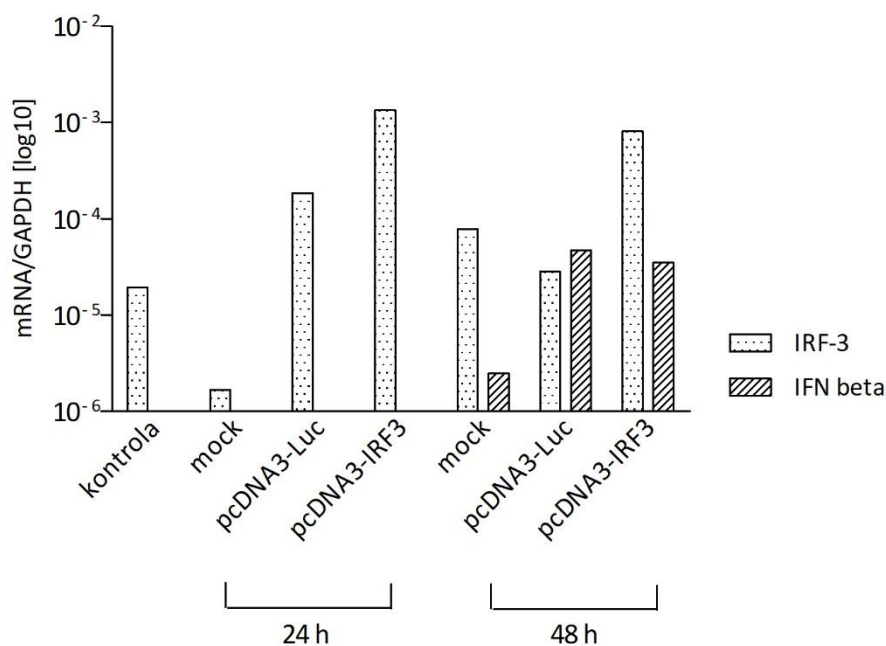
Je patrné, že transfekce pcDNA3-IRF3 vedla ve 24 h po transfekci k cca 800x vyšší expresi mRNA pro IRF-3 vůči netransfekovaným buňkám, zatímco v případě pcDNA3-Luc jen cca 100x. Ve 48 h došlo v případě pcDNA3-Luc dokonce ke snížení exprese IRF-3 vůči netransfekovaným buňkám. V případě exprese mRNA pro IFN $\beta$  bylo zvýšení vůči netransfekovaným buňkám podobné u obou plazmidů (cca 20x u pcDNA3-Luc a cca 14x u pcDNA3-IRF3). Relativní změny exprese IRF-3 a IFN $\beta$  vůči netransfekovaným buňkám jsou pro přehlednost uvedeny v tabulce č. 11.



Obrázek č. 9: Restrikční analýza plazmidů pcDNA3-Luc a pcDNA3-IRF3 pomocí restrikčních enzymů BamHI, EcoRV a HindIII na 0,8% agarózovém gelu, 1x TBE, 0,5 µl/ml EtBr. Očekávaná velikost fragmentů: pcDNA3-Luc – BamHI: 5,4 kbp + 1,9 kbp; EcoRV: 6,8 kbp + 0,5 kbp. pcDNA3-IRF3 – EcoRV: 5,4 kbp + 1,3 kbp; HindIII: 6,141 bp + 559 bp; EcoRV + HindIII: 5,4 kbp + 741 bp + 559 bp.



Obrázek č. 10: Kontrolní transfekce NIH 3T3 buněk s pEGFP-N1. Fotografováno ve 24 a 48 h po transfekci. Originální zvětšení 40x. Vlevo fázový kontrast, vpravo zelená fluorescence. Transfekce 1 µg DNA/6µl Canfast na jamku.



Obrázek č. 11: Hladiny mRNA pro IRF-3 a IFN $\beta$  v transfekovaných buňkách NIH 3T3 ve 24 a 48 h po transfekci. Hodnoty normalizované na GAPDH mRNA. Výsledky z jednoho pokusu provedeného v duplikátech (n = 2). Mock – netransfekované buňky; kontrola – čas 0.

	h po transfekci	24	48
IRF-3	pcDNA3-Luc	111,45	0,36
	pcDNA3-IRF3	800,22	10,24
IFN $\beta$	pcDNA3-Luc	X	19,20
	pcDNA3-IRF3	X	14,18

Tabulka č. 11: Relativní změny hladin mRNA pro IRF-3 a IFN $\beta$  vztažené k netransfekovaným buňkám NIH 3T3 ve 24 a 48 h po transfekci. Výsledky z jednoho pokusu v duplikátech (n = 2).

### 5.1.6 Vliv exprese IRF-3 na indukci apoptózy v buněčných liniích NIH 3T3 a BSC-40

V minulosti bylo ukázáno, že zvýšená exprese IRF-3 vede k apoptóze (Chattopadhyay et al. 2010). Apoptóza indukovaná expresí myšího IRF-3 byla proto zkoumána v buněčných liniích myšího a opičího původu. Míra apoptózy byla charakterizována kondenzací jaderného chromatinu v obou buněčných liniích pomocí fluorescenční mikroskopie a v linii NIH 3T3 ještě štěpením PARP-1 pomocí western blot analýzy. V prvním případě byly obě buněčné linie infikovány WR-IRF3 nebo kontrolním WR-Luc s M.O.I. 0,1 a 1 a ve 24 a 48 h po infekci byly buňky označeny fluorochromem Hoechst 33342 o koncentraci 0,02  $\mu$ g/ml, jehož fluorescence po vazbě na dsDNA (do malého žlábků) vizualizuje kondenzovaný heterochromatin. Vyšší míra apoptózy byla pozorována v myších fibroblastech NIH 3T3 infikovaných WR-IRF3, a to zejména v případě infekce s M.O.I. 1 ve 48 h.p.i. Naproti tomu v opičích epitelálních buňkách BSC-40 měla infekce oběma viry srovnatelný efekt. Pro ilustraci jsou na

obr. č. 12 prezentovány fotografie z fluorescenčního mikroskopu vždy po jednom snímku z daného intervalu a multiplicity infekce.

Pro kvantifikaci míry apoptózy po infekci rekombinantními VACV pomocí western blot analýzy byly myší fibroblasty NIH 3T3 infikovány výše popsáním způsobem a ve 24 a 48 h.p.i. sklizeny a zlyzovány v Laemmliho redukčním vzorkovém pufru. Pomocí western blot analýzy byla detekována štěpená PARP-1, kumulativní produkt terminální kaspáz-3 a 7. Bylo detekováno široké spektrum štěpených fragmentů PARP-1. Kvantifikace byla provedena na základě fragmentu o hmotnosti přibližně 40 kDa, jelikož ten se podařilo řádně detekovat u obou pokusů. Relativní kvantifikace byla provedena vztažením detekované hladiny tohoto fragmentu k neštěpené PARP-1. Tento poměr byl vždy vyšší v případě M.O.I. 1 než v případě M.O.I. 0,1 a to u obou rekombinantních virů. Ve 24 h.p.i. byl rozdíl mezi viry minimální, kdežto ve 48 h.p.i. byl patrný nárůst štěpené PARP-1 u buněk infikovaných WR-IRF3, i když se nejedná o statisticky významný rozdíl ( $p = 0,07$ ). Viz obr. č. 13.

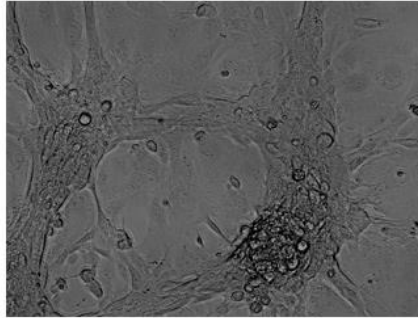


BSC-40  
24 h.p.i.

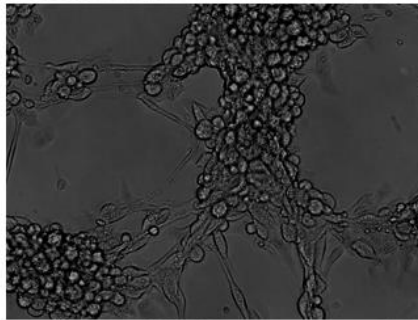
Mock infikované

Fázový kontrast

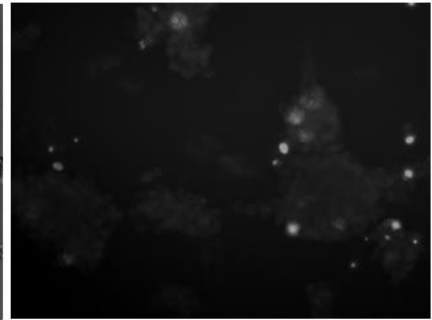
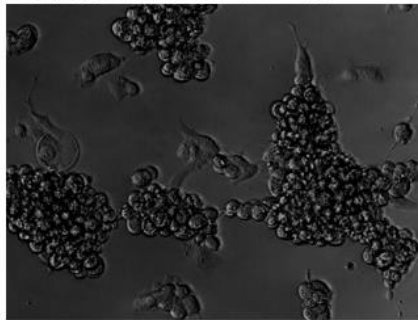
UV



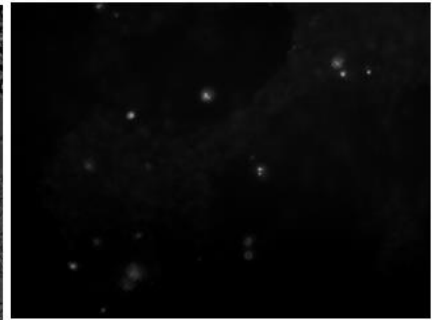
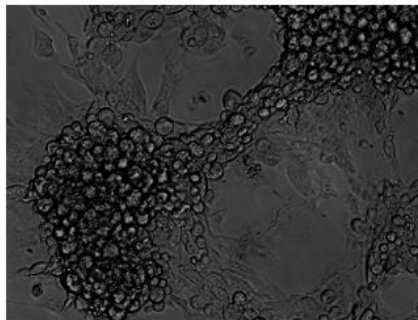
WR-Luc M.O.I. 0,1



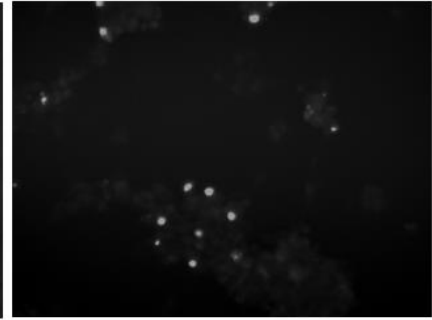
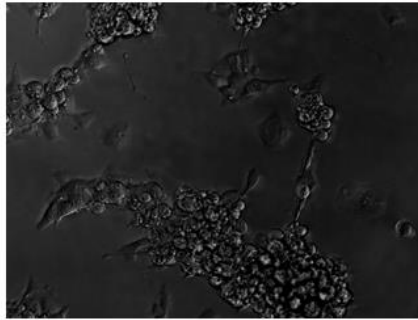
WR-Luc M.O.I. 1



WR-IRF3 M.O.I. 0,1



WR-IRF3 M.O.I. 1

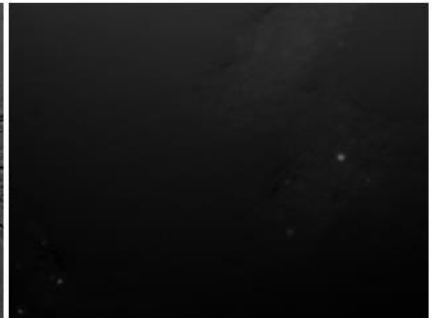
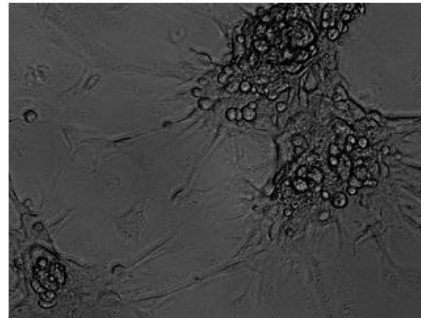


BSC-40  
48 h.p.i.

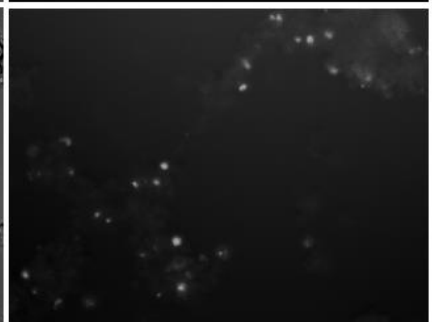
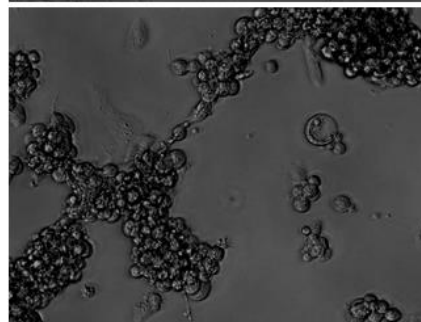
Mock infikované

Fázový kontrast

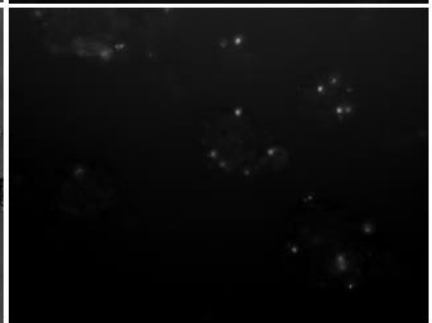
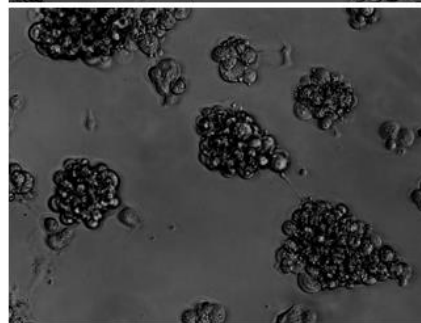
UV



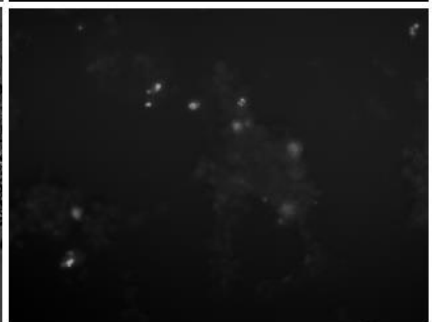
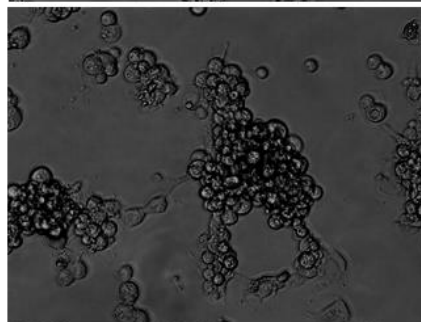
WR-Luc M.O.I. 0,1



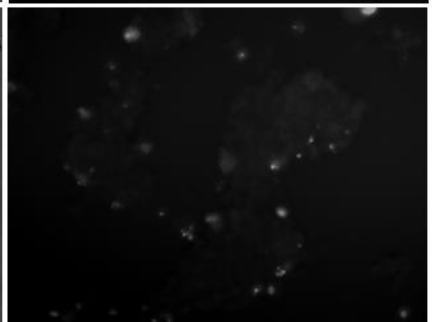
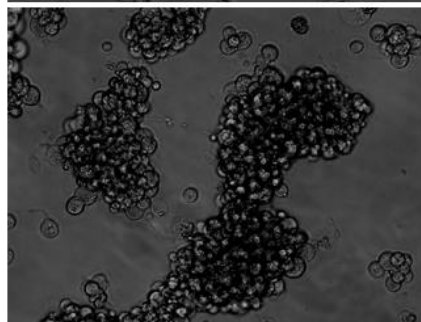
WR-Luc M.O.I. 1



WR-IRF3 M.O.I. 0,1



WR-IRF3 M.O.I. 1

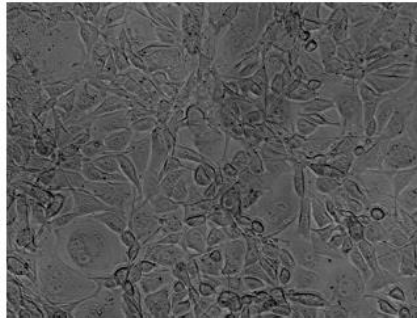


NIH3T3  
24 h.p.i.

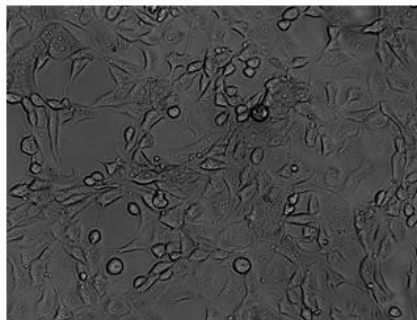
Mock infikované

Fázový kontrast

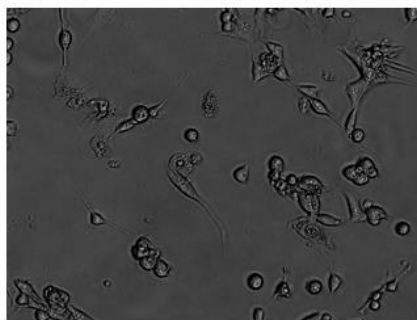
UV



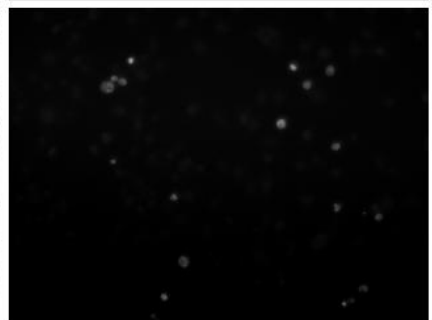
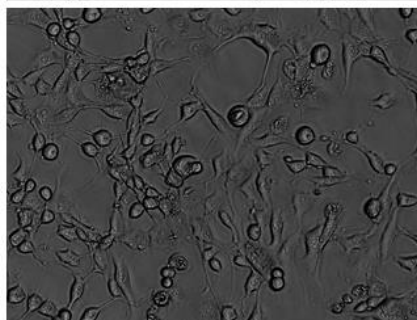
WR-Luc M.O.I. 0,1



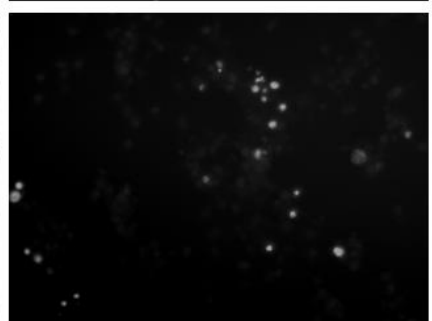
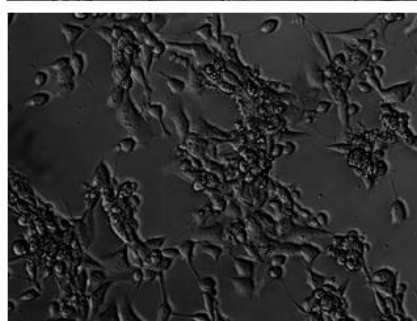
WR-Luc M.O.I. 1



WR-IRF3 M.O.I. 0,1



WR-IRF3 M.O.I. 1

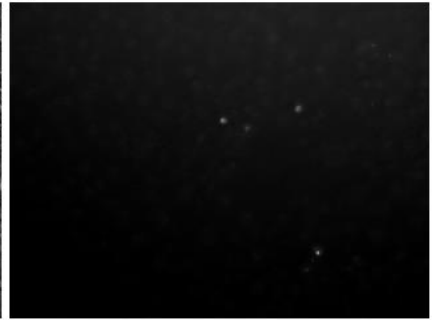
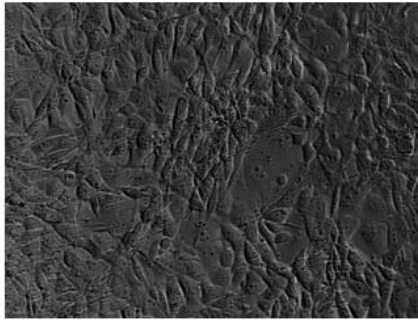


NIH3T3  
48 h.p.i.

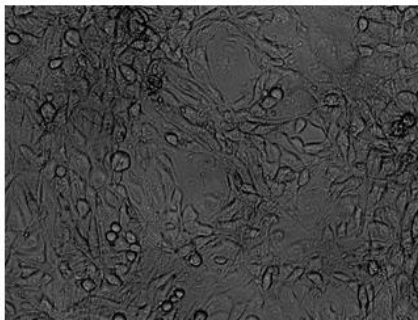
Mock infikované

Fázový kontrast

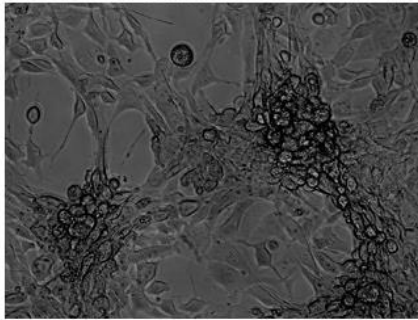
UV



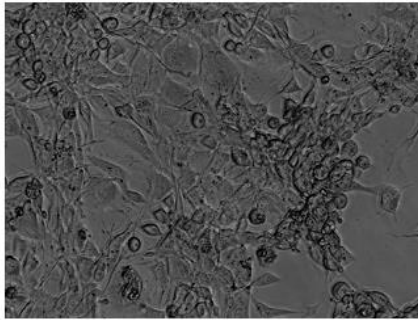
WR-Luc M.O.I. 0,1



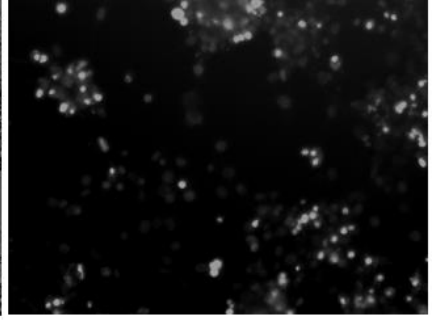
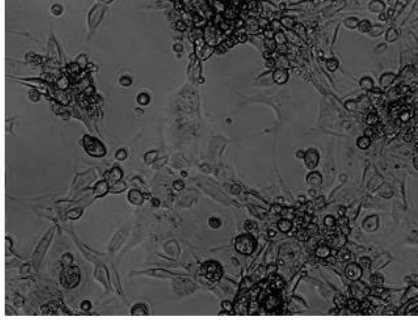
WR-Luc M.O.I. 1



