
Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Doktorský studijní program v biomedicíně
Buněčná a molekulární biologie, genetika a virologie



Mgr. Martina Spišáková

**Charakter bunkovej smrti hostiteľskej bunky
indukovanej vírusom vakcínie a inhibičný efekt kyseliny
lipoovej na rast vírusu vakcínie**

*Character of the host cell death induced by vaccinia virus
and inhibitory effects of the lipoic acid on vaccinia virus
growth*

Dizertační práce

Vedoucí dizertační práce: MUDr. Zora Mělková, PhD.

Praha, 2010

Prehlásenie:

Prehlasujem, že som záverečnú prácu spracovala samostatne, a že som uviedla všetky použité informačné zdroje. Súčasne dávam povolenie na to, aby bola táto záverečná práca archivovaná v Ústave vedeckých informácií 1. lekárskej fakulty Univerzity Karlovy v Prahe a tu používaná na študijné účely. Za predpokladu, že každý, kto túto prácu použije pre svoju prednáškovú alebo publikačnú aktivitu, sa zaväzuje, že bude tento zdroj informácií riadne citovať.

Súhlasím so sprístupnením elektronickej verzie mojej práce v Digitálnom repozitári Univerzity Karlovy v Prahe (<http://repozitar.cuni.cz>). Práca je sprístupnená len v rámci Univerzity Karlovy v Prahe.

Súhlasím – ~~Nesúhlasím~~

*

V Prahe,

Mgr. Martina Spišáková

* Nehodiace sa škrtnite

Identifikačný záznam:

SPIŠÁKOVÁ, Martina. *Charakter bunkovej smrti hostiteľskej bunky indukovanej vírusom vakcínie a inhibičný efekt kyseliny lípovej na rast vírusu vakcínie.* Praha, 2010. 129 s., 2 publikace. Dizertační práce. 1. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze. Vedoucí práce MUDr. Zora Mělková, PhD.

Abstrakt

Vírus vakcínie je typickým zástupcom poxvírusov. V minulosti bol ako vakcína používaný na úspešnú eradikáciu pravých kiahní (ang. smallpox). V súčasnosti je používaný ako vektor pre profylaktické aj experimentálne účely.

Táto dizertačná práca nadväzuje na výsledky publikovaných prác z nášho laboratória a je zčasti zameraná na bližšie charakterizovanie vplyvu infekcie vírusom vakcínie na typ bunkovej smrti hostiteľskej bunky. Výsledky ukazujú na to, že počas infekcie vírusom vakcínie sa aktivujú dráhy apoptózy, apoptóza ale nie je dokončená a bunka umiera nekroticky. V našich pokusoch sme farmakologickou inhibíciou aktivity enzýmu PARP (Poly-(ADP-ribóza) polymeráza) nedokázali zmeniť formu bunkovej smrti indukovanú vírusom vakcínie z nekrózy na apoptózu. Efekty anti-apoptotických faktorov kódovaných vírusom vakcínie pravdepodobne hrajú významnejšiu úlohu.

Ďalšia časť práce sa venuje sledovaniu inhibičného efektu redox-modulujúcej látky, kyseliny lipoovej, na infekciu vírusom vakcínie. Výsledky ukázali jej inhibičný vplyv v bunkových líniach rôzneho embryonálneho pôvodu. Naše výsledky ukazujú na to, že inhibičný efekt kyseliny lipoovej je na úrovni expresie neskorých génov alebo morfogénézy vírusových častíc. Kyselina lipoová tak ponúka možnosť použitia ako podpornej látky pri liečbe infekcie poxvírusmi.

Kľúčové slová:

vírus vakcínie, apoptóza, kaspázy, kyselina lipoová, antivirotické pôsobenie

Summary

Vaccinia virus is a typical member of the poxvirus family. It had been successfully used during the worldwide smallpox eradication campaign. Currently, it is used as vector for prophylactic, as well as experimental purposes.

This PhD thesis stems from the findings previously published in our lab. It is partially focused on a further characterization of vaccinia virus effects on the type of host cell death. The results point to the activation of apoptosis during vaccinia virus infection, but it cannot be completed and the cell dies by necrosis. Our attempts to shift the necrotic type of cell death induced by vaccinia virus infection towards apoptosis using a pharmacological inhibition of activity of a key enzyme PARP (Poly-(ADP-ribose) polymerase) remained unsuccessful. The effects of vaccinia virus-encoded anti-apoptotic factors appear superior to the inhibition of this single enzyme.

The second part of the thesis is focused on inhibitory effects of a redox-modulating compound, lipoic acid, on vaccinia virus infection. Our results demonstrated its inhibitory effects in cell lines of different embryonic origin. It appears that the lipoic acid inhibits vaccinia virus growth at the stage of late gene expression or possibly later, during virus morphogenesis. Lipoic acid could be potentially used as a supportive treatment in therapy of a poxvirus infection.

Key words:

vaccinia virus, apoptosis, caspases, lipoic acid, antiviral effect

PodĎakovanie

Chcela by som poĎakovať mojej školiteľke, Zore Mělkovej, za to, že mi dala možnosť pracovať na jej projektoch, za jej nekonečný entuziazmus, podporu a pomoc.

Zvlášť by som chcela poĎakovať mojim rodičom za ich dôveru vo mňa, za domov plný lásky, kde sa môžem kedykoľvek vrátiť a podporu, ktorú v nich mám, hoci na veľkú vzdialenosť.

Osobitne sa tiež chcem poĎakovať môjmu priateľovi Michalovi za jeho nekonečnú lásku, trpezlivosť a domov, ktorý mi tvorí.

Moje poĎakovanie patrí aj mojim kolegom z laboratória a ústavu, Martinovi, Petrovi, Barbore, Jane, Markovi, Zdenkovi, Adele a Hanke za ich podnety, diskusie a rady k experimentom. Rovnako tiež laborantkám Monike a Alene za ich každodennú pomoc a humor.

Ďakujem tiež všetkým ostatným ľuďom, ktorých som neznamenala, ale boli mojou oporou akoukoľvek formou.

Práca bola urobená s podporou grantov GAĎR 301/00/1259, 310/05/0477 a 310/05/H533 a výskumného zámeru Ministerstva školstva ĎR MSM0021620806.

Obsah

IDENTIFIKAČNÝ ZÁZNAM:	3
ABSTRAKT	4
SUMMARY	5
POĎAKOVANIE	6
OBSAH	7
ZOZNAM SKRATIEK.....	11
1. ÚVOD	14
1.1 Vírus vakcínie	14
1.1.1 Štruktúra vírusu vakcínie	15
1.1.2 Replikačný cyklus vírusu vakcínie.....	15
1.1.3 Interakcia vírusu vakcínie s hostiteľskou bunkou	17
1.1.3.1 Interakcia s plazmatickou membránou hostiteľskej bunky	18
1.1.3.2 Vplyv infekcie vírusom vakcínie na metabolizmus hostiteľskej bunky ..	19
1.1.3.3 Interakcia vírusu s obranným systémom hostiteľského organizmu.....	20
1.1.3.3.1 Inhibícia kaskády komplementu.....	20
1.1.3.3.2 Ovplyvňovanie činnosti cytokínov	21
1.1.3.3.3 Apoptóza	22
1.1.4 Redoxný systém kódovaný VACV	28
1.1.5 Vírus vakcínie – úspešný v boji proti smallpox.....	29
1.1.5.1 Postvakcinačné komplikácie spojené s použitím VACV	31
1.2 Terapia postvakcinačných komplikácií spojených s použitím VACV	32
1.2.1 VACV imunoglobulín	32
1.2.2 Tiosemikarbazónové deriváty	33
1.2.3 Rifampin.....	33
1.2.4 Nukleozidové analógy.....	33
1.2.5 Látky inhibujúce šírenie VACV.....	35
1.2.6 Látky reagujúce s tiolovými skupinami.....	36
1.2.6.1 Kyselina lipoová.....	37
1.2.6.2 Kyselina etakrynová.....	38

1.3 Interakcia vírusu vakcínie s hostiteľskou bunkou – predchádzajúce výsledky našej skupiny	39
3. MATERIÁL A METÓDY	43
3.1 Chemikálie.....	43
3.2 Bunkové línie a kultivačné podmienky	43
3.3 Príprava stabilne transfekovaných bunkových línií Tet-On	44
3.3.1 Stabilné transfekcie a selekcia bunkových línií	44
3.3.2 Skrining stabilne transfekovaných línií BSC-40-pTet-On a HeLa G-pTet-On	45
3.3.3 Skrining stabilne transfekovaných línií BSC-40-Tet-On-Bcl-2 a BSC-40-Tet-On-Luc	45
3.4 Vírusy	45
3.5 Infekcia	46
3.6 Titrácia.....	47
3.7 Stanovenie cytopatického efektu – test CPE	47
3.8 Prietoková cytometria	47
3.8.1 Stanovenie mitochondriálneho membránového potenciálu ($\Delta\Psi_m$).....	48
3.8.2 Stanovenie integrity cytoplazmatickej membrány	48
3.8.3 YOPRO.....	49
3.8.4 Stanovenie kaspázovej aktivity	49
3.8.4.1 CaspaTag™ Fluorescein Caspase (VAD) Assay Kit (Intergen).	49
3.8.4.2 Rhodamín 110 bis-(amid kyseliny L-asparágovej).....	49
3.9 Fluorescenčná mikroskopia	49
3.10 Western blot	50
3.11 Stanovenie luciferázovej aktivity	51
3.12 Time of addition assay.....	51
3.13 Izolácia DNA a real-time PCR	52
3.14 Stanovenie inhibičných koncentrácií antivírusových látok - IC50 a IC90	53
3.15 Stanovenie cytotoxických koncentrácií antivírusových látok - CC50	53
3.16 Štatistika	53
4. VÝSLEDKY.....	55

4.1	Typ bunkovej smrti spôsobený infekciou vírusom vakcínie	55
4.1.1	Lýtický charakter bunkovej smrti v bunkách infikovaných vírusom vakcínie	55
4.1.2	Kaspázová aktivita počas lýtickej infekcie vírusom vakcínie	58
4.1.2.1	Aktivácia a aktivita kaspáz po indukcii apoptózy ionomycínom a staurosporínom.	59
4.1.2.2	Štiepenie substrátov kaspáz	65
4.1.2.2.1	Cytokeratín 18	65
4.1.2.2.2	Aktín	66
4.1.2.2.3	PARP	67
4.1.3	Efekt inhibície kaspáz a PARP na infekciu vírusom vakcínie	68
4.1.3.1	Vplyv kaspázového inhibítora na infekciu vírusom vakcínie	68
4.1.3.2	Vplyv inhibície PARP na infekciu vírusom vakcínie.	73
4.1.4	Stabilne transfekované bunkové línie	77
4.1.4.1	Príprava stabilne transfekovaných línií	78
4.1.4.2	Efekt inducibilnej expresie Bcl-2 na morfológiu bunkovej línie.....	81
4.1.4.3	Efekt inducibilnej expresie Bcl-2 na bunky infikované vírusom vakcínie	82
4.1.4.4	Strata inducibilnej expresie proteínu Bcl-2.....	84
4.2	Ovplyvnenie rastu vírusu vakcínie pôsobením redox-modulujúcich látok..	85
4.2.1	Vplyv rôznych redox-modulujúcich látok na infekciu vírusom vakcínie	85
4.2.2	Charakterizácia efektu kyseliny lipoovej na životný cyklus vírusu vakcínie	87
4.2.2.1	Inhibičný efekt kyseliny lipoovej na rast vírusu vakcínie v bunkových líniách rôzneho pôvodu	87
4.2.2.2	Inhibičný efekt na luciferázovú aktivitu exprimovanú VACV v bunkových líniách rôzneho pôvodu	90
4.2.2.3	Efekt kyseliny lipoovej na expresiu skorých a neskorých génov exprimovaných vírusom vakcínie	93
4.2.2.4	Inhibičný efekt kyseliny lipoovej na expresiu celkových proteínov vírusu vakcínie	95

4.2.2.5	Efekt kyseliny lipoovej na replikáciu vírusovej DNA.....	96
4.2.2.6	Efekt LA na infekciu VACV v závislosti od času pridania.....	98
5	DISKUSIA	100
5.1	Typ bunkovej smrti spôsobený infekciou vírusom vakcínie	100
5.1.1	Vplyv inhibície kaspáz na infekciu VACV	104
5.1.2	Inhibícia aktivity PARP a typ bunkovej smrti spôsobený VACV	105
5.2	Stabilne transfekované bunkové línie	108
5.3	Ovplyvnenie rastu vírusu vakcínie pôsobením redox-modulujúcich látok	110
7.	REFERENCIE	116
8.	PRÍLOHY - PUBLIKÁCIE.....	129

Zoznam skratiek

AIF	faktor indukujúci apoptózu
AraC	cytozín arabinozid
ATP	adenozín trifosfát
BH	doména s Bcl-2 homológiou
CAT	chloramfenikol acetyltransferáza
CC	cytotoxická koncentrácia
CPE	cytopatický efekt
CrmA	modifikátor cytokínovej odpovede A
CTP	cytozíntrifosfát
Cyt C	cytochróm c
dCTP	deoxy-cytozíntrifosfát
dGTP	deoxy-guanozíntrifosfát
DHLA	kyselina dihydrolipoová
DiOC ₆ (3)	3,3'-dihexyloxacarbo cyanín iodid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimetylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
Dox	doxycyklín
dsRNA	dvojvláknová ribonukleová kyselina
DTT	dithiotreitol
EA	kyselina etakrynová
EEV	extracelulárny obalený virión
EGFR	receptor epidermálneho rastového faktora
eIF-2 α	aktivátor translácie
ER	endoplazmické retikulum
FBS	fetálne bovinné sérum
GSSG	oxidovaný glutatión
GTP	guanozíntrifosfát
h.p.i.	hodiny po infekcii
IC	inhibičná koncentrácia

IEV	intracelulárny obalený virión
IFN	interferón
IL	interleukín
IMP	inozínmonofosfát
IMV	intracelulárny zrelý virión
IPTG	isopropyl- β -D-tiogalaktopyranozid
LA	kyselina α -lipoová
Luc E/L	luciferáza exprimovaná pod kontrolou skorého/neskorého promotora VACV p7.5
LucL	luciferáza exprimovaná pod neskorým promotorom p4b
MK-471	5-azacytozín analóg cidofoviru
MK-612	alkoxyalkyl ester MK-471
m.o.i.	multiplicita infekcie
mRNA	mediátorová kyselina ribonukleová
M Φ	makrofágy
NAD ⁺	nikotínamid adenín dinukleotid
NCS	neonatálne tel'acie sérum
NF- κ B	jadrový faktor κ B
NOS	NO syntetáza
OAS	2', 5'-oligoadenylát syntetáza
OMP	orotidín 5'-fosfát dekarboxyláza
PAB	proteín viažúci poly(A)
PARP	poly-(ADP-ribózo) polymeráza
PBS	fosfátový pufer
PFU	jednotky tvoriace plaky
PI	propídium iodid
PKC	proteín kináza C
PKR	proteín kináza R
POLADS	polyadenylované RNA
RLU	relatívne luciferázové jednotky
RNA	ribonukleová kyselina

ROS	reaktívne deriváty kyslíka
SAH hydroláza	hydroláza S-adenozylcysteínu
S.D.	výberová smerodajná odchýlka
S.E.M.	stredná chyba priemeru
SI	index selektivity
Tet-On	expresný systém Tet-On
TNF	tumor necrosis faktor
TNFR	receptor TNF
VACV	vírus vakcínie
VCP	komplement regulujúci proteín exprimovaný VACV
VIG	VACV imunoglobulín
WHO	svetová zdravotnícka organizácia
WR	western reserve kmeň vírusu vakcínie
XMP	xantozínmonofosfát
β -ME	β -mercaptoetanol
$\Delta\Psi_m$	mitochondriálny membránový potenciál

1. Úvod

1.1 Vírus vakcínie

Vírus vakcínie (VACV) je typickým zástupcom poxvírusov. Taxonomicky patrí do čeľade Poxviridae, rodu Orthopoxvirus. Jeho genóm obsahuje jednu molekulu dvojvláknovej DNA o veľkosti asi 195 kbp, kódujúcu okolo 200 proteínov, a jeho replikačný cyklus prebieha v cytoplazme hostiteľskej bunky.

Pôvod VACV nie je doteraz presne objasnený. Existujú najmenej štyri potenciálne hypotézy - VACV sa vyvinul buď z vírusu varioly neustálym pasážovaním na koži kráv a ľudí; alebo z vírusu kravských kiahní opakovaným pasážovaním na koži zvierat; ďalšou možnosťou je, že je hybridom vírusu kravských kiahní a varioly; alebo že jeho prirodzený hostiteľ vyhynul (Buller a Palumbo, 1991).

VACV bol prvý vírus pozorovaný svetelným mikroskopom a prvý purifikovaný vírus. Rovnako tiež, v ako prvom víruse vôbec, v ňom bola ukázaná prítomnosť aktívnej RNA polymerázy, čo poskytovalo možnosť štúdia mechanizmov transkripcie. Praktické využitie má VACV aj ako súčasť viacerých rekombinantných vakcín alebo ako nástroj na expresiu rôznych proteínov. Medzi vlastnosti, ktoré robia rekombinanty poxvírusov vhodné ako vektory, patrí vysoká stabilita vakcín, nízka nákladnosť, jednoduchá príprava, možnosť aplikácie viacerými cestami, schopnosť indukovať dlhodobú protilátkovú aj bunkovú imunitu po prvom podaní a možnosť začlenenia veľkých častí DNA (Pastoret a Vanderplasschen, 2003). Vďaka množstvu génov, ktorými ovplyvňuje imunitný systém, VACV ponúka viaceré možnosti na štúdium interakcií s hostiteľskou bunkou (Condit a Niles, 2002).

VACV bol úspešne používaný v celosvetovej kampani na eradikáciu pravých kiahní (smallpox). Najčastejšie používané kmene boli New York City Board of Health (USA), Lister (Spojené kráľovstvo), EM-63 (bývalý Sovietský zväz) a Temple of Heaven (Čína). Kmene Western Reserve (WR), Wyeth a IHD,

ktoré sú bežne používané v laboratóriách, sú odvodené od kmeňa New York City Board of Health (Buller a Palumbo, 1991).

1.1.1 Štruktúra vírusu vakcínie

Zdokonalenie zobrazovacích techník mikroskopickej analýzy v 60. rokoch 20. storočia prinieslo vizualizáciu a objasnenie detailnej štruktúry VACV. Morfológicky patrí VACV medzi najväčšie vírusy, jeho virión má charakteristický tehličkovitý tvar s rozmermi približne 200x400 nm. Okrem genetickej informácie uloženej v lineárnej dvojláknovej DNA o veľkosti 195 kb, virión obsahuje aj viac ako 100 rôznych polypeptidov tvoriacich jadro, obal a membrány (Virology, 2001).

Membrána viriónu je tvorená 50-55 nm lipoproteínovou dvojvrstvou. Na vonkajšom povrchu sa nachádzajú asi 7x100 nm tubulárne štruktúry dávajúce viriónu typickú povrchovú štruktúru. Lipidové zloženie membrány je iné ako hostiteľskej bunky, obsahuje menej fosfatidyletanolamínu, ale väčšie množstvo acylfosfatidylglycerolu a mono- a dihexosylceramidov. Spomedzi fosfolipidov sú v membráne najviac zastúpené fosfatidylcholín, fosfatidyletanolamín a fosfatidylserín. Podrobnejšie analýzy ukázali na prítomnosť najmenej 12 polypeptidov (Buller a Palumbo, 1991).

Virión VACV, tvorený nukleoproteínovým jadrom a obklopený membránou, priberá ešte ďalšiu lipidovú dvojvrstvu, obal. Obal obsahuje najmenej 7 glykoproteínov (210; 110; 89; 42; 21,5; 21 a 20 kDa) a jeden neglykozylovaný ale acetylovaný polypeptid, 37 kDa (Buller a Palumbo, 1991).

1.1.2 Replikačný cyklus vírusu vakcínie

VACV tvorí dve hlavné infekčné formy, intracelulárny zrelý virión (intracellular mature virion, IMV) a extracelulárny obalený virión (extracellular enveloped virion, EEV). IMV je skompletovaný v cytoplazme a uvoľnený z bunky po jej lýze. Malé množstvo IMV je obalených dvojitou membránou získanou v trans-Golgi alebo endozóme, a tvoria tak vnútrobunkový obalený virión

(intracellular enveloped virion, IEV). IEV putuje pozdĺž mikrotubulov smerom k plazmatickej membráne bunky a po fúzii s ňou je ako EEV uvoľňovaný von z bunky (Schepis et al., 2006). Obe formy, IMV a EEV, sa viažu na bunku odlišne, v závislosti na prítomnosti iných proteínov na ich povrchových membránach. Doteraz však nebol potvrdený žiadny bunkový receptor na primárnych bunkách alebo bunkových líniách zásadný pre väzbu akejkoľvek formy VACV. Na vstupe IMV do hostiteľskej bunky sa podieľajú 4 transmembránové proteíny - A21, A28, H2 a L5. Rovnaké proteíny sú potrebné aj na šírenie extracelulárnych viriónov z bunky na bunku po odstránení nadbytočnej membrány pred fúziou (Foo et al., 2009; Senkevich et al., 2005).

Po vstupe do bunky je z obidvoch foriem VACV uvoľnené jadro viriónu. Takmer okamžite po vstupe dochádza vo virióne k transkripcii asi 100 rôznych molekúl skorých mRNA transkripčným aparátom, ktorý je v ňom obsiahnutý. Skoré mRNA sú následne uvoľňované do cytoplazmy a podľa nich sú syntetizované proteíny. Skoré mRNA sú polyadenylované, diskkrétnej veľkosti a nepodliehajú splicingu (Moss et al., 1991). Nasyntetizované skoré proteíny VACV sú potrebné pre rozvoľnenie vírusového jadra, uvoľnenie vírusovej DNA a replikáciu DNA. Proteíny syntetizované zo skorých génov sú zodpovedné aj za ďalšie zmeny v bunke, ako sú modifikácie bunkového cytoskeletu a ďalšie interakcie s hostiteľskou bunkou (Schramm a Locker, 2005).

Genóm vírusu (kmeň Copenhagen) bol sekvenovaný a obsahuje približne 200 génov. Gény VACV nemajú intróny a každý má vlastný promotor. Replikácia vírusovej DNA je nezávislá na jadre hostiteľskej bunky a prebieha v častiach cytoplazmy označovaných ako virozómy alebo vírusové továrne (viral factories), rozlíšiteľných elektrónovou mikroskopiou alebo po fluorescenčnom značení DNA asi 2-5 hod. od začiatku infekcie. Dcérske molekuly DNA tvoria veľké konkateméry, ktoré sú rozdelené do jednotlivých molekúl DNA a začleňované do viriónov vznikajúcich v neskorých fázach infekcie (Beaud, 1995). Počas replikácie poxvírusov dochádza vo veľkej miere k rekombinácii DNA.

Po replikácii DNA dochádza k syntéze mRNA pre intermediárne gény. Medzi proteíny vznikajúce z tejto mRNA patria trans-aktivátory neskorých génov VACV (Baldick a Moss, 1993).

Po úspešnej syntéze DNA a expresii intermediárnych génov dochádza k expresii neskorých génov VACV, ktorá má niekoľko charakteristík: promotor obsahuje TAAAT sekvenciu, na ktorej začína transkripcia, na 3' konci nie je cis-terminačný signál, veľkosť neskorej RNA je heterogénna a nedochádza ku zostrihu RNA. Počas neskorých mRNA je výrazne kratší ako skorých mRNA. Zároveň s objavením sa neskorých proteínov, dochádza k redukcii syntézy väčšiny skorých proteínov. Niektoré z neskorých proteínov sú následne glykozylované, fosforylované a štiepené pred alebo počas komplementovania do viriónových častíc. Medzi produkty expresie neskorých génov VACV patria štruktúrne proteíny, ale tiež proteíny s enzymatickou aktivitou nevyhnutnou v skorých fázach infekcie určené na zbalenie do viriónu (Buller a Palumbo, 1991).

Skladanie materiálu do vírusovej častice je komplexné. Postupne sú do nezrelých, membránou obklopených častíc, včleňované štruktúrne a enzýmové proteíny a DNA vírusu. V závislosti na bunkovom type sa môže vírusové potomstvo objaviť už 4-6 hod. po infikovaní. Najviac viriónov vzniká medzi 12 a 24 hod. od infekcie. Následne sú virióny transportované z cytoplazmy.

1.1.3 Interakcia vírusu vakcínie s hostiteľskou bunkou

VACV, ako typický poxvírus, má cytopatický efekt (CPE) na hostiteľskú bunku charakteristický podľa typu infikovanej bunky. U epiteliálnych línií sa má za to, že dochádza k zväčšovaniu objemu buniek, granulácii a zhlukovaniu. U makrofágov má infekcia VACV za následok apoptózu, čo sa morfológicky prejavuje zvrášťovaním, zhlukovaním a oddeľovaním buniek od kultivačnej plochy (Humlova et al., 2002). Zaguľacovanie buniek môžeme pozorovať v časovom intervale závislom na multiplicitate infekcie (m.o.i.), ale už 30-60 min. od vstupu VACV do bunky. Ďalšie efekty na hostiteľskú bunku sú popísané v nasledujúcich častiach.

1.1.3.1 Interakcia s plazmatickou membránou hostiteľskej bunky

Vstup VACV do hostiteľskej bunky je na rozdiel od iných vírusov komplikovanejší kvôli existencii dvoch morfológicky odlišných foriem vírusovej častice líšiacich sa prítomnosťou jednej vrstvy obalu. Ako bolo potvrdené trasmisnou elektrónovou mikroskopiou a kryo-elektrónovou tomografiou, IEV má na svojom povrchu jednu dvojvrstvovú membránu. EEV obsahuje navyše ďalšiu vrstvu membrány získanú pri uvoľňovaní z hostiteľskej bunky, pri prechode cez jej plazmatickú membránu. Navyše, sú na povrchu EEV obsiahnuté aj proteíny, ktoré sa v obale IEV nenachádzajú. Po uvoľnení EEV z bunky ostáva väčšina vírusových častíc v spojení s hostiteľskou bunkou (u WR kmeňa VACV je len 0,5% EEV neasociovaných s bunkovým povrchom hostiteľskej bunky; (Moss, 2006).

Na základe odlišného morfológického ale aj súvisiaceho proteínového zloženia obalov IEV a EEV sa dá predpokladať aj ich odlišná receptorová špecifita určujúca ich preferenčný vstup do jednotlivých bunkových typov (Vanderplasschen et al., 1997). V bunkových líniách bola po infekcii IMV ukázaná aktivácia proteínu CCR5 a následne signálnej dráhy, ktorej činnosťou sa zvýši permisivita bunky pre vstup vírusu. EEV neaktivuje žiadnu signálnu dráhu, čo mu dáva aj dobrý potenciál uniknúť bunkovým obranným mechanizmom (Locker et al., 2000; Rahbar et al., 2006).

Podľa aktuálnych informácií, IEV využíva pre svoj vstup do hostiteľskej bunky makropinocytózu a apoptotické mimikry. Počas uvoľňovania vírusových častíc z hostiteľskej bunky vírus získava obal pochádzajúci z membrány bunky a tým aj fosfatidylerín z bunky vykazujúcej známky apoptózy. Následne môže byť VACV fagocytovaný ako apoptotické teliesko. Pre vstup do bunky VACV využíva makropinocytózu. Vírus sa najskôr naviaže na cytoplazmatické výbežky, filopódia, a putuje po nich smerom k telu bunky, kde stimuluje dočasnú tvorbu bublín na membráne bunky prostredníctvom aktínu. Vzniknuté bubliny alebo výbežky tak napomáhajú k makropinocytóze (Mercer a Helenius, 2008; Sandvig a van Deurs, 2008).

Zásadná otázka riešiaci odstránenie ďalšieho obalu u EEV nie je zatiaľ presne zodpovedaná. Vonkajší obal EEV je veľmi krehký, a tak sú väčšinou na povrchu infikovaných buniek viditeľné virióny s poškodeným obalom. Do úvahy prichádza možnosť odstránenia vonkajšieho obalu EEV v endozóme (Moss, 2006).

Pre samotný vstup do hostiteľskej bunky je kľúčová úloha 4 vírusových membránových proteínov konzervatívne sa vyskytujúcich vo všetkých doteraz sekvenovaných poxvírusoch - A21, A28, H2 a L5. Proteíny vznikajú počas neskorých štádií infekcie a obsahujú disulfidické väzby. Sú navzájom asociované a tiež spojené s ďalšími membránovými proteínmi, čo ukazuje na pravdepodobný mechanizmus fúzneho komplexu pre vstup do bunky (Moss, 2006).

1.1.3.2 Vplyv infekcie vírusom vakcínie na metabolizmus hostiteľskej bunky

Počas infekcie VACV dochádza k výrazným zmenám v metabolizme hostiteľskej bunky. Syntéza DNA hostiteľskej bunky je inhibovaná krátko po vstupe vírusu. Endonukleázy prítomné vo viriónoch hydrolyzujú hostiteľskú DNA.

K inhibícii dochádza aj na úrovni syntézy a procesingu hostiteľskej RNA, čím sa zabezpečí dostatok prekursorov pre transkripciu a transláciu vírusu, a tiež sa zabráni tvorbe bunkových proteínov zapojených do obranných reakcií hostiteľskej bunky na infekciu VACV. Kľúčovým enzýmom v tejto inhibícii je hydroláza Nudix, produkt VACV génu D10. Tá odstraňuje 5'-konce z mRNA (McLennan, 2007).