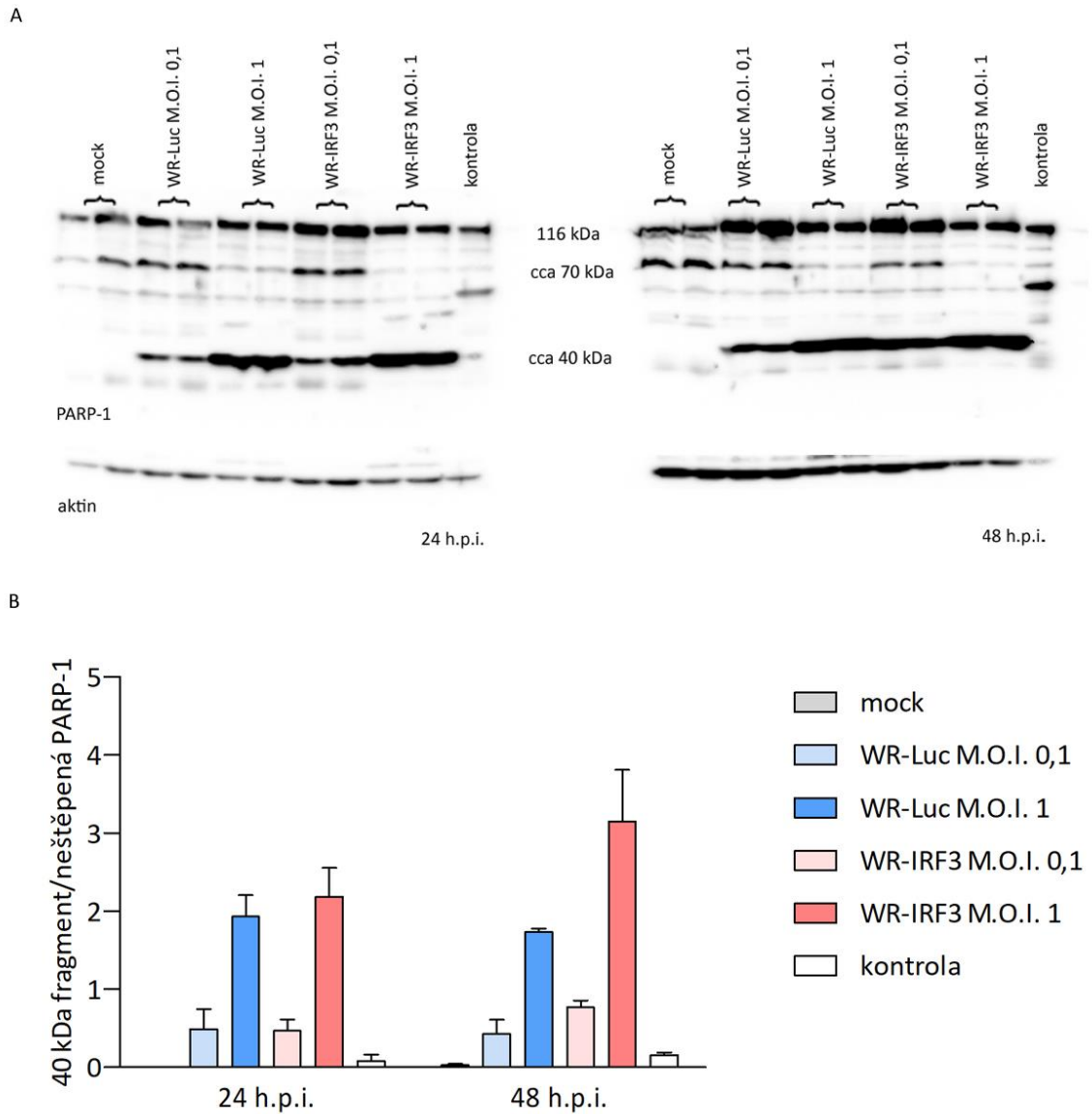
WR-IRF3 M.O.I. 0,1



WR-IRF3 M.O.I. 1



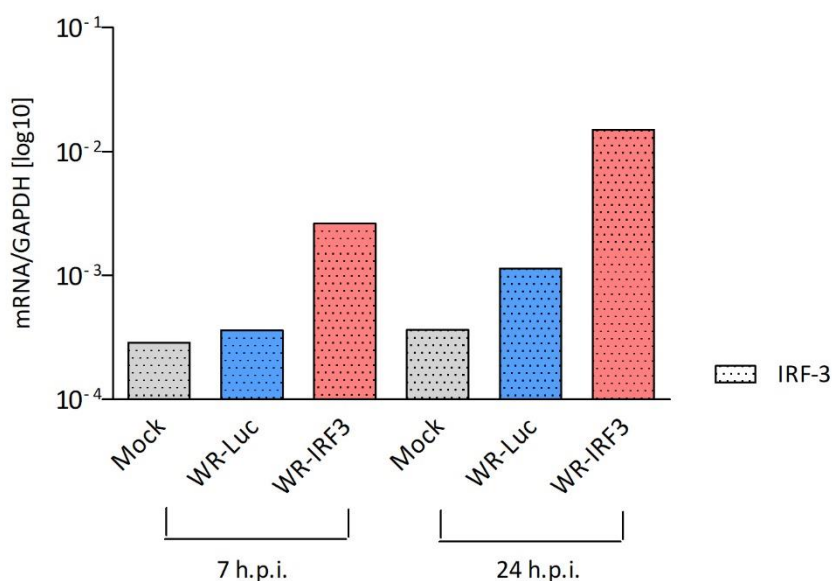
Obrázek č. 12: Fotografie apoptotických jader v buněčných liniích BSC-40 a NIH 3T3 po infekci WR-Luc a WR-IRF3 s M.O.I. 0,1 a 1 v intervalech 24 a 48 h.p.i. Kondenzovaný jaderný heterochromatin byl vizualizován fluorochromem Hoechst 33342 (0,2 µg/ml) a UV fluorescencí. Vlevo fázový kontrast, vpravo UV. Originální zvětšení 150x.



Obrázek č. 13: A) Detekce PARP-1 (neštěpené i štěpených produktů) v buněčné linii NIH 3T3 pomocí western blot analýzy po infekci WR-Luc a WR-IRF3 v intervalech 24 a 48 h.p.i. M.O.I. = 0,1 a 1. Proteiny byly rozděleny pomocí 8% SDS-PAGE a hladiny PARP-1 a  $\beta$ -aktinu byly charakterizovány pomocí western blot analýzy a chemiluminiscence s použitím polyklonálních protilátek proti PARP-1 a  $\beta$ -aktinu. Reprezentativní výsledek ze dvou pokusů provedených v duplikátech ( $n = 4$  – infikované a neinfikované buňky;  $n = 2$  – kontrola v čase 0). Mock – neinfikované buňky; kontrola – čas 0. B) Kvantifikace hladin 40 kDa fragmentu PARP-1 vůči neštěpené PARP-1 z panelu A. Mock – neinfikované buňky; kontrola – čas 0. Chybové úsečky – SEM.

### 5.1.7 Charakterizace vlivu infekce rekombinantními viry na buněčnou linii J774.G8

Pro ověření exprese myšího rekombinantního IRF-3 v buňkách myeloidního původu byla myší monocyto-makrofágová linie J774.G8 infikována oběma rekombinantními viry s M.O.I. 1. Makrofágy byly sklizeny 7 a 24 h po infekci a z buněk vyizolovaná RNA byla použita pro RT-qPCR analýzu. Hladiny IRF-3 mRNA byly v 7 h.p.i. v neinfikovaných buňkách a buňkách infikovaných WR-Luc podobné, zatímco v buňkách infikovaných WR-IRF3 byly o řád vyšší. Ve 24 h.p.i. byl rozdíl v hladině detekované mRNA mezi neinfikovanými a WR-Luc půl řádu a mezi buňkami infikovanými WR-Luc a WR-IRF3 celý řád. Viz obr. č. 14. Relativní změny exprese mRNA pro IRF-3 vztahované k neinfikovaným buňkám jsou pro přehlednost uvedeny v tabulce č. 12.

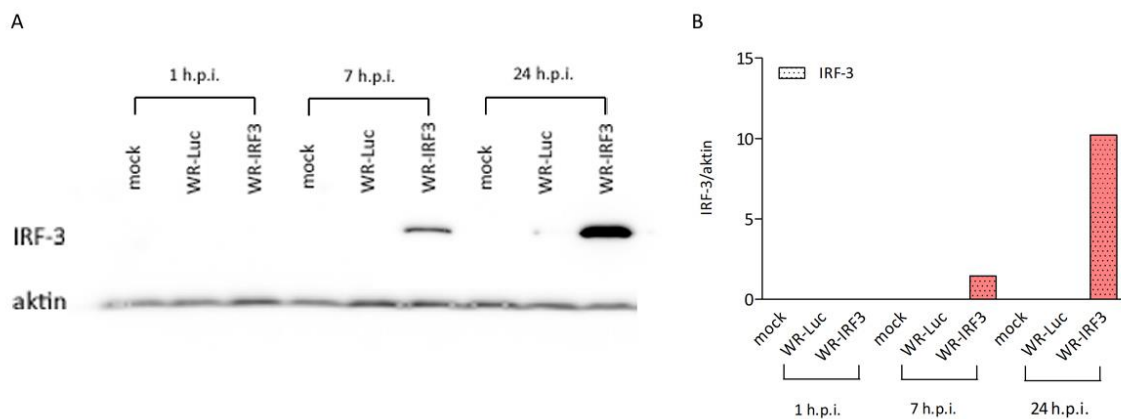


Obrázek č. 14: Zvýšení hladin mRNA pro IRF-3 v infikovaných makrofázích J774.G8 v 7 a 24 h.p.i. M.O.I. = 1. Hodnoty normalizované na GAPDH mRNA. Výsledky z jednoho pokusu (n = 1). Mock – neinfikované buňky.

h.p.i.	7	24
WR-Luc	1,27	3,14
WR-IRF3	9,21	13,02

Tabulka č. 12: Relativní změny v hladinách mRNA pro IRF-3 vztahované k neinfikovaným buňkám J774.G8 v 7 a 24 h.p.i. Výsledky z jednoho pokusu (n = 1).

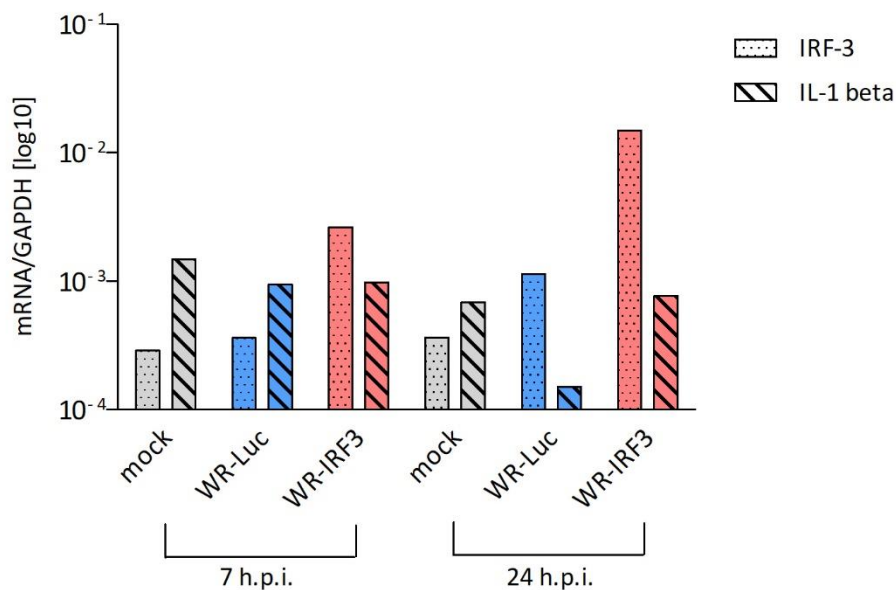
V myších makrofázích byla exprese rekombinantního IRF-3 na úrovni proteinu charakterizována rovněž v 7 a 24 h.p.i. a M.O.I. 1. Hladiny IRF-3 byly pozorovatelně vyšší ve 24 h.p.i. a to cca 7x vůči hladinám v 7 h.p.i. (viz obr. č. 15). V 1 h.p.i. IRF-3 detekován nebyl. Stejně jako v buněčné linii NIH 3T3 se endogenní IRF-3 detekovat nepodařilo.



Obrázek č. 15: A) Detekce rekombinantního IRF-3 v buněčné linii J774.G8 pomocí western blot analýzy po infekci WR-Luc a WR-IRF3 v intervalech 1, 7 a 24 h.p.i. M.O.I. = 1. Proteiny byly rozděleny pomocí 12% SDS-PAGE a hladiny IRF-3 a  $\beta$ -aktinu byly charakterizovány pomocí western blot analýzy a chemiluminiscence, s použitím monoklonální protilátky proti myšimu IRF-3 a polyklonální protilátky proti  $\beta$ -aktinu. B) Relativní kvantifikace hladin IRF-3 vůči  $\beta$ -aktinu z panelu A. Mock – neinfikované buňky.

### 5.1.8 Vliv exprese rekombinantního IRF-3 na produkci IL-1 $\beta$

V monocyto-makrofágové linii J774.G8 byly dále studovány efekty WR-IRF3 na produkci IL-1 $\beta$ , neboť u jiného klonu, J774.A1, je popisována spontánní produkce tohoto cytokinu (ATCC®TIB-67™). Pro RT-qPCR analýzu byly buňky infikovány s M.O.I. 1 a sklizeny v 7 a 24 h.p.i. V 7 h.p.i. byly hladiny IL-1 $\beta$  mRNA srovnatelné u buněk infikovaných oběma viry i v neinfikovaných buňkách. Totéž platilo i pro neinfikované buňky a WR-IRF3 ve 24 h.p.i. Avšak hladiny IL-1 $\beta$  mRNA u buněk infikovaných WR-Luc byly v tomto intervalu o řád nižší v porovnání s neinfikovanými buňkami a WR-IRF3. Lze tedy říci, že rekombinantní IRF-3 zabránil poklesu IL-1 $\beta$  způsobeného VACV. Viz obr. č. 16. Relativní změny v expresi mRNA pro IRF-3 a IL-1 $\beta$  vůči neinfikovaným buňkám jsou pro přehlednost uvedeny v tabulce č. 13.



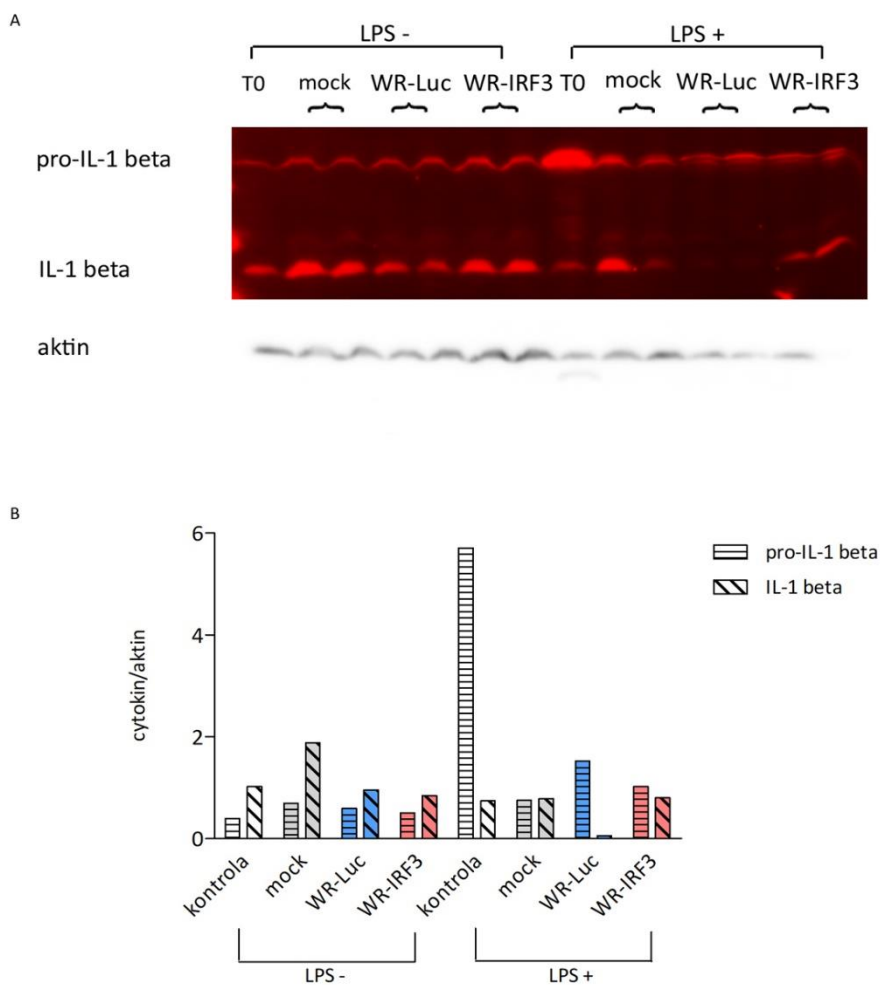
Obrázek č. 16: Změna hladin mRNA pro IRF-3 a IL-1 $\beta$  v makrofázích J774.G8 po infekci WR-Luc a WR-IRF3 v intervalech 7 a 24 h.p.i. M.O.I. = 1. Hodnoty normalizované na GAPDH mRNA. Výsledky z jednoho pokusu (n = 1). Mock – neinfikované buňky.

h.p.i.	7	24
WR-Luc	0,63	0,22
WR-IRF3	0,66	1,13

Tabulka č. 13: Relativní změny hladin mRNA pro IL-1 $\beta$  vztahované k neinfikovaným buňkám J774.G8 v 7 a 24 h.p.i. Výsledky z jednoho pokusu (n = 1).

Pro studium exprese IL-1 $\beta$  na úrovni proteinu byla polovina buněk 24 h před infekcí stimulována pomocí LPS o koncentraci 1  $\mu$ g/ml. Buňky byly infikovány WR-Luc a WR-IRF3 s M.O.I. 1 a sklizeny 24 h.p.i. Hladiny pro-IL-1 $\beta$  byly dle kvantifikace vůči aktinu vyšší u makrofágů stimulovaných LPS než u nestimulovaných. Nejvyšší hladiny tohoto prekurzoru byly detekovány po 24 h stimulace LPS, tedy u kontroly v čase 0 před infekcí. Hladiny štěpeného IL-1 $\beta$  byly u nestimulovaných infikovaných buněk podobné u obou virů, zatímco u neinfikovaných buněk byla pozorovaná míra štěpení vyšší. U stimulovaných buněk byla míra produkce štěpeného IL-1 $\beta$  podobná u buněk neinfikovaných a infikovaných WR-IRF3. U buněk infikovaných WR-Luc byly hladiny štěpeného produktu sníženy, a to cca 14x oproti buňkám infikovaným WR-IRF3 (viz obr. č. 17).





Obrázek č. 17: A) Detekce pro-IL-1 $\beta$  a IL-1 $\beta$  v buněčné linii J774.G8 pomocí western blot analýzy po stimulaci LPS a infekci WR-Luc a WR-IRF3 ve 24 h.p.i. M.O.I. = 1. Proteiny byly rozděleny pomocí 12% SDS-PAGE a hladiny pro-IL-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$  a  $\beta$ -aktinu byly charakterizovány pomocí western blot analýzy. Detekce  $\beta$ -aktinu pomocí polyklonální protilátky a chemiluminiscence, detekce pro-IL-1 $\beta$  a IL-1 $\beta$  pomocí monoklonální protilátky a IR fluorescence. Výsledky z jednoho pokusu v duplikátech (n = 2). Mock – neinfikované buňky; kontrola – čas 0. B) Relativní kvantifikace hladin pro-IL-1 $\beta$  a IL-1 $\beta$  vůči  $\beta$ -aktinu z panelu A.

Tento pokus byl třikrát opakován, nicméně rozdíly v expresi a především štěpení IL-1 $\beta$  se podařilo pozorovat jen v jednom případě.

IL-1 $\beta$  je po proteolytické aktivaci secernován z buněk. To může ovlivnit jeho detekci v buněčných lyzátech. Proto byly z kulturačních médií ve výše popsaných pokusech precipitovány proteiny a ty pak použity pro western blot analýzu. Nicméně v těchto precipitátech se zde zvolenou metodou IL-1 $\beta$  detekovat nepodařilo.

### 5.1.9 Produkce NO infikovanými makrofágy

Produkce NO hraje v imunitní odpovědi proti VACV důležitou úlohu (Karupiah et al. 1993). Byla proto charakterizována schopnost infikovaných makrofágů produkovat NO, a to pomocí stanovení koncentrace nitritů v kulturačním médiu Griessovou metodou. Koncentrace nitritů byla

stanovena jednak v supernatantech různě stimulovaných neinfikovaných buněk a jednak v supernatantech infikovaných buněk.

Makrofágy byly v prvním případě inkubovány s LPS (1 µg/ml), IFN $\gamma$  (5 U/ml), 1 mM aminoguanidinem (AG; inhibitor iNOS) a s kombinací LPS + IFN $\gamma$  či LPS + IFN $\gamma$  + AG. V tomto uspořádání byly zvýšené hladiny nitritů stanoveny pouze v supernatantu buněk stimulovaných kombinací LPS a IFN $\gamma$ , a to 28,04 µM. Inhibitor iNOS, aminoguanidin, tyto hladiny snížil na úroveň nestimulovaných vzorků, ve kterých nebyla koncentrace nitritů vůbec detekována.

Při pokusech popisovaných v předchozí kapitole byl z jamek s buňkami před jejich sběrem odebrán alikvot kultivačního média, a ten následně použit pro stanovení koncentrace nitritů. Z těchto tří pokusů byl pouze v jednom detekován mírný rozdíl v produkci nitritů mezi infikovanými a neinfikovanými buňkami předem stimulovanými LPS. V tomto pokuse nebyly nitrity detekovány u kontrolních buněk v čase 0. Ve 24 h.p.i. byla koncentrace nitritů stanovena na 4,7 µM u neinfikovaných buněk; u buněk infikovaných WR-Luc byla koncentrace nitritů 1,1 µM a u WR-IRF3 1,2 µM. V tomto případě tedy infekce VACV snížila produkci NO, nicméně exprese rekombinantního IRF-3 neměla žádný pozorovatelný efekt. (Popisovaný pokus byl jiný než ten, ve kterém byla detekována změna ve štěpení pro-IL-1 $\beta$ .)

## 5.2 Pokusy na myších

Jako model lidské atopické dermatitidy byly použity spontánně atopické myši kmene Nc/Nga. Jako kontrolní organismus byly použity myši kmene Balb/c.

### 5.2.1 Charakteristika exprese cytokinů v kůžích intradermálně infikovaných myší Balb/c a Nc/Nga po infekci WR-Luc a WR-IRF3

Pro charakterizaci exprese cytokinů v kůžích byli myši samci kmene Balb/c a Nc/Nga inokulováni rekombinantními viry WR-Luc a WR-IRF3. Inokulum v dávce  $7,5 \times 10^5$  PFU/myš bylo do kůží zaškrabáno pomocí akupunkturních jehel. Neinfikovaným kontrolním myším byl aplikován 1x PBS. Myši byly usmrceny před inokulací VACV a ve 2 a 4 dnech po infekci. Na úrovni mRNA byly detekovány IFN $\alpha$  a IFN $\beta$ , neboť hrají ústřední roli v primární antivirové obraně a jejich exprese by měla být ovlivněna WR-IRF3. IL-1 $\beta$  a TNF $\alpha$  hrají důležitou roli v navození zánětu. Dále byly sledovány cytokiny charakteristické pro polarizace imunitní odpovědi: IFN $\gamma$  a IL-12 pro Th1, IL-4 pro Th2 a IL-17A pro Th17. Z cytokinů přispívajících hojení a tlumení imunitní odpovědi byly sledovány IL-10, TGF $\beta$ 1 a TGF $\beta$ 3. Exprese obou zmiňovaných izoform TGF $\beta$  by měla být podstatná pro hojení ran v kůži (TGF $\beta$ 1 by měl být produkován imunitními buňkami po stimulaci a TGF $\beta$ 3 kožními buňkami) (Schmid et al. 1993). Dále byly detekovány IFN $\gamma$ -inducibilní AIM2 a iNOS.

Hladiny mRNA pro pozorované cytokiny, AIM2 a iNOS byly stanoveny u obou myších kmenů i v čase 0. V tomto bodě byly hladiny detekované mRNA srovnatelné u obou myších kmenů a to ve všech případech.

Hladiny mRNA všech pozorovaných cytokinů, AIM2 a iNOS byly ovlivněny expresí rekombinantního IRF-3. Tento vliv se však mezi oběma myšími kmeny lišil. V kůži myší kmene Nc/Nga byla hladina mRNA pro většinu pozorovaných produktů (kromě IL-12 a částečně TNF $\alpha$ ) po infekci WR-Luc výrazně zvýšena oproti neinfikovaným vzorkům a WR-IRF3 tyto hladiny většinou snižoval, případně přibližoval k hladinám mRNA v neinfikovaných vzorcích. Tyto efekty byly výraznější ve 4. dni po infekci.

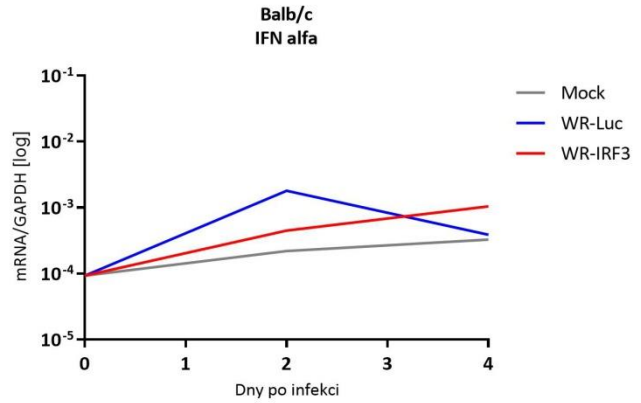
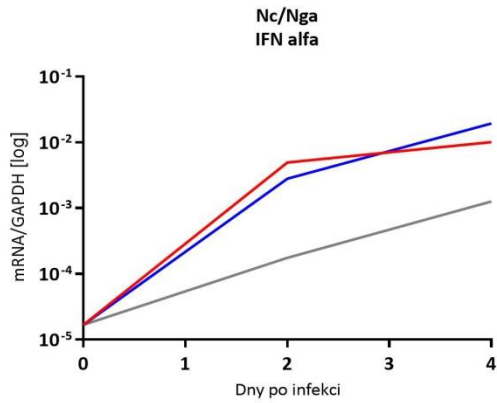
U neinfikovaných vzorků s aplikací PBS bylo pozorováno setrvalé zvýšení hladin mRNA pro IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\gamma$ , IL-12 a IL-17A, zatímco nárůst hladin do 2. dne po infekci a následná stagnace či pokles do 4. dne u iNOS, IL-1 $\beta$ , AIM2, TNF $\alpha$ , IL-4, IL-10 a TGF $\beta$ 1. Hladiny mRNA pro TGF $\beta$ 3 se v podstatě neměnily. Největší rozdíl v hladinách mRNA po infekci jednotlivými viry byl pozorován u IFN $\gamma$ , jehož hladiny byly po infekci WR-Luc v porovnání s WR-IRF3 přibližně 20x vyšší, a u IL-4, kde byly vyšší cca 14x. Na úrovni mRNA tedy došlo ke zvýšení exprese cytokinů klíčových pro Th1 i Th2 polarizaci imunitní odpovědi. Mírně zvýšené hladiny mRNA byly při infekci WR-IRF3 oproti WR-Luc pozorovány ve 2. den po infekci u IFN $\alpha$  a IFN $\beta$  a ve 4. den po infekci u TGF $\beta$ 3. Jediný cytokin, jehož hladiny mRNA byly u myší Nc/Nga výrazně zvýšeny po infekci WR-IRF3 v obou intervalech, byl IL-12.

Jde též o jediný z testovaných cytokinů, jehož hladiny byly po infekci WR-IRF3 zvýšeny v obou dnech u obou myších kmenů. V souhrnu exprese IRF-3 snižovala hladiny mRNA pro IFN $\gamma$ , iNOS, IL-1 $\beta$ , AIM2, TNF $\alpha$ , IL-17A, IL-4, IL-10 a TGF $\beta$ 1, respektive je přibližovala hladinám naměřeným u neinfikovaných myší.

U myší Balb/c byl efekt exprese rekombinantního IRF-3 různorodější než u Nc/Nga. U neinfikovaných vzorků bylo většinou pozorováno zvýšení hladin mRNA pro jednotlivé cytokiny a faktory ve 2. den po infekci a následná stagnace či pokles do 4. dne. Infekce WR-Luc vedla ve srovnání s neinfikovanými vzorky kůže ke zvýšení hladin mRNA pro IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-4 a naopak ke snížení u iNOS, TNF $\alpha$ , IL-12, IL-17A, TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 3.

Infekce WR-IRF3 vedla v porovnání s WR-Luc k nižším hladinám mRNA ve 2. den po infekci a následně k jejich zvýšení ve 4. den po infekci u mRNA pro IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , AIM2, IL-4, IL-10 a TGF $\beta$  1. Hladiny mRNA pro IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-17A byly 2. den po infekci srovnatelné u obou virů, avšak 4. den došlo ke zvýšení u infekce WR-IRF3 oproti WR-Luc. WR-IRF3 v porovnání s WR-Luc dále v obou pozorovaných intervalech zvyšoval hladiny mRNA pro IFN $\beta$ , TNF $\alpha$  a mírně pro iNOS. Jediný z pozorovaných cytokinů, jehož exprese byla u Balb/c snížena po infekci WR-IRF3 v obou intervalech byl TGF $\beta$ 3.

Výsledky jsou znázorněné na následujících grafech (obr. č. 18). Tabulky s relativními změnami detekovaných hladin v poměru jednak k neinfikovaným buňkám a jednak k hodnotám naměřených v čase 0 jsou vždy uvedeny pod příslušným grafem.



		GM	% GM SD			GM	% GM SD
TO		1,68E-05	19,25				
Den 2	mock	1,76E-04	2,78	Den 4	mock	1,22E-03	5,58
	WR-Luc	2,81E-03	1,84		WR-Luc	1,94E-02	1,64
	WR-IRF3	4,94E-03	2,14		WR-IRF3	1,01E-02	1,63

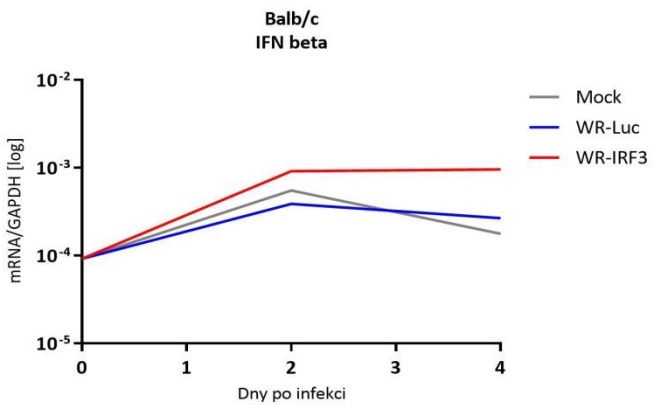
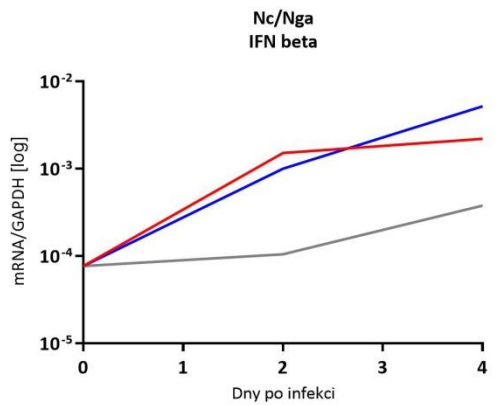
		GM	% GM SD			GM	% GM SD
TO		9,32E-05	3,17				
Den 2	mock	2,20E-04	2,48	Den 4	mock	3,27E-04	1,43
	WR-Luc	1,80E-03	2,70		WR-Luc	3,88E-04	2,06
	WR-IRF3	4,47E-04	1,76		WR-IRF3	1,04E-03	2,33

Relativní změna hladin vůči TO		
d.p.i.	2	4
mock	10,48	72,75
WR-Luc	167,69	1156,87
WR-IRF3	294,84	602,19

Relativní změna hladin vůči neinfikovaným myším		
d.p.i.	2	4
WR-Luc	16,00	15,90
WR-IRF3	28,13	8,28

Relativní změna hladin vůči TO		
d.p.i.	2	4
mock	2,36	3,51
WR-Luc	19,28	4,16
WR-IRF3	4,80	11,21

Relativní změna hladin vůči neinfikovaným myším		
d.p.i.	2	4
WR-Luc	8,19	1,19
WR-IRF3	2,04	3,19



		GM	% GM SD			GM	% GM SD
TO		7,70E-05	2,00				
Den 2	mock	1,05E-04	1,96	Den 4	mock	2,47E-04	2,83
	WR-Luc	1,00E-03	2,74		WR-Luc	5,19E-03	1,20
	WR-IRF3	1,52E-03	2,41		WR-IRF3	2,21E-03	1,23

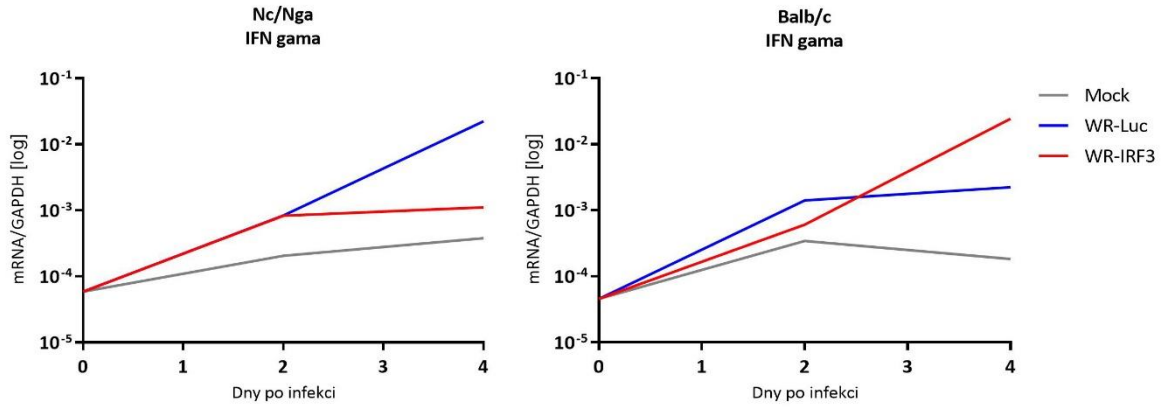
		GM	% GM SD			GM	% GM SD
TO		9,21E-05	1,37				
Den 2	mock	5,50E-04	2,43	Den 4	mock	1,77E-04	1,22
	WR-Luc	3,87E-04	3,92		WR-Luc	2,67E-04	1,61
	WR-IRF3	9,15E-04	1,60		WR-IRF3	9,55E-04	1,88

Relativní změna hladin vůči TO		
d.p.i.	2	4
mock	1,36	3,21
WR-Luc	13,02	67,49
WR-IRF3	19,76	28,68

Relativní změna hladin vůči neinfikovaným myším		
d.p.i.	2	4
WR-Luc	9,55	21,03
WR-IRF3	14,49	8,94

Relativní změna hladin vůči TO		
d.p.i.	2	4
mock	5,98	1,93
WR-Luc	4,20	2,90
WR-IRF3	9,93	10,37

Relativní změna hladin vůči neinfikovaným myším		
d.p.i.	2	4
WR-Luc	0,70	1,51
WR-IRF3	1,66	5,38



	GM	*± GM SD
TO	5,87E-05	1,39
Den 2	mock	2,06E-04
	WR-Luc	8,33E-04
	WR-IRF3	8,29E-04
Den 4	mock	3,80E-04
	WR-Luc	2,23E-02
	WR-IRF3	1,11E-03

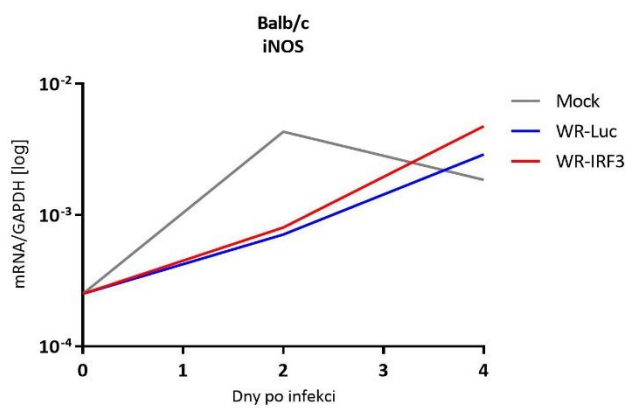
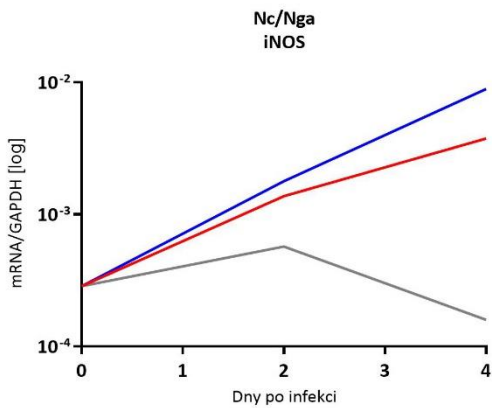
	GM	*± GM SD
TO	4,57E-05	1,26
Den 2	mock	3,42E-04
	WR-Luc	1,41E-03
	WR-IRF3	6,06E-04
Den 4	mock	1,82E-04
	WR-Luc	2,23E-03
	WR-IRF3	2,43E-02

Relativní změna hladin vůči TO		
d.p.i.	2	4
mock	3,50	6,47
WR-Luc	14,19	380,36
WR-IRF3	14,11	18,89

Relativní změna hladin vůči neinfikovaným myším		
d.p.i.	2	4
WR-Luc	4,05	58,79
WR-IRF3	4,03	2,92

Relativní změna hladin vůči TO		
d.p.i.	2	4
mock	7,48	3,98
WR-Luc	30,86	48,73
WR-IRF3	13,26	532,47

Relativní změna hladin vůči neinfikovaným myším		
d.p.i.	2	4
WR-Luc	4,13	12,24
WR-IRF3	1,77	133,76



	GM	*± GM SD
TO	2,86E-04	3,79
Den 2	mock	5,69E-04
	WR-Luc	1,78E-03
	WR-IRF3	1,37E-03
Den 4	mock	1,59E-04
	WR-Luc	8,88E-03
	WR-IRF3	3,75E-03

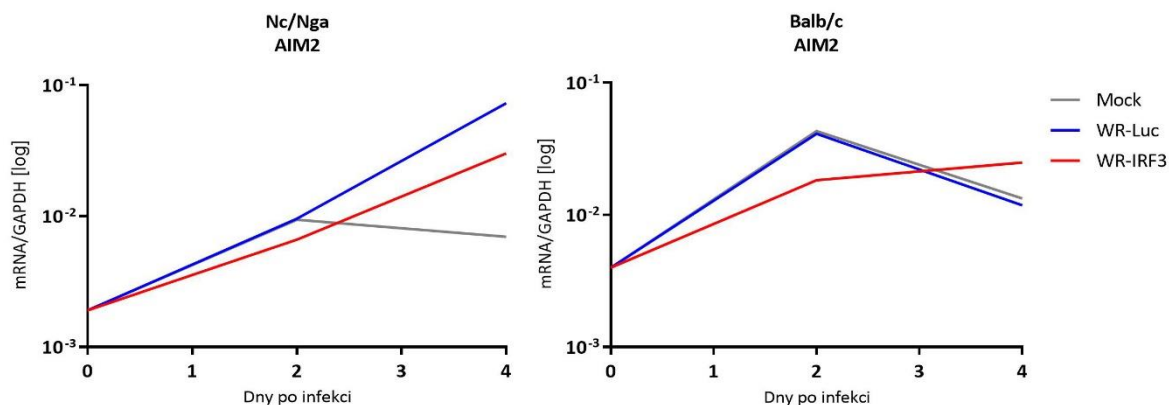
	GM	*± GM SD
TO	2,52E-04	2,37
Den 2	mock	4,32E-03
	WR-Luc	7,11E-04
	WR-IRF3	8,05E-04
Den 4	mock	1,86E-03
	WR-Luc	2,90E-03
	WR-IRF3	4,75E-03

Relativní změna hladin vůči TO		
d.p.i.	2	4
mock	1,99	0,55
WR-Luc	6,22	31,02
WR-IRF3	4,79	13,09

Relativní změna hladin vůči neinfikovaným myším		
d.p.i.	2	4
WR-Luc	3,13	56,01
WR-IRF3	2,41	23,64

Relativní změna hladin vůči TO		
d.p.i.	2	4
mock	17,17	7,39
WR-Luc	2,83	11,54
WR-IRF3	3,20	18,88

Relativní změna hladin vůči neinfikovaným myším		
d.p.i.	2	4
WR-Luc	0,16	1,56
WR-IRF3	0,19	2,55



		GM	*± GM SD			GM	*± GM SD
TO		1,91E-03	3,64				
Den 2	mock	9,40E-03	1,96	Den 4	mock	6,96E-03	2,87
	WR-Luc	9,55E-03	1,65		WR-Luc	7,29E-02	1,53
	WR-IRF3	6,61E-03	2,24		WR-IRF3	3,01E-02	1,24

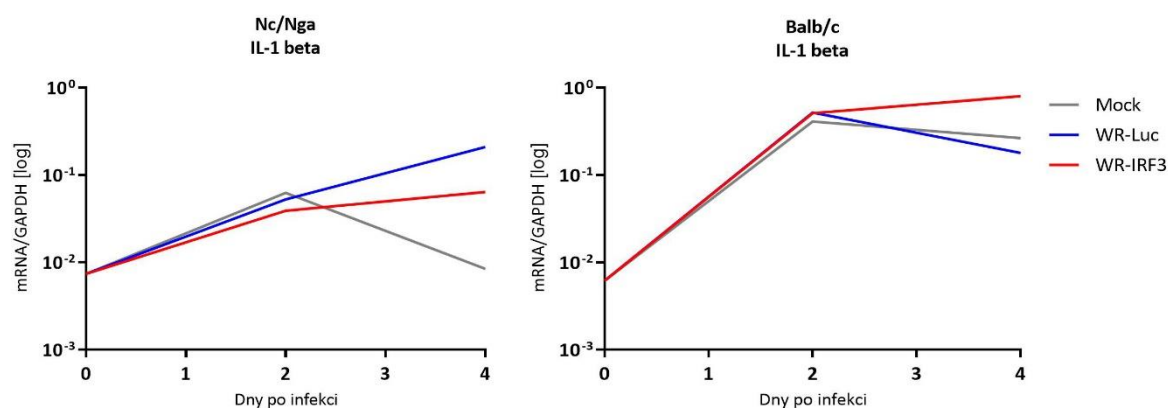
		GM	*± GM SD			GM	*± GM SD
TO		3,99E-03	1,33				
Den 2	mock	4,21E-02	1,25	Den 4	mock	1,23E-02	1,29
	WR-Luc	4,12E-02	2,53		WR-Luc	1,18E-02	1,24
	WR-IRF3	1,83E-02	1,55		WR-IRF3	2,49E-02	1,69

Relativní změna hladin vůči TO		
d.p.i.	2	4
mock	4,92	3,64
WR-Luc	5,00	38,19
WR-IRF3	3,46	15,75

Relativní změna hladin vůči neinfikovaným myším		
d.p.i.	2	4
WR-Luc	1,02	10,48
WR-IRF3	0,70	4,32

Relativní změna hladin vůči TO		
d.p.i.	2	4
mock	10,53	3,08
WR-Luc	10,32	2,96
WR-IRF3	4,59	6,25

Relativní změna hladin vůči neinfikovaným myším		
d.p.i.	2	4
WR-Luc	0,98	0,96
WR-IRF3	0,44	2,03



		GM	*± GM SD			GM	*± GM SD
TO		7,39E-03	3,55				
Den 2	mock	6,26E-02	6,02	Den 4	mock	1,08E-02	1,11
	WR-Luc	5,26E-02	2,81		WR-Luc	2,10E-01	1,15
	WR-IRF3	3,89E-02	2,32		WR-IRF3	6,40E-02	1,14

		GM	*± GM SD			GM	*± GM SD
TO		6,18E-03	1,98				
Den 2	mock	4,10E-01	3,43	Den 4	mock	2,65E-01	2,29
	WR-Luc	5,20E-01	6,65		WR-Luc	1,79E-01	1,27
	WR-IRF3	5,11E-01	2,16		WR-IRF3	8,00E-01	1,87

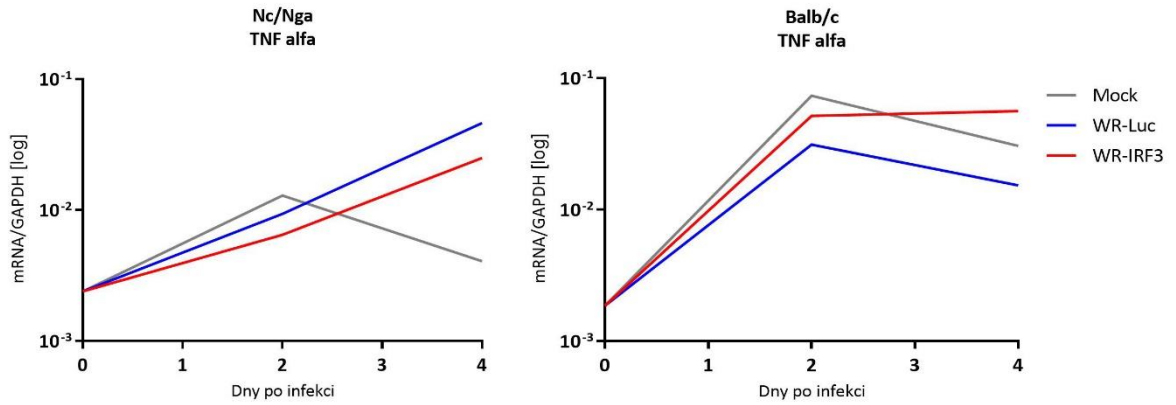
Relativní změna hladin vůči TO		
d.p.i.	2	4
mock	8,47	1,46
WR-Luc	7,12	28,40
WR-IRF3	5,27	8,65

Relativní změna hladin vůči neinfikovaným myším		
d.p.i.	2	4
WR-Luc	0,84	19,43
WR-IRF3	0,62	5,92

Relativní změna hladin vůči TO		
d.p.i.	2	4
mock	66,35	42,81
WR-Luc	84,10	28,92
WR-IRF3	82,62	129,39

Relativní změna hladin vůči neinfikovaným myším		
d.p.i.	2	4
WR-Luc	1,27	0,68
WR-IRF3	1,25	3,02





		GM	*± GM SD
Den 2	TO	2,39E-03	2,14
	mock	1,29E-02	3,31
	WR-Luc	9,36E-03	1,26
Den 4	WR-IRF3	6,48E-03	2,04

		GM	*± GM SD
Den 2	TO	4,06E-03	1,16
	mock	4,62E-02	1,18
	WR-Luc	4,62E-02	1,18
Den 4	WR-IRF3	2,50E-02	1,24

		GM	*± GM SD
Den 2	TO	1,86E-03	1,42
	mock	7,35E-02	4,61
	WR-Luc	3,12E-02	5,42
Den 4	WR-IRF3	5,15E-02	1,70

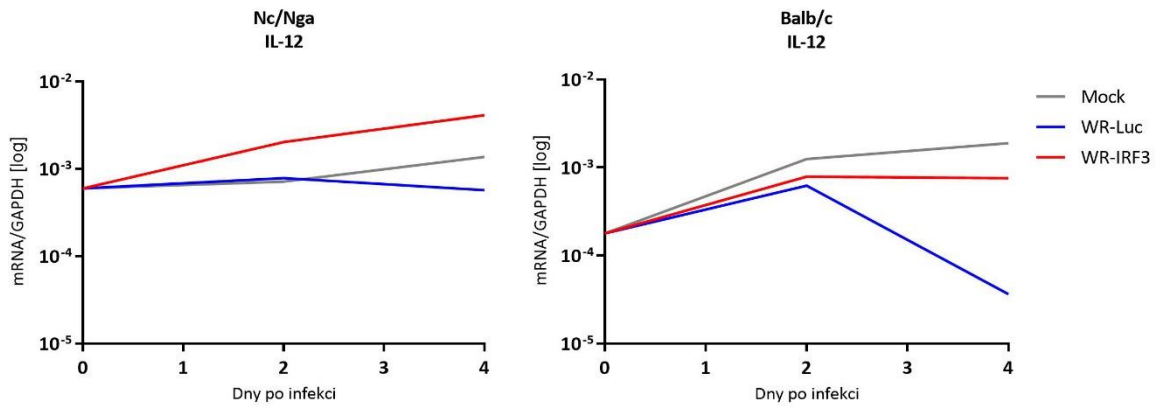
		GM	*± GM SD
Den 2	TO	3,05E-02	2,57
	mock	1,53E-02	1,61
	WR-Luc	1,53E-02	1,61
Den 4	WR-IRF3	5,62E-02	1,79

Relativní změna hladin vůči TO		
d.p.i.	2	4
mock	5,41	1,70
WR-Luc	3,92	19,32
WR-IRF3	2,71	10,48

Relativní změna hladin vůči neinfikovaným myším		
d.p.i.	2	4
WR-Luc	0,72	11,37
WR-IRF3	0,50	6,17

Relativní změna hladin vůči TO		
d.p.i.	2	4
mock	39,47	16,37
WR-Luc	16,76	8,21
WR-IRF3	27,64	30,19

Relativní změna hladin vůči neinfikovaným myším		
d.p.i.	2	4
WR-Luc	0,42	0,50
WR-IRF3	0,70	1,84



		GM	*± GM SD
Den 2	TO	5,96E-04	3,25
	mock	7,15E-04	1,75
	WR-Luc	7,82E-04	1,57
Den 4	WR-IRF3	2,02E-03	1,39

		GM	*± GM SD
Den 2	TO	1,37E-03	1,50
	mock	1,37E-03	1,50
	WR-Luc	5,70E-04	1,95
Den 4	WR-IRF3	4,12E-03	1,94

		GM	*± GM SD
Den 2	TO	1,78E-04	2,67
	mock	1,25E-03	1,70
	WR-Luc	6,22E-04	10,14
Den 4	WR-IRF3	7,88E-04	2,62

		GM	*± GM SD
Den 2	TO	1,89E-03	1,52
	mock	1,89E-03	1,52
	WR-Luc	3,65E-05	1,95
Den 4	WR-IRF3	7,58E-04	3,78