VACV dokáže tiež selektívne inhibovať syntézu hostiteľských proteínov a to tvorbou malých, polyadenylovaných RNA (POLADS) v skorých fázach rastového cyklu. VACV pomocou svojej poly(A) polymerázy adenyluje akýkoľvek RNA primer. Zvýšená hladina poly(A) v cytoplazme vyviaže proteín viažúci poly(A), PAB, kľúčový iniciačný faktor, čo má za následok selektívnu inhibíciu translácie hostiteľskej mRNA. Vírusové mRNA začínajú transláciu aj s limitovaným množstvom PAB (Lu a Bablanian, 1996).

VACV taktiež inhibuje samotnú syntézu hostiteľských proteínov, a to rôznymi mechanizmami (na úrovni iniciácie polypeptidového reťazca, zablokovaním tvorby ribozómovej podjednotky iniciačného komplexu a inhibíciou predlžovania polypeptidového reťazca). Miera tejto inhibície závisí na type infikovaných buniek a na multiplicitate infekcie (napr. pri m.o.i. = 50 dochádza k inhibícii syntézy hostiteľských proteínov už 20 min. po infekcii a do 1 hodiny po infekcii (h.p.i.) táto inhibícia dosiahne hladinu 90%) (Buller a Palumbo, 1991).

Na druhej strane, aj metabolizmus v hostiteľskej bunke ovplyvňuje priebeh infekcie VACV. Z opublikovaných výsledkov môjho kolegu, Mareka Vrbackého, vyplýva, že efekt infekcie rekombinantom VACV na energetický metabolizmus hostiteľskej bunky závisí aj na spôsobe, akým táto bunka získava energiu. Infekcia rekombinantom VACV mala odlišný efekt v bunkách HeLa G, ktoré získavajú energiu glykolýzou, ako v bunkách BSC-40, ktorých energetické zdroje pochádzajú z oxidatívnej fosforylácie (Vrbacky et al., 2003).

1.1.3.3 Interakcia vírusu s obranným systémom hostiteľského organizmu

Napriek svojej veľkosti a ďalším vlastnostiam (modifikácie membrány alebo expresia vírusových proteínov rozpoznateľných pre imunitné bunky), ktorými na seba vírus v hostiteľskom organizme „upozorňuje“, sú poxvírusy úspešnými patogénmi. Vďaka viacerým mechanizmom dokážu odolať obrane hostiteľskej bunky.

1.1.3.3.1 Inhibícia kaskády komplementu

Systém viac ako 20 proteínov komplementu prispieva k obrane organizmu pred infekciou vírusmi. Výsledkom je neutralizácia vírusu, opsonizácia, lýza vírusom infikovaných buniek a aktivácia špecifickej imunitnej odpovede. VACV patrí medzi vírusy, ktoré vyvinuli obranu proti systému komplementu hostiteľa.

35-kDa proteín VCP (VACV complement control protein) sekretovaný VACV, kódovaný génom C3L, obsahuje repetície štruktúrne podobné eukaryotickým proteínom, ktorými sa viaže na C4b fragment klasickej dráhy

komplementu a tým inhibuje aktiváciu tejto obrany organizmu. Okrem sekretovanej formy sa VCP, po interakcii s ďalším vírusovým proteínom, A56, vyskytuje aj na povrchoch infikovaných buniek. Expresia VCP na bunkovom povrchu chráni infikované bunky od komplementom sprostredkovanej lýzy a tým poskytuje čas na množenie vírusu. Obmedzená aktivácia komplementu na povrchu buniek navyše znižuje produkciu pro-zápalových peptidov C3a a C5a a tým bráni lokálnemu zápalu a aktivácii imunitného systému (Girgis et al., 2008; Kotwal et al., 1990).

1.1.3.3.2 Ovpływňovanie činnosti cytokínov

Viacero obranných protivírusových mechanizmov organizmu je sprostredkovaných činnosťou interferónov (IFN). Poxvírusy prekonávajú túto obranu sekréciou solubilných homológov receptorov IFN s presnou druhovou špecifitou. VACV exprimuje B8R, IFN γ -viažúci proteín, ktorý je zásadný pre plnú virulenciu in vivo. IFN γ -receptor exprimovaný VACV (aj cowpox) viaže a blokuje aktivitu ľudského, hovädzieho a krysieho, ale nie myšacieho IFN γ (Alcami a Smith, 1995a; Alcami a Smith, 1995b). Ďalším proteínom, B18R, sa VACV viaže a inaktivuje IFN skupiny α/β . Okrem spomínaných IFN receptorov, poxvírusy tiež kódujú receptory viažúce interleukín 1 β , interleukín 18 a ďalšie cytokíny (Seet et al., 2003a; Seet et al., 2003b; Smith et al., 1999).

Okrem ovplyvňovania funkcie IFN na úrovni receptorov, VACV ovplyvňuje aj efektorové fázy interferónovej obrany organizmu. IFN indukované enzýmy, proteín kináza R (PKR) a 2',5'-oligoadenylát syntetáza (OAS), prispievajú, po aktivácii dvojvláknovou RNA (intermediáty vírusovej replikácie), k zastaveniu syntézy proteínov (fosforyláciou aktivátora translácie eIF-2 α). VACV gény E3L a K3L exprimujú inhibítory, ktorých cieľom sú PKR a OAS. VACV proteín E3L „vychytáva“ dvojvláknové RNA intermediáty a bráni tak aktivácii PKR a OAS. E3L sa tiež priamo viaže na PKR (Sharp et al., 1998) a tým bráni jej funkčnosti, čím zamedzí fosforylácii iniciačného faktora eukaryotickej bunky 2 α (eIF-2 α) a faktorov interferónovej odpovede (IRF-3 a IRF-7) spojených s inhibíciou

indukcie IFN kaskády. Ďalší VACV proteín, K3L, funguje ako pseudosubstrát pre eIF-2 α (Everett a McFadden, 2002; Johnston a McFadden, 2003).

Proteíny kódované VACV ovplyvňujú aj ďalšie časti IFN dráh. H1L gén VACV exprimuje fosfatázu, ktorá inhibuje IFN-indukovanú aktiváciu transkripčného faktora STAT-1 (Signal Transducer and Activator of Transcription - 1). Produkty VACV génov A46R a A52R obsahujú domény Toll-like/IL-1 receptora, ktoré im umožňujú prerušiť IL-1 signálnu dráhu a zainhibovať NF- κ B aktiváciu indukovanú IL-1 (Johnston a McFadden, 2003).

1.1.3.3.3 Apoptóza

Dôležitú úlohu v eliminácii infikovaných buniek v organizme hraje programovaná bunková smrť – apoptóza.

Infikované bunky sú kontrolované jedným z dvoch mechanizmov smerujúcich bunky k apoptóze. Prvým je prezentácia vírusových peptidov na povrchu infikovanej bunky v komplexe s histokompatibilnými antigénmi, ktorý je rozpoznávaný cytotoxickými T lymfocytmi. Tie indukujú apoptózu v infikovanej bunke. Druhým mechanizmom je regulácia vírusovej infekcie v bunke samotnej. Bunka rozpozná aktiváciu bunkového cyklu vírusovým proteínom a samotná spustí proces apoptózy prostredníctvom proteínu p53 (O'Brien, 1998).

Zásadným dejom počas apoptózy je štiepenie a aktivácia kaspáz, rodiny cysteínových proteáz (Kumar, 2007). Doteraz bolo u cicavcov identifikovaných 14 kaspáz, ktoré sa členia na kaspázy nevyhnutné pre maturáciu cytokínov (kaspázy 1, 4 a 5) a kaspázy priamo zapojené do iniciačnej (kaspázy 8, 9 a 10) alebo efektórovej (kaspázy 3, 6 a 7) fázy apoptózy. Výsledkom pôsobenia efektórových kaspáz je štiepenie množstva bunkových proteínov, ktoré vedie k bunkovej smrti. Substráty kaspáz regulujú zásadné morfológické zmeny počas apoptózy (napr. fodrín, vimentín, cytokeratíny). Niektoré ďalšie sa podieľajú na prenose a znásobení apoptotického signálu (Fischer et al., 2003). Aktivita týchto proteáz je v bunkách regulovaná, a to ako bunkovými, tak aj patogénmi kódovanými proteínmi.

Apoptóza môže byť spustená dvoma dráhami, prostredníctvom extracelulárnych alebo intracelulárnych signálov.

Dráha spustená extracelulárnymi receptormi je aktivovaná väzbou ligandu na jemu prislúchajúci receptor bunkovej smrti (death receptor). Napríklad väzba Fas ligandu na Fas receptor alebo TNF na TNF receptor 1 (TNFR1) vedie k trimerizácii receptorov a prenosu signálu cez adaptérové proteíny FADD v prípade Fas, resp. FADD a TRADD v prípade TNFR. Interakciou s adaptorovými proteínmi je následne do dráhy zapojená kaspáza 8. Aktívna kaspáza 8 môže ďalej buď priamo aktivovať efektórovú kaspázu 3 a viesť tak bunku k jej smrti, alebo alternatívnou dráhou vedie k aktivácii proteínu Bid, patriaceho do rodiny proteínov Bcl-2. Aktivácia Bid má za následok uvoľňovanie cytochrómu c z mitochondrií a aktiváciu efektórovej kaspázy 9 (Danial a Korsmeyer, 2004).

Intracelulárna apoptotická dráha je spúšťaná vo vnútri bunky a vyžaduje zapojenie mitochondrií. Spustenie dráhy je iniciované stresovými signálmi v bunke, ako sú poškodenie DNA, nedostatok rastových faktorov, dsRNA alebo vírusová infekcia. Stresové signály vedú k narušeniu funkcie mitochondrií a uvoľňovaniu cytochrómu c a faktora indukujúceho apoptózu (AIF). Uvoľnenie cytochrómu c vedie prostredníctvom jeho interakcie s adaptérovou molekulou Apaf-1 k aktivácii kaspázy 9 (Ghobrial et al., 2005).

Tretia popísaná dráha spustenia apoptózy vychádza z endoplazmatického retikula (ER). Zmeny v homeostáze iónov Ca^{2+} a hromadenie nesprávne zložených proteínov vedú k stresu v ER. Ten môže mať za následok aktiváciu kaspázy 12. Kaspázou 12 môže byť aktivovaná kaspáza 9 a následne efektorové kaspázy (Pinton et al., 2002; Rao et al., 2004). Kaspáza 12 sa však u väčšiny ľudí bielej populácie vyskytuje vo forme nefunkčného pseudogénu, funkčná je u myší.

Počas prebiehajúcej apoptózy predstavujú kľúčový kontrolný bod mitochondrie. Indukcia apoptózy vedie k zníženiu mitochondriálneho membránového potenciálu ($\Delta\Psi_m$) a uvoľňovaniu mnohých pro-apoptotických faktorov ako napríklad cytochróm c a Smac/DIABLO (Green a Kroemer, 2004).

Uvoľňovanie týchto faktorov z mitochondrií je prísne regulované proteínmi z rodiny Bcl-2.

Všetky proteíny rodiny Bcl-2 sú charakteristické obsahom aspoň jednej domény s Bcl-2 homológiou (BH) a sú kategorizované na anti-apoptotické (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1), pro-apoptotické s viacerými BH doménami (Bak, Bax, Bok) a pro-apoptotické obsahujúce len BH 3 doménu (Bid, Bad, Bim, Bmf, Noxa, Puma, Nbk/Bik). Pre apoptózu prostredníctvom mitochondrií je zásadná expresia Bak a Bax a ich aktivita musí byť prísne regulovaná pre potlačenie apoptózy (Wei et al., 2001). Bak je konštitutívne prítomný v mitochondriách. Bax sa normálne nachádza v cytoplazme, voľne asociovaný s mitochondriálnou membránou. Po stimulácii apoptotickým stimulom dochádza k zmene jeho konformácie a inzercii do vonkajšej mitochondriálnej membrány. Po aktivácii dochádza k homologizácii Bak a Bax a následne k uvoľňovaniu pro-apoptotických proteínov z mitochondrií (Eskes et al., 2000; Wei et al., 2001).

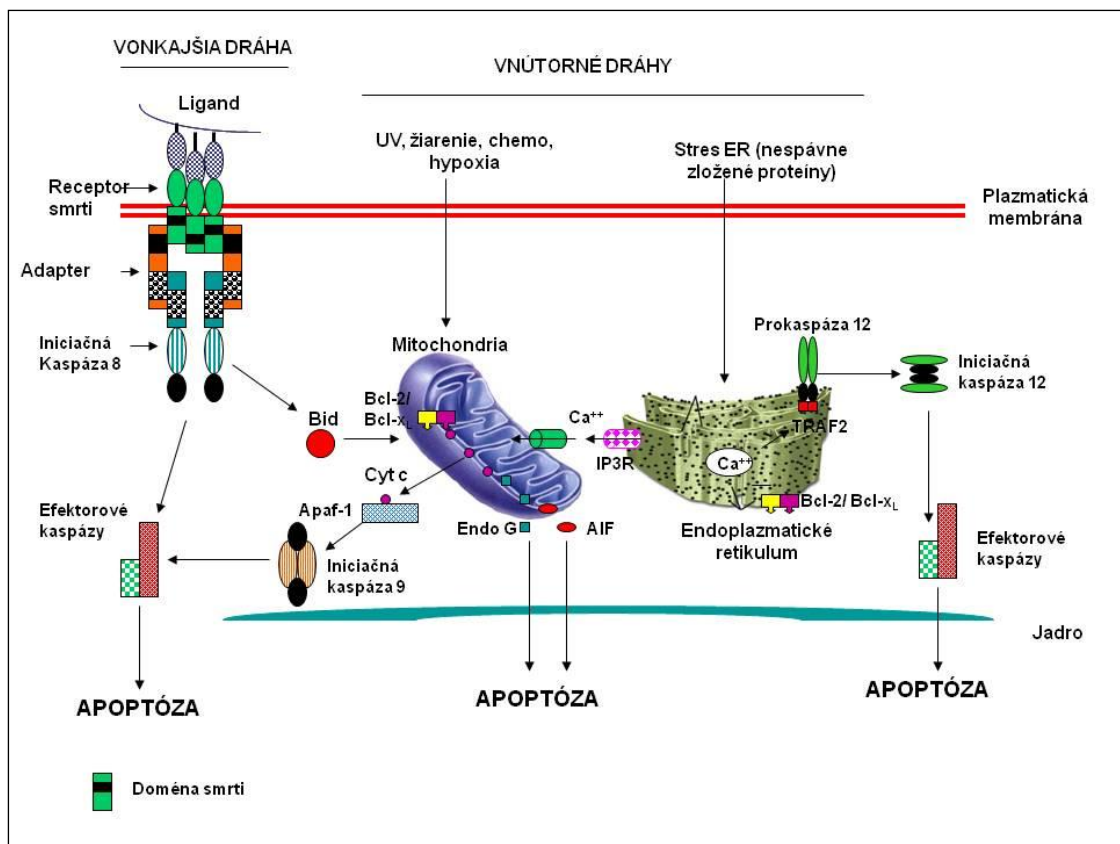
Predpokladaný mechanizmus uvoľňovania týchto proteínov z mitochondrií je buď prostredníctvom pórov vo vonkajšej mitochondriálnej membráne, ktoré vznikli po pôsobení Bax a Bak, alebo prostredníctvom pórov vo vonkajšej mitochondriálnej membráne, ktoré sa tam už nachádzali a činnosťou Bax a Bak boli otvorené (Degli Esposti a Dive, 2003; Scorrano a Korsmeyer, 2003).

Primárne je apoptotický signál prenášaný do mitochondrií prostredníctvom proteínov tvorených len BH3 doménou. K prenosu signálu dochádza buď priamou aktiváciou Bak a Bax prostredníctvom týchto proteínov, alebo inaktiváciou anti-apoptotických proteínov Bcl-2 prostredníctvom proteínov len s BH3 doménou, čo umožní aktiváciu Bak a Bax (Huang a Strasser, 2000).

Úlohou anti-apoptotických proteínov Bcl-2 je zabrániť pro-apoptotickým efektom Bak a Bax, a to interakciou s nimi zamedziť ich aktivácii, alebo inaktivovať proteíny tvorené len BH3 doménou.

Typický antiapoptotický člen rodiny proteínov Bcl-2, samotný proteín Bcl-2, je v bunke asociovaný s membránovými štruktúrami, s vonkajšou mitochondriálnou membránou, jadrovým obalom a membránou endoplazmatického retikula. Aj vzhľadom na jeho distribúciu v bunke je

pravdepodobné, že k jeho antiapoptotickému pôsobeniu dochádza na viacerých úrovniach apoptotických dráh. Na úrovni mitochondrií zamedzuje uvoľňovaniu proapoptotických faktorov ako AIF a cytochróm c. Jeho účinok je závislý na schopnosti interagovať s ďalšími proteínmi rodiny Bcl-2 (Bcl-X_L, Bax). Pravdepodobne bráni oligomerizácii molekúl Bax v mitochondriálnej membráne, a tak tvorbe kanálov v lipidovej membráne. Ďalšou úrovňou ovplyvňovanou Bcl-2 je inhibičný vplyv na apoptogénny proteín p53 a na jeho vstup do jadra. Bcl-2 má tiež vplyv na apoptózu iniciovanú z ER (Cory et al., 2003; Reed, 1998).



Obr. 1. Vonkajšie a vnútorné dráhy vedúce k apoptóze. Upravený obrázok podľa (Gupta et al., 2006).

Okrem už spomenutých kaspáz sa na apoptóze tiež podieľajú ďalšie typy proteáz - granzýmy, katepsíny, kalpaíny a seríny (Vandenabeele et al., 2005).

Vzhľadom na to, akú dôležitú úlohu hraje apoptóza v správnom fungovaní imunitného systému, vyvinuli vírusy viaceré mechanizmy ako interferovať

s proteínmi zapojenými do jej dráh. Poxvírusy patria medzi mnohé vírusy, ktoré pôsobením svojich antiapoptotických proteínov maria proces apoptózy a snažia sa tak predĺžiť svoje prežívanie v bunke (Taylor a Barry, 2006).

1.1.3.3.3.1 CrmA – inhibítor kaspáz a serínových proteáz

Pre efektívnu inhibíciu apoptózy poxvírusy exprimujú proteíny, ktoré priamo ovplyvňujú aktivitu kaspáz. Cowpox vírus exprimuje v skorých fázach infekcie modifikátor cytokínovej odpovede A (CrmA; cytokine response modifier), známy tiež ako SPI-2 (kódovaný génom B13R VACV), inhibítor serpínov, serínových proteáz, ktorý zároveň vykazuje významnú homológiu s kaspázami. CrmA tak teda inhibuje ako cysteínové, tak aj serínové proteázy. CrmA inhibuje kaspázu 1, ktorá štiepi pre-IL-1 β na IL-1 β , a kaspázu 8, ktorá je zásadná v apoptóze sprostredkovanej vonkajšou dráhou, t.j. TNF prostredníctvom Fas receptorov, ale neinhibuje apoptózu sprostredkovanú vnútornou, mitochondriálnou, dráhou. Bolo ukázané, že CrmA inhibuje aj granzým B, serínovú proteázu, ktorá je uvoľňovaná z granúl cytotoxických T lymfocytov, a ktorá spúšťa apoptózu priamou aktiváciou kaspáz, alebo iniciáciou mitochondriálnej apoptotickej dráhy (Taylor a Barry, 2006).

1.1.3.3.3.2 SPI-1

Okrem spomínaného CrmA, exprimujú poxvírusy aj ďalší proteín patriaci do veľkej skupiny serpínov, z ktorých sa niektoré podieľajú na regulácii imunitnej a zápalovej odpovede a bunkovej smrti. SPI-1 (u VACV produkt génu B22R) viaže katepsín G a zdá sa, že je zapojený do inhibície apoptózy prostredníctvom mitochondrií (Guo et al., 2005; Shisler et al., 1999).

1.1.3.3.3.3 SPI-3

Okrem vyššie uvedených serpínov, exprimujú poxvírusy tretí, SPI-3 (u VACV produkt génu K2L), ktorý je však SPI-1 a SPI-2 len vzdialene podobný. Inhibuje fúziu EEV s hostiteľskou bunkou a bráni tak jej reinfekcii. Vzhľadom na jeho príslušnosť k serpínom, predpokladá sa aj jeho ďalšia úloha počas infekcie poxvírusmi, a to inhibícia niektorej proteázy (Turner a Moyer, 1995).

1.1.3.3.3.4 P28

P28 je ubikvitín ligáza kódovaná orthopoxvírusmi. p28 inhibuje apoptózu indukovanú UV, ale neinhibuje apoptózu iniciovanú receptormi smrti. Ďalším spojivom medzi antiapoptotickou aktivitou a p28 je činnosť jeho domény s ubikvitín ligázou, ubikvitinácia totiž reguluje viaceré komponenty apoptotickej dráhy. Konkrétne cieľové proteíny p28 sú stále neznáme. Delécia p28 z genómu ectromelia vírusu viedla k výrazne slabším prejavom choroby u myší, čo mohlo byť spôsobené neschopnosťou vírusu replikovať sa v makrofágoch (Senkevich et al., 1994; Senkevich et al., 1995). Presný význam dôležitosti aktivity p28 na virulenciu alebo inhibíciu apoptózy ale zostáva naďalej predmetom skúmania (Taylor a Barry, 2006).

1.1.3.3.3.5 Ovplyvňovanie na úrovni mitochondrií

Vzhľadom na dôležitosť mitochondrií v apoptóze nie je prekvapivé, že vírusy vyvinuli množstvo mechanizmov ako ovplyvniť apoptózu prostredníctvom mitochondrií.

Práce ukázali, že VACV exprimuje jedinečné proteíny, ktoré fungujú ako inhibítory apoptózy v mitochondriách (Everett et al., 2000; Wasilenko et al., 2003). Wasilenko vo svojich prácach prezentoval proteín F1L, ktorý je lokalizovaný v mitochondriách a pôsobí anti-apoptoticky (Stewart et al., 2005; Wasilenko et al., 2003). Expresia F1L má za následok zainhibovanie poklesu

$\Delta\Psi_m$ a uvoľňovania cytochrómu c z mitochondrií indukovaných rôznymi apoptotickými stimulátormi (UV svetlo, staurosporín, TNF a anti-Fas). Vírusy s deletovaným F1L nie sú schopné inhibície apoptózy indukovanej staurosporínom ani TNF α . Štruktúrne analýzy F1L ukazujú na prítomnosť C-koncovkej transmembránovej domény, zásadnej pre lokalizáciu do vonkajšej mitochondriálnej membrány, podobnej proteínom rodiny Bcl-2 (Stewart et al., 2005; Wasilenko et al., 2003). Pravdepodobný mechanizmus anti-apoptotického pôsobenia F1L je jeho interakcia s proteínmi tvorenými len BH3 doménou z rodiny Bcl-2, a to konkrétne s proteínom Bim alebo do určitej miery s BH3 doménami Bax a Bak (Fischer et al., 2006).

1.1.3.3.3.6 N1L

Ďalším VACV proteínom ovplyvňujúcim apoptózu je N1L. Bolo ukázané, že infikované bunky exprimujúce N1L sú rezistentné voči apoptóze indukovanej staurosporínom. Mechanizmom pôsobenia proteínu N1L je väzba na pro-apoptotické proteíny skupiny Bcl-2, špecificky na tie, ktoré obsahujú BH3 peptid – Bad, Bax a Bid (Cooray et al., 2007).

1.1.4 Redoxný systém kódovaný VACV

Niektoré proteíny obsiahnuté vo viriónoch VACV majú vo svojich cytoplazmových doménach stabilné disulfidové väzby. Podobné proteíny sa vyskytujú aj u iných vírusov a k ich tvorbe dochádza pri prechode endoplazmatickým retikulom hostiteľskej bunky. Odlišná situácia je však u poxvírusov, kde k formácii disulfidových väzieb dochádza v cytoplazme, a to prostredníctvom dráhy kódovanej vírusom. Mechanizmom vzniku disulfidových väzieb, aj vo vysoko redukčnom prostredí cytoplazmy, je priamy prenos elektrónov cez reakcie výmeny tiol-disulfid.

Dráha pozostáva z troch vírusom kódovaných redox-aktívnych proteínov (E10, A2.5 a G4) a vírusových substrátových proteínov obsahujúcich stabilné

disulfidové väzby. VACV kódovaná redoxná dráha začína od E10, ktorý tvorí disulfidovými väzbami spojený komplex s A2.5. Ďalší proteín v dráhe, G4, tvorí meziprodukt s A2.5 a s konečnými substrátmi. Viacero proteínov VACV bolo identifikovaných ako substráty G4 – medzi ne patrí proteín L1, cieľ neutralizačných protilátok a proteíny zapojené do fúzie s membránou hostiteľskej bunky počas vírusovej infekcie, A21, A28, L5, H2 a A16.

Všetky proteíny zapojené v popísanej dráhe sa vyskytujú v celej skupine poxvírusov. Redoxné proteíny E10, A2.5 a G4 sa nachádzajú v tých častiach cytoplazmy hostiteľskej bunky, kde dochádza k morfogénze vírusu. O dôležitosti tejto dráhy pre úspešnú vírusovú infekciu svedčí aj fakt, že znefunkčnenie ktoréhokoľvek z troch proteínov dráhy má za následok zamedzenie tvorby vírusových častíc (Senkevich et al., 2002a; Senkevich et al., 2002b; Su et al., 2006).

1.1.5 Vírus vakcínie – úspešný v boji proti smallpox

VACV bol úspešne použitý v eradikácii vírusu varioly, pôvodcu pravých kiahní. Pravé kiahne boli takmer do konca 20. storočia jednou z najväčších hrozieb ľudstva. Prvé pokusy o ochranu pred pravými kiahňami pochádzajú zo starého Egypta a spočívali v aplikácii tekutiny z vriedkov alebo strupov na kožu, prípadne ich šňupania a viedli síce k rozvoju ochorenia, ale s nižšími smrteľnými následkami ako po prirodzenej infekcii cez aerosól. Aplikácia pravých kiahní ako prevencie pred ochorením sa nazýva variolácia.

Edward Jenner zaviedol v roku 1798 ďalší spôsob prevencie pred pravými kiahňami, ktorý bol následne označený ako vakcinácia (lat. vacca = krava). Išlo o inokuláciu materiálu získaného z lézií vzniknutých po infekcii cowpox. Na konci 19. storočia sa súčasťou vakcín stal VACV, ale jeho pôvod, ako už bolo zmienené, ostáva otáznym. Súčasne s pokrokom v zdravotníctve v nasledujúcom období sa skvalitnila aj výroba používaných vakcín (Virology, 2001). Počas eradikačnej kampane Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO) v rozmedzí 40-tych až 70-tych rokov 20. storočia boli na očkovanie používané kmene uvedené

v kapitole 1.1. Očkovanie všetkými kmeňmi bolo veľmi efektívne a aj vďaka nemu bolo možné vírus pravých kiahní eliminovať (Tegnell et al., 2002). Je potrebné zmieniť, že k úspešnej eradikácii prispela aj skutočnosť, že človek je jediný rezervoár pre vírus pravých kiahní. Vďaka intenzívnemu eradikačnému programu WHO sú od roku 1980 pravé kiahne považované za kompletne eradikované (WHO, 1980). Od začiatku 80. rokov 20. storočia bolo pozastavené očkovanie populácie aj v bývalom Československu.

Napriek celosvetovému zlikvidovaniu varioly, vyvstala v posledných rokoch hrozba jej potenciálneho zneužitia ako biologickej zbrane. Dopad na dnešnú populáciu by bol vzhľadom na pozastavené očkovanie, vysokú prenosnosť a úmrtnosť (do 40%) viac katastrofálny ako v minulom storočí. Práve preto je v programoch mnohých farmaceutických spoločností produkcia nových kvalitných vakcín a plánovanie rozsiahlych vakcinácií v prípade, že by bol vírus varioly zneužitý ako biologická zbraň. USA začali očkovanie zdravotníckych pracovníkov a vojakov odchádzajúcich do rizikových oblastí.

Prekážkou v opätovnom celoplošnom očkovaní je fakt, že vakcinácia je spojená s vyššou pravdepodobnosťou vedľajších účinkov ako ktorákoľvek iná imunizácia a navyše tieto efekty sú 10-násobne pravdepodobnejšie u prvoočkovaných.

V súčasnosti sa v USA používa vakcína Dryvax[®] Wyeth, lyofilizovaný materiál z New York City Board of Health (NYCBOH) kmeňa VACV, ten istý materiál ako bol používaný v 60. rokoch 20. storočia. Samozrejme, že sa v súčasnosti vyvíjajú nové a bezpečnejšie vakcíny, no ich schválenie a používanie je ešte otázkou budúcnosti.

Navyše, okrem hrozby zneužitia poxvírusov ako biologickej zbrane, vystupuje do popredia hrozba z prirodzeného prostredia, a to od vírusu monkeypox, ktorý u ľudí spôsobuje ochorenie podobné pravým kiahňam. Monkeypox sa vyskytuje v západnej a centrálnej Afrike, ale 72 prípadov bolo hlásených v roku 2003 aj v USA (Sliva a Schnierle, 2007).

1.1.5.1 Postvakcinačné komplikácie spojené s použitím VACV

Väčšina postvakcinačných komplikácií sa dá predpokladať už vychádzajúc zo samotnej procedúry vakcinácie, kedy vlastne malá oblasť kože slúži ako „kultivačná platňa“ pre VACV. Komplikácie sa následne týkajú nadmerného množenia VACV v mieste vakcinácie alebo v ďalších častiach tela.

Najčastejšou komplikáciou vyplývajúcou z nadmernej vírusovej replikácie je náhodná infekcia, kedy sa vírus prenesie z miesta vakcinácie na povrch iných častí tela očkovanej osoby alebo jej blízkych.

Menej častá je generalizovaná vakcína, ku ktorej dochádza pri rozšírení vírusu cez krvné riečisko, a pri ktorej sa vyrážky objavujú náhodne na navzájom izolovaných častiach tela. Ku generalizovanej vakcínii dochádza pravdepodobne v dôsledku poruchy protilátkovej alebo imunitnej odpovede sprostredkovanej B-lymfocytmi.

Obidva spôsoby rozšírenia vírusu môžu mať závažné následky pre ľudí s poruchami nešpecifickej imunity, hlavne cytokínovej Th2 odpovede na kožné vírusové infekcie, t. j. pre pacientov s ekzémami alebo inými formami atopickej dermatitídy. Ich koža je významne permissívna pre iniciáciu a rapídne šírenie VACV infekcie, u týchto osôb môže dôjsť k rozvoju eczema vaccinatum.

K menej častej postvakcinačnej komplikácii, k progresívnej vakcínii, vedie neúmyselné očkovanie ľudí s poruchou bunkovej imunity (protilátková imunitná odpoveď je neporušená). Progresívna vakcína je charakteristická nadmerným zväčšením vakcinačného miesta a prípadným objavením sa podobných lézií niekde inde na tele.

Ku extrémne zriedkavej komplikácii, fetálnej vakcínii, dochádza keď po očkovaní tehotnej ženy dôjde k rozšíreniu vírusu na jej plod.

Ďalšími komplikáciami sú tie, ktoré nesúvisia s nadmernou replikáciou vírusu. Patria sem bakteriálne superinfekcie, kožný erytém, myoperikarditída a postvakcinačná encefalitída.

Ku bakteriálnym superinfekciám dochádza po kontaminácii očkovacieho miesta. Menej často očkovanie vyvoláva koprivkovitú kožnú reakciu, erytéma

multiforme. Niektoré formy tejto reakcie si vyžadujú terapiu steroidmi (Bray, 2003; Fulginiti, 2003).

Ako postvákcinálna komplikácia bola zdokumentovaná aj akútna myoperikarditída. Bola zaznamenaná počas vákcináčnej kampane v armáde USA v rokoch 2002-2003 a príčina tejto komplikácie nebola presne určená (Arness et al., 2004).

Najzávažnejšou, ale najzriedkavejšou komplikáciou je postvákcinálna encefalitída, ktorá sa náhodne objavuje u pacientov bez žiadnej známej predispozície. Neurologické príznaky sa objavujú 1-2 týždne po vákcinácii, začínajú zvýšeným vnútrolebkovým tlakom a často vedú k apatii, kóme, záchvatom alebo paralýze. Patogenéza tejto formy encefalitídy je neznáma, uvažuje sa, o autoimunitnom procese v bielej mozgovej hmote (Bray a Wright, 2003; Fulginiti, 2003).

1.2 Terapia postvákcinálnych komplikácií spojených s použitím VACV

Ako už bolo zmienené, väčšina postvákcinálnych komplikácií má pôvod v úniku VACV z miesta inokulácie a v jeho replikácii a šírení. Tieto sa stávajú potenciálnymi cieľmi pre antivírusovú terapiu.

1.2.1 VACV imunoglobulín

Do 50. rokov 20. storočia, kedy boli zavedené VACV imunoglobulín (VIG) a tiosemikarbazónové deriváty, nebola dostupná žiadna špecifická terapia na postvákcinálne komplikácie spojené s očkovaním VACV. VIG bol pripravený ako 20-násobný koncentrát γ -globulínu z plazmy očkovaných osôb. V čase keď bol VIG zavedený do klinického používania, bola väčšina postvákcinálnych komplikácií považovaná za chybnú protilátkovú odpoveď. Napriek jeho nepotvrdenej účinnosti, bol VIG po roku 1960 podávaný takmer všetkým pacientom s postvákcinálnymi komplikáciami. VIG bol tiež podávaný profylakticky (Bray, 2003).

1.2.2 Tiosemikarbazónové deriváty

Prvými látkami s antivírusovou aktivitou proti VACV zavedenými do klinickej praxe v 50-tych rokoch 20. storočia boli tiosemikarbazóny. Prototypom tiosemikarbazónov bol metisazón (Marboran®). Inhiboval syntézu vírusových proteínov z neskorej vírusovej mRNA a ovplyvňoval maturáciu vírusu. Napriek jeho toxicite pri systémovom podávaní bol používaný v terapii postvakcinačných komplikácií. Aj keď pár správ svedčiacich o jeho prospechu pri liečbe ekzema vakcinatum a progresívnej vakcínii bolo prezentovaných, chýbajúce rozsiahlejšie štúdie znemožňujú potvrdiť jeho pozitívnu úlohu pri liečbe VACV infekcie. V súčasnosti sa táto látka nepoužíva (Bray, 2003; De Clercq, 2001).

1.2.3 Rifampin

Ďalšiou látkou s dokázanou schopnosťou inhibovať poxvírusovú infekciu je účinné tuberkulostatikum, rifampin. Účinnosť len pri veľmi vysokých koncentráciách (100 µg/ml) ho robí nepoužiteľným v bežnej klinickej praxi. Rifampin ovplyvňuje neskorý štruktúrny proteín VACV, p65, čoho dôsledkom je reverzibilné zablokovanie kompletovania VACV - membrány, ktoré by mali obalovať budúce vírusové častice majú nesprávny tvar a výsledkom sú nezrelé vírusové častice kosákovitého tvaru (Sodeik et al., 1994).

1.2.4 Nukleozidové analógy

Počas dlhoročného výskumu bol VACV zaradený do kategórie vírusov, ktoré sú testované na citlivosť na rôzne skupiny látok. Väčšina látok, u ktorých bola dokázaná účinnosť proti VACV sú nukleozidové analógy radiace sa do rôznych skupín.

Ribavirin (Virazole) bol prvý z nukleozidových analógov aktívny proti širokému spektru RNA aj DNA vírusov, vrátane VACV. Patrí medzi IMP dehydrogenázové inhibítory. Ich mechanizmus účinku spočíva v inhibícii IMP dehydrogenázy, ktorá prispieva k premene inozínmonofosfátu (IMP) na

xantozínmonofosfát (XMP), zásadnému kroku v biosyntéze purínových mononukleotidov, napr. GTP a dGTP. Táto inhibícia má za následok nedostatok GTP a dGTP a tým inhibíciu syntézy RNA a DNA. Podobné aktivity ako Ribavirin vykazujú aj ďalšie nukleozidové deriváty, FICAR, EICAR, tiazofurín a selenazol (De Clercq, 2001).

Ďalšou skupinou nukleozidových analógov s anti-VACV aktivitou sú inhibítory hydrolázy S-adenozylcysteínu (SAH hydrolázy). Tie ovplyvňujú maturáciu VACV mRNA, konkrétne správnu tvorbu metylovaného 5'-konca. Medzi účinné inhibítory SAH hydrolázy s aktivitou aj proti VACV patria cyklické adenzínové analógy (S)-DHPA, (RS)-AHPA, C-c³ Ado a neplanocin A (De Clercq, 2001).

Medzi nukleozidové analógy s anti-VACV účinkom patrí tiež skupina inhibítorov tymidylát syntetázy, 5-substituované 2'-deoxyuridíny. Ich antivírusová aktivita spočíva v inhibícii činnosti tymidylát syntetázy, ktorá mení dUMP na dTMP.

Inhibítorom orotidín-5'-monofosfát (OMP) dekarboxyláz a CTP syntetáz ovplyvňujúcim syntézu pyrimidínových mononukleotidov nebola spočiatku venovaná veľká pozornosť z hľadiska možnosti výrazne iného ovplyvnenia vírusov ako hostiteľských buniek. Avšak, pyrazofurín, prototyp inhibítorov OMP dekarboxyláz, vykazuje inhibičné efekty na viaceré vírusy, vrátane VACV, v koncentráciach zjavne netoxických pre hostiteľské bunky. Podobne je to aj u carbodinu a cyklopentenyl cytozínu – inhibítorov CTP syntetázy, ktoré majú tiež protivírusový efekt (De Clercq, 2001; Sliva a Schnierle, 2007).

Do skupiny nukleozidových analógov patrí tiež jediná látka schválená FDA USA na liečbu postvákcinálnych reakcií po VACV vakcíne, Cidofovir (Vistide[®]), analóg cytozínu (HPMPC), pôvodne schválený na liečbu cytomegalovírusových infekcií popísaný profesorom A. Holým (De Clercq et al., 1986). Presný mechanizmus inhibície VACV alebo iných poxvírusov cidofovirom nebol objasnený, ale väčšina toho čo je známe o efekte na iné DNA vírusy, je aplikovateľná aj na mechanizmus účinku na poxvírusy. Cieľom pôsobenia cidofoviru na molekulárnej úrovni je syntéza vírusovej DNA, a to konkrétne buď

tak, že metabolit cidofoviru funguje ako kompetitívny analóg dCTP a pôsobí ako kompetitívny inhibítor DNA polymerizácii, alebo samotnou inkorporáciou metabolitu cidofoviru dôjde k zablokovaniu predlžovania DNA reťazca. Navyše, cidofovir vykazuje dlhodobý proti-vírusový efekt, čo ho odlišuje od ostatných nukleozidových analógov. Dlhodobý efekt cidofoviru je pripisovaný dlhému polčasu jeho metabolitov (De Clercq, 2002). Nevýhodou tohto preparátu je jeho intravenózna aplikácia a nefrotoxicita (Naesens et al., 1996; Safrin et al., 1997).

Jedinečná antivírusová aktivita cidofoviru však viedla k ďalšiemu vývoju jeho derivátov. Skupine prof. Holého a Dr. M. Krečmerovej sa podarilo pripraviť účinný derivát cidofoviru pridaním ďalšieho dusíka do jeho základnej štruktúry, čím vznikol 5-azacytozín analóg cidofoviru (HPMP-5-azaC; MK-471). Tento preparát vykazuje silnú protivírusovú aktivitu proti širokému spektru vírusov, vrátane poxvírusov a minimálne rovnaké alebo vyššie inhibičné a priaznivejšie cytotoxické vlastnosti ako cidofovir. Následne sa tento tím chemikov zameril na prípravu cyklickej formy a esterov tohto preparátu a testovanie ich protivírusových aktivít. Cyklická forma vykazovala antivírusové vlastnosti porovnateľné s pôvodným HPMP-5-azaC alebo cidofovirom. Najlepšie výsledky spomedzi testovaných esterov vykazoval alkoxyalkyl ester (hexadecyloxyethyl ester; MK-612), ktorý mal 58-krát vyššiu aktivitu proti VACV ako HPMP-5-azaC (Krečmerova et al., 2007).

Ďalšou účinnou látkou na báze cidofoviru sa zdá byť jeho lipidový derivát, hexadecyloxypropyl-CDV (HDP-cidofovir, CMX001), ktorý umožňuje perorálnu aplikáciu a vykazuje až 100 násobne vyššiu potenciu v inhibícii poxvírusov v bunkových kultúrach, čím poskytuje sľubnú potrebnú rovnováhu medzi vysokou účinnosťou a nízkou toxicitou (Kern et al., 2002; Sliva a Schnierle, 2007).

1.2.5 Látky inhibujúce šírenie VACV

V posledných troch rokoch sa objavila nová skupina anti-poxvírusových látok, ktoré sa nevyznačujú priamou inhibíciou vírusovej replikácie, ale redukovaním šírenia vírusovej infekcie.

Niektoré znižujú uvoľňovanie EEV z buniek, hlavný mechanizmus rýchleho šírenia poxvírusov u hostiteľa. EEV sú vytláčané von z bunky pomocou aktínových vláken. Tvorba týchto aktínových vláken je ovplyvňovaná fosforyláciou vírusového proteínu A36 bunkovou tyrozínkinázou c-Src. Z toho vyplýva, že špecifický kinázový inhibítor by mohol byť schopný zainhibovať šírenie VACV. Jednou z takýchto látok je Gleevec (STI-571, Glivec), ktorý je schválený na použitie u ľudí a primárne bol určený pre terapiu chronickej myeloidnej leukémie. Gleevec inhibuje tyrozín kinázu rodiny Abl a bola ukázaná jeho schopnosť zabrániť uvoľňovaniu VACV z infikovaných buniek. Táto látka nie je prvým príkladom inhibície VACV kinázovým inhibítorom, ale je to prvá látka tohto druhu schválená pre použitie na ľuďoch. Podobný efekt ako Gleevec má inhibítor EGFR (receptor epidermálneho rastového faktora) kinázy, CI-1033. U neho tiež bola ukázaná schopnosť uchrániť myši pred letálnou intranasálnou dávkou VACV. Ďalší kinázový inhibítor, U1026, inhibítor Erk, inhibuje replikáciu VACV v bunkových kultúrach (Sliva a Schnierle, 2007).

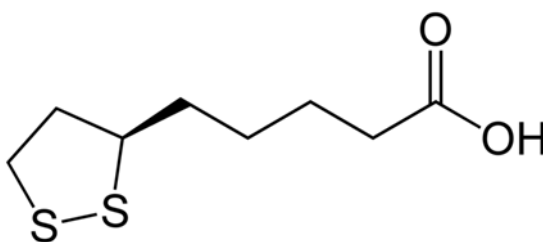
Odlíšnym typom preparátu je ST-246, ktorý bol identifikovaný počas vysoko účinného skríningu súboru nízkomolekulových látok na inhibičný efekt na replikáciu poxvírusov (Sliva a Schnierle, 2007). ST-246 špecificky inhibuje tvorbu extracelulárnej formy vírusu ovplyvnením proteínu F13L VACV. Analýzy pomocou delečných mutantov ukázali, že F13L je potrebný pre zabalenie IMV formy vírusu do formy IEV. K inhibícii ST-246 dochádza pri obalovaní vírusových častíc v trans-Golgi (Duraffour et al., 2007).

1.2.6 Látky reagujúce s tiolovými skupinami

Časť našej práce sledujúcej interakcie VACV s hostiteľskou bunkou je zameraná na inhibičné efekty na infekciu VACV. Pozorovali sme efekt nového typu inhibítorov VACV na infekciu týmto vírusom, látok reagujúcich s SH-skupinami, najmä kyseliny lipoovej a etakrynovej. Výsledky charakterizujúce inhibičné pôsobenie kyseliny lipoovej tvoria druhú hlavnú časť tejto dizertácie.

1.2.6.1 Kyselina lipoová

Kyselina lipoová (LA) je disulfidový derivát kyseliny oktánovej (kaprylovej), ktorý v oxidovanej forme tvorí intramolekulovú disulfidovú väzbu. LA bola v roku 1950 izolovaná z pečene hovädzieho dobytká. Vzhľadom na jej úlohu v biochemických procesoch bola zaradená medzi vitamíny komplexu B. V súčasnosti už však nie je považovaná za vitamín. Pravdepodobným miestom jej syntézy sú mitochondrie, kde sa nachádzajú prekursor LA, kyselina oktánová a cysteín ako zdroj síry (Bilska a Wlodek, 2005).



Obr. 2. Kyselina lipoová.

Amid LA je koenzým E2 (dihydrolipoát acyltransferáza) podjednotky multienzymatického mitochondriového komplexu katalyzujúceho oxidatívnu dekarboxyláciu pyruvátu, α -ketoglutarátu a α -ketokyselín s rozvetvenými reťazcami vznikajúcich pri transaminácii leucínu, izoleucínu a valínu. LA je tiež dôležitou súčasťou mitochondriového komplexu zodpovedného za syntézu a degradáciu glycínu (Bilska a Wlodek, 2005).

Zvýšený záujem o túto látku v súčasnej medicíne vyplýva z jej unikátnej redukčnej schopnosti. Vďaka nízkemu redukčnému potenciálu dvojice LA/DHLA, sa redukovaná LA podieľa jednak na reakciách neutralizujúcich kyslíkové radikály, ako aj na reakciách redukujúcich oxidované formy iných antioxidantov. Navyše má LA ďalšiu špecifickú vlastnosť, a to je rozpustnosť nielen vo vode, ale aj v tukoch. Všetky tieto zmienené vlastnosti prispievajú k tomu, že sa LA tiež nazýva „antioxidant medzi antioxidantmi“ (Bilska a Wlodek, 2005).

Viacerými autormi boli potvrdené závery o antioxidačných vlastnostiach LA. LA vychytáva hydroxylový radikál, kyselinu chlórnu a singletový kyslík. Zdá sa, že nereaguje s peroxidom vodíka, peroxylovým a superoxidovým radikálom. Tiež bola ukázaná schopnosť LA reagovať s radikálmi dusíka. LA je schopná redukovať GSSG na glutatión. Významne tiež prispieva k regenerácii vitamínu E z jeho oxidovanej formy (Moini et al., 2002). Okrem reakcie s ROS (reaktívne deriváty kyslíka), LA reaguje s Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} a Fe^{2+} (Packer et al., 1995).

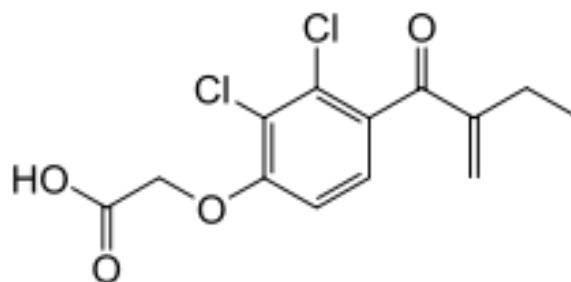
V súčasnosti vzbudzuje LA značný záujem pre jej terapeutické použitie a pozitívny vplyv na liečbu viacerých ochorení ako sú diabetes, arteroskleróza, degeneratívne nervové ochorenia alebo AIDS (Bilska a Wlodek, 2005).

Bolo ukázané, že LA porušuje replikáciu HIV zainhibovaním aktivácie NF κ B v bunkových kultúrach (Pande a Ramos, 2003). Počas aktivácie NF- κ B sú dva procesy, ktoré môžu byť ovplyvnené tiolovými antioxidantami ako je LA. Prvým je jeho disociácia z inhibičnej jednotky I κ B, pričom oxidácia stimuluje disociáciu a tým aj aktiváciu NF- κ B. Druhým je samotná väzba NF- κ B na DNA, na ktorej sa podieľajú cysteínové zvyšky, ktoré vo svojej redukovanej forme zvyšujú väzbu na DNA (Packer et al., 1995).

O túto látku prejavili záujem tiež dermatológovia a krémy obsahujúce LA sú už na trhu. Vo viacerých športových kluboch dostávajú športovci preparáty obsahujúce LA, ktorá znižuje oxidačný stres vznikajúci pri cvičení a zvýšenej svalovej regenerácii (Bilska a Wlodek, 2005).

1.2.6.2 Kyselina etakrynová

Kyselina etakrynová (EA) bola pôvodne nasyntetizovaná kvôli nájdeniu efektívnejšieho diuretika. Miestom jej diuretického pôsobenia je Henleova kľučka, kde inhibuje aktívny transport chloridu. EA má len malý vplyv na prestup sodíka a chloridu. Aktívnou formou nie je EA samotná, ale EA-cysteín. EA-cysteín v lumen dilučného segmentu inhibuje aktívny transport chloridu pri koncentrácii 200-krát nižšej ako EA samotná (Burg, 1976).



Obr. 3. Kyselina etakrynová.

EA môže vďaka svojej štruktúre alkylovať tiolové skupiny proteínov alebo glutatiónu. Na základe toho sa dá predpokladať, že môže modifikovať aj tiolové zvyšky v NF- κ B zásadné pre jeho aktiváciu a to buď znižovaním intracelulárnych hladín glutatiónu alebo priamo alkyláciou proteínov (Han et al., 2005).

Derivát EA, amid EA, bol ukázaný ako možný inhibítor proteázy koronavírusov, medzi ktoré patrí aj vírus SARS (Kaeppler et al., 2005).

1.3 Interakcia vírusu vakcínie s hostiteľskou bunkou – predchádzajúce výsledky našej skupiny

V tejto časti úvodu by som chcela stručne zhrnúť výsledky práce ľudí našej pracovnej skupiny, na ktoré bude táto dizertačná práca nadväzovať. Moji kolegovia čiastočne charakterizovali lýtický charakter bunkovej smrti spôsobený infekciou dvoma rekombinantmi VACV (VACV-Cat a VACV-Bcl-2) na dve bunkové línie HeLa G a BSC-40 (Kalbacova et al., 2002; Vrbacky et al., 2003). Konkrétne bol popísaný vplyv VACV infekcie na zmeny v integrite plazmatickej membrány a na $\Delta\Psi_m$ za pomoci fluorescenčného indikátora propídium iodidu (PI), resp. DiOC₆(3).

Infekcia VACV vedie k významnému porušeniu integrity plazmatickej membrány v HeLa G bunkách (Obr. 4A - (Kalbacova et al., 2008). Proteín Bcl-2 exprimovaný VACV je schopný tento trend významne zvrátiť v 48 h.p.i. V bunkách BSC-40 je priebeh infekcie podobný, v skorších časových intervaloch po infekcii má VACV za následok zvýšené poškodenie bunkovej membrány. Od

časového intervalu 12 h.p.i. sa už ale prejavuje apoptotický charakter bunkovej smrti indukovanej VACV-Bcl-2 a v bunkách infikovaných týmto rekombinantom je znížený počet buniek s porušenou bunkovou membránou, čo zodpovedá pozorovanej morfológii.

Infekcia VACV má za následok aj zmeny v $\Delta\Psi_m$. Infekcia VACV-CAT vedie k štatisticky významnému zníženiu $\Delta\Psi_m$ v oboch bunkových líniiach, HeLa G aj BSC-40. Počas infekcie VACV-Bcl-2 je tento pokles zvrátený, pričom v HeLa G bunkách k tomu dochádza 36-48 h.p.i. a u BSC-40 bolo zaznamenané zvýšenie $\Delta\Psi_m$ indukované Bcl-2 v časových intervaloch 12-18 h.p.i. (Obr. 4B - (Kalbacova et al., 2008).

Moja kolegyňa, Marie Kalbáčová (Kalbacova, 2003; Kalbacova et al., 2008), vo svojich experimentoch ďalej zaznamenala aktiváciu aj aktivitu kaspáz v bunkách lýticky infikovaných VACV. Kaspázy sú proteázy, ktorých aktivita je charakteristická počas apoptózy, nie však počas nekrózy. Kaspázovú aktivitu sledovala na troch rôznych úrovniach ich kaskády tromi rôznymi metódami prietokovej cytometrie.

Najskôr bola zisťovaná miera aktivácie kaspáz za použitia testu CaspaTagTM, ktorý stanovuje aktiváciu kaspáz na základe ireverzibilnej väzby fluoresceínom značeného inhibítora kaspáz (FAM-VAD-FMK) do aktívneho miesta kaspáz, no nie pre-kaspáz. V bunkách HeLa G bola nameraná zvýšená aktivácia kaspáz v bunkách infikovaných VACV-CAT a pozorovaný inhibičný efekt na túto aktiváciu v bunkách infikovaných VACV-Bcl-2 v oboch časových intervaloch – 24 a 48 h.p.i. (Obr. 5A - (Kalbacova et al., 2008). V BSC-40 bola aktivácia kaspáz v bunkách infikovaných VACV-CAT rovnako vyššia ako v neinfikovaných kontrolách. VACV-Bcl-2 túto aktiváciu neovplyvnilo v skorších meraných časových intervaloch (6 a 12 h.p.i.), zatiaľ čo v neskorších sú už bunky mrtvé.

Druhá použitá metóda sledovala štiepenie nefluorescenčného substrátu kaspáz, kaspázami na fluorescenčný produkt. U HeLa G bolo štiepenie pozorované v bunkách infikovaných VACV-CAT, no Bcl-2 exprimovaný VACV nemal na túto aktivitu inhibičný efekt v 24 h.p.i. V 48 h.p.i. bol už ale inhibičný

efekt na hladiny štiepeného Rhodamínu 110 bis-(amidu kyseliny L-aspartátovej) zaznamenaný (Obr. 5B - (Kalbacova et al., 2008). V BSC-40 bol nárast hladín štiepeného Rhodamínu 110 bis-(amidu kyseliny L-aspartátovej) pozorovaný u vzoriek infikovaných VACV-CAT od časového intervalu 12 h.p.i. Bcl-2 ho zainhiboval v časových intervaloch 12 a 15 h.p.i. V 18 h.p.i. boli namerané zvýšené hladiny štiepeného Rhodamínu 110 bis-(amidu kyseliny L-aspartátovej) u vzoriek infikovaných VACV-Bcl-2, no v tomto časovom intervale boli už bunky mrtvé a zaznamenané štiepenie je pravdepodobne artefakt.

Treťou metódou, M30 CytoDEATH (Fluorescein), bol stanovovaný konečný produkt štiepenia kaspáz, neoepitop cytokeratínu 18, ktorý je typický pre apoptotické epitelové bunky. V bunkách HeLa G infikovaných VACV-CAT bolo pozorované vyššie štiepenie cytokeratínu 18 v porovnaní s neinfikovanými kontrolami. Pôsobenie Bcl-2 toto štiepenie zainhibovalo. V BSC-40 bola, podobne ako v HeLa G, nameraná zvýšená fluorescencia v bunkách infikovaných VACV-CAT svedčiaca o štiepení cytokeratínu 18. Infekcia VACV-Bcl-2 mala za následok ešte výraznejšie štiepenie cytokeratínu 18, čo je v zhode s apoptózou prebiehajúcou v týchto vzorkách.

Na základe týchto opublikovaných výsledkov sme sa rozhodli pokračovať v podrobnejšom charakterizovaní interakcie VACV s hostiteľskou bunkou, resp. v analýze efektu VACV na typ bunkovej smrti. Rovnako sme v návaznosti na opublikované práce chceli podrobnejšie popísať efekt Bcl-2 na infekciu VACV a odlíšiť ho od efektu samotnej infekcie VACV.

2. Ciele práce

Predchádzajúce práce z našej pracovnej skupiny priniesli nové poznatky v oblasti interakcie vírusu vakcínie s hostiteľskou bunkou. Netypicky bola počas lýtickej infekcie vírusom vakcínie pomocou prietokovej cytometrie nameraná aktivácia/aktivita kaspáz, proteáz typických pre apoptózu. Ďalším unikátnym pozorovaním bol proapoptotický efekt protoonkogénu Bcl-2 po expresii vírusu vakcínie v bunkovej línii BSC-40, zatiaľ čo v inej epiteliálnej bunkovej línii, HeLa G, pôsobí tento rekombinant vírusu vakcínie antiapoptoticky. Vzhľadom na hrozbu zneužitia príbuzného vírusu, varioly, ako biologickej zbrane a na preukázané vedľajšie účinky v súčasnosti dostupných očkovacích látok založených na víruse vakcínie, stáva sa otázka lepšieho porozumenia interakciám poxvírusov s hostiteľom vysoko aktuálnou. V práci sme sa zamerali jednak na hlbšie objasnenie skôr sledovaných dejov týkajúcich sa aktivácie dráh apoptózy počas infekcie vírusom vakcínie, ale rovnako tiež na nové možnosti inhibície infekcie vírusom vakcínie a sledovanie inhibičných účinkov redox-modulujúcich látok.

Konkrétne ciele práce boli:

1. Sledovanie štiepenia substrátov proteáz počas infekcie vírusom vakcínie.
2. Vplyv inhibície aktivity kaspáz a PARP na infekciu vírusom vakcínie.
3. Príprava bunkových línii HeLa G a BSC-40 exprimujúcich Bcl-2 pomocou indukovateľného expresného systému Tet-On; sledovanie efektu expresie Bcl-2 na tieto bunkové línie.
4. Charakterizácia efektu redox-modulujúcich látok, zvlášť kyseliny lipoovej, na infekciu vírusom vakcínie.

3. Materiál a metódy

3.1 Chemikálie

Všetky použité kultivačné média a rastové doplnky boli od firiem Invitrogen, Gibco alebo PAA Laboratories. Kyselina askorbová, dithiothreitol (DTT), β -mercaptoetanol (β -ME), kyselina etakrynová, kyselina α -lipoová, ATP a isopropyl- β -thiogalactopyranoside (IPTG) bol od Sigma. Luciferín bol od Promega. 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide (DiOC₆(3)) od Molecular Probes a propidium iodid (PI) od Fluka. Všetky enzýmy, primery, sondy a chemikálie pre real-time PCR boli od Applied Biosystems. Ďalšie použité chemikálie boli od Sigma alebo Fluka, pokiaľ nie je uvedené inak.

3.2 Bunkové línie a kultivačné podmienky

Bunkové línie HeLa G (human cervical carcinoma cells, ľudský karcinóm krčka maternice) a BSC-40 (African green monkey kidney cells, obličkové bunky mačička zeleného) boli kultivované v DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, glukóza 4,5 g/l) obohatenom o 10% neonatálne teľacie sérum inaktivované pri 65°C (NCS; 10% NCS-DMEM) a antibiotiká (penicilín 1x10⁵ U/l, streptomycín 100 mg/l). Myšacia fibroblastová línia L929 a myšacia monocytovo/makrofágová bunková línia J774.G8 boli kultivované v DMEM obohatenom o 10% fetálne bovinné sérum inaktivované pri 65°C (FBS; 10% FBS-DMEM) a antibiotiká. Makrofágy boli preinkubované so 100 U/ml IFN γ (R&D Systems) 18 hodín pred infekciou 100 U/ml IFN γ (R&D Systems). Ľudská bunková línia Jurkat odvodená od T-buniek bola kultivovaná v RPMI 1640 obohatenom o 10% fetálne bovinné sérum inaktivované pri 65°C (10% FBS-RPMI), antibiotiká a 2 mM glutamín. Všetky bunkové línie boli kultivované v 37°C, v atmosfére s 5% CO₂ a 95% vlhkosťou.