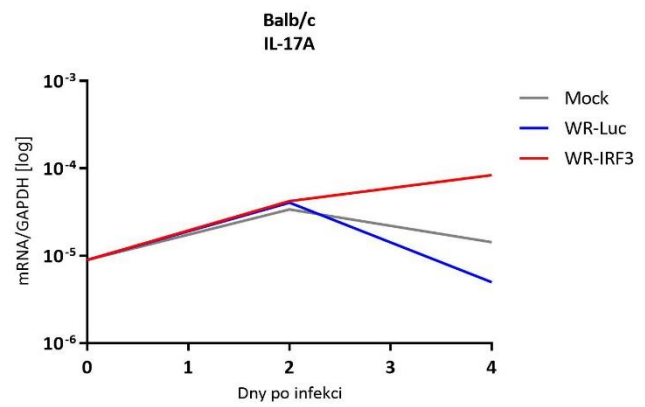
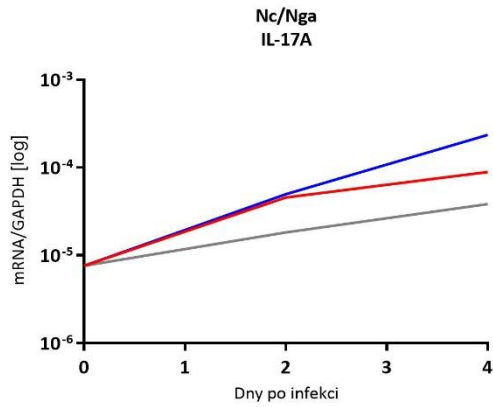
Relativní změna hladin vůči TO		
d.p.i.	2	4
mock	1,20	2,29
WR-Luc	1,31	0,96
WR-IRF3	3,40	6,91

Relativní změna hladin vůči neinfikovaným myším		
d.p.i.	2	4
WR-Luc	1,09	0,42
WR-IRF3	2,83	3,02

Relativní změna hladin vůči TO		
d.p.i.	2	4
mock	7,01	10,64
WR-Luc	3,50	0,21
WR-IRF3	4,44	4,26

Relativní změna hladin vůči neinfikovaným myším		
d.p.i.	2	4
WR-Luc	0,50	0,02
WR-IRF3	0,63	0,40





		GM	*± GM SD			GM	*± GM SD
TO		7,61E-06	1,88				
Den 2	mock	1,83E-05	1,41	Den 4	mock	1,64E-05	2,07
	WR-Luc	4,96E-05	2,55		WR-Luc	2,35E-04	1,80
	WR-IRF3	4,91E-05	2,62		WR-IRF3	8,91E-05	1,61

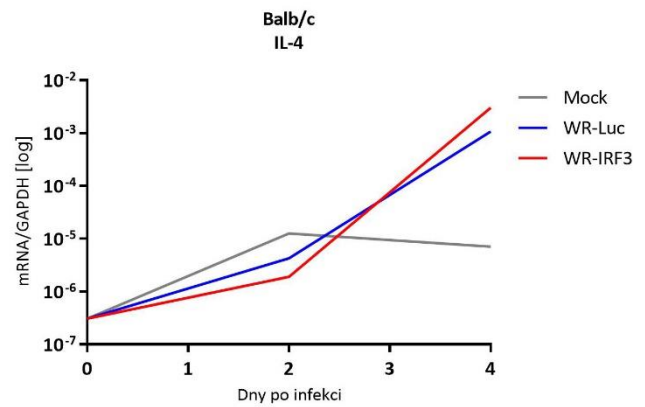
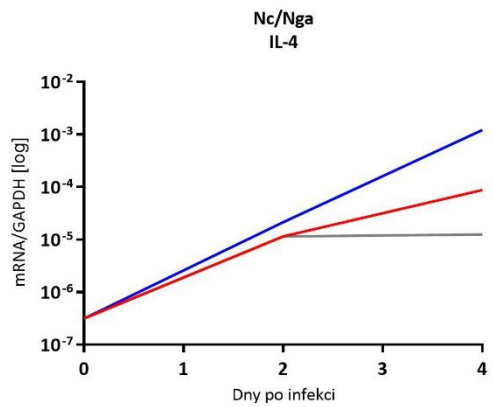
		GM	*± GM SD			GM	*± GM SD
TO		5,08E-06	2,83				
Den 2	mock	3,39E-05	1,97	Den 4	mock	1,43E-05	4,30
	WR-Luc	4,06E-05	3,93		WR-Luc	5,00E-06	3,48
	WR-IRF3	4,24E-05	3,17		WR-IRF3	8,38E-05	2,87

Relativní změna hladin vůči TO		
d.p.i.	2	4
mock	2,40	2,16
WR-Luc	6,52	30,82
WR-IRF3	6,45	11,71

Relativní změna hladin vůči neinfikovaným myším		
d.p.i.	2	4
WR-Luc	2,71	14,30
WR-IRF3	2,49	5,43

Relativní změna hladin vůči TO		
d.p.i.	2	4
mock	6,67	2,81
WR-Luc	8,00	0,98
WR-IRF3	8,34	16,49

Relativní změna hladin vůči neinfikovaným myším		
d.p.i.	2	4
WR-Luc	1,20	0,35
WR-IRF3	1,25	5,86
WR-Luc	1,20	0,35



		GM	*± GM SD			GM	*± GM SD
TO		3,77E-07	2,23				
Den 2	mock	1,15E-05	1,44	Den 4	mock	1,25E-05	1,77
	WR-Luc	2,13E-05	1,56		WR-Luc	1,22E-03	1,61
	WR-IRF3	1,15E-05	2,03		WR-IRF3	8,81E-05	3,51

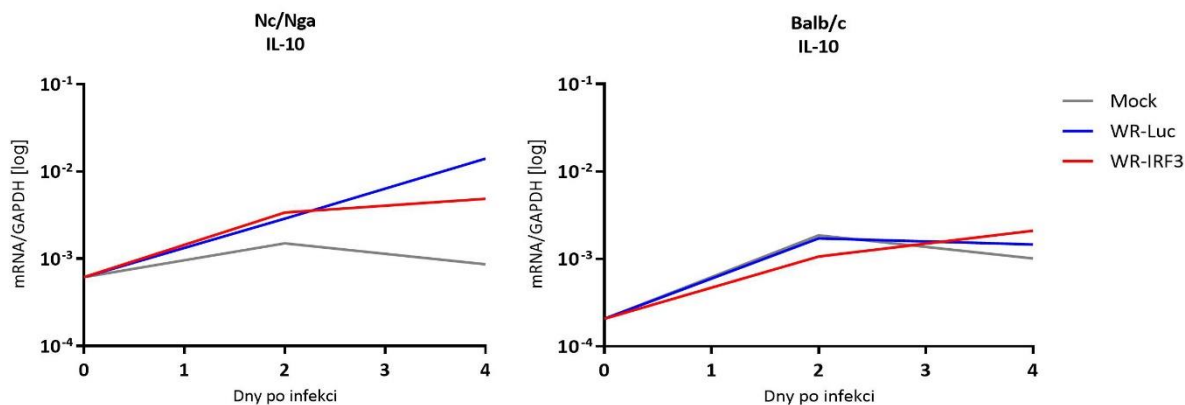
		GM	*± GM SD			GM	*± GM SD
TO		3,09E-07	28,50				
Den 2	mock	1,27E-05	3,05	Den 4	mock	7,11E-06	2,49
	WR-Luc	1,38E-06	16,59		WR-Luc	1,07E-03	1,99
	WR-IRF3	1,92E-06	36,01		WR-IRF3	3,03E-03	2,53

Relativní změna hladin vůči TO		
d.p.i.	2	4
mock	30,58	33,24
WR-Luc	56,63	3237,69
WR-IRF3	30,62	233,96

Relativní změna hladin vůči neinfikovaným myším		
d.p.i.	2	4
WR-Luc	1,85	97,41
WR-IRF3	1,00	7,04

Relativní změna hladin vůči TO		
d.p.i.	2	4
mock	41,02	23,01
WR-Luc	4,47	3472,88
WR-IRF3	6,21	9810,77

Relativní změna hladin vůči neinfikovaným myším		
d.p.i.	2	4
WR-Luc	0,34	150,92
WR-IRF3	0,15	426,34



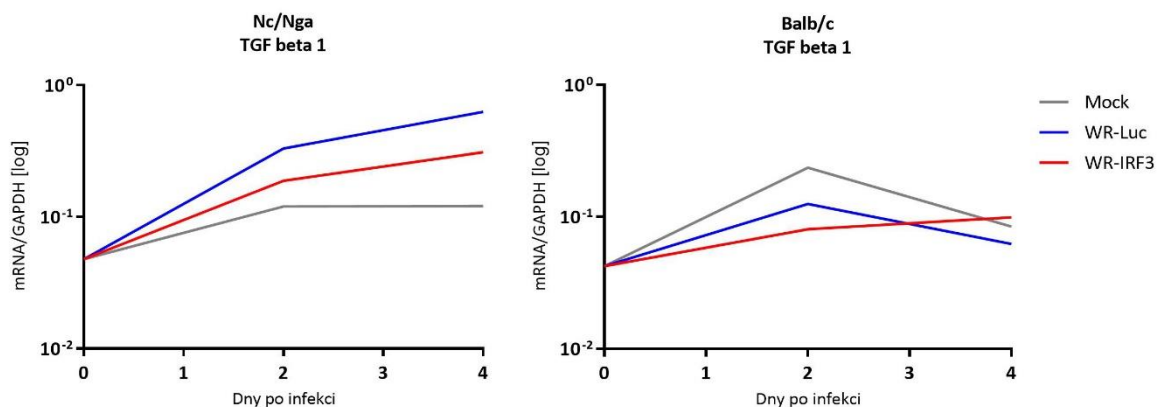
			GM	*± GM SD				GM	*± GM SD
Den 2	TO		6,16E-04	1,99	Den 4	TO		8,65E-04	1,38
	mock	1,50E-03	1,68	WR-Luc		1,40E-02	2,03		
	WR-Luc	2,87E-03	1,68	WR-IRF3		4,86E-03	1,41		
	WR-IRF3	3,38E-03	3,86						

Relativní změna hladin vůči TO		
d.p.i.	2	4
mock	2,43	1,41
WR-Luc	4,65	22,66
WR-IRF3	5,49	7,89

Relativní změna hladin vůči neinfikovaným myším		
d.p.i.	2	4
WR-Luc	1,91	16,12
WR-IRF3	2,25	5,61

Relativní změna hladin vůči TO		
d.p.i.	2	4
mock	9,02	4,91
WR-Luc	8,29	7,08
WR-IRF3	5,16	10,19

Relativní změna hladin vůči neinfikovaným myším		
d.p.i.	2	4
WR-Luc	0,92	1,44
WR-IRF3	0,57	2,08



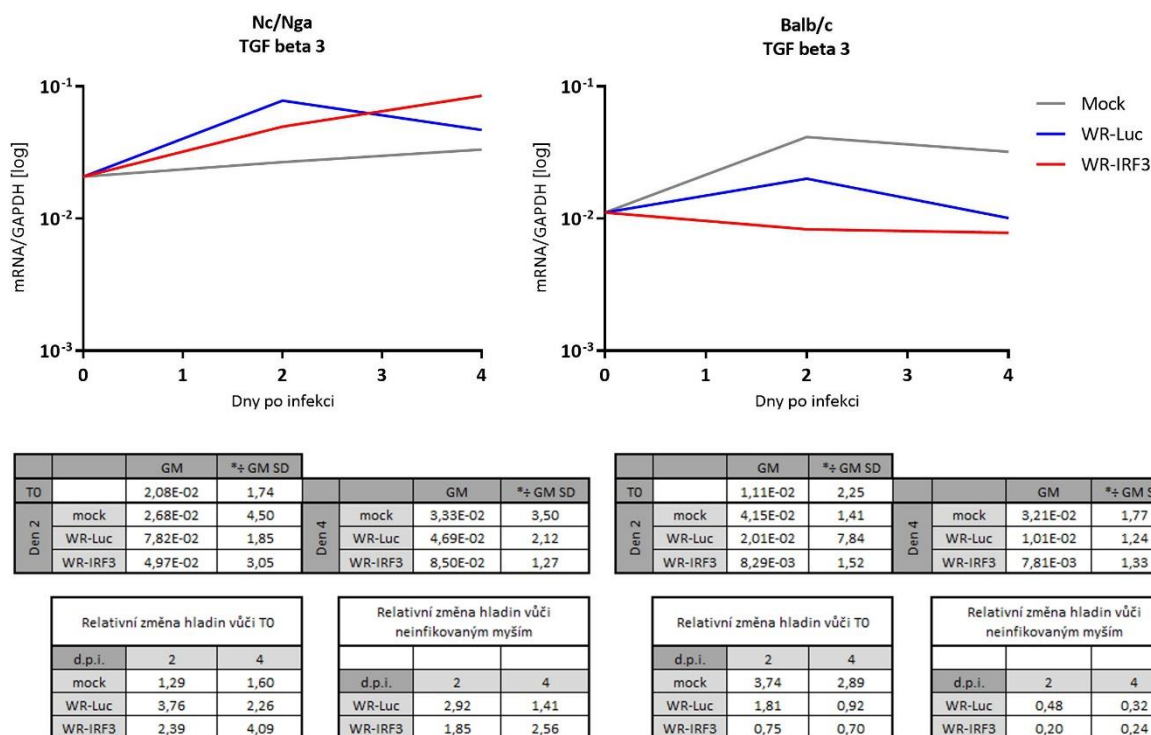
			GM	*± GM SD				GM	*± GM SD
Den 2	TO		4,77E-02	1,35	Den 4	TO		1,21E-01	3,73
	mock	1,20E-01	1,93	WR-Luc		6,28E-01	1,06		
	WR-Luc	3,31E-01	1,58	WR-IRF3		3,10E-01	1,27		
	WR-IRF3	1,88E-01	3,42						

Relativní změna hladin vůči TO		
d.p.i.	2	4
mock	2,52	2,53
WR-Luc	6,93	13,15
WR-IRF3	3,95	6,49

Relativní změna hladin vůči neinfikovaným myším		
d.p.i.	2	4
WR-Luc	2,75	5,21
WR-IRF3	1,56	2,57

Relativní změna hladin vůči TO		
d.p.i.	2	4
mock	5,61	2,00
WR-Luc	2,97	1,48
WR-IRF3	1,91	2,35

Relativní změna hladin vůči neinfikovaným myším		
d.p.i.	2	4
WR-Luc	0,53	0,74
WR-IRF3	0,34	1,18



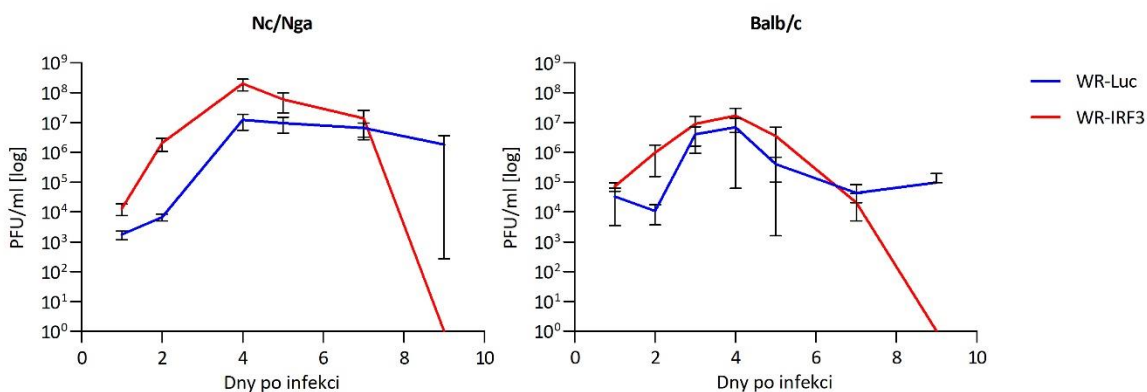
Obrázek č. 18: Expresí cytokinů a dalších faktorů na úrovni mRNA v kůži myších kmenů Nc/Nga a Balb/c v čase 0 a ve 2 a 4 dnech po intradermální inokulaci rekombinantních virů. Infekční dávka  $7,5 \times 10^5$  PFU/myš. Hodnoty byly normalizovány na GAPDH mRNA. Standardní odchylky pro geometrické průměry u jednotlivých hodnot a relativní změny vztahované k času 0 a k neinfikovaným myším jsou uvedeny v tabulkách pod grafy. Výsledky z jednoho pokusu prováděného v triplicátech ( $n = 3$ ). Mock – neinfikované myši (aplikace PBS); d.p.i. – den po infekci; GM – geometrický průměr.

## 5.2.2 Stanovení titru viru v kůžích Balb/c a Nc/Nga po inokulaci WR-Luc a WR-IRF3

Kvalita i intenzita imunitní odpovědi je mimo jiné ovlivňována výší virového inokula a jeho replikací v infikované tkáni. Naopak imunitní mechanismy ovlivňují růst viru a jeho šíření. Růst VACV byl stanovován u myší Balb/c a Nc/Nga, které byly intradermálně inokulovány rekombinantními viry WR-Luc a WR-IRF3 v dávce  $10^4$  PFU/myš. V každém pozorovaném intervalu byly usmrceny tři myši a v jejich kůžích byl stanoven titr viru. Z těchto pokusů je patrné, že růst viru v kůžích infikovaných myší byl ovlivněn expresí rekombinantního IRF-3. Tento efekt byl u obou myších kmenů srovnatelný a obdobný jako v tkáňových kulturách myších fibroblastů NIH 3T3. U obou kmenů byl titr WR-IRF3 mírně vyšší než u WR-Luc po celou dobu pozorování kromě 9. dne po infekci, kdy titr WR-IRF3 klesal k nule, zatímco titr WR-Luc zůstával srovnatelný se stavem v 7. dni po infekci. Viz obr. č. 19.

Stanovení titru charakterizuje jen množství infekce schopných virionů. Na imunitní odpověď ale může mít vliv i množství neinfekčních virových částic přítomných v inokulu. Replikaci viru je možno charakterizovat pomocí DNA replikujícího se viru i ve fázi, kdy ještě nejsou sestavené nové infekční viriony (vše bývá v nadbytku). Byl tedy proveden pokus, kdy byly odebrány vzorky kůží i.d. inokulovaných samic Nc/Nga po inokulaci WR-Luc nebo WR-IRF3, byla z nich vyzolována DNA, a ta

použita pro qPCR analýzu. Shodně s titrací kvantifikace VACV DNA ukázala vyšší hladiny v případě inokulace WR-IRF3 než v případě WR-Luc. Nicméně tato metoda je zdlouhavá a citlivá na kontaminaci neinfikovaných vzorků (hladina VACV DNA byla detekovaná i v neinfikovaných vzorcích) a proto od ní bylo upuštěno.



Obrázek č. 19: Stanovení titru virů WR-Luc a WR-IRF3 v kůžích Nc/Nga a Balb/c myší po intradermální inokulaci v intervalech od 1 do 9 dnů po infekci. Infekční dávka  $10^4$  PFU/myš. Výsledky z jednoho pokusu prováděného v triplikátech ( $n=3$ ). Chybové úsečky – SEM.

### 5.2.3 Detekce cytokinů ve slezinách intranasálně infikovaných myší na úrovni mRNA

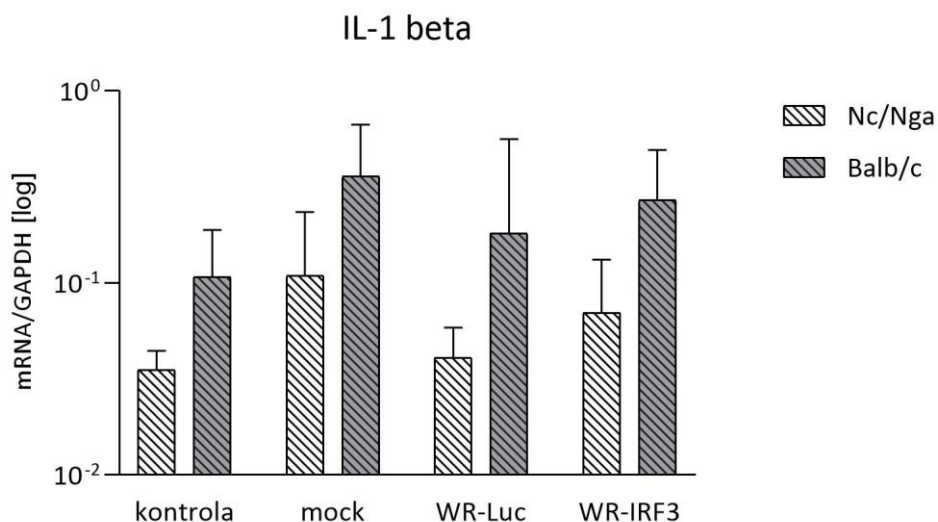
Slezina je důležitým sekundárním lymfatickým orgánem, kde se odehrává řada klíčových procesů podstatných pro navození adaptivní imunitní odpovědi. Proto byly níže uvedené cytokiny detekovány na úrovni mRNA a později i proteinů i ve slezinách i.n. infikovaných myší.

Pro určení vhodného intervalu pro odběr slezin po intranasální infekci VACV bylo v první fázi infikováno 10 Balb/c myší rekombinantním virem WR-IRF3. Inokulum o objemu  $10 \mu\text{l}$  a infekční dávce  $4,37 \times 10^5$  PFU/myš bylo myším vpraveno pipetou do jedné nozdry. Myši byly následně usmrceny v intervalech 0, 1, 3, 5 a 8 dní po infekci (vždy po dvou jedincích). Ze slezin odebraných těmito myším byla izolována RNA pro RT-qPCR analýzu. Byla stanovena hladina mRNA pro cytokin IL-1 $\beta$  a jeho exprese byla normalizována na GAPDH. Na základě těchto výsledků byl k dalším pokusům vybrán den 3 po infekci.

Pro samotný pokus byly Balb/c a Nc/Nga myši infikovány rekombinantními WR-Luc a WR-IRF3 výše popsaným způsobem a usmrceny 3. den po infekci. Exprese IL-1 $\beta$  ve slezině byla charakterizována na úrovni mRNA pomocí RT-qPCR.

U obou myších kmenů byla pozorována vyšší exprese IL-1 $\beta$  v případě infekce WR-IRF3. V obou myších kmenech bylo toto zvýšení srovnatelné. Viz obr. č. 20. U obou myších kmenů též došlo

k poklesu detekovaných hladin mRNA pro IL-1 $\beta$  po infekci oběma viry v porovnání s hladinami naměřenými u neinfikovaných myší (viz. tabulka č. 14).



Obrázek č. 20: Hladiny mRNA pro IL-1 $\beta$  normalizované na GAPDH mRNA ve slezinách myší Balb/c a Nc/Nga po intranasální infekci WR-Luc a WR-IRF v intervalu 3 dny po infekci. Infekční dávka 4,37x10<sup>5</sup> PFU/myš. Výsledky z jednoho pokusu provedeného v triplicátech (n = 3). Mock – neinfikované myši (aplikace PBS); kontrola – čas 0. Chybové úsečky – standardní odchylka pro geometrický průměr.

	Nc/Nga	Balb/c
WR-Luc	0,37	0,51
WR-IRF3	0,64	0,76

Tabulka č. 14: Relativní změny v hladinách mRNA pro IL-1 $\beta$  ve slezinách intranasálně infikovaných myší vztažené k neinfikovaným myším ve 3 d.p.i. Výsledky z jednoho pokusu provedeného v triplicátech (n = 3).

#### 5.2.4 Detekce cytokinů v supernatantech splenocytů intranasálně infikovaných myší na úrovni proteinů

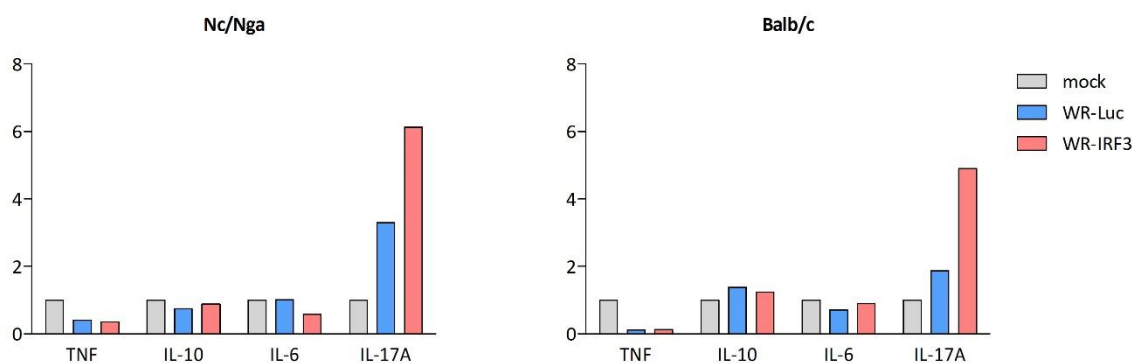
Pro detekci cytokinů ve slezinách byly samice myší Balb/c a Nc/Nga intranasálně infikovány rekombinantními viry WR-Luc a WR-IRF3 v dávce 10<sup>6</sup> PFU/myš. Třetí den po infekci byly tyto myši usmrceny a byly jim odebrány sleziny, z nichž byly připraveny suspenze splenocytů v 10% FBS-RPMI o koncentraci 10x10<sup>6</sup> buněk/ml. Splenocyty byly inkubovány 24 h a následně odebrány supernatanty pro analýzu produkovaných cytokinů. Koncentrace jednotlivých cytokinů byly stanoveny pomocí Th1/Th2/Th17 CBA kitu. V analyzovaných vzorcích stanovena koncentrace sedmi cytokinů – IL-2, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-10, IL-4, IL-17A a IL-6.