3.3 Príprava stabilne transfekovaných bunkových línií Tet-On

3.3.1 Stabilné transfekcie a selekcia bunkových línií

Príprava stabilne transfekovaných bunkových línií Tet-On spočívala v dvoch po sebe nasledujúcich stabilných transfekciách. V prvej stabilnej transfekcii boli bunky transfekované regulačným plazmidom pTet-On (Clontech) za použitia transfekčného činidla Superfect (Qiagen). 24 hod. pred transfekciou bolo $0,5 \times 10^6$ buniek bunkovej línie BSC-40, resp. HeLa G, nasadených na 6-jamkovú kultivačnú platňu v 10% NCS-DMEM. Bunky boli na druhý deň po nasadení opláchnuté DMEM bez pridaného séra a transfekované podľa protokolu výrobcu. Stručne, 4 μg plazmidu pTet-On boli rozpustené v DMEM bez pridaných antibiotík a séra do celkového objemu 100 μl . K DNA bolo pridaných 6,67 μl transfekčného činidla a pripravená zmes komplexov podľa protokolu výrobcu. Po 2-3 hod. inkubácii buniek so zmesou transfekčných komplexov v 37°C, 5% CO₂ boli zvyškové komplexy z jamiek odsaté a k bunkám boli pridané 3 ml 10% NCS-DMEM. 48 hod. po transfekcii boli bunky ztrypsinizované a prenesené na 100 mm kultivačné platne, na ktorých boli kultivované v 10% NCS-DMEM s pridaným 0,5 mg/ml G.418. Počas niekoľkých nasledujúcich týždňov boli stabilne transfekované línie selektované v prítomnosti G.418. Použité koncentrácie G.418 boli vybraté na základe predchádzajúcich pokusov na bunkových liniách BSC-40 a HeLa G.

V druhej stabilnej transfekcii boli bunky s úspešne včleneným regulačným plazmidom (testovanie úspešnej prvej transfekcie pozri nižšie) transfekované plazmidom s vklonovaným génom, ktorý sme chceli exprimovať. Zároveň plazmid obsahoval aj gén pre rezistenciu na hygromycín. 24 hod. pred transfekciou bolo $0,225 \times 10^6$ buniek bunkovej línie BSC-40-pTet-On nasadených na 6-jamkovú kultivačnú platňu v 10% NCS-DMEM. Pre druhú stabilnú transfekciu bol použitý rovnaký protokol ako pre prvú. Do pripravených buniek sme transfekovali 4 μg plazmidu pTRE2Hyg-Luc alebo pTRE2Hyg-Blc-2. Po 2-3 hod. inkubácii boli odsaté zvyškové komplexy a k bunkám bolo pridané 10% NCS-DMEM s G.418

(0,75 mg/ml). 48 hod. po transfekcii boli bunky ztrypsinizované a prenesené na 100 mm kultivačné platne, na ktorých boli kultivované v 10% NCS-DMEM s pridaným G.418 (0,75 mg/ml) a hygromycínom (0,2 mg/ml). Počas niekoľkých nasledujúcich týždňov boli stabilne transfekované línie selektované v prítomnosti obidvoch antibiotík.

3.3.2 Skríning stabilne transfekovaných línií BSC-40-pTet-On a HeLa G-pTet-On

0,12x10⁶ resp. 0,15x10⁶ stabilne transfekovaných BSC-40-pTet-On, resp. HeLa G-pTet-On bolo nasadených na 12 jamkovú kultivačnú platňu 24 hodín pred transienntnou transfekciou. Na transienntnú transfekciu bolo, podobne ako na stabilnú, použité transfekčné činidlo Superfect a protokol výrobcu. Na transfekciu 1 jamky bolo použitých 0,8 µg DNA (pTRE-Luc – Clontech) a 2,7 µl reakčného činidla Superfect. Po 2-3 hod. inkubácií boli odsaté zvyškové komplexy a k bunkám bolo pridaných 1,5 ml 10% NCS-DMEM s pridaným doxycyklínom (1 µg/ml). 24 hodín po transfekcii boli bunky ztrypsinizované a odpipetované na stanovenie luciferázovej aktivity.

3.3.3 Skríning stabilne transfekovaných línií BSC-40-Tet-On-Bcl-2 a BSC-40-Tet-On-Luc

0,45x10⁶ stabilne transfekovaných BSC-40-Tet-On-Bcl-2 bolo nasadených na 12 jamkovú kultivačnú platňu. K bunkám bol na indukciu expresie Bcl-2 a Luc pridaný doxycyklín (2; 5 a 10 µg/ml). 24, resp. 48 hodín, po indukcii boli bunky odpipetované a spracované na western blot.

3.4 Vírusy

V pokusoch bol použitý wild-type VACV (WT-VACV), kmeň Western Reserve (WR; ATCC VR-119) a niekoľko rekombinantných VACV. Všetky použité rekombinantné VACV boli pripravené homológnoú rekombináciou do TK génu vírusu. Rekombinantné VACV exprimujúce chloramfenikol acetyltransferázu

(CAT), Bcl-2 a PKR pod kontrolou IPTG-indukovateľného neskorého promotora VACV p4b boli pripravené a láskavo poskytnuté Dr. S. B. Lee (Lee et al., 1993; Lee et al., 1997). Podobný rekombinantný VACV exprimujúci inducibilnú syntetázu NO (iNOS) pod p4b promotorom VACV bol pripravený a popísaný Dr. Mělkovou (Melkova a Esteban, 1995). Rekombinantné VACV exprimujúce luciferázu pod kontrolou skorého/neskorého promotora VACV p7.5 alebo pod kontrolou neskorého promotora VACV p4b boli rovnako pred časom popísané (Rodriguez et al., 1988; Rodriguez a Smith, 1990). Vírusy boli pomnožené v bunkovej línii BSC-40, v 2% NCS-DMEM a ich titer bol stanovený 10-násobným riedením a plakovou esejou na bunkách BSC-40.

3.5 Infekcia

Adherentné bunky boli 24 hod. pred infekciou nasadené na 24-, 12- alebo 6-jamkové kultivačné platne v hustote $0,3 \times 10^6$; $0,6 \times 10^6$ alebo $1,5 \times 10^6$ buniek na jamku. Suspenzné bunky boli 24 hod. pred infekciou nariedené čerstvým kultivačným médiom. Pred infekciou boli bunky raz omyté kultivačným médiom bez pridaného séra. Inokulum vírusu bolo pridané k bunkám v médiu bez séra o multiplicitate infekcie m.o.i. = 2 (pokiaľ nie je uvedené inak) a ponechané absorbovať po dobu 1 hodiny. Po odstránení vírusového inokula boli bunky kultivované v 2% NCS-DMEM (HeLa G a BSC-40), 2% FBS-DMEM (L929 a J774.G8) alebo v 2% FBS-RPMI (Jurkat). U rekombinantov VACV exprimujúcich rekombinantné gény pod kontrolou indukovateľného promotora bolo počas infekcie, ako aj do kultivačného média po infekcii, pridané 1,5 mM IPTG. Pri infekcii rekombinantom exprimujúcim iNOS bol k bunkám pridaný arginín vo výslednej koncentrácii 1 mM. Na infekciu väčšiny bunkových línii boli použité nepurifikované vírusy, len na infekciu makrofágov a bunkovej línii Jurkat boli použité vírusy purifikované na sacharózovom gradiente (Joklik, 1962). V stanovených intervaloch od infekcie (h.p.i.) boli bunky zozbierané a spracované podľa konkrétnych esejí.

3.6 Titrácia

Pre stanovenie titrov vírusov boli bunky zobrať priamo v kultivačnom médiu a zlyzované v 3 cykloch zmrazenia-rozmrazenia a sonikácie. Kvantita vírusu bola stanovená desiatkovým riedením a plakovou esejou na bunkách BSC-40. Na monolayer buniek BSC-40 na 12-jamkovej kultivačnej platni nasadených 24 hod. vopred bolo pridaných 200 µl bunkového lyzátu po sonikácii príslušného riedenia a ponechaných na absorpciu počas 1 hod. za občasného miešania. Po odstránení inokula boli bunky kultivované v 2% NCS-DMEM asi 42 hod. Následne boli zafixované 4% paraformaldehydom v PBS a ofarbené 1% kryštálovou violetou v PBS s pridaným 2% etanolom. Po usušení bol stanovený počet vírusových plakov a titer vírusu bol vyjadrený ako PFU/ml.

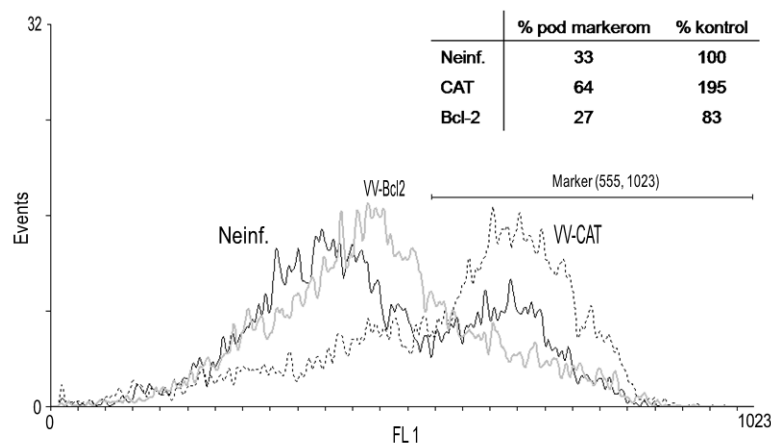
3.7 Stanovenie cytopatického efektu – test CPE

$0,6 \times 10^6$ buniek BSC-40 na 24-jamkovej kultivačnej platni bolo 24 hod. po nasadení infikovaných inokulom obsahujúcim približne 20 PFU WT-VACV alebo rekombinantným VACV exprimujúcim luciferázu pod neskorým promotomom p4b (Luc L). Po odstránení inokula boli bunky kultivované v 2% NCS-DMEM s pridanými testovanými látkami o príslušnej koncentrácii alebo s vehikulom. 48 hod. po infekcii boli bunky zafixované 4% paraformaldehydom v PBS a ofarbené roztokom obsahujúcim 1% kryštál violet a 2% etanol.

3.8 Prietoková cytometria

Na stanovenie bunkových charakteristík prietokovou cytometriou bol používaný prietokový cytometer FACScan (Beckton Dickinson) s argónovým laserom emitujúcim pri 488 nm a detekujúci v 3 kanáloch (FL1 detekuje 535 nm, FL2 580 nm a FL3 viac ako 630 nm). Merania boli vykonávané pomocou CellQuest programu (Beckton Dickinson). Na základe ohraničenia a výberu v FSC-SSC dot plot zobrazení bolo meraných 5000, resp. 10 000 buniek. Následné analýzy dát boli vykonávané pomocou softvéru WinMDi v2.8 (Joseph

Trotter, The Scripps Research Institute, <http://facs.scripps.edu/software.html>). V určitom časovom intervale boli bunky zobraté, resuspendované rozpípetovaním, označené fluorochrómom a použité na meranie a analýzu v príslušnom detekčnom kanále. Pri analýze boli v histogramoch získaných vo WinMDi špecificky preložené markere (Obr. 4) a po vyhodnotení štatistiky poskytnutej softwérom boli stanovené percentá buniek v označenej oblasti. Tieto hodnoty boli následne porovnané a vyjadrené ako percentá z kontrolných populácií (100%).



Obr. 4. Ukážka cytometrickej analýzy.

3.8.1 Stanovenie mitochondriálneho membránového potenciálu ($\Delta\Psi_m$)

$0,15 \times 10^6$ buniek bolo inkubovaných s DiOC₆(3) o konečnej koncentrácii 20 nM po dobu 15 min. pri 37°C, 5% CO₂. Následne boli analyzované na prietokovom cytometri v kanáli FL1.

3.8.2 Stanovenie integrity cytoplazmatickej membrány

PI o konečnej koncentrácii 1 µg/ml bol pridaný krátko pred cytometrickou analýzou ku vzorkám inkubovaným s DiOC₆(3). Fluorescencia bola analyzovaná prietokovou cytometriou v kanáli FL3.

3.8.3 YOPRO

0,15x10⁶ buniek bolo inkubovaných s YOPRO o konečnej koncentrácii 5 µM po dobu 15 min. pri 37°C, 5% CO₂. Následne boli analyzované na prietokovom cytometri v kanáli FL1.

3.8.4 Stanovenie kaspázovej aktivity

3.8.4.1 CaspaTag™ Fluorescein Caspase (VAD) Assay Kit (Intergen).

K 0,15x10⁶ odpipetovaných buniek bolo pridaných 5 µl 30x koncentrovaného roztoku FAM-VAD-FMK. Po 1 hod. inkubácii v 37°C, 5% CO₂ boli bunky dvakrát premyté 1 ml 1x premývacieho roztoku a resuspendované v 200 µl tohto roztoku. Vzorky boli analyzované prietokovou cytometriou v kanáli FL1.

3.8.4.2 Rhodamín 110 bis-(amid kyseliny L-asparágovej)

0,6 x 10⁶ odpipetovaných buniek bolo resuspendovaných v 100 µl kultivačného média. K bunkám bol pridaný Rhodamín 110 bis-(amid kyseliny L-asparágovej; Molecular Probes) v konečnej koncentrácii 50 µM a po 30 min. inkubácii v 37 °C, 5% CO₂ boli vzorky analyzované prietokovou cytometriou v kanáli FL1.

3.9 Fluorescenčná mikroskopia

Kultivované bunky boli sledované priamo v kultivačných platniach inverzným fluorescenčným mikroskopom Olympus IX-70 a zobrazovacím analyzačným systémom vybaveným čiernobiou kamerou Cohu 4912 (obrazový analyzačný software LUCIA 4.6; Laboratory Imaging Ltd., Česká republika). Bunky boli pozorované vo fázovom kontraste ako aj pod UV svetlom po označení

bunkovo priechodným, DNA viažúcim fluorochrómom Hoechst 33342 (0,1 µg/ml; Intergen).

3.10 Western blot

SDS-PAGE a western blot boli robené podľa publikovaných postupov (Ausubel et al., 2002; Harlow a Lane, 1988; Laemmli, 1970). V stanovených časoch po infekcii boli bunky odpipetované, scentrifugované pri 3500 rpm 5 min a médium bolo odstránené. Pelet bol následne 2x premytý v PBS, scentrifugovaný pri 3500 rpm 5 min. Bunky boli resuspendované v príslušnom objeme 1x Laemli Reducing Sample buffer a denaturované 3 min. varom. Vzorky, rovnako ako aj použitý marker, boli krátko zvortexované a scentrifugované pri teplote okolia, 5 min., 14 000 rpm.

Na analýzu western blotom boli proteíny rozdelené na 8% SDS-PAGE (pre detekciu PARP), na 10% SDS-PAGE (pre detekciu VACV polypeptidov, luciferázy, cytokeratínu 18 a β-aktínu) alebo na 14% SDS-PAGE (pre detekciu Bcl-2).

VACV polypeptidy boli detekované králičím antisérom proti VACV (riedenie 1:500; antisérum bolo pripravené imunizáciou inaktivovaným purifikovaným VACV, pripravené v Seva-Imuno Praha), kozou sekundárnou protilátkou konjugovanou s peroxidázou - (riedenie 1:1000; Cappel Research Products) a chromogénnym substrátom α-chloronaftol. Luciferáza bola detekovaná pomocou králičej polyklonálnej protilátky (riedenie 1:500; Santa Cruz Biotechnology). PARP bola detekovaná králičou polyklonálnou protilátkou proti aminokyselinám 764-1014 na C-konci PARP (116/85 kDa; riedenie 1:500; Santa Cruz Biotechnology). Cytokeratín 18 bol detekovaný myšími monoklonálnymi protilátkami DC-10 a DA-7 (riedenie 1:500; Exbio). β-aktín bol detekovaný kozou polyklonálnou protilátkou (riedenie 1:200; Santa Cruz Biotechnology). Bcl-2 bol detekovaný králičou polyklonálnou protilátkou proti aminokyselinám 1-205 Bcl-2 (riedenie 1:500; Santa Cruz Biotechnology). Sekundárnou protilátkou pre protilátky detekujúce luciferázu, PARP, cytokeratín 18 a Bcl-2 bola kozia

protilátka konjugovaná s peroxidázou (Luc, PARP, Bcl-2 - riedenie 1:20 000, Cappel Research Products; cytokeratín 18 - riedenie 1:20 000; Sigma). Sekundárnou protilátkou pre stanovenie β -aktínu bola oslia protilátka konjugovaná s peroxidázou (riedenie 1:20 000; Jackson ImmunoResearch Laboratories). Luciferáza, PARP, cytokeratín 18, β -aktín a Bcl-2 boli stanovované použitím chemiluminiscenčného substrátu West Femto (Pierce).

3.11 Stanovenie luciferázovej aktivity

V stanovených časoch po infekcii bolo $0,6 \times 10^6$ buniek odpipetovaných, scentrifugovaných pri teplote okolia, 5 min., 3500 rpm a médium bolo odstránené. Pelet bol následne 2x premytý v PBS a scentrifugovaný pri teplote okolia, 5 min., 3500 rpm. Bunky boli zlyzované v 100 μ l luciferázového extrakčného pufru (25 mM glycyglycine, pH 7,8; 1% Triton X-100; 15 mM $MgSO_4$; 4 mM EGTA; 1 mM DTT a inhibítory proteáz - Complete, Roche) a scentrifugované pri 14 000 rpm 5 min. pri 4°C. Supernatant obsahujúci luciferázu bol prepipetovaný do nových skúmaviek a zamrazený pred následnými meraniami. Do reakcie na stanovenie luciferázovej aktivity bolo pridané 10 mM ATP, pH 7,0 a 0,1 mM luciferín v luciferín dilučnom pufri (25 mM Hepes, pH 7,4; 136 mM NaCl; 1 mM EDTA; 6 mM $MgCl_2$; a 0,6% polyethylene glykol; (Brasier et al., 1989; Rodriguez et al., 1988). Luciferázová aktivita bola meraná luminometrom Microlite TLX 2 (Dynatech Laboratories) ako relatívne luciferázové jednotky (RLU). Nameraná luciferázová aktivita jednotlivých vzoriek bola porovnaná s hodnotami kontrolnej skupiny a vyjadrená ako % z kontrol.

3.12 Time of addition assay

$0,6 \times 10^6$ buniek HeLa G na 24 jamkovej kultivačnej platni bolo 24 hod. po nasadení infikovaných rekombinantným VACV exprimujúcim luciferázu pod neskorým promotorom p4b (Luc L) o m.o.i.=2. 500 μ M LA alebo vehikulum boli pridané do inokula, ako aj počas celej doby inkubácie po jeho odstránení alebo pridané v indikovaných časových intervaloch (h.p.i.). 24 hod. po infekcii boli

bunky odpipetované a zmeny v raste vírusu boli stanovené luciferázovou aktivitou a stanovením titru vírusu.

3.13 Izolácia DNA a real-time PCR

0,36x10⁶ buniek bolo v stanovených časoch po infekcii odpipetovaných, scentrifugovaných pri 3500 rpm, 5 min, teplote okolia a médium bolo odstránené. Pelet bol následne 2x premytý v 1xPBS a scentrifugovaný pri 3500 rpm, 5 min, teplote okolia. Bunky boli zlyzované v 120 µl PCR lyzačného pufru (50 mM KCl; 10mM Tris-HCl, pH 8,3; 2,5 mM MgCl₂; 0,1 mg želatíny/ml; 0,45% Nonidet P-40; 0,45% Tween 20 a 100 mg proteínázy K/ml; (Schmidtmayerova et al., 1998). Po proteolyze (2 hod, 56°C) a následnej inaktivácii proteázy (10 min, 95°C) bola vírusová DNA kvantifikovaná metódou real-time PCR za použitia Applied Biosystems 7300 Real-time PCR System. Primery a próby boli pripravené v Applied Biosystems ako Custom TaqMan® Gene Expression Assay. Set primerov a sonda boli navrhnuté na koncovú časť genómu VACV, bps 1-4000 (forward primer, bps 3457-3487, CGTATCACACTATTGAGACAGAAAAAGAAGA; reverse primer, bps 3532-3557, GACACTATATTCCGGTTTGCAAACA; FAM probe, bps 3490-3512, TCGCGAGAGGTAAC TTTTGTGA; strain Western Reserve, GenBank accession no. AY243312). Pre absolútnu kvantifikáciu VACV bol pripravený štandard, ktorý mal amplifikovanú oblasť vklonovanú do plazmidu pCR®4Blunt-TOPO (Generi-Biotech). Pre určenie kalibračnej krivky bol štandard nariedený na 6,22x10³-6,22x10⁸ kópií/reakciu. Do reakcie bolo použitých 100 ng celkovej izolovanej DNA, TaqMan®Universal PCR Master Mix (No AmpErase® UNG, Applied Biosystems) a Assay mix obsahujúci set primerov a značenú sondu (Custom TaqMan® Gene Expression Assays, Applied Biosystems). Celkový objem reakčnej zmesi bol 20 µl a boli použité univerzálne reakčné tepelné podmienky: 10 min. počiatočná denaturácia pri 95°C a 40 cyklov pozostávajúcich z 15-sekundovej denaturácie pri 95°C a 60-sekundovej fázy annealing/extension pri 60°C. Všetky vzorky, vrátane štandardu a kontrol neobsahujúcich templát, boli

pipetované v duplikátoch. Výsledné data boli analyzované Sequence Detection Softvérom ver. 1.3 (Applied Biosystems).

3.14 Stanovenie inhibičných koncentrácií antivírusových látok - IC50 a IC90

Inhibičné koncentrácie testovaných látok boli vyjadrené ako IC50 a IC90, koncentrácie testovaných látok, ktoré znížia rast vírusu alebo luciferázovú aktivitu na 50 resp. 90% kontrol bez pridanej látky. Tieto hodnoty boli stanovené z lineárnych alebo exponenciálnych regresíí kriviek charakterizujúcich závislosť titru vírusu alebo luciferázovej aktivity na koncentrácii testovaných látok.

3.15 Stanovenie cytotoxických koncentrácií antivírusových látok - CC50

Cytotoxické koncentrácie antivírusových látok boli vyjadrené ako CC50, koncentrácie testovaných látok, ktoré znížia rast buniek na 50% kontrol bez pridanej látky detekovaný podľa adaptovaného protokolu TOX-1 kit (Sigma). $0,03 \times 10^6$ adherentných buniek/ml/jamku bolo nasadených na 24 jamkovú kultivačnú platňu. Po 24 hod. bolo bunkám vymenené kultivačné médium za čerstvé so stúpajúcou koncentráciou testovanej látky. V prípade suspenzných bunkových línií boli bunky po zpasážovaní najskôr kultivované v čerstvom médiu, po 24 hod. boli nasadené na 24 jamkovú kultivačnú platňu o hustote $0,06 \times 10^6$ buniek/ml/jamku v čerstvom médiu so stúpajúcou koncentráciou testovanej látky. Po dvoch dňoch boli rast a životnosť buniek charakterizované aktivitou mitochondriových dehydrogenáz pomocou MTT testu. Premena MTT na formazán bola detekovaná fotometricky pri 540 nm po rozpustení produktu v kyslom izopropanole.

Index selektivity (SI) bol vyjadrený ako CC50/IC50.

3.16 Štatistika

Výsledky sú prezentované ako priemery +/- S.E.M. (standard error of mean). Štatistické rozdiely v rámci jednotlivých skupín boli vypočítavane

pomocou ANOVA. Štatistické rozdiely medzi jednotlivými skupinami a kontrolami alebo medzi dvoma odlišnými skupinami boli hodnotené pomocou Student t-testu.

4. Výsledky

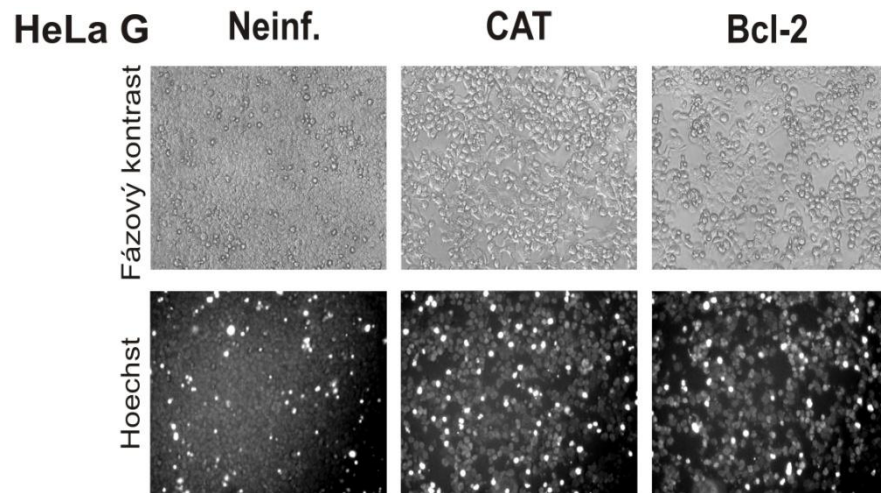
4.1 Typ bunkovej smrti spôsobený infekciou vírusom vakcínie.

4.1.1 Lýtický charakter bunkovej smrti v bunkách infikovaných vírusom vakcínie

VACV spôsobuje vo väčšine infikovaných buniek lýzu, ekvivalent nekrózy. Typ bunkovej smrti spôsobený VACV sme sledovali najskôr morfológicky. Vo väčšine experimentov boli používané dve epiteliálne bunkové línie, HeLa G, pochádzajúca z rakovinových buniek krčka maternice, a BSC-40, pôvodom z obličiek mačička zeleného. Typická morfológia buniek infikovaných VACV je na obr. 5. Bunky HeLa G a BSC-40 boli infikované dvoma rekombinantmi VACV, VACV-CAT a VACV-Bcl-2 (m.o.i.=2), a pozorované vo fázovom kontraste, resp. po ofarbení Hoechstom 33342, fluorescenčným mikroskopom v určených časových intervaloch po infekcii. Na základe výsledkov z predošlých experimentov v laboratóriu (Kalbacova, 2003; Kalbacova et al., 2002), ktoré ukázali odlišný časový priebeh bunkových pochodov súvisiacich s infekciou VACV u rôznych bunkových línií, boli pre sledované bunkové línie zvolené odlišné časové intervaly infekcie. Hoechst 33342 je fluorescenčný DNA indikátor, ktorý sa výrazne akumuluje do kondenzovaných jadier apoptotických buniek a pod UV svetlom sa tieto javia ako jasno žiariace body. Jadrá s nekondenzovanou DNA, v bunkách živých alebo nekrotických, sú tiež označené Hoechstom 33342, ale v porovnaní s jasne žiariacimi apoptotickými sa javia ako matné.

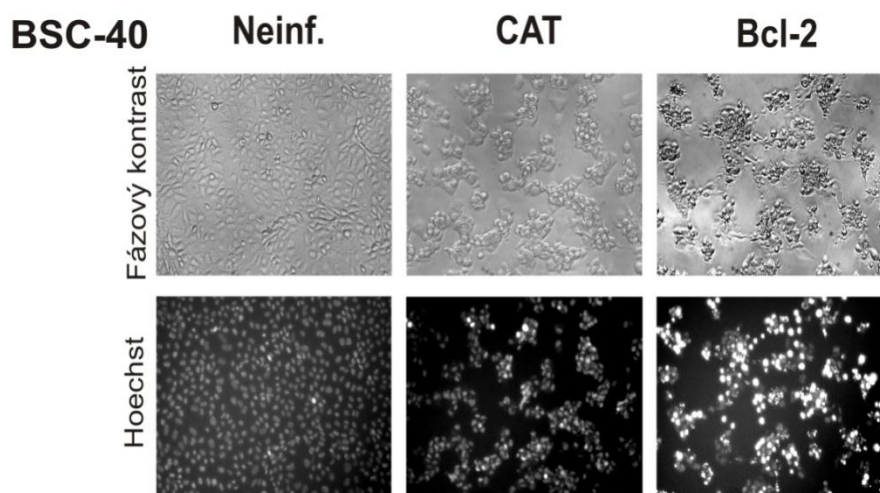
Bunky HeLa G infikované obidvoma rekombinantmi VACV vykazovali cytopatický efekt VACV na hostiteľské bunky (Obr. 5A). Pri pozorovaní vo fázovom kontraste sme videli bunky s charakteristicky zväčšeným objemom. V dôsledku porušenej iónovej rovnováhy sa v týchto bunkách mení obsah vody, v ďalších fázach praská membrána a bunkový obsah sa vylieva von z bunky (Obr. 5A). Po ofarbení Hoechstom 33342 sme videli približne rovnaký malý počet buniek s naakumulovaným indikátorom v kondenzovaných jadrách vo vzorkách

neinfikovaných aj infikovaných VACV, svedčiaci o nezvýšenom bazálnom počte apoptotických buniek v infikovaných vzorkách.



Obr. 5A. Morfológia buniek infikovaných rekombinantným VACV – lýtický efekt na bunky HeLa G. Bunky boli neinfikované (Neinf.) alebo infikované (m.o.i.=2) VACV-CAT (CAT) alebo VACV-Bcl-2 (Bcl-2). 48 h.p.i. boli bunky označené Hoechstom 33342 a pozorované inverzným fluorescenčným mikroskopom vo fázovom kontraste a v UV svetle; pôvodné zväčšenie 150x.