Naměřené hodnoty byly u cytokinů IFN $\gamma$ , IL-2, IL-4 a částečně IL-17A na hranici citlivosti eseje, a tudíž obtížně hodnotitelné. Celkově vyšší hodnoty byly nalezeny pro TNF, IL-10 a IL-6.

V supernatantu splenocytů myší obou kmenů byly v důsledku i.n. infekce oběma rekombinantními viry hladiny TNF několikrát sníženy oproti neinfikované kontrole, které bylo

aplikováno pouze 1x PBS. Hladiny IL-10 se zdají být mírně zvýšeny v případě obou rekombinantních virů u Balb/c a naopak sníženy u Nc/Nga. Hladiny IL-6 se zdají být poněkud sníženy infekcí WR-Luc u Balb/c a infekcí WR-IRF3 u Nc/Nga. IL-17A se zdá být zvýšen v supernatantu slezin myši infikovaných oběma viry, a to u obou kmenů. Nicméně toto zvýšení je vyšší v případě WR-IRF3. Viz obr. č. 21.

Tyto výsledky je však třeba považovat za pouze orientační a pokus bude třeba zopakovat.



Obrázek č. 14: Změny hladin TNF, IL-10, IL-6 a IL-17A v supernatantu splenocytů myši Balb/c a Nc/Nga po intranasální infekci WR-Luc a WR-IRF v intervalu 3 dny po infekci. Infekční dávka  $10^6$  PFU/myš. Relativní změny hladin jednotlivých cytokinů u infikovaných myši vůči neinfikovaným myším detekované pomocí CBA kitu. Mock – neinfikované myši (aplikace PBS). Výsledky z jednoho pokusu ( $n = 3$  - infikované myši Balb/c a WR-IRF3 u Nc/Nga;  $n = 2$  – neinfikované myši u obou kmenů a WR-Luc u Nc/Nga).

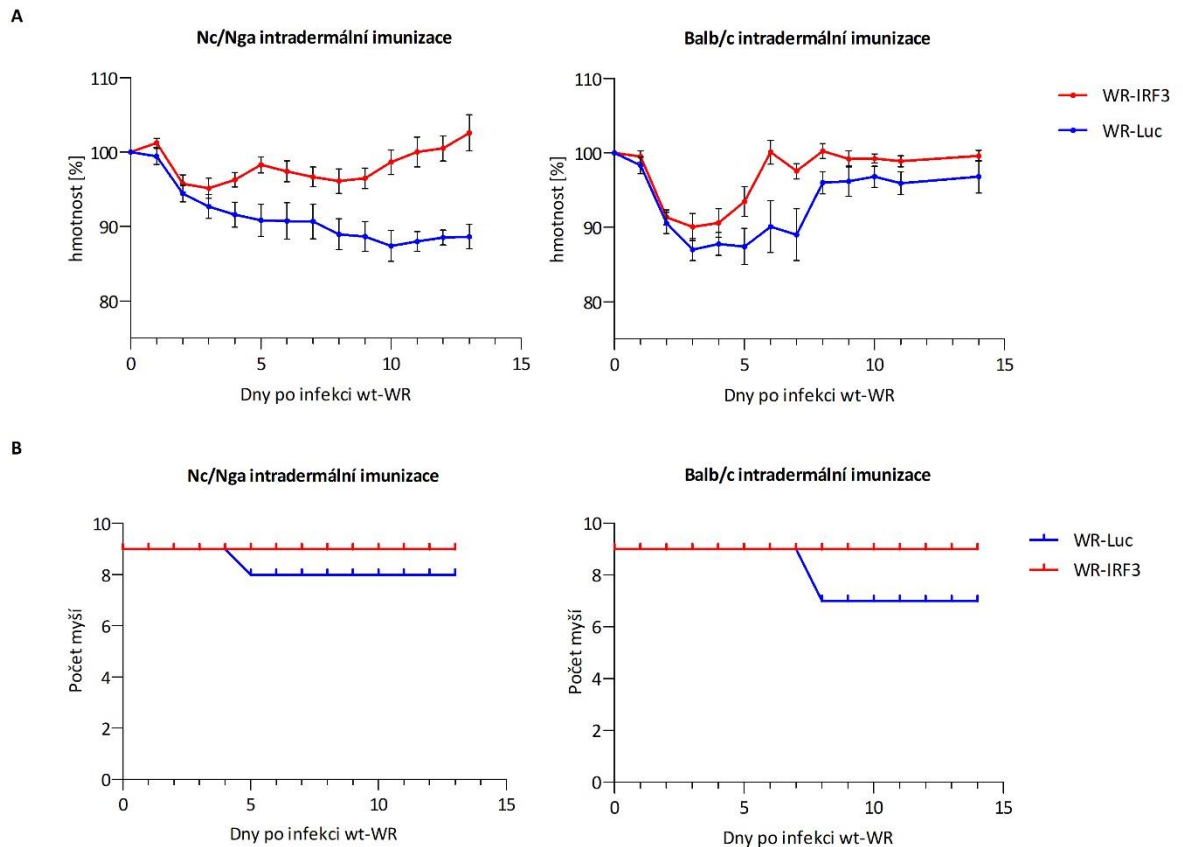
### 5.2.5 Protektivní pokusy

Pro posouzení efektu WR-IRF3 na navození protektivní imunity proti letální infekci wt-WR byly myši Balb/c a Nc/Nga imunizovány rekombinantními viry WR-Luc a WR-IRF3, a to 24 dní před letální infekcí. Tato inokulace byla prováděna jak intradermálně (i.d.), tak intranasálně (i.n.). Po i.n. aplikaci letální dávky wt-WR byly myši denně pozorovány a váženy. Pokud nedošlo k úmrtí v důsledku infekce, byly tyto myši mezi 12. a 15. dnem po infekci wt-WR usmrceny.

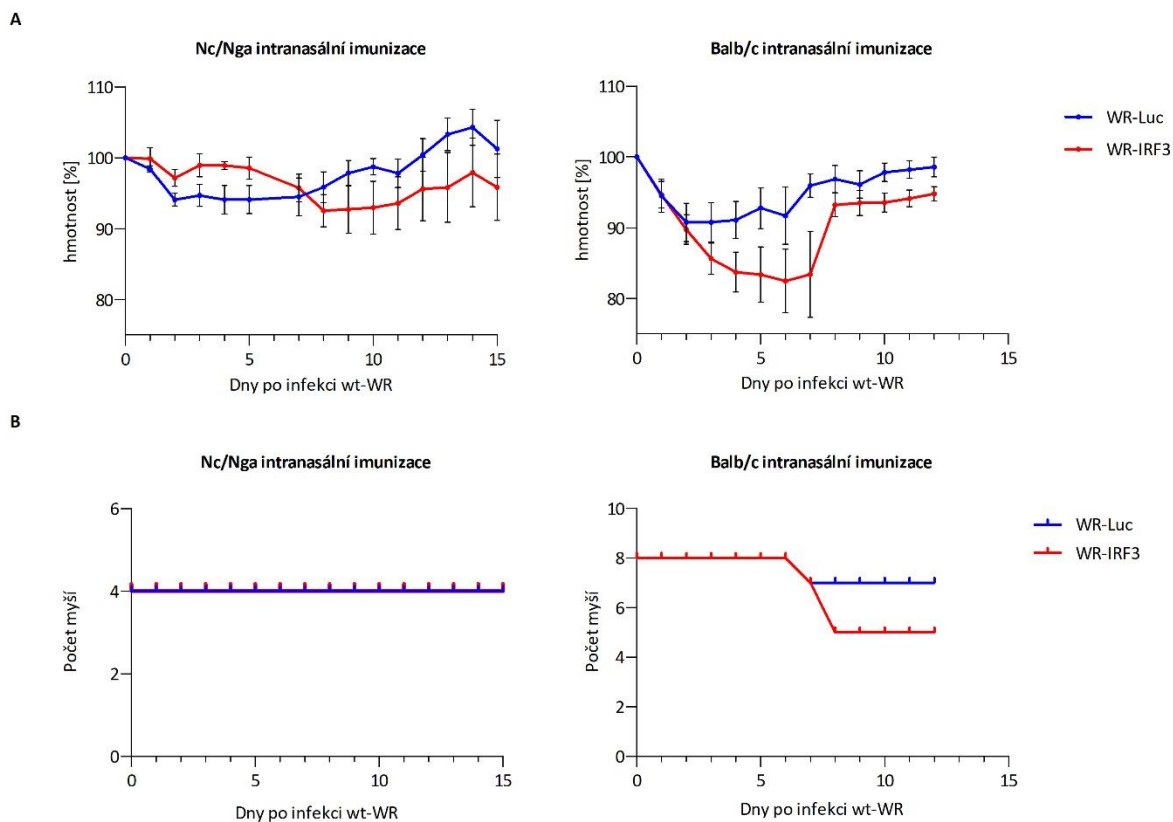
Myši byly imunizovány různými dávkami obou virů - navození protektivní imunity bylo závislé na imunizační dávce viru a na způsobu imunizace. V případě Nc/Nga myši bylo též patrné, že u i.d. imunizace ovlivňuje navození protektivní imunity i pohlaví myši (u samců dochází k rozvoji ekzému), zatímco u Balb/c tento efekt pozorován nebyl. V případě i.d. imunizace dávkou  $10^4$  PFU/myš byla navozena lepší protektivní imunita při imunizaci pomocí WR-IRF3 u obou kmenů, jak je patrné jednak z váhových úbytků u infikovaných myši (obr. č. 22 – A) a jednak ze skutečnosti, že v případě i.d. imunizace pomocí WR-IRF3 žádná myš po letální infekci nezemřela. V případě i.d. imunizace pomocí WR-Luc z devíti letálně infikovaných myši ve skupině zemřela jedna u myši Nc/Nga a dvě u Balb/c (obr. č. 22 – B). Při i.n. imunizaci stejnou imunizační dávkou ( $10^4$  PFU/myš) byl pozorován efekt na



úbytek váhy myší po letální infekci spíše opačný (obr. č. 23 – A). U Nc/Nga nedošlo k žádnému úmrtí, ale od 7. dne po infekci ubývaly myši imunizované WR-IRF3 více na váze než myši imunizované WR-Luc. U myší Balb/c byl tento efekt ještě výraznější. Myši imunizované WR-Luc byly od začátku v lepší kondici a z osmi zemřela jedna, zatímco u myší imunizovaných WR-IRF3 to byly tři z osmi (obr. č. 23 - B).



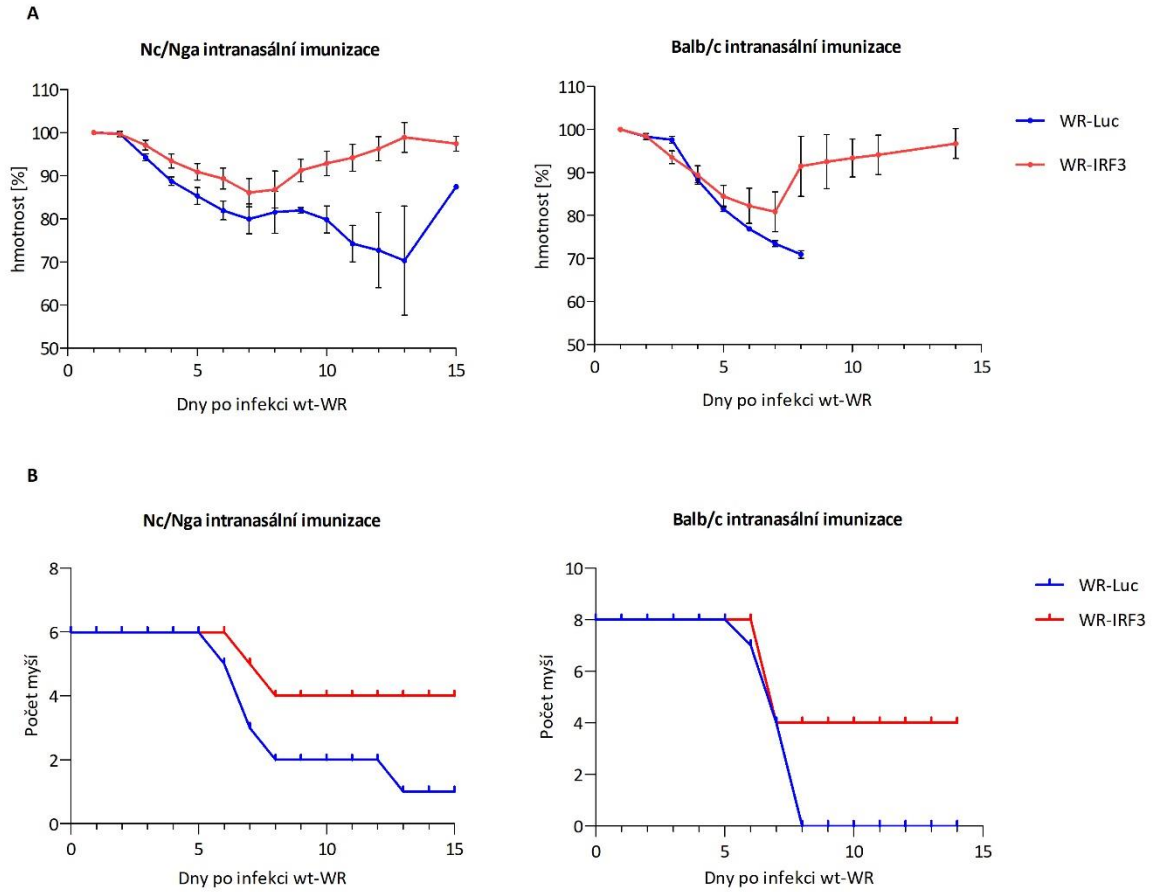
Obrázek č. 22: A) Váhové úbytky a B) úmrtnost samic myší Nc/Nga a Balb/c po letální infekci wt-WR po předchozí i.d. imunizaci WR-Luc a WR-IRF3. Imunizační dávka  $10^4$  PFU/myš. (Balb/c: n = 9; Nc/Nga: n = 9). Panel A, chybové úsečky – SEM.



Obrázek č. 23: A) Váhové úbytky a B) úmrtnost samic myši Nc/Nga a Balb/c po letální infekci wt-WR po předchozí intranasální imunizaci viry WR-Luc a WR-IRF3. Imunizační dávka  $10^4$  PFU/myš. (Balb/c:  $n = 8$ ; Nc/Nga:  $n = 4$ ). Panel A, chybové úsečky – SEM.

Přestože výše popsané pokusy by mohly vést k závěru, že po intranasální imunizaci dochází zejména u Balb/c k lepšímu navození protektivní imunity pomocí WR-Luc, pokusy s nižší imunizační dávkou naznačují opak. Když byly oba kmeny myši imunizovány intranasálně dávkou  $10^3$  PFU/myš, myši obou kmenů ubývaly na váze více v případě imunizace pomocí WR-Luc než v případě WR-IRF3 (obr. č. 24 – A). Rovněž úmrtnost byla vyšší v případě imunizace pomocí WR-Luc, a to opět u obou myších kmenů (obr. č. 24 – B).





Obrázek č. 24: A) Váhové úbytky a B) úmrtnost samic myši Nc/Nga a Balb/c po letální infekci wt-WR po předchozí intranasální imunizaci pomocí WR-Luc potažmo WR-IRF3. Imunizační dávka  $10^3$  PFU/myš. (Nc/Nga: n = 6; Balb/c: n = 8). Panel A - chybové úsečky – SEM.

## 6 Diskuze

Tato práce charakterizuje některé vlastnosti rekombinantního viru WR-IRF3, který byl původně zkonstruován jako kandidát na bezpečnější vakcínu proti pravým neštovicím pro atopiky, a to v kontextu buněčných linií NIH 3T3, BSC-40, J744.G8 a myších kmenů Nc/Nga a Balb/c.

V první řadě byla ověřena exprese IRF-3 virem WR-IRF3 v infikovaných buňkách na úrovni mRNA i proteinu. Endogenní IRF-3 je konstitutivně exprimován celou škálou různých buněčných typů. Po aktivaci PRR a příslušných signálních kaskád dochází k jeho fosforylaci, dimerizaci a následné translokaci do jádra (Servant et al. 2001). Infekce v rané fázi tedy nevede v první řadě ke zvýšení exprese tohoto faktoru, ale k jeho posttranslační modifikaci. V souladu s tím v této práci nebyla u buněk infikovaných kontrolním virem WR-Luc v porovnání s neinfikovanými buňkami detekována statisticky významná změna v expresi IRF-3 na úrovni mRNA. V případě infekce WR-IRF3 byl jak v buněčné linii NIH 3T3 tak v J774.G8 pozorován nárůst hladin IRF-3 mRNA i proteinu. Přestože je endogenní IRF-3 exprimován konstitutivně, použitými metodami se jej v buněčných liniích nepodařilo detekovat na úrovni proteinu, neboť jeho hladiny jsou podstatně nižší než hladiny virem exprimovaných genů.

VACV kóduje celou řadu imunomodulačních faktorů. Některé z nich přímo inhibují fosforylaci či aktivitu IRF-3 jako proteiny C6 a N2 (Unterholzner et al. 2011, Ferguson et al. 2013). Další faktory jako proteiny K7 a A49 zase slouží pro inhibici aktivace NF- $\kappa$ B transkripčního faktoru (Benfield et al. 2013, Mansur et al. 2013). Bylo pozorováno, že oba tyto transkripční faktory se podílejí na aktivaci transkripce IFN $\beta$  (Garoufalidis et al. 1994). V buňkách infikovaných VACV tedy dochází vlivem infekce k indukci exprese IFN $\beta$  a celé řady dalších cytokinů a zároveň k aktivnímu potlačování této exprese vakcíniovými produkty. V infikovaných buňkách NIH 3T3 mnou byla na úrovni mRNA stanovena exprese IFN $\beta$ . Exprese byla zvýšena v případě infekce oběma viry, nicméně v případě WR-IRF3 bylo zvýšení větší. To poukazuje na to, že v důsledku exprese rekombinantního IRF-3 zjevně dochází do určité míry k obejití bloku fosforylace IRF-3.

Na úrovni mRNA byla v této buněčné linii detekována také exprese AIM2 a IL-1 $\beta$ . AIM2 se jako senzor cytoplazmatické dsDNA podílí na aktivaci kaspázy-1, jejíž aktivitu inhibuje VACV-kódovaný SPI-2. VACV tak inhibuje funkci inflammasomu a štěpení pro-IL-1 $\beta$  na aktivní IL-1 $\beta$  (Kettle et al. 1997). Zároveň je aktivace IRF-3, následná produkce IFN $\beta$  a signalizace skrze IFNAR důležitá pro dostatečnou aktivaci AIM2 (Fernandes-Alnemri et al. 2010). Avšak na úrovni transkripce nebyly v expresi AIM2 v linii NIH 3T3 pozorovány žádné rozdíly v důsledku infekce ani v důsledku exprese rekombinantního IRF-3.

Na úrovni mRNA však bylo při expresi rekombinantního IRF-3 a IFN $\beta$  v této práci detekováno zvýšení exprese IL-1 $\beta$ , zatímco v odborné literatuře byla popsána řada případů, kdy exprese IFN typu I

vedla ke snížení exprese IL-1 $\beta$  a dalších prozánětlivých cytokinů (Guarda et al. 2011; Castiglia et al. 2016). I u přímé overexprese exogenního IRF-3 bylo pozorováno snížení exprese IL-1 $\beta$  a dalších protizánětlivých cytokinů (Tarassishin et al. 2011).

Expres IL-1 $\beta$  je dle dostupné literatury zprostředkována především transkripčním faktorem NF- $\kappa$ B. Aby bylo možné rozlišit, zda je zvýšení exprese IL-1 $\beta$  při expresi IRF-3 ovlivněno virem vakcínie nepřímou nebo přímo interakcí IRF-3 s IL-1 $\beta$  promotorem, byl testován efekt exprese IRF-3 pomocí expresního vektoru po transfekci NIH 3T3 buněk. Nicméně na úrovni mRNA nebyl IL-1 $\beta$  v transfekovaných buňkách vůbec detekován. Je možné, že v tomto případě chyběl další stimul pro dostatečnou aktivaci signálních drah vedoucích k fosforylaci IRF-3 či I- $\kappa$ B. Případnou interakci IRF-3 s IL-1 $\beta$  by tak bylo vhodnější studovat pomocí transfekce ještě druhého expresního vektoru s reporterovým genem pod kontrolou IL-1 $\beta$  promotoru. Nicméně je třeba podotknout, že v tomto případě mohlo jít i o technickou chybu, jelikož v neinfikovaných NIH 3T3 byl v jiném pokusu IL-1 $\beta$  na úrovni mRNA detekován. K určité nespecifické stimulaci IRF-3 po transfekci nicméně došlo, neboť se ve 48 h po transfekci podařilo detekovat zvýšenou expresi IFN $\beta$ . Toto zvýšení však bylo srovnatelné u buněk transfekovaných plazmidem s IRF-3 i s kontrolní luciferázou. Šlo tedy spíše o reakci na přítomnost plazmidové DNA v cytosolu (Tamassia et al. 2012) než o vliv rekombinantního IRF-3.

V buněčných liniích BCS-40 a NIH 3T3 byl následně charakterizován vliv exprese rekombinantního IRF-3 na růst WR-IRF3. IRF-3 je konzervovaný napříč různými organismy, nicméně jeho sekvence se stejně jako u dalších faktorů druh od druhu liší (Huang et al. 2010). Nebylo tedy překvapivé, že exprese myšního IRF-3 neměla na růst viru v opičích buňkách BSC-40 žádný pozorovatelný efekt, zatímco v myších buňkách vedla exprese tohoto faktoru k rozdílnému růstu viru WR-IRF3 v porovnání s WR-Luc. Překvapivě však exprese IRF-3 a následně IFN $\beta$ , který by měl vykazovat protivirové efekty, vedla ke zvýšení růstu daného rekombinantního viru.

V minulosti bylo popsáno, že exprese a aktivace IRF-3 vede k indukci apoptózy, a to několika způsoby. Jednak interferony typu I exprimované po aktivaci IRF-3 mohou aktivovat vnější apoptotickou dráhu (Apelbaum et al. 2013), jednak bylo pozorováno, že samotný IRF-3 se váže na proapoptotický faktor Bax a spolu s ním je pak translokován na vnější mitochondriální membránu, kde spouští vnitřní apoptotickou dráhu (Chattopadhyay et al. 2010). V souladu s těmito poznatky bylo v buňkách NIH 3T3 pozorováno, že exprese rekombinantního IRF-3 v myších buňkách vedla ve zvýšené míře k apoptóze. Indukce apoptózy byla charakterizována nejprve pomocí fluorescenční mikroskopie, kde byla pozorována kondenzovaná buněčná jádra obarvená fluorochromem Hoechst 33342. Kondenzace chromatinu je jedním z jevů, k nimž dochází v průběhu apoptózy (Oberhammer et al. 1994). Jelikož se však nepodařilo pořídit snímky v takové kvalitě, aby byla možná analýza míry apoptózy na jejich základě, byla provedena western blot analýza, při které byla detekována štěpená PARP-1 jako jeden z cílových substrátů štěpení aktivovaných terminálních kaspáz (Los et al. 2002).

Tato analýza, provedená na buňkách NIH 3T3, potvrdila vyšší míru apoptózy u buněk infikovaných WR-IRF3 než WR-Luc, přičemž byl tento efekt pozorovatelný 48 hodin po infekci.

Expresí rekombinantního IRF-3 a jeho vliv na produkci IL-1 $\beta$  byl studován také na linii myších makrofágů J774.G8. Hladiny mRNA pro IL-1 $\beta$  byly v 7 h.p.i. srovnatelné u infikovaných i neinfikovaných buněk. Avšak u buněk infikovaných WR-Luc byl ve 24 hodinách po infekci pozorován pokles v expresi IL-1 $\beta$  mRNA oproti buňkám neinfikovaným, což naznačuje aktivní inhibici produkce tohoto cytokinu nebo obecnou inhibici buněčné makromolekulární syntézy vakcíniovými proteiny, zatímco expresí IRF-3 poklesu IL-1 $\beta$  mRNA zabránila. Nicméně hodnocení vlivu expresí IRF-3 a infekce na produkci IL-1 $\beta$  těmito buňkami může být ovlivněno i faktem, že by měly produkovat určité množství IL-1 $\beta$  i spontánně, bez stimulace (ATCC®TIB-67™). Na úrovni proteinu se hladiny pro-IL-1 $\beta$  lišily mezi infikovanými a neinfikovanými buňkami jen minimálně. Rozdíl byl detekován ve štěpení neaktivního prekurzoru na aktivní IL-1 $\beta$  v případě buněk předem stimulovaných LPS. LPS stimuluje TLR4 a následná signální dráha vede k produkci prozánětlivých cytokinů (Wang et al. 2001). Avšak nejvyšší hladiny pro-IL-1 $\beta$  byly pozorovány u kontrolních buněk po stimulaci LPS, odebraných v čase 0 před infekcí. VACV kóduje inhibitory serinových proteáz (Gerlic et al. 2013; Kettle et al. 1997). Infekce VACV by tedy měla vést k inhibici proteolytické aktivace IL-1 $\beta$ . Tento efekt byl mnou pozorován pouze u makrofágů, které byly před infekcí WR-Luc ošetřeny LPS. U takto ošetřených makrofágů byl v případě infekce WR-IRF3 detekován IL-1 $\beta$  v podobném množství jako u neinfikovaných buněk; k inhibici jeho štěpení očividně nedošlo. Proteolytická aktivace IL-1 $\beta$  by měla být následována jeho sekrecí z buněk (Rathinam et al. 2010), což může ovlivnit výsledek detekce IL-1 $\beta$  v buněčných lyzátech. Snažili jsme se proto precipitovat IL-1 $\beta$  i ze supernatantu infikovaných makrofágů, avšak námi zvolenou metodou se nepodařilo v precipitátech IL-1 $\beta$  detekovat.

Dalším faktorem sledovaným u infikovaných makrofágů byla produkce NO. Produkce NO hraje v imunitní odpovědi proti VACV důležitou roli (Mělková and Esteban 1995; Karupiah et al. 1993). Expresí iNOS může být u makrofágů stimulována prostřednictvím IFN $\gamma$  (Martin et al. 1994), LPS a zejména jejich kombinací (Wang et al. 2009). Makrofágy stimulované LPS a následně infikované VACV by tedy teoreticky mohly být dostatečně stimulované k produkci NO. Avšak u neinfikovaných makrofágů byla v této práci produkce NO detekována pouze v případě současné stimulace LPS a IFN $\gamma$ . Produkce NO byla stanovena i u infikovaných makrofágů. Určitou produkci NO se podařilo detekovat v jednom ze tří pokusů u makrofágů stimulovaných pouze LPS. V tomto případě byla produkce NO nižší u buněk infikovaných oběma viry než u neinfikované kontroly, což by odpovídalo pozorování, že VACV inhibuje produkci NO *in vitro* a to zejména obecným narušením syntézy hostitelských proteinů (Bellows et al. 2003).

Atopická dermatitida je jedním z nejčastěji se vyskytujících zánětlivých onemocnění kůže a v závislosti na závažnosti může zásadně ovlivňovat kvalitu života lidí, kteří jí trpí (Werfel et al. 2016). Pro studium tohoto onemocnění byla v minulosti použita celá řada zvířecích modelů. Mezi nimi i spontánně atopický myší kmen Nc/Nga. Bylo provedeno několik studií, které ukazují, že deregulované imunitní procesy pozorované u lidských atopiků jsou do určité míry pozorovatelné i v těchto myších. Například v kůži lidských atopiků ať už s lézemi nebo bez nich, byla v minulosti detekována řada prozánětlivých elementů (Brunner et al. 2017). Tyto elementy byly detekovány i v kůžích Nc/Nga myší (Suto et al. 1999).

V kůži atopiků dochází v důsledku deregulace imunitních procesů v případě některých virů k nekontrolovanému množení a vzniku takových komplikací jako *eczema vaccinatum* (Ong et al. 2002, Mashiko et al. 2015) či *eczema herpeticum* (Leung et al. 2011). Na myších modelech atopické dermatitidy bylo popsáno zejména snížené vycestování pDB, hlavních producentů protivirově působícího IFN $\alpha$ , ale i jiných zánětlivých elementů do kůže, a to vlivem zvýšené produkce IL-17A (Mashiko et al. 2015, Kawakami et al. 2009). WR-IRF3 navržený v laboratoři Dr. Mělkové měl expresi rekombinantního IRF-3 napomoci lepší produkci IFN typu I (především IFN $\beta$ , který následně stimuluje tvorbu IFN $\alpha$ ), a tím vyvážit deregulaci a sníženou produkci IFN typu I. Stanovení titru wt-WR (Knitlova et al. 2014) i rekombinantních virů v kůžích intradermálně infikovaných myší naznačuje o něco vyšší replikaci VACV, zejména WR-IRF3, u myší atopických. Nicméně časový průběh infekce byl srovnatelný u obou myších kmenů a, obdobně jako v buněčné linii NIH 3T3, WR-IRF3 dosahoval zpočátku vyšších titrů. Avšak exprese rekombinantního IRF-3 vedla zároveň k rychlejší eliminaci viru a v 9. dni po infekci už nebyl detekovatelný, a to u obou myších kmenů, zatímco titr WR-Luc či wt-WR (nepublikované výsledky) zůstal srovnatelný s předchozími intervaly.

Charakterizace primární imunitní odpovědi proti intradermálně inokulovaným rekombinantním virům byla provedena na základě detekce mRNA řady cytokinů reprezentujících Th1, Th2 a Th17 polarizaci na úrovni mRNA. Dále byly na úrovni mRNA detekovány cytokiny exprimované regulačními T lymfocyty a IFN $\gamma$ -inducibilní iNOS a AIM2. Stanovované hladiny mRNA cytokinů mohou sloužit jako marker aktivace buněk v kůži již přítomných či jako marker zánětlivých elementů, které do místa infekce vycestovaly. Expresie na úrovni proteinu či funkce příslušného proteinu však hladinám mRNA odpovídat nemusí. Přestože byla replikace virů v kůžích relativně srovnatelná u obou myších kmenů, hladiny mRNA infekcí indukovaných cytokinů se lišily.

Vliv exprese rekombinantního IRF-3 v kůžích Nc/Nga myší na expresi zde pozorovaných faktorů a cytokinů byl do značné míry uniformní, a sice docházelo ke snižování hladin jejich mRNA při porovnání s hladinami po infekci WR-Luc. Dalo by se tedy říci, že rekombinantní IRF-3 u těchto myší do určité míry normalizuje produkci cytokinů, iNOS a AIM2 na úrovni mRNA. Při porovnání s neinfikovanými myši došlo v případě všech sledovaných mRNA ve 4. den po infekci ke zvýšení u

obou virů s větším zvýšením u WR-Luc. Jedinými výjimkami byly TGFβ3, který byl o něco více zvýšený u WR-IRF3, a později diskutovaný IL-12.

V případě obou sledovaných IFN typu I, které jak známo hrají vitální roli v primární antivirové odpovědi, došlo u Nc/Nga k výraznému zvýšení hladin mRNA v porovnání s neinfikovanými myši. Toto pozorování by mohlo korespondovat s již zmiňovaným prozánětlivým prostředím v atopické kůži (Suto et al. 1999). Pro ověření přítomnosti těchto elementů bude v rámci tohoto projektu provedena histologie kožních preparátů.

Jediný cytokin, u něž byl pozorován nárůst hladin mRNA po infekci WR-IRF3 v porovnání s WR-Luc a to v obou pozorovaných intervalech, byl IL-12; WR-Luc hladiny IL-12 dokonce snižoval pod úroveň kontrolně inokulovaných myší. Zároveň to je jediný ze zde pozorovaných cytokinů, jehož zvýšení exprese v důsledku exprese IRF-3 bylo srovnatelné u obou myších kmenů. IL-12 je jeden z hlavních cytokinů určujících Th1 polarizaci a hraje tak vitální roli v antivirové odpovědi (Komatsu et al. 1998). Toto shodné zvýšení by tedy mohlo korespondovat s pozorovaným vymizením WR-IRF3 z místa infekce u obou myších kmenů. Tyto výsledky jsou rovněž v souladu s pozorováním, že exprese rekombinantního IL-12 VACV vede k urychlenému vymizení virové infekce (Gherardi et al. 1999).

U Nc/Nga bylo ve 4. den po infekci pozorováno zvýšení hladin mRNA pro AIM2 u obou virů (vyšší u WR-Luc) v porovnání s neinfikovanými myši. To může jednak korespondovat se zde detekovanou zvýšenou hladinou IFN $\gamma$  a jednak s pozorováním, že u myší dochází v důsledku poranění, podráždění či infekce kůže ke zvýšení exprese tohoto faktoru (Naik et al. 2017). Dalším IFN $\gamma$ -inducibilním faktorem je iNOS (Mělková and Esteban 1994; Karupiah et al. 1993), jejíž zvýšené hladiny zde byly rovněž detekovány v případě obou virů v porovnání s neinfikovanými myši (opět vyšší v případě WR-Luc). Dalšími cytokiny, které mohou mít vliv na expresi iNOS jsou IL-1β a TNF $\alpha$  (Corbett et al. 1992; Fonseca et al. 2003). I jejich hladiny zde byly ve 4. den po infekci zvýšené.

U lidských atopiků dochází k dysfunkci T regulačních lymfocytů (Verhagen et al. 2006). V této práci pozorované relativně vysoké hladiny cytokinů u myší Nc/Nga, které mají být těmito buňkami exprimovány (jmenovitě TGFβ1 a IL-10 (Bettini and Vignali 2009)), jsou tedy do určité míry v rozporu s tímto tvrzením. Nicméně je nutné vzít v úvahu, že zde byly veškeré cytokiny detekovány pouze na úrovni mRNA. Jejich zvýšená transkripce tedy může být i důsledkem chybějícího proteinu, resp. jeho nefunkčnosti, a tím chybějící negativní zpětné vazby. Stejně tak pozorované silné zvýšení exprese IL-4, který je typickým Th2 cytokinem, může být čistě na úrovni mRNA. U chronické AD by exprese Th2 cytokinů měla být snižena a naopak by mělo docházet ke zvýšené expresi Th1 cytokinů (Yamanaka and Mizutani 2011). Je tedy možné, že zde pozorujeme mix chronické Th1 a akutní Th2 odpovědi vyvolané inokulací PBS či VACV.

V kůžích Balb/c myší vedla exprese rekombinantního IRF-3 k odlišnému efektu než u atopických myší. Intradermální aplikace PBS u neinfikovaných myší vedla ve 2. dni obecně k nárůstu

hladin, který byl následován poklesem ve 4. dni. Hladiny mRNA detekované po infekci WR-Luc do značné míry kopírují tento profil exprese, což nejspíš ukazuje na aktivní modulaci hostitelské imunitní odpovědi vakcíniovými faktory. Výjimkami jsou už zmiňovaný IL-12, jehož hladiny mRNA oba viry snižují pod hladiny u neinfikovaných myší, a dále zmiňovaný IL-4.

Na úrovni mRNA byla 4. den po infekci WR-IRF3 detekována zvýšená exprese všech pozorovaných prozánětlivých cytokinů ve srovnání s WR-Luc – tedy IFN typu I, IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-17A, IL-12 a TNF $\alpha$ . S výjimkou IL-12 se jednalo o zvýšení i vůči neinfikovaným kontrolám. Zvýšené hladiny IFN $\beta$  po infekci WR-IRF3 (vztažené k WR-Luc i neinfikovaným kontrolám) odpovídají v této práci prezentovaným výsledkům z tkáňových kultur, kde pod vlivem rekombinantního IRF-3 rovněž došlo ke zvýšení hladin mRNA pro tento cytokin. Pozorovaná zvýšená hladina IFN $\beta$  též koresponduje se zvýšenou hladinou IFN $\alpha$  ve 4. den po infekci, jelikož by mělo docházet k indukci exprese IFN $\alpha$  (Asano et al. 1990).

Výrazné zvýšení bylo 4. den pozorováno i u IL-4 po infekci oběma viry, což je nejspíš v souladu s pozorováním, že u Balb/c myší dochází k Th2 polarizaci imunitní odpovědi (Cameron et al. 2003). mRNA pro TGF $\beta$ 1 i 3 byla v případě obou virů snížena vůči neinfikovaným myším, v případě WR-IRF3 více. Exprese IL-10 nebyla infekcí takřka ovlivněna. Tyto výsledky by mohly ukazovat na aktivní inhibici hojivých procesů, potažmo by nízké hladiny těchto cytokinů mohly v případě WR-IRF3 souviset s předpokládanou interferonopatií vyvolanou nadprodukcí rekombinantního IRF-3. U exprese iNOS byl detekován nižší nárůst hladin mRNA 2. den po infekci oběma viry ve srovnání s kontrolně inokulovanými myši; ve 4. den hladiny mRNA pro iNOS pokračovaly v růstu, vyšším u WR-IRF3, což koresponduje se zvýšenou hladinou IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  a IL-1 $\beta$ , které se, jak již bylo zmíněno, mohou všechny podílet na indukci exprese iNOS, která významně přispívá k inhibici růstu VACV (Karupiah et al. 1993; Mělková and Esteban 1995; Corbett et al. 1992; Fonseca et al. 2003). Exprese AIM2 byla u infekce WR-Luc takřka totožná s neinfikovanou kontrolou, zatímco infekce WR-IRF3 expresi tohoto faktoru ve 2. dni snížila a ve 4. naopak zvýšila při porovnání s kontrolou i WR-Luc. Samotné poškození kůže při intradermální infekci vede do značné míry k indukci některých prozánětlivých faktorů a následné indukci hojivých procesů (Naik et al. 2017).

Přestože v principu funguje imunitní systém v celém organismu podobně, regulace se v jednotlivých orgánových soustavách liší. Zde byla zkoumána především imunita spojená s kůží, protože intradermální inokulace byla původním způsobem, kterým se imunizovalo proti pravým neštovicím (Parrino and Graham 2006). Avšak VACV se stejně jako virus pravých nebo opičích neštovic může přenášet či roznášet i kontaktem, respektive autoinokulací, což způsobuje komplikace zejména u atopiků, popřípadě osob se závažněji poraněnou kůží (Neff et al. 2002). Nicméně z epidemiologického hlediska je hlavním způsobem, kterým se šíří poxviry, kapénková infekce (Milton

2012). V námi provedených pokusech byl proto sledován efekt intranasální inokulace jednak na produkci cytokinů splenocyty imunizovaných myší a jednak na účinnost navození protektivní imunity proti letální infekci wt-WR v porovnání s intradermální inokulací.

Na úrovni mRNA byl ve slezinách i.n. infikovaných myší detekován IL-1 $\beta$ . U Balb/c myší byly detekovány celkově vyšší hladiny tohoto cytokinu, nicméně profil exprese byl srovnatelný u obou myších kmenů. V případě infekce WR-Luc došlo ke snížení exprese vůči slezinám neinfikovaných myší a v případě WR-IRF3 k jejich normalizaci či přiblížení. Tyto výsledky naznačují, že infekce virem exprimujícím rekombinantní IRF-3 ovlivňuje expresi mRNA pro IL-1 $\beta$  i zprostředkovaně, neboť ze slezin myší po imunizaci se v minulosti nepodařilo titrací detekovat infekční virus (nepublikované výsledky).

Na úrovni proteinů byla v supernatantu splenocytů izolovaných z i.n. infikovaných myší detekována produkce řady cytokinů reprezentujících Th1, Th2 a Th17 polarizaci. Přestože byl použit CBA kit, který by měl být citlivější než ELISA, zjištěné hodnoty byly velmi nízké, na dolní hranici kalibrační křivky. I vlastní rozdíly v produkci jednotlivých cytokinů byly ve většině případů příliš malé na to, aby bylo možno z těchto výsledků činit nějaké větší závěry. Nicméně v případě exprese IL-17A byla pozorována zvýšená exprese u obou myších kmenů v případě infekce WR-IRF3, a to jak vůči neinfikovaným buňkám tak vůči WR-Luc. V minulosti bylo popsáno, že IFN typu I mohou do určité míry fungovat synergicky s IL-17 (Biswas et al. 2015), i když v případě infekce VACV může vést vyšší hladina IL-17A spíše k imunopatologiím než k účinné antivirové obraně (Darling et al. 2014). Nicméně za předpokladu, že infekce WR-IRF3 vede k vyšší indukci IFN typu I i na proteinové úrovni, mohla by tato zvýšená produkce vést k indukci respektive podpoře exprese IL-17A, a to bez ohledu na genetické pozadí použitých myších kmenů. Dalším z cytokinů, jehož exprese byla stanovena ve slezinách, byl TNF. U něj byl pozorován pokles u obou myších kmenů v případě infekce oběma viry. Tyto výsledky jsou v souladu s pozorováním, že VACV kóduje solubilní receptory pro tento cytokin (Alcami et al. 1999). Otázkou zůstává, do jaké míry mohla být detekce tohoto cytokinu ve splenocytech ovlivněna produkcí solubilních receptorů v místě inokula v respiračním systému, pokud nepředpokládáme přítomnost viru v analyzovaných slezinách.

Cesta, kterou virus vstupuje do organismu, ovlivňuje intenzitu i kvalitu imunitní odpovědi. Bylo by logické předpokládat, že proti virům napadajícím svého hostitele intranasální případně orální cestou budou lépe účinné vakcíny aplikované též přes sliznice. Tohoto přístupu bylo využito například při přípravě vakcíny proti viru dětské obrny (Ghendon and Robertson 1994) nebo u intranasální vakcíny proti chřipce (Tamura et al. 2016). V našich pokusech bylo navození protektivní imunity pozorováno po intradermální i intranasální imunizaci rekombinantními viry WR-Luc a WR-IRF3 následované intranasální letální infekcí wt-WR, který se experimentálně používá jako model viru pravých neštovic (Adams et al. 2007). Expresi rekombinantního IRF-3 měla na navození protektivní



imunity vliv, který se do určité míry lišil v závislosti na infekční dávce použité pro imunizaci i cestě imunizace.

Při intranasální imunizaci byly u obou myších kmenů při imunizační dávce  $10^4$  pozorovány větší váhové úbytky v případě imunizace pomocí WR-IRF3 než WR-Luc. Jen v případě Balb/c se tento efekt projevil i na vyšší úmrtnosti myši imunizovaných WR-IRF3. Je možné, že se zde do jisté míry projevila předpokládaná interferonopatie vyvolaná expresí IRF-3. Avšak při použití nižší imunizační dávky ( $10^3$ ) došlo u obou myších kmenů k navození lepší protektivní imunity při imunizaci WR-IRF3 v porovnání s WR-Luc, a to jak z hlediska ubývání na váze, kdy myši imunizované WR-IRF3 ubývaly méně, tak z hlediska přežívání.

Při imunizační dávce  $10^4$  a intradermální imunizaci přežívaly lépe myši imunizované WR-IRF3 než ty s WR-Luc, a to u obou myších kmenů. Tento protektivní efekt se v tomto případě projevil jak na váhových úbytcích (myši s WR-IRF3 ubývaly méně), tak i na počtu pozorovaných úmrtí. Je možné, že jednou z příčin, která stojí za tímto protektivním efektem je již zmíněná zvýšená exprese IL-12 a IFN $\gamma$ , které se zásadně podílejí na Th1 polarizaci, a tedy protivirové odpovědi. Lze též předpokládat, že za navození rozdílné protektivní imunity u WR-IRF3 stojí též pozorovaná zvýšená míra apoptózy u infikovaných buněk. V minulosti bylo pozorováno, že fagocytóza apoptotických buněk v kontextu infekce vede k expresi cytokinů vedoucích k Th17 polarizaci (Torchinsky et al. 2009). Je tedy teoreticky možné, že by takovýto zásah do cytokinového prostředí měl vliv na navození protektivní imunity.

Dle různých studií závisí navození účinné protektivní imunity proti VACV jednak na dostatečné odpovědi zprostředkované CD8+ T lymfocyty (Goulding et al. 2012) a jednak na produkci specifických protilátek (Belyakov et al. 2003). S ohledem na to, že v rámci této práce už nebylo možné věnovat se protilátkové odpovědi či se zaměřit na antigenně specifickou odpověď proti VACV zprostředkovanou CD8+ T lymfocyty, je možné se pouze dohadovat, jaký mechanismus stojí za pozorovaným protektivním efektem rekombinantního IRF-3.

V souhrnu tato práce charakterizuje vliv rekombinantního IRF-3 exprimovaného VACV, a to jak v buněčných liniích, tak v myším atopickém modelu. Z výsledků je patrné, že exprese IRF-3 má pozorovatelný vliv na procesy relevantní pro imunitní odpověď, a to jak na úrovni regulace exprese různých faktorů, tak na úrovni navození protektivní imunity proti letální poxviróvé infekci. Budou však třeba další pokusy, aby bylo možné více přiblížit, jakým mechanismem se tak děje.

## 7 Závěr

Cílem této práce bylo charakterizovat vliv myšího IRF-3 exprimovaného rekombinantním virem vakcínie v buněčných liniích a na myším atopickém modelu.

- V myší fibroblastové linii NIH 3T3 dosahoval rekombinantní WR-IRF3 vyšších titrů než kontrolní WR-Luc. V opičí epitelální linii BSC-40 tento efekt pozorován nebyl.
- V myší fibroblastové linii NIH 3T3 a v monocyto/makrofágové linii J774.G8 byl na úrovni mRNA pozorován stimulační efekt rekombinantního IRF-3 na expresi IFN $\beta$  a IL-1 $\beta$ .
- Exprese rekombinantního IRF-3 vedla v infikovaných buňkách NIH 3T3 ke zvýšené míře apoptózy, což bylo zdokumentováno pomocí fluorescenční mikroskopie apoptotických jader a detekcí štěpené PARP-1, produktu terminálních kaspáz.
- Fosforylaci IRF-3 se ověřit nepodařilo.
- V kůžích atopických myší kmene Nc/Nga a kontrolních myší Balb/c byla charakterizována exprese klíčových cytokinů pro antivirovou odpověď, dále cytokinů typických pro jednotlivé polarizace imunitní odpovědi (Th1, Th2 a Th17) a též exprese iNOS a AIM2. Exprese většiny těchto faktorů byla ovlivněna expresí rekombinantního IRF-3 a profil exprese se u obou myších kmenů lišil. Zatímco u atopických Nc/Nga myší IRF-3 přibližoval hladiny mRNA pro většinu cytokinů k hodnotám kontrol, u Balb/c spíše indukoval interferonopatii resp. přemrštěnou imunitní odpověď.
- U myší imunizovaných rekombinantními VACV bylo charakterizováno navození protektivní imunity proti letální infekci wt-WR. V případě intradermální i intranasální imunizace byl při vhodné dávce pozorován lepší protektivní efekt rekombinantního WR-IRF3, a to u obou myších kmenů.