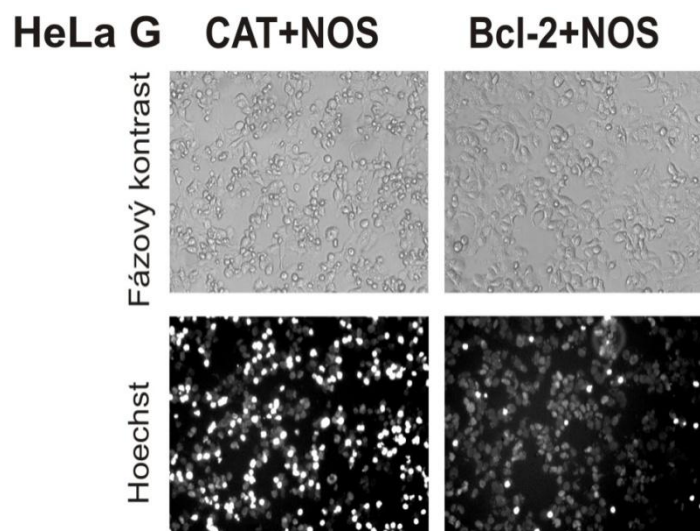
Odlišné bolo pozorovanie u buniek BSC-40 (Obr. 5B). V bunkách infikovaných VACV-CAT sme videli, podobne ako u HeLa G, malý počet apoptotických buniek. Bunky BSC-40 infikované VACV-Bcl-2 mali naopak typicky apoptotickú morfológiu, vo fázovom kontraste boli zjavné malé scvrknuté apoptotické bunky. Po ofarbení Hoechstom 33342 sme v UV svetle pozorovali výrazne väčšie množstvo buniek s kondenzovanou DNA u buniek infikovaných VACV-Bcl-2 ako u buniek infikovaných VACV-CAT a kontrolných, neinfikovaných.



Obr. 5B. Morfológia buniek infikovaných rekombinantným VACV – proapoptotický efekt VACV-Bcl-2 na BSC-40. Bunky boli neinfikované (Neinf.) alebo infikované (m.o.i.=2) VACV-CAT (CAT) alebo VACV-Bcl-2 (Bcl-2). 18 h.p.i. boli bunky označené Hoechstom 33342 a pozorované inverzným fluorescenčným mikroskopom vo fázovom kontraste a v UV svetle; pôvodné zväčšenie 150x.

Mikroskopické pozorovanie potvrdilo proapoptotický efekt proteínu Bcl-2 exprimovaného rekombinantným VACV v bunkách BSC-40. Dva protichodné účinky Bcl-2 exprimovaného VACV boli už v minulosti viackrát popísané v našom laboratóriu (Kalbacova, 2003; Kalbacova et al., 2008; Kalbacova et al., 2002; Lee et al., 1997; Melkova et al., 1997; Vrbacky et al., 2003).

Na obr. 5C je vidieť charakteristický antiapoptotický efekt Bcl-2 na bunky HeLa G. Infekcia rekombinantom VACV-NOS indukuje apoptózu v HeLa G bunkách (Melkova et al., 1997). Vo fázovom kontraste, aj po ofarbení Hoechstom 33342, sme pozorovali zamedzenie apoptózy indukovanej VACV-NOS pri súčasnej infekcii VACV-Bcl-2, čo dokazuje antiapoptotický efekt Bcl-2 v bunkách HeLa G. Naopak, súčasná infekcia kontrolným VACV-CAT tento efekt nezvrátila. Proapoptotický efekt Bcl-2 v bunkách BSC-40 bol prezentovaný vyššie.



Obr. 5C. Morfológia buniek infikovaných rekombinantným VACV – antiapoptotický efekt VACV-Bcl-2 na HeLa G. Bunky boli infikované dvoma rekombinantnými VACV, VACV-CAT (CAT) a VACV-NOS (NOS) alebo VACV-Bcl-2 (Bcl-2) a VACV-NOS (NOS; m.o.i.=1 pre každý rekombinant). 48 h.p.i. boli bunky označené Hoechstom 33342 a pozorované inverzným fluorescenčným mikroskopom vo fázovom kontraste a v UV svetle; pôvodné zväčšenie 150x.

Výsledky prezentované na obr. 5 morfológicky potvrdzujú lýtický charakter bunkovej smrti indukovanej infekciou kontrolnou VACV.

4.1.2 Kaspázová aktivita počas lýtickej infekcie vírusom vakcínie

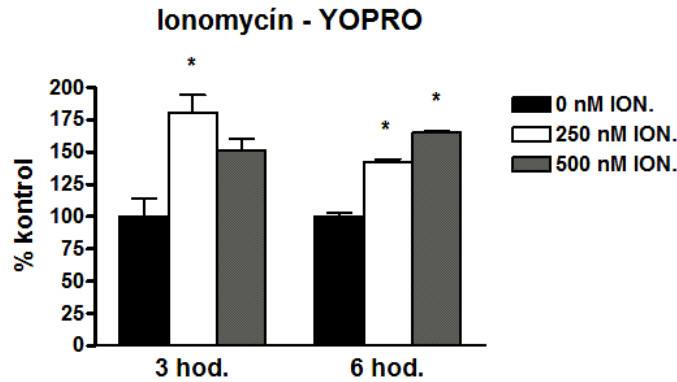
Kaspázy sú cysteínové proteázy typicky asociované s biochemickými procesmi prebiehajúcimi počas apoptózy. Avšak, ich aktivácia či aktivita nie sú spájané s nekrózou. Ako už bolo uvedené v úvode tejto práce, v našom laboratóriu bola M. Kalbáčovou počas lýtickej infekcie VACV u buniek HeLa G a BSC-40 pozorovaná aktivácia/aktivita kaspáz, prípadne iných proteáz, ktorá bola zainhibovaná proteínom Bcl-2 exprimovaným VACV. Rovnako bolo v bunkách lýticky infikovaných VACV-CAT (HeLa G a BSC-40) pomocou prietokovej cytometrie zistené štiepenie cytokeratínu 18, substrátu kaspáz, ktoré bolo zainhibované VACV-Bcl-2 v bunkách HeLa G. V apoptotických BSC-40

infikovaných VACV-Bcl-2 bolo naopak štiepenie cytokeratínu 18 zvýšené v porovnaní s kontrolami (Kalbacova et al., 2008; Kalbacova et al., 2002).

4.1.2.1 Aktivácia a aktivita kaspáz po indukcii apoptózy ionomycínom a staurosporínom.

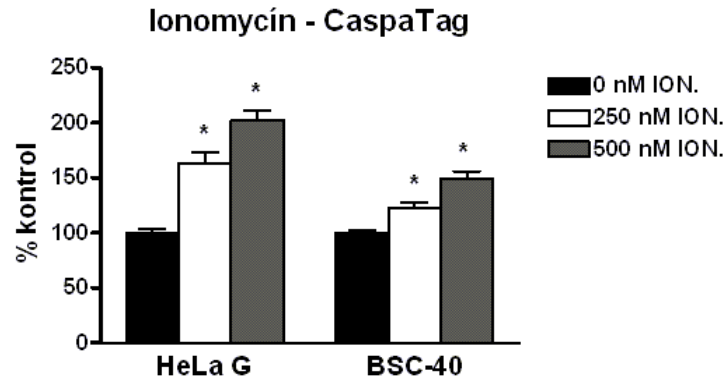
Vzhľadom na to, že spomínané skôr namerané výsledky pochádzali len z infekčných experimentov, rozhodli sme sa ich doplniť a porovnať o hodnoty získané po indukcii apoptózy používanými neinfekčným induktormi, staurosporínom a ionomycínom, v rovnakých experimentálnych podmienkach. Pokusy boli vykonané na rovnakých bunkových líniiach a za rovnakých podmienok, aké boli použité aj v experimentoch s VACV.

Prvým použitým induktorom apoptózy bol ionomycín, kalciový ionofór. Najskôr bola v analyzovaných bunkových líniiach charakterizovaná miera indukcie apoptózy. V určitých časových intervaloch od pridania ionomycínu bolo po označení YOPRO a za použitia prietokovej cytometrie stanovované množstvo apoptotických buniek. YOPRO je známy fluorescenčný indikátor nukleových kyselín. Špecificky vstupuje do apoptotických buniek, preto býva súčasťou apoptotických kitov. 3 hodiny po pridaní 250 a 500 nM ionomycínu bolo v bunkách BSC-40 pozorované zvýšenie počtu apoptotických buniek približne o 75, resp. 50% oproti kontrolám (Obr. 6). Po 6 hodinách bola populácia apoptotických buniek menšia, pravdepodobne na úkor buniek sekundárne nekrotických.



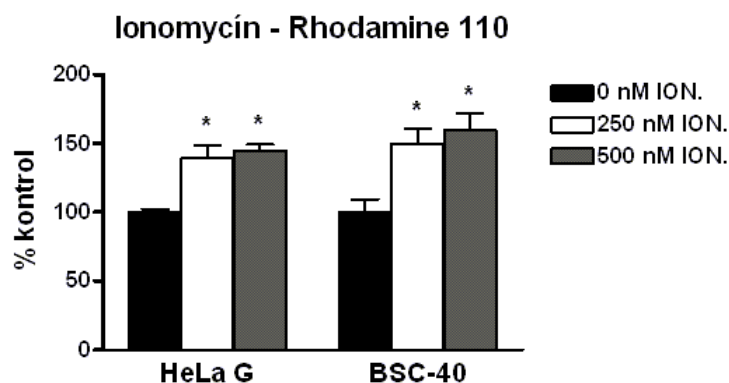
Obr. 6. Indukcia apoptózy v bunkách BSC-40 po pridaní ionomycínu. K bunkám bolo 24 hod. po nasadení vymenené kultivačné médium za 2% NCS-DMEM s príslušnou koncentráciou ionomycínu. 3, resp. 6 hodín, po pridaní ionomycínu boli bunky odpipetované, ofarbené YOPRO a PI a analyzované na prietokovom cytometri. Graf zobrazuje priemer z 2 pokusov v triplikátoch +/- S.E.M., PI-pozitívna populácia buniek bola pred analýzou odgateovaná; *, štatisticky významný rozdiel ($p < 0,05$) oproti kontrolám bez pridaného ionomycínu.

Následne sme stanovovali mieru aktivácie kaspáz po indukcii apoptózy ionomycínom testom CaspaTag. Na základe predošlých experimentov bol pre stanovenie aktivácie kaspáz zvolený 3 hod. časový interval od pridaní ionomycínu. V obidvoch bunkových líniiach, HeLa G aj BSC-40, malo pridanie 250 nM ionomycínu za následok štatisticky významný nárast v aktivácii kaspáz o 50, resp. 25% oproti kontrolám. Pôsobenie 500 nM ionomycínu viedlo ku zvýšeniu fluorescencie indikátora u obidvoch sledovaných bunkových línii a to o 100, resp. 50% (Obr. 7).



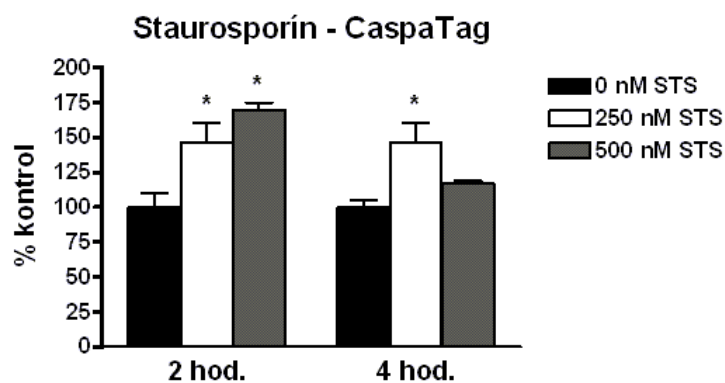
Obr. 7. Zvýšená aktivácia kaspáz v bunkách HeLa G a BSC-40 indukovaná ionomycínom. Bunkám bolo 24 hod. po nasadení vymenené kultivačné médium za 2% NCS-DMEM s príslušnou koncentráciou ionomycínu. 3 hod. po pridaní ionomycínu boli bunky odpipetované, spracované na stanovenie aktivácie kaspáz testom CaspaTag a analyzované na prietokovom cytometri. Graf zobrazuje priemer zo 4 pokusov v triplikátoch +/- S.E.M; *, štatisticky významný rozdiel ($p < 0,05$) oproti kontrolám bez pridaného ionomycínu.

V ďalšom experimente sme stanovovali štiepenie Rhodamínu 110 bis-(amidu kyseliny L-asparágovej), ktorý bol ukázaný ako substrát kaspázy 3 a 7. V zhode s výsledkami z nameranej fluorescence CaspaTagu, bola v tom istom experimentálnom usporiadaní pozorovaná zvýšená fluorescence štiepeného Rhodamínu 110 bis-(amidu kyseliny L-asparágovej) (Obr. 8). 3 hod. od pridanía 250nM ionomycínu bolo namerané významné zvýšenie fluorescence asi o 40% u HeLa G a asi o 50% u BSC-40 buniek v porovnaní s kontrolami. Pôsobenie 500 nM ionofóra malo za následok ešte vyšší nárast stanovovanej fluorescence.



Obr. 8. Zvýšená fluorescencia štiepeného Rhodamínu 110 bis-(amidu kyseliny L-asparágovej) v bunkách HeLa G a BSC-40 indukovaná ionomycínom. Bunkám bolo 24 hod. po nasadení vymenené kultivačné médium za 2% NCS-DMEM s príslušnou koncentráciou ionomycínu. 3 hod. po pridaní ionomycínu boli bunky odpipetované, označené Rhodamínom 110 bis-(amid kyseliny L-asparágovej) a po 30 min. inkubácii analyzované na prietokovom cytometri. Graf zobrazuje priemer z 2 pokusov v triplikátoch +/- S.E.M; *, štatisticky významný rozdiel ($p < 0,05$) oproti kontrolám bez pridaného ionomycínu.

Testom CaspaTag sme stanovovali aktiváciu kaspáz aj po pôsobení ďalšieho induktora apoptózy, staurosporínu. Štatisticky významne zvýšená fluorescencia dokazujúca aktiváciu kaspáz bola nameraná po pridaní 250 a 500 nM staurosporínu k HeLa G bunkám po 2 hodinách (Obr. 9). Po 4 hodinách bola aktivácia kaspáz v bunkách s pridaným 500 nM staurosporínom nižšia ako u 250 nM.



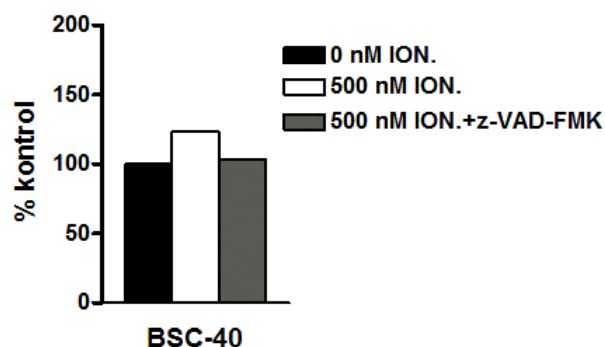
Obr. 9. Zvýšená aktivácia kaspáz v bunkách HeLa G indukovaná staurosporínom. Bunkám bolo 24 hod. po nasadení vymenené kultivačné médium za 2% NCS-DMEM s príslušnou koncentráciou staurosporínu. 2, resp. 4 hod. po pridaní staurosporínu boli bunky odpipetované, spracované na stanovenie aktivácie kaspáz testom CaspaTag a analyzované na prietokovom cytometri. Graf zobrazuje priemer najmenej z 2 pokusov v duplikátoch +/- S.E.M; *, štatisticky významný rozdiel ($p < 0,05$) oproti kontrolám bez pridaného staurosporínu.

Na základe uvedených výsledkov môžeme uzavrieť, že po indukcii apoptózy ionomycínom a staurosporínom sme pozorovali významné zvýšenú aktiváciu/aktivitu kaspáz stanovenú rovnakými testami ako boli použité v infekčných experimentoch. Miera tejto aktivácie/aktivity v neinfekčnom modeli bola porovnateľná s hodnotami nameranými po infekcii VACV u oboch testovaných bunkových línií (Obr. 5A,B - (Kalbacova et al., 2008).

Experimentálne sme sa zamerali aj na potvrdenie špecificity používaných cytometrických testov. 15 min. pred začatím testu CaspaTag bol k bunkám pridaný širokospektrálny kaspázový inhibítor z-VAD-FMK. Obr. 10 potvrdzuje zvýšenú aktiváciu kaspáz po pôsobení 500 nM ionomycínu. Po pridaní z-VAD-FMK sme zaznamenali pokles v tejto aktivácii na úroveň porovnateľnú s kontrolami bez indukovanej apoptózy.

Podľa nameraných výsledkov sa zdá, že test CaspaTag je špecifický pre aktivitu kaspáz.

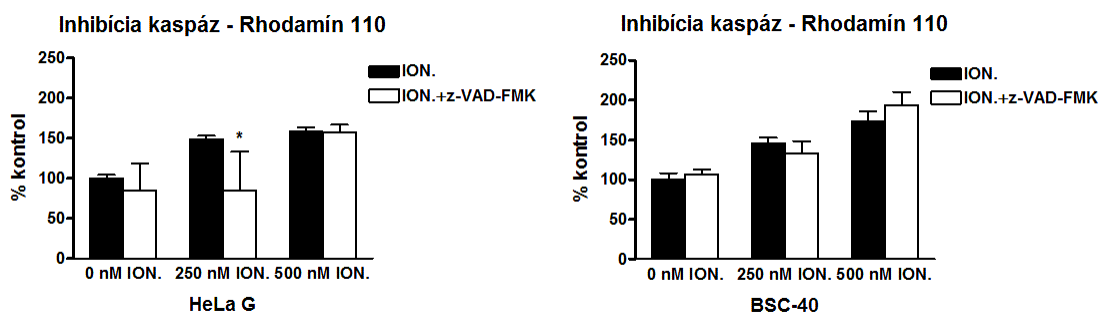
Inhibícia kaspáz - CaspaTag



Obr. 10. Inhibícia aktivácie kaspáz po pridaní z-VAD-FMK. Bunkám bolo 24 hod. po nasadení vymenené kultivačné médium za 2% NCS-DMEM s 500 nM ionomycínom. 3 hod. po pridaní ionomycínu bol k bunkám pridaný 50 μ M z-VAD-FMK, po 15 min. boli bunky odpipetované, spracované na stanovenie aktivácie kaspáz testom CaspaTag a analyzované na prietokovom cytometri. Graf zobrazuje reprezentatívny výsledok.

Podobne ako u CaspaTagu sme skúšali špecificitu aj u stanovenia štiepeného Rhodamínu 110 bis-(amid kyseliny L-asparágovej). K bunkám bol po indukcii apoptózy ionomycínom pridaný kaspázový inhibítor z-VAD-FMK. Obr. 11 potvrdzuje skôr ukázané výsledky zvýšenej fluorescencie indukovanej ionomycínom. Zároveň ale ukazuje, že po pridaní kaspázového inhibítora sme nezaznamenali výrazné zníženie tejto fluorescencie.

Z našich pozorovaní sa dá uzavrieť, že metóda používajúca Rhodamín 110 bis-(amid kyseliny L-asparágovej) nie je špecifická len pre kaspázy, ale pravdepodobne stanovuje aktivitu aj iných proteáz, ktoré prispievajú k štiepeniu fluorogenného substrátu. Uvedená metóda má teda inú špecificitu ako CaspaTag.



Obr. 11. Inhibícia aktivity kaspáz v bunkách HeLa G a BSC-40 po pridaní z-VAD-FMK. Bunkám bolo 24 hod. po nasadení vymenené kultivačné médium za 2% NCS-DMEM s uvedenou koncentráciou ionomycínu. 3 hod. po pridaní ionomycínu bol k bunkám pridaný 50 μ M z-VAD-FMK, po 15 min boli bunky odpipetované, označené Rhodamínom 110 bis-(amid kyseliny L-asparágovej) a po 30 min. inkubácii analyzované na prietokovom cytometri. Graf zobrazuje priemer z 2 pokusov v duplikátoch +/- S.E.M; *, štatisticky významný rozdiel ($p < 0,05$) oproti kontrolám bez pridaného z-VAD-FMK.

4.1.2.2 Štiepenie substrátov kaspáz

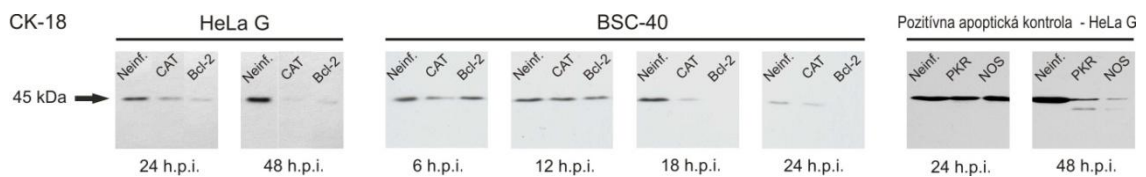
4.1.2.2.1 Cytokeratín 18

Na základe cytometricky stanovenej aktivácie kaspáz počas infekcie VACV (Kalbacova et al., 2008), sme sa rozhodli charakterizovať aktivitu kaspáz na úrovni štiepenia ich substrátov a to western blot analýzou. Ako kontrola k cytometrickému M30 CytoDEATH testu stanovujúceho neoepitop cytokeratínu 18 vznikajúci štiepením kaspázami, ktorý použila vo svojej práci kolegyňa M. Kalbáčová, bola zvolená detekcia štiepenia cytokeratínu 18 western blotom. Použité protilátky detekujú neštiepenú formu tohto proteínu, takže na rozdiel od M30 CytoDEATH, ktorý detekuje epitop na štiepenom cytokeratíne 18, sa dá v bunkách so štiepeným cytokeratínom na western blote očakávať pokles signálu. Výsledky (Obr. 12) potvrdzujú zistenia z M30 CytoDEATH testu (Obr. 5C - (Kalbacova et al., 2008). V bunkách HeLa G bol najsilnejší signál v neinfikovaných kontrolách. V bunkách infikovaných VACV-CAT aj VACV-Bcl-2

bol viditeľný pokles hladín neštiepeného cytokeratínu 18 v 24 h.p.i., ktorý bol ešte výraznejší v 48 h.p.i.

U BSC-40 boli výsledky podobné, najsilnejší signál bol u neinfikovaných kontrol, v bunkách infikovaných VACV bol výrazný pokles neštiepeného cytokeratínu 18 od 18 h.p.i. V bunkách infikovaných VACV-Bcl-2 bolo štiepenie ešte výraznejšie ako v bunkách s VACV-CAT, čo je v zhode s apoptotickou morfológiou týchto buniek a s výsledkami z prietokovej cytometrie. Ako pozitívna kontrola boli do pokusu zaradené bunky HeLa G infikované rekombinantmi VACV exprimujúcimi pro-apoptotické gény PKR a iNOS (Lee et al., 1997; Melkova et al., 1997). V týchto bunkách bol viditeľný pokles neštiepeného cytokeratínu 18 v 48 h.p.i.

Môžeme uzavrieť, že infekcia obidvoma rekombinantmi VACV viedla k zníženiu hladín cytokeratínu 18 v obidvoch testovaných bunkových líniách.



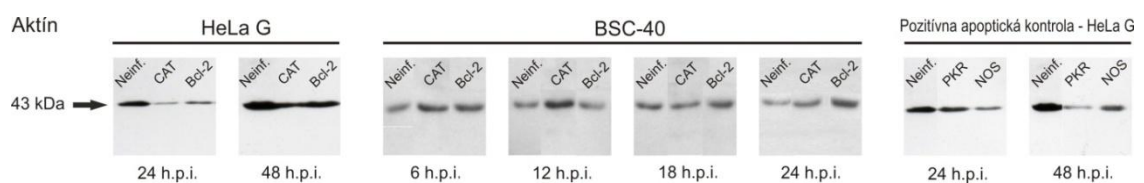
Obr. 12. Western blot analýza štiepenia cytokeratínu 18. 3×10^6 buniek HeLa G a BSC-40 na 6-jamkovej kultivačnej platni bolo neinfikovaných alebo infikovaných rekombinantnými VACV (m.o.i.=2). V uvedených časových intervaloch boli bunky odpipetované a spracované na western blot analýzu. Cytokeratín 18 bol detekovaný pomocou myšacej monoklonálnej protilátky DC-10 a chemiluminiscencie. Obrázok reprezentuje výsledok z 3 pokusov.

4.1.2.2.2 Aktín

Aktín patriaci medzi základné zložky cytoskeletu buniek je tiež jedným z cieľov pôsobenia efektorových kaspáz. Jeho štiepené fragmenty následne prispievajú k zmenám v morfológii apoptotických buniek (Chang a Yang, 2000;

Stroh a Schulze-Osthoff, 1998). Zmeny v jeho hladinách počas infekcie VACV sme sa rozhodli sledovať aj v našich experimentoch. Infekcia obidvoma použitými rekombinantmi VACV mala v bunkách HeLa G za následok zníženie hladín aktínu už v 24 h.p.i. v porovnaní s neinfikovanými kontrolami.

V bunkách BSC-40 nebol takýto trend zaznamenaný, infekcia VACV nevedla k zmenám hladín aktínu v tejto bunkovej línii. V pozitívnych apoptotických kontrolách bol zachytený pokles neštiepeného aktínu po indukcii apoptózy v HeLa G bunkách (Obr. 13).



Obr. 13. Western blot analýza štiepenia aktínu. 3×10^6 buniek HeLa G a BSC-40 na 6-jamkovej kultivačnej platni bolo neinfikovaných alebo infikovaných rekombinantnými VACV (m.o.i.=2). V uvedených časových intervaloch boli bunky odpipetované a spracované na western blot analýzu. Aktín bol detekovaný pomocou kozej polyklonálnej protilátky a chemiluminiscencie. Obrázok reprezentuje výsledok z 2 pokusov.

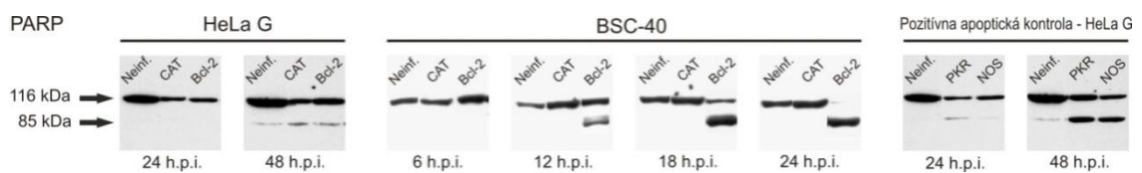
4.1.2.2.3 PARP

Aktivitu kaspáz sme chceli potvrdiť aj analýzou štiepenia ďalšieho typického substrátu kaspáz, proteínu PARP. PARP je počas apoptózy inaktívovaný štiepením na 85 kDa fragment (Kaufmann et al., 1993).

V HeLa G bunkách infikovaných obidvoma používanými rekombinantmi VACV však v súlade s lýtickou morfológiou nebolo zaznamenané výrazné štiepenie PARP v porovnaní s neinfikovanými kontrolami (Obr. 14). Podobne nebol zachytený štiepený PARP ani v neinfikovaných a VACV-CAT infikovaných bunkách BSC-40. U BSC-40 infikovaných VACV-Bcl-2 bol v zhode s apoptotickou

morfológiou týchto buniek detekovaný aj 85 kDa fragment štiepeného PARP od časového intervalu 12 h.p.i. V bunkách predstavujúcich pozitívnu kontrolu apoptózy, HeLa G infikovaných VACV-PKR a VACV-NOS, bol štiepený fragment zjavný už v 24 h.p.i., resp. v 48 h.p.i.

Zo získaných výsledkov vyplýva, že štiepený fragment PARP, typický pre apoptotické bunky, sme v našich experimentoch videli len u tých buniek infikovaných VACV, ktoré vykazovali morfológické známky apoptózy.



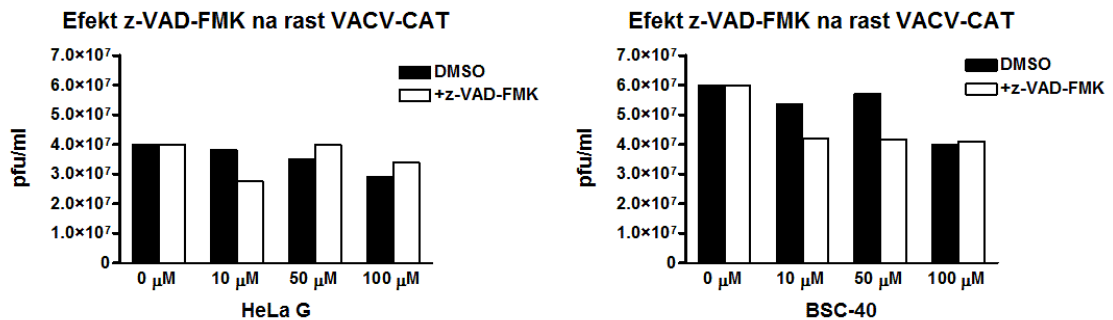
Obr. 14. Western blot analýza štiepenia PARP. 3×10^6 buniek HeLa G a BSC-40 na 6-jamkovej kultivačnej platni bolo neinfikovaných alebo infikovaných rekombinantnými VACV (m.o.i.=2). V uvedených časových intervaloch boli bunky odpipetované a spracované na western blot analýzu. PARP bol detekovaný pomocou králičej polyklonálnej protilátky a chemiluminiscencie. Obrázok reprezentuje výsledok z 2 pokusov.

4.1.3 Efekt inhibície kaspáz a PARP na infekciu vírusom vakcínie

4.1.3.1 Vplyv kaspázového inhibítora na infekciu vírusom vakcínie

Na základe predchádzajúcich výsledkov sa zdá, že kaspázy zohrávajú určitú úlohu počas rastového cyklu VACV. Rozhodli sme sa teda experimentálne sledovať efekt pôsobenia inhibície kaspáz na infekciu VACV. Bunky HeLa G a BSC-40 boli infikované rekombinantom VACV-CAT a zároveň bol po odstránení inokula k časti vzoriek pridaný kaspázový inhibítor z-VAD-FMK (10, 50 a 100 μ M). Po 18 hod. boli bunky odpipetované a použité na stanovenie titru vírusu a western blot analýzu. Obr. 15 ukazuje, že prídanie z-VAD-FMK nemalo štatisticky

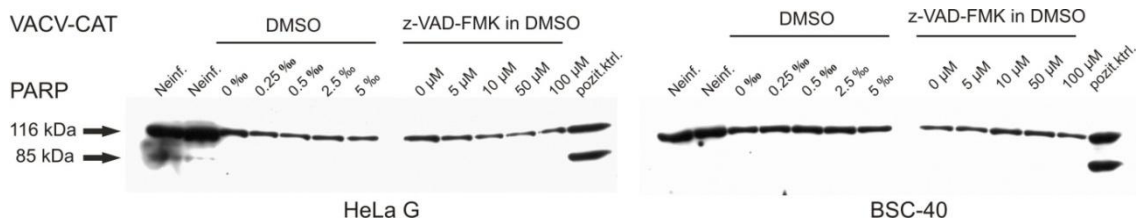
významný efekt na rast VACV v bunkách HeLa G. Efekt v bunkách BSC-40 bol podobný.



Obr.15. Efekt kaspázového inhibítora z-VAD-FMK na rast VACV. $0,6 \times 10^6$ buniek HeLa G alebo BSC-40 bolo infikovaných VACV-CAT (m.o.i.=2). Po odstránení inokula bol k bunkám v čerstvom médiu pridaný z-VAD-FMK v uvedených koncentráciách. Ako kontrola boli použité bunky pestované v médiu s DMSO, v ktorom bol z-VAD-FMK nariedený a objem ktorého je ekvivalentný objemu použitému na nariedenie z-VAD-FMK do príslušnej koncentrácie. V 18 h.p.i. boli bunky odpipetované a bol v nich stanovený titer VACV na bunkách BSC-40. Grafy predstavujú reprezentatívny výsledok.

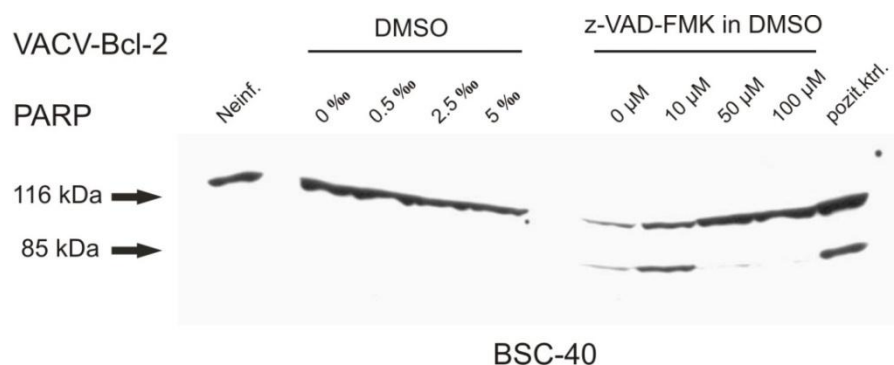
V tých istých vzorkách sme analyzovali aj efekt z-VAD-FMK na štiepenie kaspázových substrátov, cytokeratínu 18 a PARP.

Vzhľadom na to, že sme po infekcii VACV zaznamenali štiepenie PARP len v bunkách morfológicky apoptotických, t.j. len u BSC-40 infikovaných VACV-Bcl-2, slúžila analýza štiepenia PARP v experimentoch stanovujúcich efekt z-VAD-FMK na infekciu VACV ako kontrola. V zhode s predchádzajúcimi výsledkami sme v žiadnej z testovaných bunkových línií, HeLa G a BSC-40, nezaznamenali žiadne štiepenie PARP po infekcii VACV-CAT. Pridanie kaspázového inhibítora z-VAD-FMK v štyroch odlišných koncentráciách neovplyvnilo štiepenie PARP (Obr. 16)



Obr. 16. Efekt pridania kaspázového inhibítora z-VAD-FMK na štiepenie PARP v bunkách infikovaných VACV-CAT. $0,6 \times 10^6$ buniek HeLa G a BSC-40 bolo neinfikovaných alebo infikovaných VACV-CAT (m.o.i.=2). Po odstránení inokula bol k bunkám v čerstvom médiu pridaný z-VAD-FMK v DMSO v uvedených koncentráciách. Ako kontrola boli použité bunky pestované v médiu so zodpovedajúcim množstvom DMSO (%), v ktorom bol z-VAD-FMK nariedený. 18 h.p.i. boli bunky odpipetované a spracované na western blot analýzu. PARP bol detekovaný pomocou králičej polyklonálnej protilátky a chemiluminiscencie. Ako pozitívne kontroly boli použité lyzáty z buniek HeLa G infikovaných VACV-PKR. Obrázok reprezentuje výsledok z 2 pokusov.

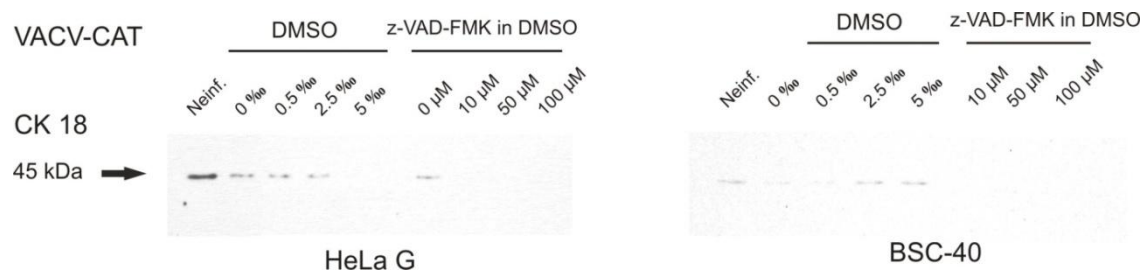
Účinnosť použitého z-VAD-FMK potvrdzuje obr. 17. Na bunkovej línii BSC-40, u ktorej infekcia VACV-Bcl-2 indukuje štiepenie PARP je vidieť efekt z-VAD-FMK. Pridaný z-VAD-FMK inhibuje aktivitu kaspáz, čoho následkom je zamedzenie štiepenia PARP týmito proteázami.



Obr. 17. Efekt pridania kaspázového inhibítora z-VAD-FMK na štiepenie PARP v bunkách BSC-40 infikovaných VACV-Bcl-2. $0,6 \times 10^6$ buniek BSC-40 bolo neinfikovaných alebo infikovaných VACV-Bcl-2 (m.o.i.=2). Po odstránení inokula bol k bunkám v čerstvom médiu pridaný z-VAD-FMK v DMSO v uvedených koncentráciách. Ako kontrola boli použité bunky pestované v médiu so zodpovedajúcim množstvom DMSO (%), v ktorom bol z-VAD-FMK nariedený. 18 h.p.i. boli bunky odpipetované a spracované na western blot analýzu. PARP bol detekovaný pomocou králičej polyklonálnej protilátky a chemiluminiscencie. Ako pozitívne kontroly boli použité lyzáty z HeLa G buniek infikovaných VACV-PKR. Obrázok predstavuje reprezentatívny výsledok.

Efekt z-VAD-FMK na infekciu VACV sme analyzovali aj sledovaním zmien v štiepení cytokeratínu 18. V bunkách HeLa G infikovaných VACV-CAT bol potvrdený už prezentovaný pokles hladín cytokeratínu 18 oproti neinfikovaných kontrolám (Obr. 18). Pridaný z-VAD-FMK tento trend ešte zvýraznil a v infikovaných vzorkách s pridaným z-VAD-FMK o koncentráciách od $10 \mu\text{M}$ nebola na western blote zachytená žiadna neštiepená forma cytokeratínu 18 (Obr. 18). V bunkách BSC-40 je kvôli slabému signálu aj v neinfikovaných kontrolách ťažko objektívne posúdiť zmeny indukované z-VAD-FMK. V každom prípade mala infekcia VACV-CAT v BSC-40 za následok zníženie hladín cytokeratínu 18 oproti neinfikovaným kontrolám. Pridaný z-VAD-FMK tento trend nezvrátil, v bunkách infikovaných VACV-CAT s pridaným z-VAD-FMK sme vôbec žiadne hladiny neštiepeného cytokeratínu 18 nedetekovali.

Podľa mierneho poklesu hladín neštiepeného cytokeratínu 18 v bunkách HeLa G sa zdá, že pôsobenie z-VAD-FMK prispieva k ďalšiemu štiepeniu cytokeratínu 18.



Obr. 18. Efekt pridania kaspázového inhibítora z-VAD-FMK na štiepenie cytokeratínu 18 v bunkách infikovaných VACV-CAT. $0,6 \times 10^6$ buniek HeLa G a BSC-40 bolo neinfikovaných alebo infikovaných VACV-CAT (m.o.i.=2). Po odstránení inokula bol k bunkám v čerstvom médiu pridaný z-VAD-FMK v DMSO v uvedených koncentráciách. Ako kontrola boli použité bunky pestované v médiu so zodpovedajúcim množstvom DMSO (%), v ktorom bol z-VAD-FMK nariedený. 18 h.p.i. boli bunky odpipetované a spracované na western blot analýzu. Cytokeratín 18 bol detekovaný pomocou myšacej monoklonálnej protilátky DC-10 a chemiluminiscencie. Obrázok predstavuje reprezentatívny výsledok.

Podľa našich zistení sa dá uzavrieť, že inhibícia kaspáz širokospektrálnym kaspázovým inhibítorm z-VAD-FMK nemá významný vplyv na infekciu VACV. Pôsobenie inhibítora neovplyvnilo rast vírusu v sledovaných bunkových líniiach. Analýza štiepenia cytokeratínu 18 po pridaní z-VAD-FMK ukazuje na skutočnosť, že k štiepeniu cytokeratínu 18 pravdepodobne dochádza aj činnosťou iných proteáz ako kaspáz, ktoré sú po pridaní z-VAD-FMK zablokované.

4.1.3.2 Vplyv inhibície PARP na infekciu vírusom vakcínie.

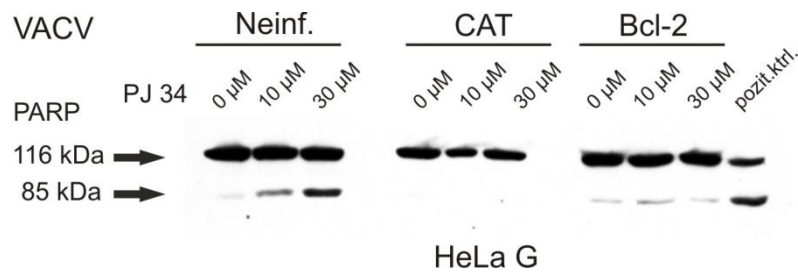
Na základe predchádzajúcich výsledkov sa dá uvažovať o možnosti, že počas infekcie VACV dochádza k zmene v prebiehajúcej bunkovej smrti. Zo začínajúcej apoptózy, o ktorej svedčí indukcia kaspázovej aktivácie, prechádza bunka do nekrózy. Je možné, že by k zmene mohlo dôjsť okrem iného aj v dôsledku zníženia dostupných energetických zdrojov, ktoré sú na úspešný priebeh apoptózy nevyhnutné. Štiepenie PARP je kritickým momentom, ktorý rozhoduje či bunkové signály smerujú bunku k apoptóze alebo nekróze (Nicotera a Leist, 1997). Aktivácia PARP vedie k zníženiu dostupných zdrojov ATP, čo má za následok nekrozu. Naopak, pokiaľ je PARP štiepený, zdroje ATP zostávajú zachované a bunka má dosť energie na procesy apoptózy.

Vzhľadom na to, že PARP nie je štiepený počas infekcie VACV, aj keď sme zaznamenali aktiváciu kaspáz, resp. aj štiepenie iného kaspázového substrátu, ponúka sa možnosť, že PARP je počas infekcie VACV aktívny a spotrebúva energetické zdroje bunky. Jeho prípadné zainhibovanie by mohlo mať teda za následok uchovanie ATP, a tým aj možnosť bunkovej smrti apoptózou. Touto hypotézou sme sa zaoberali v nasledujúcej sérii experimentov.

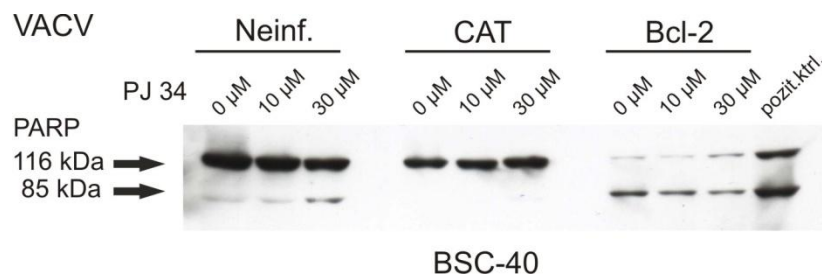
Na zablokovanie aktivity PARP sme zvolili jeho účinný inhibítor PJ 34 a v pokusoch sme sledovali jeho vplyv na hladiny štiepeného PARP a cytokeratínu 18 a tiež vplyv na $\Delta\Psi_m$ a integritu plazmatickej membrány infikovaných buniek.

Obr. 19 ukazuje vplyv prídania inhibítora PARP na štiepenie PARP počas infekcie VACV. Vo vzorkách bez prídania PJ 34 vidíme potvrdenie už skôr prezentovaných výsledkov a to, že počas infekcie VACV dochádza k štiepeniu PARP len v bunkách morfoloicky apoptotických, v našom experimentálnom usporiadaní len u buniek BSC-40 infikovaných VACV-Bcl-2. Pôsobenie PJ 34 malo efekt v podstate len u buniek neinfikovaných, v oboch bunkových líniách vidíme koncentračne závislé výraznejšie štiepenie PARP po pridaní PJ 34 čo svedčí o zvýšenej apoptóze. U oboch línií, HeLa G aj BSC-40, sme v bunkách infikovaných VACV nezaznamenali žiadnu zmenu v štiepení PARP indukovanú inhibítorom PARP.

A



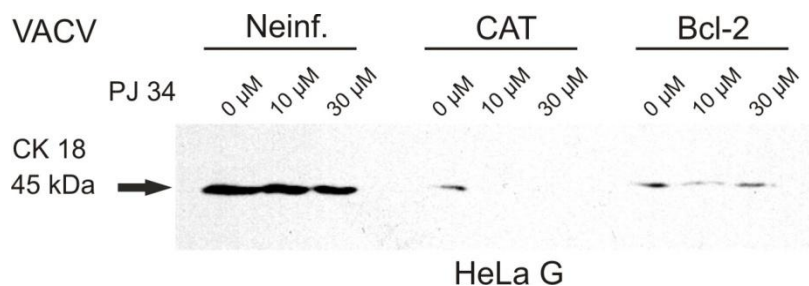
B



Obr. 19. Efekt pridania inhibítora aktivity PARP, PJ 34, na štiepenie PARP v bunkách infikovaných VACV. $0,6 \times 10^6$ buniek HeLa G (A) alebo BSC-40 (B) bolo neinfikovaných (Neinf.) alebo infikovaných VACV-CAT (CAT) alebo VACV-Bcl-2 (Bcl-2) (m.o.i.=2). Po odstránení inokula bol k bunkám v čerstvom médiu pridávaný PJ 34 v uvedených koncentráciách. 24 h.p.i. boli bunky odpipetované a spracované na western blot analýzu. PARP bol detekovaný pomocou králičej polyklonálnej protilátky a chemiluminiscencie. Ako pozitívne kontroly boli použité lyzáty z HeLa G buniek infikovaných VACV-PKR. Obrázok reprezentuje výsledok z dvoch pokusov.

Ďalším analyzovaným parametrom pri sledovaní vplyvu inhibítora PARP na infekciu VACV bolo štiepenie cytokeratínu 18. Podobne ako u PARP, potvrdzuje výsledok zo vzoriek bez pridaného PJ 34 už prezentovaný výsledok štiepenia tohto kaspázového substrátu počas infekcie VACV. Najvyššie hladiny sme pozorovali v neinfikovaných kontrolách. Infekcia obidvoma použitými rekombinantmi VACV viedla k poklesu hladín cytokeratínu 18 (Obr. 20). Pridanie inhibítora PARP nemalo žiadny efekt na neinfikované kontroly. V bunkách HeLa

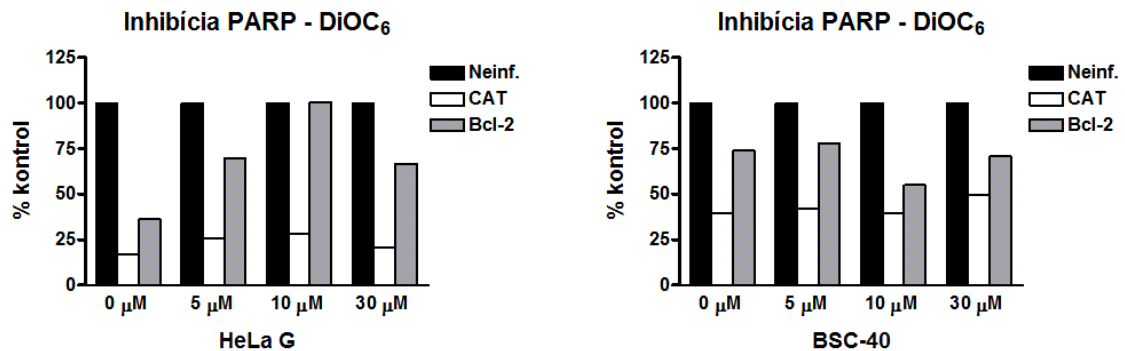
G infikovaných VACV sme po jeho pridaní pozorovali výraznejšie štiepenie cytokeratínu 18 ako bolo bez pridaní PJ 34.



Obr. 20. Efekt pridaní PARP inhibítora PJ 34 na štiepenie cytokeratínu 18 v bunkách HeLa G infikovaných VACV. $0,6 \times 10^6$ buniek HeLa G bolo neinfikovaných (Neinf.) alebo infikovaných VACV-CAT (CAT) alebo VACV-Bcl-2 (Bcl-2) (m.o.i.=2). Po odstránení inokula bol k bunkám v čerstvom médiu pridaný PJ 34 v uvedených koncentráciách. 24 h.p.i. boli bunky odpipetované a spracované na western blot analýzu. Cytokeratín 18 bol detekovaný pomocou myšej monoklonálnej protilátky DC-10 a chemiluminiscencie. Obrázok predstavuje reprezentatívny výsledok.

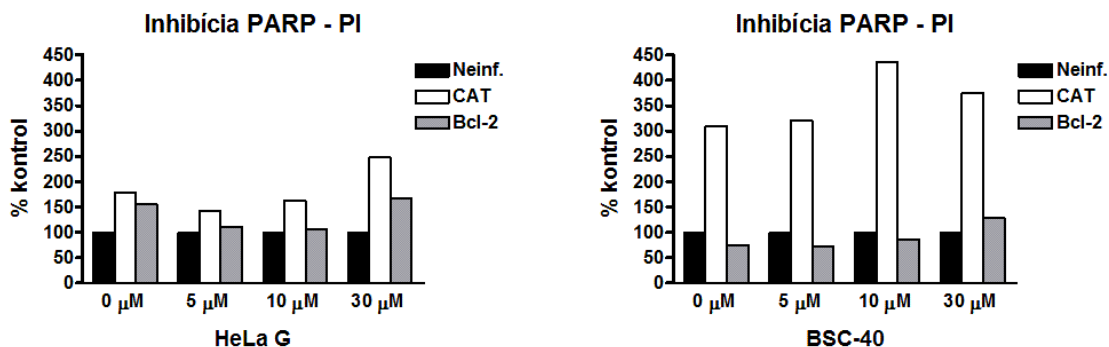
Keďže je správne fungovanie mitochondrií pre bunku zásadné a akékoľvek zmeny v ich funkcii sa následne odrážajú aj počas akéhokoľvek z typov bunkovej smrti, rozhodli sme sa analyzovať zmeny $\Delta\Psi_m$, ku ktorým dochádza po pridaní PJ 34 počas infekcie VACV. Ako už bolo viackrát publikované v prácach z nášho laboratória, infekcia kontrolným VACV-CAT vedie k štatisticky významnému zníženiu $\Delta\Psi_m$ v obidvoch sledovaných bunkových líniiach, HeLa G aj BSC-40. Počas infekcie VACV-Bcl-2 je tento pokles zvrátený. Obr. 21 potvrdzuje tieto skôr publikované výsledky. Súčasné pridanie inhibítora PARP počas infekcie VACV nemalo významný efekt na sledované zmeny $\Delta\Psi_m$. Jediným zjavným posunom, ktorý sme pozorovali bolo zvýšenie $\Delta\Psi_m$ u buniek HeLa G infikovaných VACV-

Bcl-2 indukované 10 μM PJ 34. Naproti tomu, prídanie PJ34 k bunkám BSC-40 infikovaným VACV-Bcl-2 viedlo skôr k poklesu $\Delta\Psi_m$.



Obr. 21. Vplyv inhibície PARP na zmeny $\Delta\Psi_m$ počas infekcie VACV. $0,6 \times 10^6$ buniek HeLa G alebo BSC-40 bolo neinfikovaných (Neinf.) alebo infikovaných VACV-CAT (CAT) alebo VACV-Bcl-2 (Bcl-2; m.o.i.=2). Po odstránení inokula boli k bunkám v čerstvom médiu pridaný PJ 34 v uvedených koncentráciách. 24 h.p.i. boli bunky odpipetované, ofarbené DiOC₆(3) a analyzované prietokovou cytometriou. Graf predstavuje reprezentatívny výsledok.

Následne sme v rovnakých vzorkách analyzovali vplyv inhibítora PARP na integritu plazmatickej membrány počas infekcie VACV. Rovnako ako v prípade analýzy zmien $\Delta\Psi_m$, aj zmeny v integrite membrány indukované VACV boli súčasťou viacerých publikovaných výsledkov našej skupiny (Kalbacova, 2003; Kalbacova et al., 2008; Kalbacova et al., 2002). Obr. 22 tieto pozorovania potvrdzuje, infekcia VACV vedie k porušeniu integrity plazmatickej membrány analyzovanej prietokovou cytometriou na základe integrácie PI do bunky. Protoonkogén Bcl-2 exprimovaný VACV je schopný tento trend významne zvrátiť. Prídanie PJ 34 počas infekcie výrazne nezmenilo priepustnosť plazmatickej membrány v porovnaní so vzorkami bez pridaného PARP inhibítora. V oboch testovaných bunkových líniiach sa v stanovovanom časovom intervale namerané hodnoty pred a po pridaní PJ 34 významne nelíšili.



Obr. 22. Vplyv inhibície PARP na zmeny integrity plazmatickej membrány počas infekcie VACV. $0,6 \times 10^6$ buniek HeLa G alebo BSC-40 bolo neinfikovaných (Neinf.) alebo infikovaných VACV-CAT (CAT) alebo VACV-Bcl-2 (Bcl-2; m.o.i.=2). Po odstránení inokula bol k bunkám v čerstvom médiu pridaný PJ 34 v uvedených koncentráciách. 24 h.p.i. boli bunky odpipetované, ofarbené PI a analyzované prietokovou cytometriou. Graf predstavuje reprezentatívny výsledok.

V uskutočnených experimentoch sa nám teda nepodarilo ukázať žiadny významný efekt inhibície aktivity PARP na priebeh zmien sledovaných v bunkách infikovaných VACV. Okrem dostupnosti energetických zdrojov majú dôležitú úlohu pri určovaní typu bunkovej smrti indukovanej VACV aj jej anitapoptotické mechanizmy.

4.1.4 Stabilne transfekované bunkové línie

Unikátna proapoptotická aktivita proteínu Bcl-2, (Kalbacova et al., 2008; Kalbacova et al., 2002) ktorú vidíme po jeho expresii rekombinantným VACV, môže byť určovaná proteínom samotným a jeho chovaním v špecifickom bunkovom prostredí, rovnako ako aj expresným systémom. Pokúsili sme sa preto objasniť tento fenomén protoonkogénu Bcl-2, a to za využitia expresie tohto proteínu iným expresným systémom. Zvolili sme expresný systém Tet-On, ktorý by mal mať vysokú mieru expresie v porovnaní s bazálnou expresiou

v neindukovanom stave a koncentračne závislú reguláciu expresie doxycyklínom (Dox).

4.1.4.1 Príprava stabilne transfekovaných línií

Príprava génového expresného systému Tet-On spočívala v dvoch fázach. V prvej sme bunkové línie BSC-40 a HeLa G transfekovali regulačným plazmidom pTet-On a v následnej selekcii sme izolovali jednotlivé bunkové klony rezistentné na G.418. pTet-On exprimuje hybridný proteín, ktorý predstavuje regulačný element v Tet-On systéme. Po naviazaní Dox na tento proteín je aktivovaná expresia z pTRE plazmidu, do ktorého je vklonovaný gén, ktorý chceme exprimovať a ktorý sa transfekuje do bunkovej línie v druhej fáze prípravy.

Izolované klony s integrovaným pTet-On sme testovali na schopnosť indukcie luciferázovej aktivity po transientnej transfekcii plazmidom pTRE-Luc. Cieľom bolo nájsť Tet-On bunkovú líniu, ktorá mala čo najvyššiu inducibilnú luciferázovú aktivitu a čo najnižšie pozadie. V tabuľke č. 1 sú uvedené príklady nameraných hodnôt luciferázovej aktivity u vybranej testovanej línie BSC-40-Tet-On bez a po indukciu Dox.

Do bunkovej línie HeLa G sa nám ani po niekoľkonásobných pokusoch a modifikáciách v protokoloch či transfekčných metódach nepodarilo úspešne vintegrovat' plazmid pTet-On, preto sme s ďalšou časťou prípravy expresného systému pokračovali len s líniou BSC-40-Tet-On.

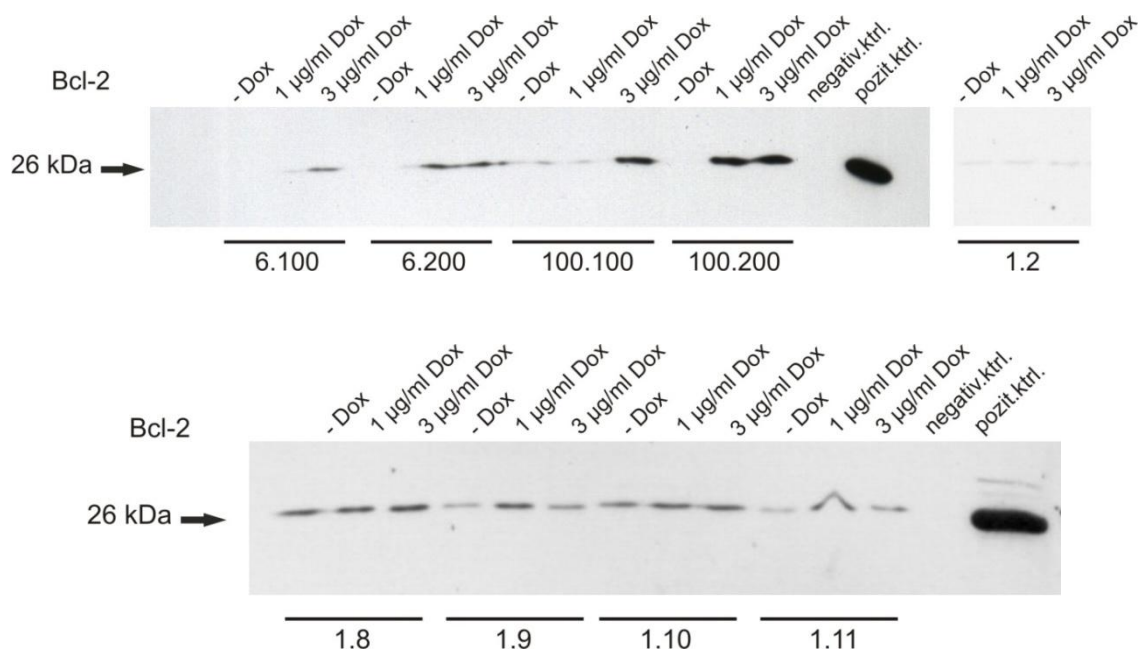
	RLU	Zvýšenie luciferázovej aktivity
pTRE-Luc2 - Dox	1861	
pTRE-Luc2 + Dox	86399	46,4 x

Tab.č. 1. Skríning bunkových línií BSC-40-Tet-On – luciferázová aktivita po transientnej transfekcii pTRE-Luc. Zmes buniek BSC-40-Tet-On bol transientne transfekovaný plazmidom pTRE-Luc2. Po transfekcii bol k časti

vzoriek pridaný Dox (1 µg/ml). Bunky boli po 24 hod. ztrypsinizované a spracované na stanovenie luciferázovej aktivity.

V druhej fáze prípravy sme sa snažili do vybraných BSC-40-Tet-On bunkových línií stabilnou kotransfekciou integrovať plazmid pTRE spolu s plazmidom pTK-Hyg, kódujúcim gén pre hygromycínovú rezistenciu. Pre naše experimenty sme si pripravili dva plazmidy pTRE, do jedného sme vkladali gén pre Bcl-2 a do druhého kontrolný gén pre luciferázu (Luc). Počas selekcie sme ale neboli schopní vyselektovať klon, ktorý by bol hygromycín rezistentný a zároveň exprimoval požadované gény.