## 8 Přehled použité literatury

- Abboud, Georges, Vikas Tahiliani, Pritesh Desai, Kyle Varkoly, John Driver, Tarun E. Hutchinson, and Shahram Salek-Ardakani. 2016. "Natural Killer Cells and Innate Interferon Gamma Participate in the Host Defense against Respiratory Vaccinia Virus Infection." Edited by K. Frueh. *Journal of Virology* 90 (1): 129–41. <https://doi.org/10.1128/JVI.01894-15>.
- Adams, M. M., A. D. Rice, and R. W. Moyer. 2007. "Rabbitpox Virus and Vaccinia Virus Infection of Rabbits as a Model for Human Smallpox." *Journal of Virology* 81 (20): 11084–95. <https://doi.org/10.1128/JVI.00423-07>.
- Aioi, A., H. Tonogaito, H. Suto, K. Hamada, C. Ra, H. Ogawa, H. Maibach, and H. Matsuda. 2001. "Impairment of Skin Barrier Function in NC/Nga Tnd Mice as a Possible Model for Atopic Dermatitis." *British Journal of Dermatology* 144 (1): 12–18.
- Alcami, A., Anu Khanna, Nina L. Paul, and Geoffrey L. Smith. 1999. "Vaccinia Virus Strains Lister, USSR and Evans Express Soluble and Cell-Surface Tumour Necrosis Factor Receptors." *Journal of General Virology* 80 (4): 949–959.
- Alcami, Antonio, and G. L. Smith. 1995. "Vaccinia, Cowpox, and Camelpox Viruses Encode Soluble Gamma Interferon Receptors with Novel Broad Species Specificity." *Journal of Virology* 69 (8): 4633–39.
1996. "A Mechanism for the Inhibition of Fever by a Virus." *Immunology* 93: 11029–34.
- Almine, Jessica F., Craig A. J. O'Hare, Gillian Dunphy, Ismar R. Haga, Rangeetha J. Naik, Abdelmadjid Atrih, Dymna J. Connolly, et al. 2017. "IFI16 and cGAS Cooperate in the Activation of STING during DNA Sensing in Human Keratinocytes." *Nature Communications* 8 (February): 14392. <https://doi.org/10.1038/ncomms14392>.
- Ank, Nina, Hans West, Christina Bartholdy, Kristina Eriksson, Allan R. Thomsen, and Søren R. Paludan. 2006. "Lambda Interferon (IFN- $\lambda$ ), a Type III IFN, Is Induced by Viruses and IFNs and Displays Potent Antiviral Activity against Select Virus Infections In Vivo." *Journal of Virology* 80 (9): 4501–9. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.9.4501-4509.2006>.
- Arakawa, Yoshiki, João V. Cordeiro, Sibylle Schleich, Timothy P. Newsome, and Michael Way. 2007. "The Release of Vaccinia Virus from Infected Cells Requires RhoA-mDia Modulation of Cortical Actin." *Cell Host & Microbe* 1 (3): 227–40. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.04.006>.
- Asano, M., M. Hayashi, E. Yoshida, Y. Kawade, and Y. Iwakura. 1990. "Induction of Interferon-Alpha by Interferon-Beta, but Not of Interferon-Beta by Interferon-Alpha, in the Mouse." *Virology* 176 (1): 30–38.
- Bahar, Mohammad W., Julia C. Kenyon, Mike M. Putz, Nicola G. A. Abrescia, James E. Pease, Emma L. Wise, David I. Stuart, Geoffrey L. Smith, and Jonathan M. Grimes. 2008. "Structure and Function of A41, a Vaccinia Virus Chemokine Binding Protein." *PLoS Pathogens* 4 (1): e5. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0040005>.
- Bellows, Charles F., Robert F. Garry, and Bernard M. Jaffe. 2003. "Vaccinia Virus-Induced Inhibition of Nitric Oxide Production." *Journal of Surgical Research* 111 (1): 127–35. [https://doi.org/10.1016/S0022-4804\(03\)00079-9](https://doi.org/10.1016/S0022-4804(03)00079-9).
- Belyakov, I. M., P. Earl, A. Dzutsev, V. A. Kuznetsov, M. Lemon, L. S. Wyatt, J. T. Snyder, et al. 2003. "Shared Modes of Protection against Poxvirus Infection by Attenuated and Conventional Smallpox Vaccine Viruses." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (16): 9458–63. <https://doi.org/10.1073/pnas.1233578100>.
- Benfield, C. T. O., H. Ren, S. J. Lucas, B. Bahsoun, and G. L. Smith. 2013. "Vaccinia Virus Protein K7 Is a Virulence Factor That Alters the Acute Immune Response to Infection." *Journal of General Virology* 94 (Pt\_7): 1647–57. <https://doi.org/10.1099/vir.0.052670-0>.
- <sup>i</sup>Bettini, Maria, and Dario A. A. Vignali. 2009. "Regulatory T Cells and Inhibitory Cytokines in Autoimmunity." *Current Opinion in Immunology* 21 (6): 612–18. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.09.011>.
- Biswas, Partha S., Rohit Aggarwal, Marc C. Levesque, Kelly Maers, and Kritika Ramani. 2015. "Type I Interferon and T Helper 17 Cells Co-Exist and Co-Regulate Disease Pathogenesis in Lupus Patients." *International Journal of Rheumatic Diseases* 18 (6): 646–653.
- <sup>i</sup>Broyles, S. S. 2003. "Vaccinia Virus Transcription." *Journal of General Virology* 84 (9): 2293–2303. <https://doi.org/10.1099/vir.0.18942-0>.
- Brunner, P. M., R. O. Emerson, C. Tipton, S. Garcet, S. Khattri, I. Coats, J. G. Krueger, and E. Guttman-Yassky. 2017. "Nonlesional Atopic Dermatitis Skin Shares Similar T-Cell Clones with Lesional Tissues." *Allergy* 72 (12): 2017–25. <https://doi.org/10.1111/all.13223>.

- Cameron, Scott B., Ellen H. Stolte, Anthony W. Chow, and Huub F. J. Savelkoul. 2003. "T Helper Cell Polarisation as a Measure of the Maturation of the Immune Response." *Mediators of Inflammation* 12 (5): 285–92. <https://doi.org/10.1080/0929350310001619744>.
- Carroll, Kathleen, Orna Elroy-Stein, Bernard Moss, and Rosemary Jagust. 1993. "Recombinant Vaccinia Virus K3L Gene Product Prevents Activation of Double-Stranded RNA-Dependent, Initiation 2a-Specific Protein Kinase." *The Journal of Biological Chemistry* 268 (17): 12837–42.
- Carter, G. C. 2005. "Entry of the Vaccinia Virus Intracellular Mature Virion and Its Interactions with Glycosaminoglycans." *Journal of General Virology* 86 (5): 1279–90. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80831-0>.
- Castellaneta, Antonino, Osamu Yoshida, Shoko Kimura, Shinichiro Yokota, David A. Geller, Noriko Murase, and Angus W. Thomson. 2014. "Plasmacytoid Dendritic Cell-Derived IFN- $\alpha$  Promotes Murine Liver Ischemia/reperfusion Injury by Induction of Hepatocyte IRF-1: Castellaneta, Yoshida, et Al." *Hepatology* 60 (1): 267–77. <https://doi.org/10.1002/hep.27037>.
- Castiglia, Virginia, Alessandra Piersigilli, Florian Ebner, Marton Janos, Oliver Goldmann, Ursula Damböck, Andrea Kröger, et al. 2016. "Type I Interferon Signaling Prevents IL-1 $\beta$ -Driven Lethal Systemic Hyperinflammation during Invasive Bacterial Infection of Soft Tissue." *Cell Host & Microbe* 19 (3): 375–87. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.02.003>.
- Chattopadhyay, Saurabh, Joao T. Marques, Michifumi Yamashita, Kristi L. Peters, Kevin Smith, Avanti Desai, Bryan RG Williams, and Ganes C. Sen. 2010. "Viral Apoptosis Is Induced by IRF-3-Mediated Activation of Bax." *The EMBO Journal* 29 (10): 1762–1773.
- Chen, Ron A.-J., Grigory Ryzhakov, Samantha Cooray, Felix Randow, and G. L. Smith. 2008. "Inhibition of I $\beta$ B Kinase by Vaccinia Virus Virulence Factor B14." *PLoS Pathogens* 4 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0040022>.
- Chiu, Yu-Hsin, John B. MacMillan, and Zhijian J. Chen. 2009. "RNA Polymerase III Detects Cytosolic DNA and Induces Type I Interferons through the RIG-I Pathway." *Cell* 138 (3): 576–91. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.015>.
- Chung, Yeonseok, Seon Hee Chang, Gustavo J. Martinez, Xuexian O. Yang, Roza Nurieva, Hong Soon Kang, Li Ma, et al. 2009. "Critical Regulation of Early Th17 Cell Differentiation by Interleukin-1 Signaling." *Immunity* 30 (4): 576–87. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.02.007>.
- Corbett, J. A., J. L. Wang, M. A. Sweetland, J. Rjr Lancaster, and M. L. McDaniel. 1992. "Interleukin 1 Beta Induces the Formation of Nitric Oxide by Beta-Cells Purified from Rodent Islets of Langerhans. Evidence for the Beta-Cell as a Source and Site of Action of Nitric Oxide." *The Journal of Clinical Investigation* 90 (6): 2384–2391.
- Curran, Terry-Ann, Reza Baradar Jalili, Ali Farrokhi, and Aziz Ghahary. 2014. "IDO Expressing Fibroblasts Promote the Expansion of Antigen Specific Regulatory T Cells." *Immunobiology* 219 (1): 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2013.06.008>.
- Czarnowicki, Tali, Hitokazu Esaki, Juana Gonzalez, Dana Malajian, Avner Shemer, Shinji Noda, Sreya Talasila, et al. 2015. "Early Pediatric Atopic Dermatitis Shows Only a Cutaneous Lymphocyte Antigen (CLA)+ TH2/TH1 Cell Imbalance, Whereas Adults Acquire CLA+ TH22/TC22 Cell Subsets." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 136 (4): 941–951.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.05.049>.
- Czarnowicki, Tali, Juana Gonzalez, Avner Shemer, Dana Malajian, Hui Xu, Xiuzhong Zheng, Saakshi Khattri, et al. 2015. "Severe Atopic Dermatitis Is Characterized by Selective Expansion of Circulating TH2/TC2 and TH22/TC22, but Not TH17/TC17, Cells within the Skin-Homing T-Cell Population." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 136 (1): 104–115.e7. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.01.020>.
- Darling, Alanna R., Eva-Jasmin Freyschmidt, Oliver T. Burton, Kyle J. Koleoglou, Michiko K. Oyoshi, and Hans C. Oettgen. 2014. "IL-10 Suppresses IL-17-Mediated Dermal Inflammation and Reduces the Systemic Burden of Vaccinia Virus in a Mouse Model of Eczema Vaccinatum." *Clinical Immunology* 150 (2): 153–60. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2013.11.010>.
- Davidson, J., A. S. Milton, and D. Rotondo. 1990. "A Study of the Pyrogenic Actions of Interleukin-1 Alpha and Interleukin-1 Beta: Interactions with a Steroidal and a Non-Steroidal Anti-Inflammatory Agent." *British Journal of Pharmacology* 100 (3): 542–46.
- Díaz-Guerra, Margarita, Carmen Rivas, and Mariano Esteban. 1997. "Inducible Expression of the 2-5A synthetase/RNase L System Results in Inhibition of Vaccinia Virus Replication."
- Dietze, K. K., G. Zelinsky, K. Gibbert, S. Schimmer, S. Francois, L. Myers, T. Sparwasser, K. J. Hasenkrug, and U. Dittmer. 2011. "Transient Depletion of Regulatory T Cells in Transgenic Mice Reactivates Virus-Specific CD8+ T Cells and Reduces Chronic Retroviral Set Points." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (6): 2420–25. <https://doi.org/10.1073/pnas.1015148108>.

- <sup>i</sup>Dinarello, Charles A. 1999. "IL-18: A TH1-Inducing, Proinflammatory Cytokine and New Member of the IL-1 Family." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 103 (1): 11–24.
- Engelmayer, Jose, Marie Larsson, Marion Subklewe, Ann Chahroudi, William I. Cox, Ralph M. Steinman, and Nina Bhardwaj. 1999. "Vaccinia Virus Inhibits the Maturation of Human Dendritic Cells: A Novel Mechanism of Immune Evasion." *The Journal of Immunology* 163 (12): 6762–6768.
- Ferguson, B. J., C. T. O. Benfield, H. Ren, V. H. Lee, G. L. Frazer, P. Strnadova, R. P. Sumner, and G. L. Smith. 2013. "Vaccinia Virus Protein N2 Is a Nuclear IRF3 Inhibitor That Promotes Virulence." *Journal of General Virology* 94 (Pt\_9): 2070–81. <https://doi.org/10.1099/vir.0.054114-0>.
- Fernandes-Alnemri, Teresa, Je-Wook Yu, Christine Juliana, Leobaldo Solorzano, Seokwon Kang, Jianghong Wu, Pinaki Datta, et al. 2010. "The AIM2 Inflammasome Is Critical for Innate Immunity to *Francisella Tularensis*." *Nature Immunology* 11 (5): 385–93. <https://doi.org/10.1038/ni.1859>.
- Fonseca, G. Simone, R. T. Pedro Romao, Florencio Figueiredo, H. Ruth Morais, C. Hermenio Lima, H. Sergio Ferreira, and Q. Fernando Cunha. 2003. "TNF Alpha Mediates the Induction of Nitric Oxide Synthase in Macrophages but Not in Neutrophils in Experimental Cutaneous Leishmaniasis." *European Journal of Immunology* 33: 2297–2306.
- Frischknecht, Friedrich, Violaine Moreau, Sabine Röttger, Stefania Gonfloni, Inge Reckmann, Giulio Superti-Furga, and Michael Way. 1999. "Actin-Based Motility of Vaccinia Virus Mimics Receptor Tyrosine Kinase Signalling." *Nature* 401 (6756): 926–29. <https://doi.org/10.1038/44860>.
- Fujikura, Yuzo, Pavla Kudlackova, Martin Vokurka, Jakub Krijt, and Zora Melkova. 2009. "The Effect of Nitric Oxide on Vaccinia Virus-Encoded Ribonucleotide Reductase." *Nitric Oxide* 20 (2): 114–21. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2008.09.002>.
- García, Maria Angel, Susana Guerra, Jesús Gil, Victoria Jimenez, and Mariano Esteban. 2002. "Anti-Apoptotic and Oncogenic Properties of the dsRNA-Binding Protein of Vaccinia Virus, E3L." *Oncogene* 21: 8379–87. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206036>.
- Garmhausen, D., T. Hagemann, T. Bieber, I. Dimitriou, R. Fimmers, T. Diepgen, and N. Novak. 2013. "Characterization of Different Courses of Atopic Dermatitis in Adolescent and Adult Patients." *Allergy* 68 (4): 498–506. <https://doi.org/10.1111/all.12112>.
- Garoufalos, Evgenia, Ivy Kwan, Rongtuan Lin, Amir Mustafa, Normand Pepin, Anne Roulston, Judith Lacoste, and John Hiscott. 1994. "Viral Induction of the Human Beta Interferon Promoter: Modulation of Transcription by NF-Kappa B/rel Proteins and Interferon Regulatory Factors." *Journal of Virology* 68 (8): 4707–4715.
- Gerlic, M., B. Faustin, A. Postigo, E. C.-W. Yu, M. Proell, N. Gombosuren, M. Krajewska, et al. 2013. "Vaccinia Virus F1L Protein Promotes Virulence by Inhibiting Inflammasome Activation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (19): 7808–13. <https://doi.org/10.1073/pnas.1215995110>.
- Ghendon, Yuri, and Susan E. Robertson. 1994. "Interrupting the Transmission of Wild Polioviruses with Vaccines: Immunological Considerations." *Bulletin of the World Health Organization* 72 (6): 973.
- Gherardi, M. Magdalena, Juan C. Ramirez, Dolores Rodríguez, Juan R. Rodríguez, Gen-Ichiro Sano, Fidel Zavala, and Mariano Esteban. 1999. "IL-12 Delivery from Recombinant Vaccinia Virus Attenuates the Vector and Enhances the Cellular Immune Response against HIV-1 Env in a Dose-Dependent Manner." *The Journal of Immunology* 162 (11): 6724–6733.
- Gittler, Julia K., Avner Shemer, Mayte Suárez-Fariñas, Judilyn Fuentes-Duculan, Kara J. Gulewicz, Claire Q.F. Wang, Hiroshi Mitsui, et al. 2012. "Progressive Activation of TH2/TH22 Cytokines and Selective Epidermal Proteins Characterizes Acute and Chronic Atopic Dermatitis." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 130 (6): 1344–54. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.07.012>.
- Goulding, J., G. Abboud, V. Tahiliani, P. Desai, T. E. Hutchinson, and S. Salek-Ardakani. 2014. "CD8 T Cells Use IFN-γ To Protect against the Lethal Effects of a Respiratory Poxvirus Infection." *The Journal of Immunology* 192 (11): 5415–25. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400256>.
- Goulding, J., R. Bogue, V. Tahiliani, M. Croft, and S. Salek-Ardakani. 2012. "CD8 T Cells Are Essential for Recovery from a Respiratory Vaccinia Virus Infection." *The Journal of Immunology* 189 (5): 2432–40. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200799>.
- <sup>i</sup>Graauw, Elisabeth de, Helmut Beltraminelli, Hans-Uwe Simon, and Dagmar Simon. 2015. "Eosinophilia in Dermatologic Disorders." *Immunology and Allergy Clinics of North America* 35 (3): 545–60. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2015.05.005>.
- Guarda, Greta, Marion Braun, Francesco Staehli, Aubry Tardivel, Chantal Mattmann, Irmgard Förster, Matthias Farlik, et al. 2011. "Type I Interferon Inhibits Interleukin-1 Production and Inflammasome Activation." *Immunity* 34 (2): 213–23. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.02.006>.

- Guenova, Emmanuella, Yuliya Skabytska, Wolfram Hoetzenecker, Günther Weindl, Karin Sauer, Manuela Tham, Kyu-Won Kim, et al. 2015. "IL-4 Abrogates TH17 Cell-Mediated Inflammation by Selective Silencing of IL-23 in Antigen-Presenting Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (7): 2163–68. <https://doi.org/10.1073/pnas.1416922112>.
- Guerra, Susana, Ana Cáceres, Klaus-Peter Knobloch, Ivan Horak, and Mariano Esteban. 2008. "Vaccinia Virus E3 Protein Prevents the Antiviral Action of ISG15." Edited by Mark L. Buller. *PLoS Pathogens* 4 (7): e1000096. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000096>.
- Harlow, E., and D. Lane. 1988. In *Antibodies a Laboratory Manual*, 726. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Henderson, D. A. 2014. "John Bartlett and Bioterrorism." *Clinical Infectious Diseases* 59 (suppl 2): S76–79. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu393>.
- Hiscott, John. 2007. "Triggering the Innate Antiviral Response through IRF-3 Activation." *Journal of Biological Chemistry* 282 (21): 15325–29. <https://doi.org/10.1074/jbc.R700002200>.
- Howell, M. D., J. F. Jones, K. O. Kisich, J. E. Streib, R. L. Gallo, and D. Y. M. Leung. 2004. "Selective Killing of Vaccinia Virus by LL-37: Implications for Eczema Vaccinatum." *The Journal of Immunology* 172 (3): 1763–67. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.3.1763>.
- Huang, Bei, Zhi T. Qi, Zhen Xu, and Pin Nie. 2010. "Global Characterization of Interferon Regulatory Factor (IRF) Genes in Vertebrates: Glimpse of the Diversification in Evolution." *BMC Immunology* 11 (1): 22.
- Humlová, Zuzana, Martin Vokurka, Mariano Esteban, and Zora Mělková. 2002. "Vaccinia Virus Induces Apoptosis of Infected Macrophages." *Journal of General Virology* 83 (11): 2821–2832.
- Hutchens, Martha, Kathryn E. Luker, Peter Sottile, Joanne Sonstein, Nicholas W. Lukacs, Gabriel Núñez, Jeffrey L. Curtis, and Gary D. Luker. 2008. "TLR3 Increases Disease Morbidity and Mortality from Vaccinia Infection." *The Journal of Immunology* 180 (1): 483–491.
- Ivashkiv, Lionel B., and Laura T. Donlin. 2014. "Regulation of Type I Interferon Responses." *Nature Reviews Immunology* 14 (1): 36–49. <https://doi.org/10.1038/nri3581>.
- Jarahian, Mostafa, Manuela Fiedler, André Cohnen, Dominik Djandji, Günter J. Hämmerling, Cornelius Gati, Adelheid Cerwenka, et al. 2011. "Modulation of NKp30- and NKp46-Mediated Natural Killer Cell Responses by Poxviral Hemagglutinin." Edited by Wayne M. Yokoyama. *PLoS Pathogens* 7 (8): e1002195. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002195>.
- Karupiah, Gunasegaran, Qiao-wen Xie, R. M. Buller, Carl Nathan, Cornalie Duarte, and John D. MacMicking. 1993. "Inhibition of Viral Replication by Interferon-Gamma-Induced Nitric Oxide Synthase." *Science* 261 (5127): 1445–1448.
- Kawakami, Yuko, Yoshiaki Tomimori, Kenji Yumoto, Shunji Hasegawa, Tomoaki Ando, Yutaka Tagaya, Shane Crotty, and Toshiaki Kawakami. 2009. "Inhibition of NK Cell Activity by IL-17 Allows Vaccinia Virus to Induce Severe Skin Lesions in a Mouse Model of Eczema Vaccinatum." *The Journal of Experimental Medicine* 206 (6): 1219–25. <https://doi.org/10.1084/jem.20082835>.
- Kettle, Susan, Antonio Alcami, Anu Khanna, Robert Ehret, Christian Jassoy, and G. L. Smith. 1997. "Vaccinia Virus Serpin B13R (SPI-2) Inhibits Interleukin-1 $\beta$ -converting Enzyme and Protects Virus-Infected Cells from TNF- and Fas-Mediated Apoptosis, but Does Not Prevent IL-1 $\beta$ -Induced Fever." *Journal of General Virology* 78: 677–85.
- Kim, Ji-Yun, Mi Sook Jeong, Mi Kyung Park, Mi-Kyung Lee, and Seong Jun Seo. 2014. "Time-Dependent Progression from the Acute to Chronic Phases in Atopic Dermatitis Induced by Epicutaneous Allergen Stimulation in NC/Nga Mice." *Experimental Dermatology* 23 (1): 53–57. <https://doi.org/10.1111/exd.12297>.
- Kirwan, Sheryl, Deborah Merriam, Nicola Barsby, Amber McKinnon, and Deborah N. Burshtyn. 2006. "Vaccinia Virus Modulation of Natural Killer Cell Function by Direct Infection." *Virology* 347 (1): 75–87. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.11.037>.
- Knitlova, Jarmila, Vera Hajkova, Ludek Voska, Jana Elsterova, Barbora Obrova, and Zora Melkova. 2014. "Development of Eczema Vaccinatum in Atopic Mouse Models and Efficacy of MVA Vaccination against Lethal Poxviral Infection." Edited by Ralph Tripp. *PLoS ONE* 9 (12): e114374. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114374>.
- Kohara, Yuki, Kyoko Tanabe, Kunie Matsuoka, Naotoshi Kanda, Hiroshi Matsuda, Hajime Karasuyama, and Hiromichi Yonekawa. 2001. "A Major Determinant Quantitative-Trait Locus Responsible for Atopic Dermatitis-like Skin Lesions in NC/Nga Mice Is Located on Chromosome 9." *Immunogenetics* 53 (1): 15–21. <https://doi.org/10.1007/s002510000286>.
- Komatsu, Takashi, Derek D. C. Ireland, and Carol Shoshkes Reiss. 1998. "IL-12 and Viral Infection." *Cytokine and Growth Factor Reviews* 9 (3/4): 277–85.