Problém sme riešili vkladovaním génu pre Bcl-2, resp. Luc, do komerčne dodaného plazmidu pTre2Hyg, obsahujúceho gén pre rezistenciu a ten sme potom transfekovali do bunkovej línie BSC-40-Tet-On. Po nasledujúcej selekcii klonov rezistentných na hygromycín sme testovali a vybrali také, ktoré vykazovali nízke pozadie v neindukovanom stave a vysokú expresiu Bcl-2, resp. Luc, po indukciu expresie. Obr. 23 ukazuje expresiu Bcl-2 vo vybraných klonoch po indukciu doxycyklínom. Pre ďalšie experimenty bol vybraný klon 100.200.

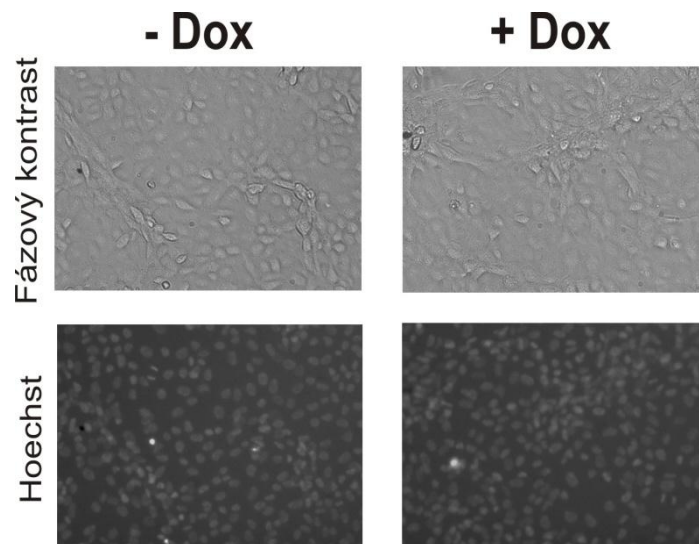


Obr. 23. Expresia Bcl-2 v bunkových líniách BSC-40-Tet-On-Bcl-2. $0,6 \times 10^6$ buniek jednotlivých klonov stabilne transfekovaných BSC-40-Tet-On-Bcl-2 bolo nasadených na 12-jamkovú kultivačnú platňu. Do média bol k bunkám zároveň pridaný Dox v uvedených koncentráciách pre indukciu expresie Bcl-2. 24 hod. po nasadení bolo bunkám vymenené médium za čerstvé s Dox a 48 hod. od nasadenia boli bunky odpipetované a spracované na western blot analýzu. Bcl-2 bol detekovaný pomocou králičej polyklonálnej protilátky a chemiluminiscencie.

Výsledne sa nám v sérii dvoch stabilných transfekcií a selekcií podarilo pripraviť bunkovú líniu BSC-40 Tet-On úspešne exprimujúcu Bcl-2 po indukcii Dox. Zároveň sme pripravovali kontrolnú bunkovú líniu BSC-40 Tet-On, ktorá mala po indukcii exprimovať luciferázu. Po niekoľkokolovej selekcii sa nám podarilo vyselektovať niekoľko línií exprimujúcich Luc, ale miera indukovanej expresie bola nízka (max. 4x vyššia luciferázová aktivita po pridaní Dox). V ďalších experimentoch sme teda ako kontrolu k línii exprimujúcej Bcl-2 zvolili líniu s integrovaným plazmidom s Bcl-2, ale neschopnú tento proteín po indukcii Dox exprimovať (na obr. 23 bunková línia označená ako 1.2).

4.1.4.2 Efekt indukibilnej expresie Bcl-2 na morfológiu bunkovej línie

V bunkových líniách, ktoré po indukcii úspešne exprimovali Bcl-2, sme najskôr sledovali prípadné zmeny v ich morfológii, ku ktorým by táto expresia viedla. Obr. 24 ukazuje, že expresia Bcl-2 neviedla k žiadnym výrazným morfológickým zmenám, bunky mali typickú morfológiu bunkovej línie BSC-40. Pozorovanie pod UV svetlom po ofarbení Hoechst 33342, ktorý by sa významne akumuloval v kondenzovaných jadrách apoptotických buniek a tie by sa javili ako jasne žiariace body, rovnako neukázalo zvýšenú prítomnosť apoptotických buniek.

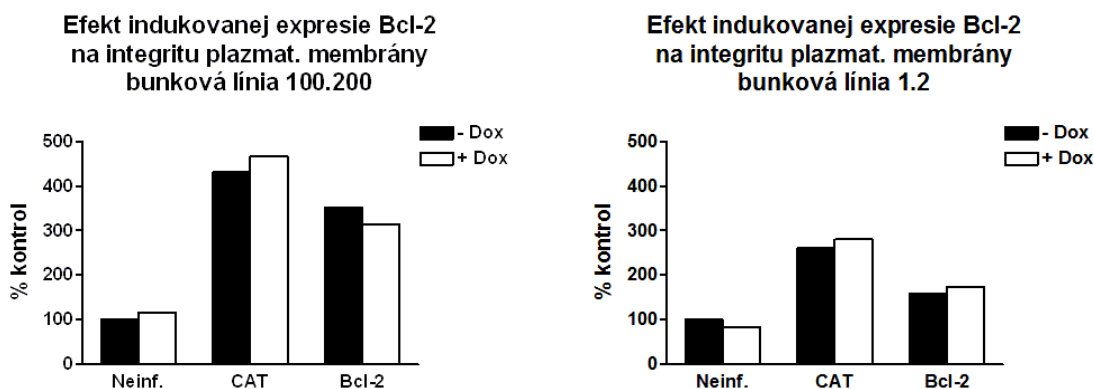


Obr. 24. Vplyv indukibilnej expresie Bcl-2 na morfológiu buniek. $0,6 \times 10^6$ buniek bunkovej línie BSC-40-Tet-On-Bcl-2 (100.200) bolo nasadených na 12-jamkovú kultivačnú platňu. Do média bol k bunkám zároveň pridaný Dox v koncentrácii 5 $\mu\text{g/ml}$ pre indukciu expresie Bcl-2. 24 hod. po nasadení bolo bunkám vymenené médium za čerstvé s Dox a 48 hod. od nasadenia boli bunky označené Hoechstom 33342 a pozorované inverzným fluorescenčným mikroskopom vo fázovom kontraste a v UV svetle; pôvodné zväčšenie 150x.

4.1.4.3 Efekt indukibilnej expresie Bcl-2 na bunky infikované vírusom vakcínie

V bunkách indukibilne exprimujúcich Bcl-2 sme chceli sledovať efekt infekcie VACV, resp. ich vzájomné ovplyvňovanie. Do pokusu boli vybraté dve stabilne transfekované línie, z ktorých jedna úspešne expimovala Bcl-2 po indukcii Dox (lína označená 100.200) a druhá nie (lína označená 1.2). K bunkám bol hneď po nasadení pridaný Dox. 24 hod. po nasadení boli bunky infikované VACV-CAT alebo VACV-Bcl-2 a 15 hod. po infekcii boli odpipetované. Vo vzorkách bol prietokovou cytometriou analyzovaný $\Delta\Psi_m$ a integrita plazmatickej membrány. Zároveň bola western blotom skontrolovaná Dox-indukovateľná expresia Bcl-2 (neprezentované výsledky).

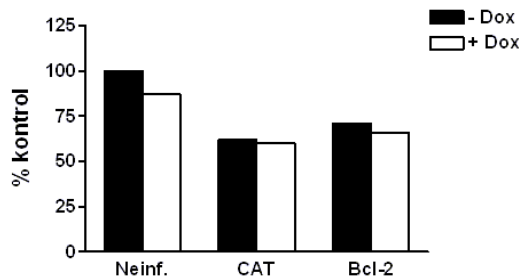
V stanovenom časovom intervale sme nepozorovali žiadne morfológické zmeny v bunkách s indukovanou expresiou Bcl-2 v porovnaní s infikovanou bunkovou líniou, ktorá po indukcii Bcl-2 neexprimovala. Analýza integrity plazmatickej membrány prietokovou cytometriou a ofarbením PI ukazuje na zmeny typické pre lýtickú infekciu VACV (Obr. 25). Infikované bunky mali zvýšenú fluorescenciu PI, čo svedčí o porušenej plazmatickej membráne. Bcl-2 exprimovaný rekombinantným VACV tento trend znižoval. Avšak nepozorovali sme žiadne významné zmeny v dôsledku expresie Bcl-2 indukovateľným systémom Tet-On. U bunkovej línie 100.200, ktorá Bcl-2 expimovala, sme zaznamenali len mierne zníženie fluorescencie PI v bunkách infikovaných VACV-Bcl-2 oproti bunkám 1.2, ktoré Bcl-2 neexprimovali. Na bunky infikované VACV-CAT nemala indukovaná expresia Bcl-2 zdá sa žiadny vplyv.



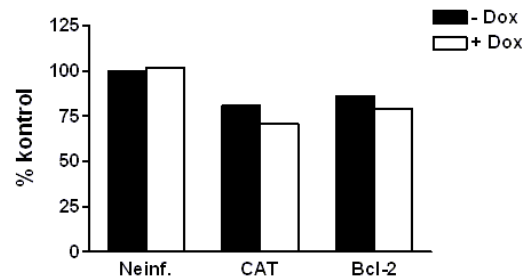
Obr. 25. Vplyv indukovanej expresie Bcl-2 na integritu plazmatickej membrány v bunkách infikovaných VACV. $0,3 \times 10^6$ buniek bolo nasadených na 24-jamkovú kultivačnú platňu a súčasne k nim bol pridaný Dox (5 $\mu\text{g/ml}$) pre indukciu expresie Bcl-2. 24 hod. po nasadení boli bunky neinfikované (Neinf.) alebo infikované VACV-CAT (CAT) alebo VACV-Bcl-2 (Bcl-2; m.o.i.=2). 15 h.p.i. boli bunky odpipetované, ofarbené PI a analyzované prietokovou cytometriou. Graf predstavuje reprezentačný výsledok z dvoch pokusov.

Ďalším sledovaným parametrom boli zmeny v $\Delta\Psi_m$ opäť sledované prietokovou cytometriou za použitia DiOC₆(3). Namerané hodnoty fluorescence ukazujú na pokles $\Delta\Psi_m$ indukovaný infekciou VACV, ktorý je mierne zvrátený pri infekcii VACV-Bcl-2 (obr. 26), čo potvrdzuje vyššie uvedené výsledky (obr. 4B - (Kalbacova et al., 2008). Podobne ako pri zmenách v integrite plazmatickej membrány, ani u $\Delta\Psi_m$ sme nezaznamenali výrazné zmeny v dôsledku Bcl-2 exprimovaného Tet-On systémom.

Efekt indukovanej expresie Bcl-2 na $\Delta\Psi_m$
bunková línia 100.200



Efekt indukovanej expresie Bcl-2 na $\Delta\Psi_m$
bunková línia 1.2

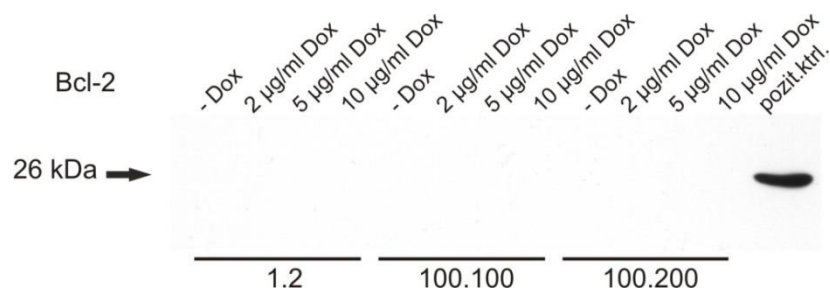


Obr. 26. Vplyv indukovanej expresie Bcl-2 na $\Delta\Psi_m$ v bunkách infikovaných VACV. $0,3 \times 10^6$ buniek bolo nasadených na 24-jamkovú kultivačnú platňu a súčasne k nim bol pridaný Dox (5 $\mu\text{g/ml}$) pre indukciu expresie Bcl-2. 24 hod. po nasadení boli bunky neinfikované (Neinf.) alebo infikované VACV-CAT (CAT) alebo VACV-Bcl-2 (Bcl-2; m.o.i.=2). 15 h.p.i. boli bunky odpipetované, ofarbené DiOC₆(3) a analyzované prietokovou cytometriou. Graf predstavuje reprezentačný výsledok z dvoch pokusov.

Na základe realizovaných experimentov sa dá uzavrieť, že pri nami dosiahnutej sile expresie pomocou expresného systému Tet-On, nemá Bcl-2 významný vplyv na morfológiu bunkovej línie ani na infekciu VACV. Sila expresie proteínu Bcl-2 je oveľa nižšia za použitia Tet-On expresného systému a pravdepodobne preto nemôžeme sledovať podobne výrazné efekty ako pri expresii VACV.

4.1.4.4 Strata inducibilnej expresie proteínu Bcl-2

Napriek zdanlivo úspešnej integrácii obidvoch plazmidov do expresného systému a počiatočne sľubnej expresii Bcl-2 inducibilným Tet-On systémom, nepodarilo sa nám naplánované experimenty dokončiť. Vyselektované bunkové línie prestávali po niekoľkých málo pasážach exprimovať Bcl-2 (Obr. 27). Výsledok bol podobný aj po rozmrazení niekoľkých ďalších úspešne transfekovaných línií.



Obr. 27. Strata inducibilnej expresie Bcl-2 v stabilne transfekovaných BSC-40-Tet-On-Bcl-2 líniách. $0,6 \times 10^6$ buniek jednotlivých klonov stabilne transfekovaných BSC-40-Tet-On-Bcl-2 bolo nasadených na 12-jamkovú kultivačnú platňu. Do média bol k bunkám zároveň pridaný Dox pre indukciu expresie Bcl-2. 24 hod. po nasadení bolo bunkám vymenené médium za čerstvé s Dox a 48 hod. od nasadenia boli bunky odpipetované a spracované na western blot analýzu. Bcl-2 bol detekovaný použitím králičej polyklonálnej protilátky a chemiluminiscencie.

Na ďalších experimentoch, ktoré by tento problém vyriešili sme okrem iného nepokračovali aj pre malú expresiu Bcl-2 v porovnaní s rekombinantným VACV. Pre objektívne porovnanie efektov Bcl-2 exprimovaného VACV by bolo potrebné exprimovať Bcl-2 silnejším systémom (iným vírusovým ako napr. adenovírusovým expresným systémom).

4.2 Ovplyvnenie rastu vírusu vakcínie pôsobením redox-modulujúcich látok

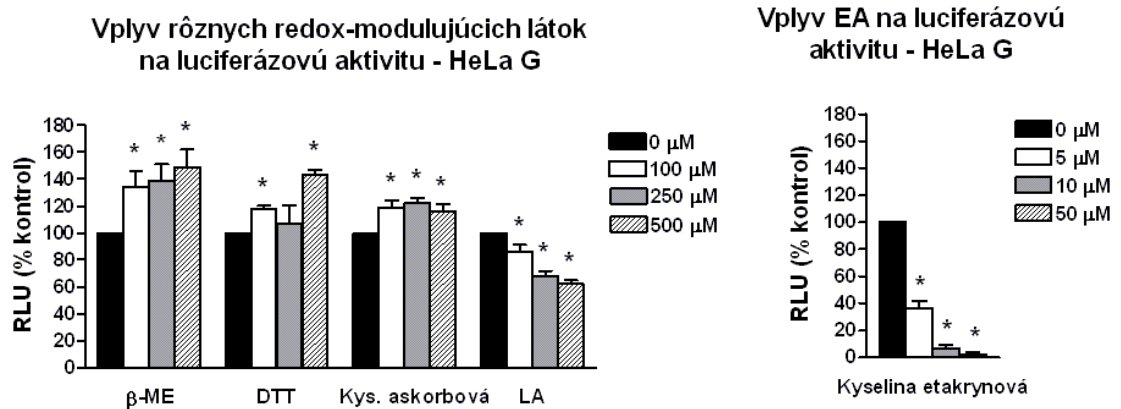
4.2.1 Vplyv rôznych redox-modulujúcich látok na infekciu vírusom vakcínie

Štruktúra VACV je závislá na disulfidických väzbách vznikajúcich počas morfogénzy viriónu za prispenia viacerých VACV redoxných proteínov (Locker a Griffiths, 1999; Senkevich et al., 2002a; Senkevich et al., 2002b). Je teda možné, že látky ovplyvňujúce redox prostredie infikovanej bunky by mohli ovplyvniť aj správny priebeh infekcie VACV.

V našich experimentoch sme analyzovali efekt rôznych redox-modulujúcich látok na infekciu VACV. Vplyv na rast VACV sme charakterizovali najskôr luciferázovou aktivitou v bunkách infikovaných rekombinantom VACV exprimujúcim luciferázu pod neskorým VACV promotorom p4b. HeLa G bunky boli infikované VACV-Luc L a po odstránení inokula k nim boli pridané testované látky – β -merkaptoetanol, DTT, kyselina askorbová, LA a EA. Použité koncentrácie boli stanovené na základe predchádzajúcich výsledkov. 24 h.p.i. boli bunky odpipetované a spracované na stanovenie luciferázovej aktivity.

U troch testovaných látok, β -merkaptoetanolu, DTT a kyseliny askorbovej, sme namerali štatisticky významné zvýšenie luciferázovej aktivity (Obr. 28). Pridanie látok o koncentrácii 500 μ M viedlo k zvýšeniu na 150, 140, resp. 120%, v porovnaní s kontrolami bez pridaného agens. Ďalšie dve analyzované látky, LA a EA, mali naopak za následok štatisticky významné zníženie luciferázovej aktivity exprimovanej rekombinantným VACV. U 500 μ M LA bola luciferázová aktivita znížená na 65% kontrol. U EA bol efekt ešte výraznejší, 5 a 10 μ M EA znížila luciferázovú aktivitu na 35 a 5%, 50 μ M EA viedla k úplnej inhibícii luciferázovej aktivity.

Môžeme zhrnúť, že EA a LA vykazujú inhibičný efekt na infekciu VACV, zatiaľ čo β -merkaptoetanol, DTT a kyselina askorbová majú opačný efekt.



Obr. 28. Vplyv rôznych redox-modulujúcich látok na infekciu VACV. $0,6 \times 10^6$ buniek HeLa G bolo infikovaných VACV-Luc L (m.o.i.=2). Po odstránení inokula

boli k bunkám v čerstvom médiu pridané sledované redox-modulujúce látky v uvedených koncentráciách. 24 h.p.i. boli bunky odpipetované a spracované na stanovenie luciferázovej aktivity. Grafy predstavujú priemery z 2 pokusov v duplikátoch +/- S.E.M. *, štatisticky významný rozdiel medzi jednotlivými koncentraciami sledovaných látok a kontrolami bez pridaných látok ($P < 0,05$).

4.2.2 Charakterizácia efektu kyseliny lipoovej na životný cyklus vírusu vakcínie

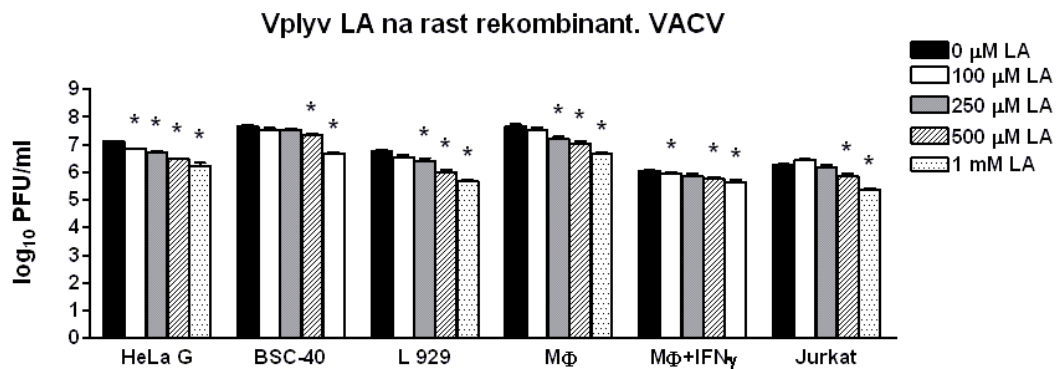
Na základe zistených výsledkov sme sa rozhodli bližšie charakterizovať inhibičný efekt LA na VACV. Napriek tomu, že efekt LA je výrazne slabší ako EA, rozhodli sme sa bližšie charakterizovať aj jej mechanizmus inhibície VACV. Ďalšiu analýzu efektov EA na infekciu VACV urobil môj kolega Z. Čížek a bola opublikovaná (Spisakova et al., 2009). Súčasťou tejto dizertačnej práce je len analýza efektov LA na infekciu VACV.

4.2.2.1 Inhibičný efekt kyseliny lipoovej na rast vírusu vakcínie v bunkových líniiach rôzneho pôvodu

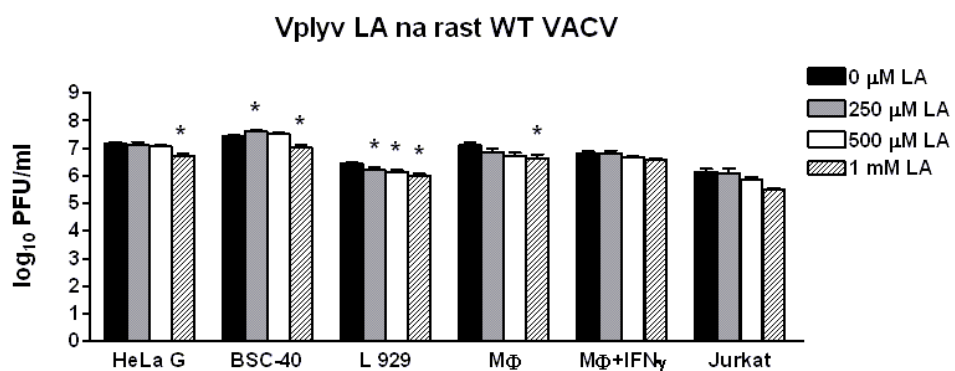
Po zistení inhibičného efektu LA v bunkách HeLa G, rozhodli sme sa tento fenomén preskúmať aj v iných bunkových líniiach. Zvolili sme päť bunkových línii rôzneho embryonálneho pôvodu – epitelové bunkové línie HeLa G a BSC-40, myšacie fibroblasty L929, myšacie makrofágy J774.G8 a ľudskú bunkovú líniu Jurkat odvodenú od T-buniek. U makrofágov sme navyše do experimentov zaradili stimuláciu IFN γ 18 hod. pred infekciou. VACV je na rozdiel od IFN α/β , k IFN γ citlivá in vitro (Melkova a Esteban, 1994; Paez a Esteban, 1984) a má tiež za následok efektívnu elimináciu VACV u hostiteľov in vivo (Huang et al., 1993). Najskôr sme sledovali efekt na infekciu VACV stanovením vírusového titra. Bunky boli infikované wild typom VACV (WT VACV) alebo rekombinantným VACV a 1 h.p.i. k nim bola na celú dobu inkubácie pridaná LA. 24 h.p.i. boli bunky odpipetované a použité na stanovenie rastu VACV titráciou na bunkách BSC-40. Ako ukazuje obr. 29A, LA mala významný inhibičný efekt na rast

rekombinantnej VACV vo všetkých testovaných bunkových líniah. Najvyššia použitá koncentrácia LA znížila titer vírusu najmenej o 1 logaritmus v BSC-40, fibroblastoch a nestimulovaných makrofágoch. V bunkách HeLa G a Jurkat bolo stanovené zníženie asi o 0,9 logaritmu. V makrofágoch stimulovaných IFN γ bol vplyv LA najmenej výrazný, pretože IFN γ inhibuje rast VACV o viac ako 1 logaritmus. LA však ešte znížila titer vírusu o 0,4 logaritmu. Efekt na rast WT VACV bol menej výrazný (obr. 29B), ale LA inhibovala rast vírusu opäť vo všetkých testovaných bunkových líniah. 1 μ M LA znížila najviac, o 0,5 logaritmu, rast VACV v bunkách Jurkat, fibroblastoch a makrofágoch bez stimulácie IFN γ . V ostatných bunkových líniah bol pokles asi o 0,4 logaritmu oproti kontrolám.

A



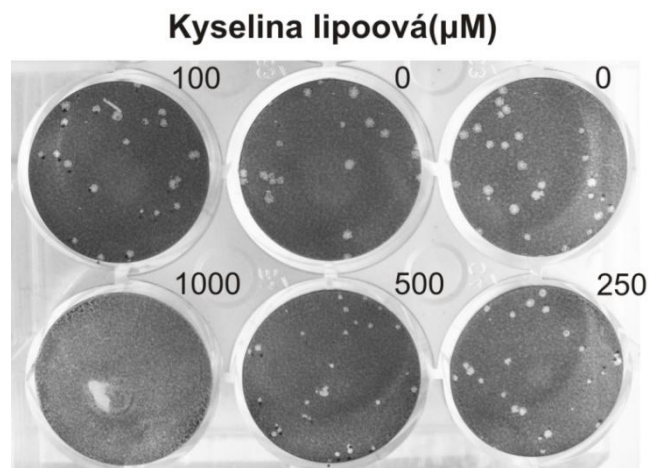
B



Obr. 29. Inhibičný efekt LA na rast VACV v bunkových líniah rôzneho pôvodu. $0,6 \times 10^6$ buniek rôzneho pôvodu bolo infikovaných (A) rekombinantnými

VACV-Luc L (HeLa G, BSC-40 a L929) alebo VACV-Luc E/L (Makrofágy a Jurkat) alebo (B) WT VACV (m.o.i.=2). Po odstránení inokula bola k bunkám v čerstvom médiu pridaná LA v uvedených koncentráciách. 24 h.p.i. boli bunky odpipetované a bol v nich stanovený titer VACV na bunkách BSC-40. Grafy predstavujú priemery z najmenej 2 pokusov v duplikátoch +/- S.E.M. *, štatisticky významný rozdiel medzi jednotlivými koncentraciami sledovaných látok a kontrolou bez pridanej LA ($P < 0,05$).

Vplyv LA na infekciu VACV bol tiež overený testom redukcie plakov (CPE assay). Na experiment bola použitá bunková línia BSC-40. Bunky na 12-jamkovej kultivačnej platni boli infikované približne 20 pfu WT VACV alebo rekombinantným VACV a kultivované s uvedenými koncentraciami LA 48 hodín. Na obr. 30 je vidieť, že pôsobenie 500 μM LA viedlo k redukcii veľkosti plakov WT VACV, zatiaľčo ich počet nebol redukovaný, 1 mM LA mala za následok úplné zainhibovanie tvorby plakov. Podobný výsledok sme dosiahli aj s rekombinantným VACV. Môžeme zhrnúť, že sme v sérii experimentov s LA experimentálne potvrdili jej inhibičný efekt na rast VACV v bunkových líniách rôzneho pôvodu.

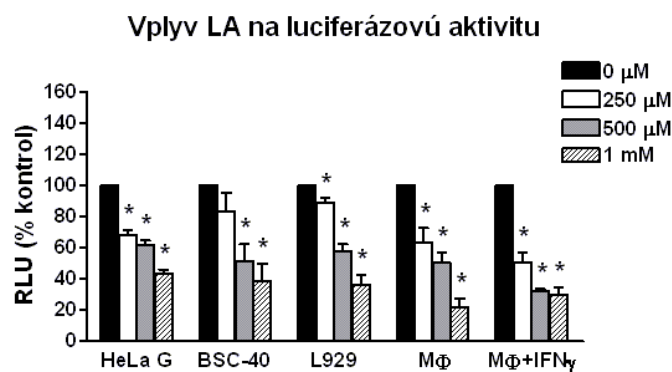


Obr. 30. Efekt LA na veľkosť plakov WT VACV. $0,6 \times 10^6$ buniek BSC-40 bolo infikovaných približne 20 pfu WT VACV. Po odstránení inokula bola k bunkám

v čerstvom médiu pridaná LA v uvedených koncentráciách. 48 h.p.i. boli bunky zafixované a ofarbené kryštálovou vioľou. Obrázok reprezentuje výsledok z dvoch pokusov.

4.2.2.2 Inhibičný efekt na luciferázovú aktivitu exprimovanú VACV v bunkových líniách rôzneho pôvodu

Vplyv LA na rast VACV sme analyzovali aj ako efekt na luciferázovú aktivitu exprimovanú rekombinantným VACV v rôznych bunkových líniách. Na obr. 31 je vidieť, že LA štatisticky významne znížila luciferázovú aktivitu vo všetkých testovaných bunkových líniách. 250 μM LA znížila luciferázovú aktivitu na najmenej 85% kontrol, zatiaľ čo najvyššia použitá koncentrácia, 1 mM, ju znížila na najmenej 45% kontrol vo všetkých testovaných líniách. Najvýraznejšia nameraná inhibícia bola v nestimulovaných makrofágoch a najnižšia v bunkách HeLa G. Môžeme zhrnúť, že sme nameranými luciferázovými aktivitami potvrdili inhibičný vplyv LA na infekciu VACV v bunkových líniách rôzneho pôvodu.



Obr. 31. Inhibičný efekt LA na luciferázovú aktivitu exprimovanú VACV v bunkových líniách rôzneho pôvodu. $0,6 \times 10^6$ buniek rôzneho pôvodu bolo infikovaných VACV-Luc L (HeLa G, BSC-40 a L929) alebo purifikovaným VACV-Luc E/L (Makrofágy; m.o.i.=2). Po odstránení inokula bola k bunkám v čerstvom médiu pridaná LA v uvedených koncentráciách. 24 h.p.i. boli bunky odpipetované a spracované na stanovenie luciferázovej aktivity. Grafy predstavujú priemery z najmenej 2 pokusov v duplikátoch \pm S.E.M. *, štatisticky

významný rozdiel medzi jednotlivými koncentráciami LA a kontrolou bez pridanej LA ($P < 0,05$).