- Kvansakul, M., H. Yang, W. D. Fairlie, P. E. Czabotar, S. F. Fischer, M. A. Perugini, D. C. S. Huang, and P. M. Colman. 2008. "Vaccinia Virus Anti-Apoptotic F1L Is a Novel Bcl-2-like Domain-Swapped Dimer That Binds a Highly Selective Subset of BH3-Containing Death Ligands." *Cell Death and Differentiation* 15: 1564–71. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.83>.
- Laemmli, U. K. 1970. "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." *Nature* 227: 680–85.
- Lee, Youjin, Amit Awasthi, Nir Yosef, Francisco J Quintana, Sheng Xiao, Anneli Peters, Chuan Wu, et al. 2012. "Induction and Molecular Signature of Pathogenic TH17 Cells." *Nature Immunology* 13 (10): 991–99. <https://doi.org/10.1038/ni.2416>.
- Leung, Donald YM, Pei-Song Gao, Dmitry N Grigoryev, Nicholas M Rafaels, Joanne E Streib, Michael D Howell, Patricia A Taylor, et al. 2011. "Human Atopic Dermatitis Complicated by Eczema Herpeticum Is Associated with Abnormalities in Gamma Interferon Response." *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127 (4): 965–973.e5. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.02.010>.
- Lin, Chi-Long, Che-Sheng Chung, Hans G. Heine, and Wen Chang. 2000. "Vaccinia Virus Envelope H3L Protein Binds to Cell Surface Heparan Sulfate and Is Important for Intracellular Mature Virion Morphogenesis and Virus Infection in Vitro and in Vivo." *Journal of Virology* 74 (7): 3353–3365.
- Liskova, Jana, Jarmila Knitlova, Richard Honner, and Zora Melkova. 2011. "Apoptosis and Necrosis in Vaccinia Virus-Infected HeLa G and BSC-40 Cells." *Virus Research* 160 (1–2): 40–50. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.05.005>.
- Liu, L., Z. Xu, R. C. Fuhlbrigge, V. Pena-Cruz, J. Lieberman, and T. S. Kupper. 2005. "Vaccinia Virus Induces Strong Immunoregulatory Cytokine Production in Healthy Human Epidermal Keratinocytes: A Novel Strategy for Immune Evasion." *Journal of Virology* 79 (12): 7363–70. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.12.7363-7370.2005>.
- Liu, S., X. Cai, J. Wu, Q. Cong, X. Chen, T. Li, F. Du, et al. 2015. "Phosphorylation of Innate Immune Adaptor Proteins MAVS, STING, and TRIF Induces IRF3 Activation." *Science* 347 (6227): aaa2630-aaa2630. <https://doi.org/10.1126/science.aaa2630>.
- Lohöfener, Jan, Nicola Steinke, Penelope Kay-Fedorov, Petra Baruch, Alexey Nikulin, Svetlana Tishchenko, Dietmar J. Manstein, and Roman Fedorov. 2015. "The Activation Mechanism of 2'-5'-Oligoadenylate Synthetase Gives New Insights Into OAS/cGAS Triggers of Innate Immunity." *Structure* 23 (5): 851–62. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.03.012>.
- Los, Marek, Malgorzata Mozoluk, Davide Ferrari, Anna Stepczynska, Christopher Stroh, Andrea Renz, Zdenko Herceg, Zhao-Qi Wang, and Klaus Schulze-Osthoff. 2002. "Activation and Caspase-Mediated Inhibition of PARP: A Molecular Switch between Fibroblast Necrosis and Apoptosis in Death Receptor Signaling." *Molecular Biology of the Cell* 13 (3): 978–988.
- Mackett, Michael, Geoffrey L. Smith, and Bernard Moss. 1984. "General Method for Production and Selection of Infectious Vaccinia Virus Recombinants Expressing Foreign Genes." *Journal of Virology* 49 (3): 857–864.
- Maluquer de Motes, Carlos, Samantha Cooray, Hongwei Ren, Gabriel M. F. Almeida, Kieran McGourty, Mohammad W. Bahar, David I. Stuart, Jonathan M. Grimes, Stephen C. Graham, and Geoffrey L. Smith. 2011. "Inhibition of Apoptosis and NF-κB Activation by Vaccinia Protein N1 Occur via Distinct Binding Surfaces and Make Different Contributions to Virulence." Edited by Michele Barry. *PLoS Pathogens* 7 (12): e1002430. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002430>.
- Mann, Brandon A., Julia He Huang, Ping Li, Hua-Chen Chang, Roger B. Slee, Audrey O'Sullivan, Mathur Anita, et al. 2008. "Vaccinia Virus Blocks Stat1-Dependent and Stat1-Independent Gene Expression Induced by Type I and Type II Interferons." *Journal of Interferon & Cytokine Research* 28 (6): 367–80. <https://doi.org/10.1089/jir.2007.0113>.
- Mansouri, Yasaman, and Emma Guttman-Yassky. 2015. "Immune Pathways in Atopic Dermatitis, and Definition of Biomarkers through Broad and Targeted Therapeutics." *Journal of Clinical Medicine* 4 (5): 858–73. <https://doi.org/10.3390/jcm4050858>.
- Mansur, Daniel S., Carlos Maluquer de Motes, Leonie Unterholzner, Rebecca P. Sumner, Brian J. Ferguson, Hongwei Ren, Pavla Strnadova, Andrew G. Bowie, and Geoffrey L. Smith. 2013. "Poxvirus Targeting of E3 Ligase β-TrCP by Molecular Mimicry: A Mechanism to Inhibit NF-κB Activation and Promote Immune Evasion and Virulence." Edited by Michele Barry. *PLoS Pathogens* 9 (2): e1003183. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003183>.
- Martin, Emil, Carl Nathan, and Q. W. Xie. 1994. "Role of Interferon Regulatory Factor 1 in Induction of Nitric Oxide Synthase." *Journal of Experimental Medicine* 180 (3): 977–984.

- Mashiko, Shunya, Salim Bouguermouh, Manuel Rubio, Nobuyasu Baba, Robert Bissonnette, and Marika Sarfati. 2015. "Human Mast Cells Are Major IL-22 Producers in Patients with Psoriasis and Atopic Dermatitis." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 136 (2): 351–359.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.01.033>.
- Masters, Seth L, Lisa A Mielke, Ann L Cornish, Caroline E Sutton, Joanne O'Donnell, Louise H Cengia, Andrew W Roberts, Ian P Wicks, Kingston H G Mills, and Ben A Croker. 2010. "Regulation of Interleukin-1 $\beta$  by Interferon- $\gamma$  Is Species Specific, Limited by Suppressor of Cytokine Signalling 1 and Influences Interleukin-17 Production." *EMBO Reports* 11 (8): 640–46. <https://doi.org/10.1038/embor.2010.93>.
- McKenzie, Robin, Girish J. Kotwal, Bernard Moss, C. H. Hammer, and M. M. Frank. 1992. "Regulation of Complement Activity by Vaccinia Virus Complement-Control Protein." *Journal of Infectious Diseases* 166 (6): 1245–1250.
- Mělková, Z., and M. Esteban. 1995. "Inhibition of Vaccinia Virus DNA Replication by Inducible Expression of Nitric Oxide Synthase." *The Journal of Immunology* 155 (12): 5711–18.
- Mělková, Zora, and Mariano Esteban. 1994. "Interferon-Gamma Severely Inhibits DNA Synthesis of Vaccinia Virus in a Macrophage Cell Line." *Virology* 198 (2): 731–35. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1087>.
- Mercer, Jason, and Ari Helenius. 2008. "Vaccinia Virus Uses Macropinocytosis and Apoptotic Mimicry to Enter Host Cells." *Science* 320: 531–35.
- Milton, Donald K. 2012. "What Was the Primary Mode of Smallpox Transmission? Implications for Biodefense." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00150>.
- Myskiw, C., J. Arsenio, R. van Bruggen, Y. Deschambault, and J. Cao. 2009. "Vaccinia Virus E3 Suppresses Expression of Diverse Cytokines through Inhibition of the PKR, NF- $\kappa$ B, and IRF3 Pathways." *Journal of Virology* 83 (13): 6757–68. <https://doi.org/10.1128/JVI.02570-08>.
- Naik, Shruti, Samantha B. Larsen, Nicholas C. Gomez, Kirill Alaverdyan, Ataman Sandoel, Shaopeng Yuan, Lisa Polak, Anita Kulukian, Sophia Chai, and Elaine Fuchs. 2017a. "Inflammatory Memory Sensitizes Skin Epithelial Stem Cells to Tissue Damage." *Nature*, no. 550(October): 475–80. <https://doi.org/10.1038/nature24271>.
- Nakajima, Saeko, Botond Z. Igyártó, Tetsuya Honda, Gyohei Egawa, Atsushi Otsuka, Mariko Hara-Chikuma, Norihiko Watanabe, et al. 2012. "Langerhans Cells Are Critical in Epicutaneous Sensitization with Protein Antigen via Thymic Stromal Lymphopoietin Receptor Signaling." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 129 (4): 1048–1055.e6. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.01.063>.
- Neff, John M., J. Michael Lane, Vincent A. Fulginiti, and Donald A. Henderson. 2002. "Contact Vaccinia—transmission of Vaccinia from Smallpox Vaccination." *Jama* 288 (15): 1901–1905.
- Nejadi, Naser, Setareh Mohammadpoor Masti, Mostafa Rezaei Tavirani, and Taghi Golmohammadi. 2014. "Comparison of Three Routine Protein Precipitation Methods: Acetone, TCA/acetone Wash and TCA/acetone." *Journal of Paramedical Sciences* 5 (4).
- Nguyen, K. B., T. P. Salazar-Mather, M. Y. Dalod, J. B. Van Deusen, X.-q. Wei, F. Y. Liew, M. A. Caligiuri, J. E. Durbin, and C. A. Biron. 2002. "Coordinated and Distinct Roles for IFN- $\gamma$ , IL-12, and IL-15 Regulation of NK Cell Responses to Viral Infection." *The Journal of Immunology* 169 (8): 4279–87. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.8.4279>.
- Nomura, I., E. Goleva, M. D. Howell, Q. A. Hamid, P. Y. Ong, C. F. Hall, M. A. Darst, et al. 2003. "Cytokine Milieu of Atopic Dermatitis, as Compared to Psoriasis, Skin Prevents Induction of Innate Immune Response Genes." *The Journal of Immunology* 171 (6): 3262–69. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.6.3262>.
- Oberhammer, Franziska A., Karin Hochegger, Gertraud Fröschl, Roman Tiefenbacher, and Margit Pavelka. 1994. "Chromatin Condensation during Apoptosis Is Accompanied by Degradation of Lamin A+ B, without Enhanced Activation of cdc2 Kinase." *The Journal of Cell Biology* 126 (4): 827–837.
- Oda, Kin-ichiro, and Wolfgang K. Joklik. 1967. "Hybridization and Sedimentation Studies on 'early' and 'late' Vaccinia Messenger RNA." *Journal of Molecular Biology* 27 (3): 395–419.
- Oda, Shun-ichiro, Martina Schröder, and Amir R. Khan. 2009. "Structural Basis for Targeting of Human RNA Helicase DDX3 by Poxvirus Protein K7." *Structure* 17 (11): 1528–37. <https://doi.org/10.1016/j.str.2009.09.005>.
- Ong, Peck Y., Takaaki Ohtake, Corinne Brandt, Ian Strickland, Mark Boguniewicz, Tomas Ganz, Richard L. Gallo, and Donald Y.M. Leung. 2002. "Endogenous Antimicrobial Peptides and Skin Infections in Atopic Dermatitis." *New England Journal of Medicine* 347 (15): 1151–1160.
- Parrino, J, and B Graham. 2006. "Smallpox Vaccines: Past, Present, and Future." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 118 (6): 1320–26. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.09.037>.



- Parrish, Susan, Wolfgang Resch, and Bernard Moss. 2007. "Vaccinia Virus D10 Protein Has mRNA Decapping Activity, Providing a Mechanism for Control of Host and Viral Gene Expression." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (7): 2139–2144.
- Payne, LENDON G. 1979. "Identification of the Vaccinia Hemagglutinin Polypeptide from a Cell System Yielding Large Amounts of Extracellular Enveloped Virus." *Journal of Virology* 31 (1): 147–155.
- Peters, Nicholas E., Brian J. Ferguson, Michela Mazzon, Aodhnait S. Fahy, Ewelina Krysztofinska, Raquel Arribas-Bosacoma, Laurence H. Pearl, Hongwei Ren, and Geoffrey L. Smith. 2013. "A Mechanism for the Inhibition of DNA-PK-Mediated DNA Sensing by a Virus." Edited by Michele Barry. *PLoS Pathogens* 9 (10): e1003649. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003649>.
- <sup>i</sup>Raphael, Itay, Saisha Nalawade, Todd N. Eagar, and Thomas G. Forsthuber. 2015. "T Cell Subsets and Their Signature Cytokines in Autoimmune and Inflammatory Diseases." *Cytokine* 74 (1): 5–17. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.09.011>.
- Rathinam, Vijay A K, Zhaozhao Jiang, Stephen N Waggoner, Shruti Sharma, Leah E Cole, Lisa Waggoner, Sivapriya Kailasan Vanaja, et al. 2010. "The AIM2 Inflammasome Is Essential for Host Defense against Cytosolic Bacteria and DNA Viruses." *Nature Immunology* 11 (5): 395–402. <https://doi.org/10.1038/ni.1864>.
- Reading, P. C., and G. L. Smith. 2003. "Vaccinia Virus Interleukin-18-Binding Protein Promotes Virulence by Reducing Gamma Interferon Production and Natural Killer and T-Cell Activity." *Journal of Virology* 77 (18): 9960–68. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.18.9960-9968.2003>.
- Rebane, Ana, Maya Zimmermann, Alar Aab, Hansjörg Baurecht, Andrea Koreck, Maire Karelson, Kristi Abram, et al. 2012. "Mechanisms of IFN- $\gamma$ -induced Apoptosis of Human Skin Keratinocytes in Patients with Atopic Dermatitis." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 129 (5): 1297–1306. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.02.020>.
- Refaeli, Yosef, Luk Van Parijs, Stephen I. Alexander, and Abul K. Abbas. 2002. "Interferon  $\gamma$  Is Required for Activation-Induced Death of T Lymphocytes." *The Journal of Experimental Medicine* 196 (7): 999–1005. <https://doi.org/10.1084/jem.20020666>.
- <sup>i</sup>Roberts, Kim L., and Geoffrey L. Smith. 2008. "Vaccinia Virus Morphogenesis and Dissemination." *Trends in Microbiology* 16 (10): 472–79. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.07.009>.
- Rodriguez, Jose F., Dolores Rodriguez, Juan-Ramon Rodriguez, Eleanor B. McGowan, and Mariano Esteban. 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* 85 (5): 1667–1671.
- Roth, Susanne, Andrea Rottach, Amelie S Lotz-Havla, Verena Laux, Andreas Muschwackh, Søren W Gersting, Ania C Muntau, et al. 2014. "Rad50-CARD9 Interactions Link Cytosolic DNA Sensing to IL-1 $\beta$  Production." *Nature Immunology* 15 (6): 538–45. <https://doi.org/10.1038/ni.2888>.
- Salimi, Maryam, Jillian L. Barlow, Sean P. Saunders, Luzheng Xue, Danuta Gutowska-Owsiak, Xinwen Wang, Li-Chieh Huang, et al. 2013. "A Role for IL-25 and IL-33-driven Type-2 Innate Lymphoid Cells in Atopic Dermatitis." *The Journal of Experimental Medicine* 210 (13): 2939–50. <https://doi.org/10.1084/jem.20130351>.
- Schmelz, Monika, Beate Sodeik, Maria Ericsson, Elizabeth J. Wolffe, Hisatoshi Shida, Gerhard Hiller, and Gareth Griffiths. 1994. "Assembly of Vaccinia Virus: The Second Wrapping Cisterna Is Derived from the Trans Golgi Network." *Journal of Virology* 68 (1): 130–147.
- Schmid, Peter, David Cox, Graeme Bilbe, Gary McMaster, Chris Morrison, Hannes Stähelin, Nicholas Lüscher, and Walter Seiler. 1993. "TGF-Bs and TGF- $\beta$  Type II Receptor in Human Epidermis: Differential Expression in Acute and Chronic Skin Wounds." *The Journal of Pathology* 171 (3): 191–197.
- Servant, Marc J., Benjamin ten Oever, Cecile LePage, Lucia Conti, Sandra Gessani, Ilkka Julkunen, Rongtuan Lin, and John Hiscott. 2001. "Identification of Distinct Signaling Pathways Leading to the Phosphorylation of Interferon Regulatory Factor 3." *Journal of Biological Chemistry* 276 (1): 355–63. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007790200>.
- Sklenovská, Nikola, and Marc Van Ranst. 2018. "Emergence of Monkeypox as the Most Important Orthopoxvirus Infection in Humans." *Frontiers in Public Health* 6 (September). <https://doi.org/10.3389/fpubh.2018.00241>.
- <sup>i</sup>Smith, G. L., C. T. O. Benfield, C. Maluquer de Motes, M. Mazzon, S. W. J. Ember, B. J. Ferguson, and R. P. Sumner. 2013. "Vaccinia Virus Immune Evasion: Mechanisms, Virulence and Immunogenicity." *Journal of General Virology* 94 (Pt\_11): 2367–92. <https://doi.org/10.1099/vir.0.055921-0>.
- <sup>i</sup>Smith, Geoffrey L., Alain Vanderplasschen, and Mansun Law. 2002. "The Formation and Function of Extracellular Enveloped Vaccinia Virus." *Journal of General Virology* 83: 2915–31.

- Stack, Julianne, Ismar R. Haga, Martina Schröder, Nathan W. Bartlett, Geraldine Maloney, Patrick C. Reading, Katherine A. Fitzgerald, Geoffrey L. Smith, and Andrew G. Bowie. 2005. "Vaccinia Virus Protein A46R Targets Multiple Toll-Like–interleukin-1 Receptor Adaptors and Contributes to Virulence." *The Journal of Experimental Medicine* 201 (6): 1007–18. <https://doi.org/10.1084/jem.20041442>.
- Stone, Richard. 2002. "Is Live Smallpox Lurking in the Arctic?" *Science* 295 (5562): 2002–2002. <https://doi.org/10.1126/science.295.5562.2002>.
- Suárez-Fariñas, Mayte, Nikhil Dhingra, Julia Gittler, Avner Shemer, Irma Cardinale, Cristina de Guzman Strong, James G. Krueger, and Emma Guttman-Yassky. 2013. "Intrinsic Atopic Dermatitis Shows Similar TH2 and Higher TH17 Immune Activation Compared with Extrinsic Atopic Dermatitis." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 132 (2): 361–70. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.04.046>.
- Sun, L., J. Wu, F. Du, X. Chen, and Z. J. Chen. 2013. "Cyclic GMP-AMP Synthase Is a Cytosolic DNA Sensor That Activates the Type I Interferon Pathway." *Science* 339 (6121): 786–91. <https://doi.org/10.1126/science.1232458>.
- Suto, Hajime, Hiroshi Matsuda, Koichi Mitsuishi, Kayako Hira, Takafumi Uchida, Tetsushi Unno, Hideoki Ogawa, and Chisei Ra. 1999. "NC/Nga Mice: A Mouse Model for Atopic Dermatitis." *International Archives of Allergy and Immunology* 120 (Suppl. 1): 70–75.
- Takaoka, Akinori, ZhiChao Wang, Myoung Kwon Choi, Hideyuki Yanai, Hideo Negishi, Tatsuma Ban, Yan Lu, et al. 2007. "DAI (DLM-1/ZBP1) Is a Cytosolic DNA Sensor and an Activator of Innate Immune Response." *Nature* 448 (7152): 501–5. <https://doi.org/10.1038/nature06013>.
- Tamassia, N., F. Bazzoni, V. Le Moigne, F. Calzetti, C. Masala, G. Grisendi, U. Bussmeyer, et al. 2012. "IFN-Expression Is Directly Activated in Human Neutrophils Transfected with Plasmid DNA and Is Further Increased via TLR-4-Mediated Signaling." *The Journal of Immunology* 189 (3): 1500–1509. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102985>.
- Tamura, Shin-ichi, Akira Aina, Tadaki Suzuki, Takeshi Kurata, and Hideki Hasegawa. 2016. "Intranasal Inactivated Influenza Vaccines: A Reasonable Approach to Improve the Efficacy of Influenza Vaccine?" *Japanese Journal of Infectious Diseases* 69 (3): 165–79. <https://doi.org/10.7883/yoken.JIID.2015.560>.
- Tarassishin, Leonid, Hyeon-Sook Suh, and Sunhee C. Lee. 2011. "Interferon Regulatory Factor 3 Plays an Anti-Inflammatory Role in Microglia by Activating the PI3K/Akt Pathway." *Journal of Neuroinflammation* 8 (1): 187.
- Terenzi, Fulvia, Srabani Pal, and Ganes C. Sen. 2005. "Induction and Mode of Action of the Viral Stress-Inducible Murine Proteins, P56 and P54." *Virology* 340 (1): 116–24. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.06.011>.
- Thomis, Daniel C., and CHARLES E. Samuel. 1993. "Mechanism of Interferon Action: Evidence for Intermolecular Autophosphorylation and Autoactivation of the Interferon-Induced, RNA-Dependent Protein Kinase PKR." *Journal of Virology* 67 (12): 7695–7700.
- Torchinsky, Miriam Beer, Johan Garaude, Andrea P. Martin, and J. Magarian Blander. 2009. "Innate Immune Recognition of Infected Apoptotic Cells Directs TH17 Cell Differentiation." *Nature* 458 (7234): 78–82. <https://doi.org/10.1038/nature07781>.
- Unterholzner, Leonie, Rebecca P. Sumner, Marcin Baran, Hongwei Ren, Daniel S. Mansur, Nollaig M. Bourke, Felix Randow, Geoffrey L. Smith, and Andrew G. Bowie. 2011. "Vaccinia Virus Protein C6 Is a Virulence Factor That Binds TBK-1 Adaptor Proteins and Inhibits Activation of IRF3 and IRF7." Edited by R. Mark L. Buller. *PLoS Pathogens* 7 (9): e1002247. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002247>.
- Valentine, R., and G. L. Smith. 2010. "Inhibition of the RNA Polymerase III-Mediated dsDNA-Sensing Pathway of Innate Immunity by Vaccinia Virus Protein E3." *Journal of General Virology* 91 (9): 2221–29. <https://doi.org/10.1099/vir.0.021998-0>.
- Verhagen, J, M Akdis, C Traidlhoffmann, P Schmidgrendelmeier, D Hijnen, E Knol, H Behrendt, K Blaser, and C Akdis. 2006. "Absence of T-Regulatory Cell Expression and Function in Atopic Dermatitis Skin." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 117 (1): 176–83. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.10.040>.
- Waibler, Z., M. Anzaghe, T. Frenz, A. Schwantes, C. Pohlmann, H. Ludwig, M. Palomo-Otero, A. Alcamí, G. Sutter, and U. Kalinke. 2009. "Vaccinia Virus-Mediated Inhibition of Type I Interferon Responses Is a Multifactorial Process Involving the Soluble Type I Interferon Receptor B18 and Intracellular Components." *Journal of Virology* 83 (4): 1563–71. <https://doi.org/10.1128/JVI.01617-08>.
- Wang, Pao-Li, Mari Oido-Mori, Takeo Fujii, Yusuke Kowashi, Masanori Kikuchi, Yasushi Suetsugu, Junzo Tanaka, Yasutaka Azuma, Mitsuko Shinohara, and Kiyoshi Ohura. 2001. "Heterogeneous Expression of Toll-like Receptor 4 and Downregulation of Toll-like Receptor 4 Expression on Human Gingival Fibroblasts by Porphyromonas Gingivalis Lipopolysaccharide." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 288 (4): 863–67. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5842>.

- Wang, Xianxi, Qun Zhao, Ranyia Matta, Xiaomei Meng, Xiuping Liu, Chang-Gong Liu, Leif D. Nelin, and Yusen Liu. 2009. "Inducible Nitric-Oxide Synthase Expression Is Regulated by Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase-1." *Journal of Biological Chemistry* 284 (40): 27123–34. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.051235>.
- Werfel, Thomas, Jean-Pierre Allam, Tilo Biedermann, Kilian Eyerich, Stefanie Gilles, Emma Guttman-Yassky, Wolfram Hoetzenecker, et al. 2016. "Cellular and Molecular Immunologic Mechanisms in Patients with Atopic Dermatitis." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 138 (2): 336–49. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.06.010>.
- <sup>i</sup>Werfel, Thomas, Akimichi Morita, Markus Grewe, Harald Renz, Ulrich Wahn, Jean Krutmann, and Alexander Kapp. 1996. "Allergen Specificity of Skin-Infiltrating T Cells Is Not Restricted to a Type-2 Cytokine Pattern in Chronic Skin Lesions of Atopic Dermatitis." *The Journal of Investigative Dermatology* 107 (6): 871–76.
- Wharton, M, R A Strikas, R Harpaz, L D Rotz, B Schwartz, C G Casey, M L Pearson, and L J Anderson. 2003. "Recommendations for Using Smallpox Vaccine in a Pre-Event Vaccination Program: Supplemental Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC)." 2003. <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5207a1.htm>.
- "WHO | Global Advisory Committee on Vaccine Safety, <br>2–3 December 2015." n.d. WHO. Accessed October 28, 2018. [http://www.who.int/vaccine\\_safety/committee/reports/Dec\\_2015/en/](http://www.who.int/vaccine_safety/committee/reports/Dec_2015/en/).
- Wollenberg, Andreas, Sandra Günther, Martina Moderer, Stefanie Wetzel, Moritz Wagner, Andreas Towarowski, Evelyn Tuma, Simon Rothenfusser, Stefan Endres, and Gunther Hartmann. 2002. "Plasmacytoid Dendritic Cells: A New Cutaneous Dendritic Cell Subset with Distinct Role in Inflammatory Skin Diseases." *Journal of Investigative Dermatology* 119 (5): 1096–1102.
- Wurtz, Olivier, Marc Bajénoff, and Sylvie Guerder. 2004. "IL-4-Mediated Inhibition of IFN-Gamma Production by CD4+ T Cells Proceeds by Several Developmentally Regulated Mechanisms." *International Immunology* 16 (3): 501–8.
- <sup>i</sup>Yamanaka, Kei-ichi, and Hitoshi Mizutani. 2011. "The Role of Cytokines/chemokines in the Pathogenesis of Atopic Dermatitis." In *Pathogenesis and Management of Atopic Dermatitis*, 41:80–92. Karger Publishers.
- Yang, Wei, Xilai Ding, Jingjing Deng, Yu Lu, Zene Matsuda, Andreas Thiel, Jianzhu Chen, Hongyu Deng, and Zhihai Qin. 2011. "Interferon-Gamma Negatively Regulates Th17-Mediated Immunopathology during Mouse Hepatitis Virus Infection." *Journal of Molecular Medicine* 89 (4): 399–409. <https://doi.org/10.1007/s00109-010-0711-5>.
- Zhu, Jiangao, Jennifer Martinez, Xiaopei Huang, and Yiping Yang. 2007. "Innate Immunity against Vaccinia Virus Is Mediated by TLR2 and Requires TLR-Independent Production of IFN- $\beta$ ." *Blood* 109 (2): 619–25. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-06-027136>.

---

<sup>i</sup> Sekundární citace