Inhibičný efekt LA na titer VACV aj luciferázovú aktivitu bol tiež vyjadrený ako inhibičné koncentrácie IC₅₀ (Tab. 2). IC₅₀ boli počítané z exponenciálnych regresných kriviek preložených závislosťami nameraných vírusových titrov a použitých koncentrácií LA. Z vypočítaných IC₅₀ a podobne stanovených CC₅₀ z MTT testu (cytotoxické koncentrácie) boli vypočítané indexy selektivity (SI).

Vypočítané hodnoty CC₅₀ ukazujú, že LA je netoxická pre bunkové línie HeLa G, BSC-40 a fibroblasty L929. Naopak, LA je toxická pre makrofágy a vo vyšších koncentráciách aj pre bunkovú líniu Jurkat. Hodnoty IC₅₀ sú nižšie pre titry z rekombinantov VACV ako z WT VACV. Celkovo sú hodnoty IC₅₀ z titrov rekombinantných VACV v rozmedzí 200-500 μM , z titrov WT VACV v rozmedzí 500-800 μM a u luciferázovej aktivity v rozmedzí 300-850 μM .

A

WT VACV (WR)	Kyselina lipoová		
	Titer		
	IC50 (μM) ± SD	CC50 (μM)	SI (IC50/CC50)
HeLa G	803 ± 273	podporuje rast	-
BSC-40	712 ± 444	podporuje rast	-
L929	702 ± 16	podporuje rast	-
MΦ - IFNγ	587 ± 296	330	0.6
MΦ + IFNγ	> 1000	-	-
Jurkat	492 ± 92	> 2000	> 4.1

B

VACV rekombinant	Kyselina lipoová			
	Luc	Titer		
	IC50 (μM) ± SD	IC50 (μM) ±SD	CC50 (μM)	SI (IC50/CC50)
HeLa G	838 ± 159	220 ± 14	podporuje rast	-
BSC-40	642 ± 4	409 ± 8	podporuje rast	-
L929	747 ± 199	245 ± 18	podporuje rast	-
MΦ - IFNγ	429 ± 156	200 ± 39	330	1.6
MΦ + IFNγ	305 ± 12	486 ± 229	-	-
Jurkat	-	354 ± 52	> 2000	> 5.7

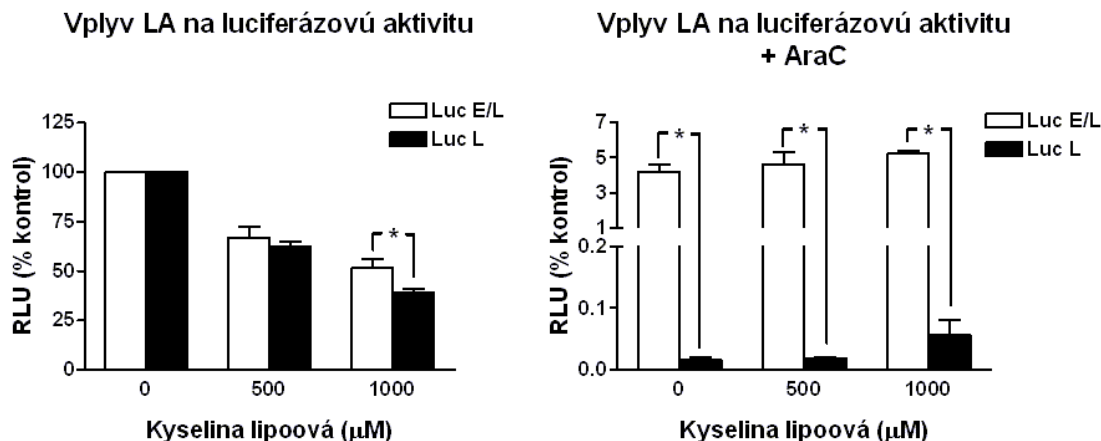
Tab. 2. Inhibičné efekty kyseliny lipoovej na infekciu VACV u rôznych bunkových línií. Z nameraných hodnôt titrov a luciferázových aktivít WT VACV (A) a VACV-Luc (B) po pôsobení LA u rôznych bunkových línií boli vypočítané inhibičné koncentrácie IC50, koncentrácie LA, pri ktorých bude titer vírusu alebo luciferázová aktivita znížená na 50%. Pre stanovenie cytotoxicity boli k $0,06 \times 10^6$ buniek pridávané zvyšujúce sa koncentrácie LA. Po 2 dňoch bola stanovená cytotoxicita pomocou MTT testu. Hodnoty CC50 predstavujú koncentrácie LA, ktoré znížili aktivitu mitochondriálnych dehydrogenáz na 50% kontrol bez LA. Výsledky predstavujú priemery z 2-3 pokusov v duplikátoch +/- S.D.

4.2.2.3 Efekt kyseliny lipoovej na expresiu skorých a neskorých génov exprimovaných vírusom vakcínie

Po zistení inhibičného efektu LA na VACV sme sa rozhodli bližšie charakterizovať, na ktorú fázu rastového cyklu VACV má LA tento účinok. Životný cyklus VACV prebieha kaskádovito, pre úspešné pokračovanie do ďalších fáz je nevyhnutnou podmienkou správne dokončenie predchádzajúcej fázy (Schramm a Locker, 2005). Syntéza neskorých génov, ktoré sú pod kontrolou neskorých promotorov VACV, začne len po úspešnom prebehnutí syntézy vírusovej DNA a tá len po úspešnom nasyntetizovaní produktov skorých génov. Na odlíšenie inhibičného účinku LA na syntézu skorých alebo neskorých génov VACV boli použité dva rekombinanty VACV exprimujúce luciferázu pod odlišnými promotormi, skorým/neskorým (VACV-Luc E/L) alebo neskorým (VACV-Luc L) a počas experimentu bol k časti vzoriek pridaný inhibítor DNA polymerázy, cytozín arabinosid (AraC). Pridaním AraC ku vzorkám je zainhibovaná vírusová DNA syntéza a nedochádza tak ani k expresii neskorých VACV proteínov. V našom experimentálnom modeli sme teda po pridaní AraC mohli analyzovať expresiu luciferázy pod skorým VACV promotorom.

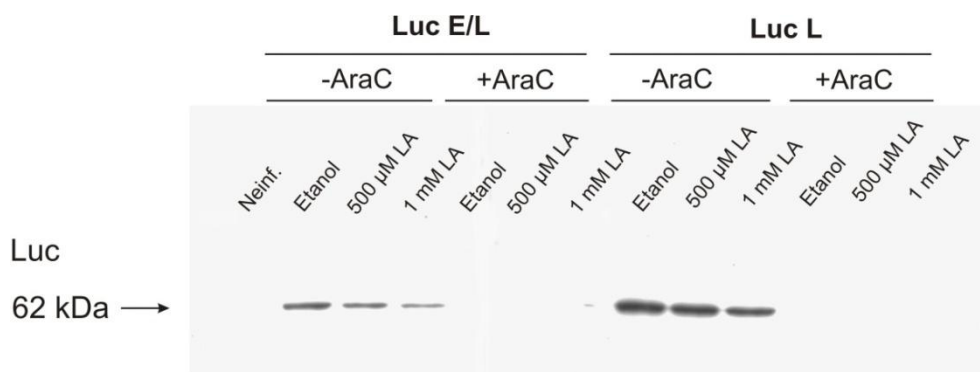
24 h.p.i. bol výsledok na HeLa G bunkách v zhode s predchádzajúcimi, pridanie LA malo za následok koncentračne závislé zníženie exprimovanej luciferázovej aktivity a to u oboch testovaných rekombinantov vo vzorkách bez pridaného AraC (Obr. 32). Po pridaní AraC bola stanovená luciferázová aktivita u VACV-Luc L na úrovni 0,05% kontrol bez pridaného AraC a LA už nemala žiadny významný efekt. Na druhej strane, u rekombinanta VACV-Luc E/L bola hladina luciferázovej aktivity na približne 5%, čo ukazuje na expresiu luciferázy pod kontrolou skorej časti skorého/neskorého promotora VACV. Pridaná LA nemala inhibičný vplyv na luciferázovú aktivitu exprimovanú týmto rekombinantom.

Z uvedených výsledkov vyplýva, že LA nejaví inhibičný efekt na úrovni expresie skorých VACV génov.



Obr. 32. Efekt LA na expresiu skorých a neskorých génov VACV. $0,6 \times 10^6$ buniek HeLa G bolo infikovaných VACV-Luc L alebo VACV-Luc E/L (m.o.i.=2). Po odstránení inokula bola k bunkám v čerstvom médiu pridaná LA v uvedených koncentráciách. Na zablokovanie syntézy vírusovej DNA bol k vzorkám pridaný AraC (4,4 µg/ml). 24 h.p.i. boli bunky odpipetované a spracované na stanovenie luciferázovej aktivity. Grafy predstavujú priemery z najmenej 2 pokusov v duplikátoch +/- S.E.M. *, štatisticky významný rozdiel medzi jednotlivými rekombinantmi s prídavkom rovnakej koncentrácie LA ($P < 0,05$).

Expresiu luciferázy rekombinantnými VACV sme analyzovali aj za použitia western blotu a protilátky proti luciferáze. Na obr. 33 je vidieť, že prídanie LA malo za následok koncentračne závislé znižovanie hladín luciferázy u oboch rekombinantov. Po prídání AraC sme nezaznamenali žiadne hladiny luciferázy. Výsledok potvrdzuje inhibičný vplyv LA na obidva rekombinanty stanovený luciferázovou aktivitou bez prídání AraC. Zároveň poukazuje na odlišnú citlivosť týchto dvoch použitých metód, pretože po prídání AraC, sme detekovali aktivitu v lyzátoch infikovaných buniek, ale žiadnu hladinu luciferázy na western blote sme neboli schopní detekovať.

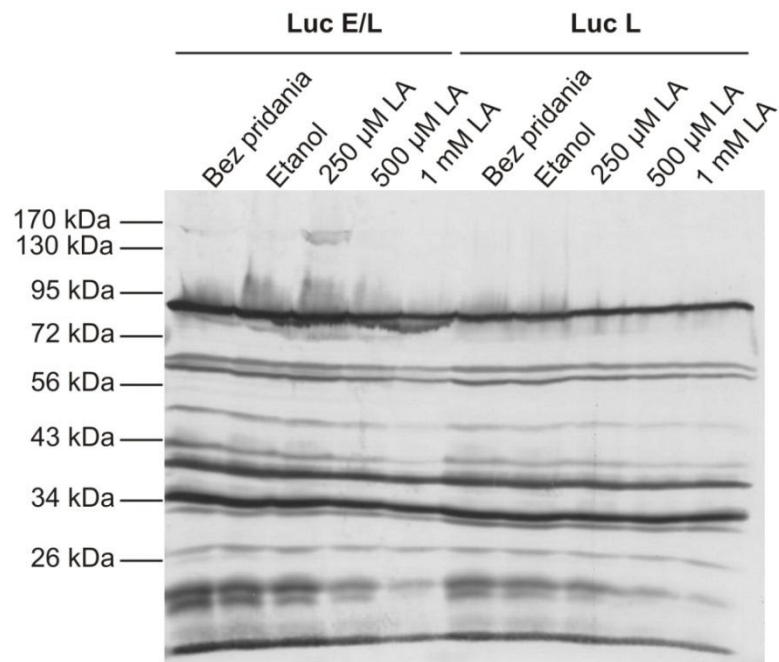


Obr. 33. Western blot analýza efektu LA na luciferázu exprimovanú VACV.

Hladiny luciferázy boli stanovované vo vzorkách použitých v obr. 32 (AraC). K lyzátoom na stanovenie luciferázovej aktivity bol pridaný 5x Laemli redukčný pufer a luciferáza bola detekovaná western blotom pomocou králičej polyklonálnej protilátky a chemiluminiscencie. Obrázok reprezentuje výsledok z 2 pokusov.

4.2.2.4 Inhibičný efekt kyseliny lipoovej na expresiu celkových proteínov vírusu vakcínie

V ďalšom experimente sme western blotom analyzovali vplyv LA na celkovú expresiu VACV proteínov v bunkách HeLa G. Na obr. 34 je vidieť, že 250 μM LA nemala viditeľný efekt na hladiny VACV proteínov v obidvoch použitých rekombinantoch. Po pôsobení 500 μM LA sme zaznamenali minimálne a po pôsobení 1 mM LA mierne zníženie hladín proteínov. Spektrum zachytených proteínov je podobné vo všetkých vzorkách a odpovedá spektru neskorých proteínov VACV. Koncentrácie LA, ktoré inhibovali rast VACV teda nemajú významný vplyv na zachytené hladiny VACV proteínov. Záverom sa môžeme domnievať, že LA ovplyvňuje expresiu neskorých proteínov VACV.

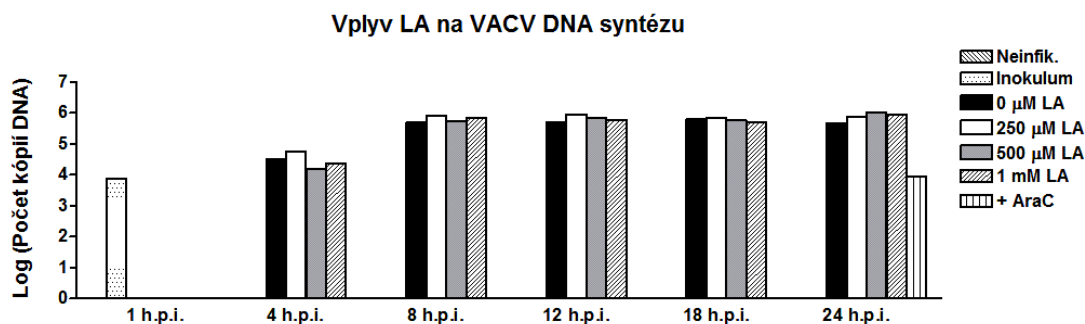


Obr. 34. Efekt LA na expresiu celkových proteínov VACV. $1,2 \times 10^6$ buniek HeLa G bolo infikovaných VACV-Luc E/L alebo VACV-Luc L (m.o.i.=2). Po odstránení inokula bola k bunkám v čerstvom médiu pridaná LA v uvedených koncentráciách. 24 h.p.i. boli bunky odpipetované a spracované na western blot. Expresia VACV proteínov bola stanovená pomocou králičieho antiséra proti VACV a imunoperoxidázového značenia. Obrázok reprezentuje výsledok z 2 pokusov.

4.2.2.5 Efekt kyseliny lipoovej na replikáciu vírusovej DNA

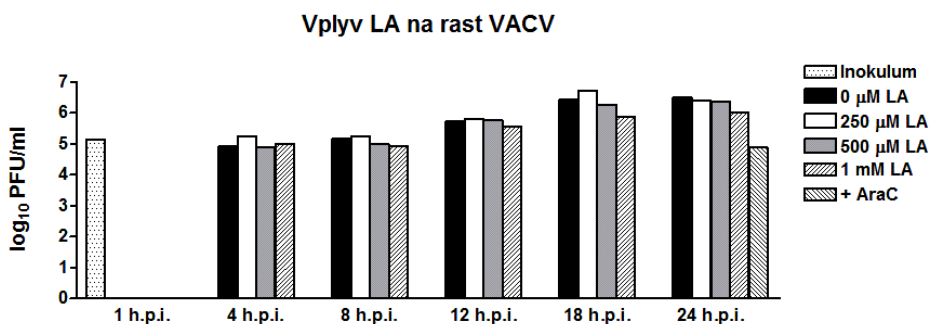
Na základe uvedených výsledkov sa dá predpokladať, že inhibičný efekt LA na infekciu VACV je na úrovni syntézy vírusovej DNA, syntézy neskorých proteínov alebo počas morfogénzy viriónov. Efekt LA na replikáciu VACV DNA sme analyzovali pomocou real-time PCR. V HeLa G bunkách sme počas 24 hod. časového intervalu kvantifikovali množstvo kópií genómovej vírusovej DNA (Obr. 35).

Výsledky ukazujú, že LA nemá inhibičný vplyv na syntézu vírusovej DNA. Na základe toho sa dá predpokladať, že LA má efekt na procesy prebiehajúce ešte neskoršie počas rastového cyklu VACV.



Obr. 35. Efekt LA na syntézu VACV DNA. $0,6 \times 10^6$ buniek HeLa G bolo infikovaných VACV-Luc L (m.o.i.=2). Po odstránení inokula bola k bunkám v čerstvom médiu pridaná LA v uvedených koncentráciách. V uvedených h.p.i. boli bunky odpipetované, izolovaná DNA a analyzovaná real-time PCR. Graf zobrazuje počet kópií VACV DNA na 100 ng celkovej DNA. Obrázok reprezentuje výsledok z 2 pokusov.

Ako kontrola bol súčasne s analýzou vzoriek pomocou real-time PCR v tých istých vzorkách stanovovaný efekt LA na rast VACV. Obr. 36 potvrdzuje už ukázaný koncentračne závislý inhibičný vplyv LA na rast vírusu v bunkách, v ktorých nebol zaznamenaný žiadny efekt na syntézu DNA.

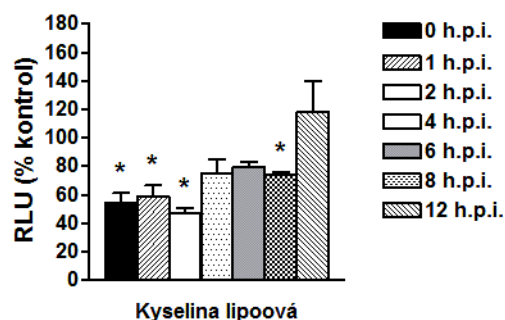


Obr. 36. Vplyv LA na rast VACV počas 24 hod. časového intervalu. $0,6 \times 10^6$ buniek HeLa G bolo infikovaných VACV-Luc L (m.o.i.=2). Po odstránení inokula bola k bunkám v čerstvom médiu pridaná LA v uvedených koncentráciách. V určených h.p.i. boli bunky odpipetované a stanovený titer VACV na bunkách BSC-40. Obrázok reprezentuje výsledok z 2 pokusov.

4.2.2.6 Efekt LA na infekciu VACV v závislosti od času pridania

Aby sme mohli bližšie charakterizovať efekt LA na jednotlivé časti rastového cyklu VACV, rozhodli sme sa ešte zanalyzovať závislosť vplyvu LA na čase pridania k infikovaným bunkám. HeLa G bunky boli infikované VACV L a v uvedených časových intervaloch bola k jednotlivým vzorkám pridaná 500 μ M LA. 24 h.p.i. boli bunky odpipetované a stanovená luciferázová aktivita. Obr. 37 ukazuje štatisticky významný inhibičný vplyv LA, pokiaľ bola pridaná do 4 h.p.i., čo je približne čas začiatku syntézy vírusovej DNA. Menšiu, aj keď štatisticky významnú, inhibíciu môžeme ale vidieť aj po pridaní LA v čase 8 h.p.i., t. j. v čase kedy už replikácia DNA určite prebehla (obr. 35), čo opäť poukazuje na to, že inhibícia VACV spôsobená LA nastáva až na úrovni exprese neskorých proteínov VACV. Po pridaní LA v čase 12 h.p.i. sme žiadnu významnú inhibíciu už nezaznamenali.

Vplyv LA na luciferázovú aktivitu v závislosti od času pridania



Obr. 37. Vplyv LA na infekciu VACV v závislosti od času pridania. $0,6 \times 10^6$ buniek HeLa G bolo infikovaných VACV-Luc L (m.o.i.=2). K inokulu alebo po odstránení inokula v uvedených časových intervaloch bola k bunkám pridávaná 500 μ M LA. 24 h.p.i. boli bunky odpipetované a spracované na stanovenie luciferázovej aktivity. Grafy predstavujú priemery z 2 pokusov v duplikátoch \pm S.E.M. *, štatisticky významný rozdiel v luciferázovej aktivite medzi bunkami s pridanou LA a kontrolami v jednotlivých časových intervaloch pridania LA ($P < 0,05$).

Celkovo môžeme uzavrieť, že sme ukázali inhibičný efekt LA na infekciu VACV, a to v bunkových líniách rôzneho pôvodu. Podľa našich výsledkov dochádza k inhibícii v neskorších fázach rastového cyklu VACV, na úrovni expresie neskorých VACV proteínov alebo možno ešte neskôr, na úrovni morfogénzy viriónov.

.

5 Diskusia

5.1 Typ bunkovej smrti spôsobený infekciou vírusom vakcínie

VACV bol v minulosti úspešne používaný v eradikačnej kampani proti pravým kiahňam, ktorá bola v roku 1980 celosvetovo ukončená. V súčasnosti je VACV vďaka svojim vlastnostiam naďalej používaný ako expresný vektor pre vakcinačné aj experimentálne účely. Napriek širokému používaniu tohto vírusu, je relatívne málo dostupných informácií o jeho vplyve na typ bunkovej smrti hostiteľskej bunky. Cieľom prvej časti tejto práce preto bolo bližšie charakterizovať typ bunkovej smrti indukovanej infekciou VACV.

Počas apoptózy a nekrózy, dvoch základných foriem bunkovej smrti, dochádza k odlišným biochemickým procesom na rôznych úrovniach (morfológia, biochemické dráhy). Jedna skutočnosť má však významný praktický dopad aj na klinické situácie – bunka umierajúca apoptoticky nevyvoláva imunitnú reakciu, zápal. Typ smrti bunky má teda ďalekosiahly dopad aj na celkové imunitné reakcie organizmu.

Práca nadväzuje na výsledky práce bývalých študentov v našom laboratóriu. Z pohľadu typu bunkovej smrti sa tradične uvádza, že VACV spôsobuje u väčšiny infikovaných buniek lýzu, ktorá je považovaná za ekvivalent nekrózy. Morfológia buniek v nami používaných epiteliálnych bunkových líniiach HeLa G a BSC-40 po infekcii VACV tiež potvrdzuje nekrotický charakter indukovanej bunkovej smrti u väčšiny buniek (Obr. 5). Výnimkou je apoptóza indukovaná po infekcii rekombinantným VACV exprimujúcim Bcl-2 v bunkách BSC-40. V tomto prípade ide ale o fenomén proapoptotického pôsobenia Bcl-2 exprimovaného VACV, ktorý bol tiež už skôr charakterizovaný v prácach pochádzajúcich z nášho laboratória (Kalbacova et al., 2003; Kalbacova et al., 2002; Vrbacky et al., 2003) a ktorému bude venovaná ďalšia časť diskusie. Ďalšie podrobnejšie charakteristiky (zmeny $\Delta\Psi_m$, integrity plazmatickej membrány a chýbajúca fragmentácia jadrovej DNA charakteristická pre apoptózu) potvrdzujúce prebiehajúcu lýtickú infekciu indukovanú VACV boli už tiež

publikované mojimi kolegami (Kalbacova et al., 2003; Kalbacova et al., 2002; Vrbacky et al., 2003).

Ako už bolo spomínané, nekróza a apoptóza sa líšia viacerými morfológickým a biochemickými procesmi. Najviac charakteristicky počas apoptózy, na rozdiel od nekrózy, dochádza k aktivácii konkrétnej skupiny proteáz, kaspáz. Kaspázy svojou proteolytickou činnosťou následne prispievajú k celkovej morfológii apoptotických buniek. Moja kolegyňa, Marie Kalbáčová, na prácu ktorej som nadväzovala, zaznamenala aktiváciu proteáz typických pre apoptózu počas lýtickej infekcie VACV (Kalbacova et al., 2008). Nameranú aktiváciu a aktivitu kaspáz stanovovala pomocou prietokovej cytometrie za použitia dvoch rôznych testov. Prvý z nich, CaspaTag, stanovoval na princípe väzby fluorescenčne značeného inhibítora kaspáz do ich aktívneho miesta ich aktiváciu. Druhý test mal sledovať štiepenie nefluorogénneho substrátu, Rhodamínu 110 bis-(amidu kyseliny L-aspartátovej), ktorý dával po štiepení kaspázami fluorescenčný produkt.

Keďže boli predchádzajúce výsledky získané len v infekčnom experimentálnom usporiadaní, v ktorom nebolo vylúčiteľné, že nameraná zvýšená fluorescencia by mohla pochádzať zo zvýšenej integrácie fluorescenčného indikátora v dôsledku porušenej integrity plazmatickej membrány počas infekcie VACV, rozhodli sme sa v tejto práci merania doplniť o neinfekčné experimenty. Aktiváciu/aktivitu kaspáz po infekcii VACV sme chceli dodatočne porovnať s tou, ku ktorej dochádza po indukcii apoptózy typickými neinfekčnými induktormi, ionomycínom a staurosporínom. Po pridaní dvoch rôznych koncentrácií ionomycínu a staurosporínu, ktoré iniciujú apoptózu v rovnakých bunkových líniiach, aké boli použité v experimentoch s VACV, sme zaznamenali štatisticky významné zvýšenie aktivity/aktivácie kaspáz (Obr. 6-9). V našich experimentoch sme zároveň ukázali, že miera aktivácie kaspáz počas infekcie VACV je porovnateľná s mierou aktivácie kaspáz po pôsobení typických induktorov apoptózy.

Experimentálne sme sa snažili potvrdiť aj špecifitu používaných testov. Pridanie kaspázového inhibítora z-VAD-FMK pred testom CaspaTag viedlo

k zníženiu populácie buniek s aktivovanými kaspázami na úroveň porovnateľnú s kontrolami, čo ukazuje na špecificitu tohto testu pre kaspázy (Obr. 10). V prípade testu používajúceho Rhodamín 110 bis-(amid kyseliny L-aspartátovej), ktorý by mal byť špecifický pre kaspázy 3 a 7 (Hug et al., 1999), však pridanie z-VAD-FMK nevedlo k zníženiu fluorescencie u žiadnej z dvoch použitých línií, HeLa G a BSC-40, čo sponchybňuje špecificitu tohto testu pre kaspázy (Obr. 11). Toto tvrdenie potvrdzuje aj výsledok experimentu, kedy po infekcii VACV a súčasnom pôsobení z-VAD-FMK na bunky BSC-40 sme rovnako nezaznamenali zníženie proteázovej aktivity stanovenej Rhodamínom 110 (Kalbacova et al., 2008).

Okrem dvoch už spomínaných metód potvrdzujúcich zapojenie kaspáz, resp. iných proteáz, počas lýtickej infekcie VACV, bolo v práci mojej kolegyne, rovnako za pomoci prietokovej cytometrie, potvrdené štiepenie jedného zo substrátov kaspáz, cytokeratínu 18 v obidvoch testovaných bunkových líniách (Kalbacova et al., 2008; Kalbacova et al., 2002). Špecificita použitého cytometrického testu na štiepenie kaspázami bola potvrdená kontrolným western blotom za použitia tej istej protilátky ako v cytometrickom teste, M30. Výsledok western blotu potvrdil štiepenie cytokeratínu 18, resp. objavenie sa jeho neoepitopu po štiepení kaspázami. Aktivita kaspáz bola potvrdená po pridaní z-VAD-FMK do experimentálneho usporiadania, čo malo za následok vymiznutie pozorovaných hladín štiepeného cytokeratínu 18 (Kalbacova et al., 2008).

Vzhľadom na pozorované neočakávané aktivovanie kaspáz počas lýtickej infekcie, rozhodli sme sa ďalej analyzovať ich pôsobenie vo VACV infikovaných bunkách. V sérii experimentov sme za pomoci western blotu sledovali štiepenie cytokeratínu 18 a ďalších substrátov kaspáz počas infekcie VACV.

Prvým analyzovaným substrátom kaspáz bol cytokeratín 18 (Obr. 12), ktorý patrí medzi molekuly udržiajúce štruktúrnú integritu epiteliálnych buniek (Ku et al., 1997). Analýza jeho hladín western blotom bola zároveň kontrolou k vyššie zmienenému cytometrickému testu, ktorý stanovoval neoepitop vznikajúci na cytokeratíne 18 po štiepení kaspázami. Keďže bola použitá protilátka, pomocou ktorej sme detekovali cytokeratín 18 na western blote, proti neštiepenej forme

proteínu, po jeho štiepení kaspázami sa dal očakávať pokles jeho hladín. Výsledky potvrdili pokles hladín cytokeratínu 18 v oboch testovaných bunkových líniiach po lýtickej infekcii VACV.

Na rozdiel od cytokeratínu 18, odlišné výsledky sme zaznamenali s druhým analyzovaným typickým substrátom kaspáz, PARP (Obr. 14). Nepozorovali sme žiadne výrazné štiepenie PARP v ani jednej testovanej bunkovej línii po infekcii kontrolným VACV. Odlišný bol len efekt na bunky BSC-40 infikované rekombinantom VACV-Bcl-2, kde sme zaznamenali štiepený fragment PARP charakteristický po pôsobení kaspáz. Pozorovaný efekt na tieto bunky je však v dôsledku expície Bcl-2 pomocou VACV a nie infekcie VACV samotným a štiepený PARP koreluje s apoptotickou morfológiou buniek. Rovnaké štiepenie sme zaznamenali aj v bunkách HeLa G infikovaných VACV-NOS a VACV-PKR, ktoré slúžili ako pozitívna apoptotická kontrola.

V bunkách s neštiepeným PARP sa teda dá predpokladať, že je aktívny a podieľa sa na spotrebúvaní bunkového ATP, čo vedie k energeticky menej náročnej forme bunkovej smrti infikovaných buniek, nekróze. Príčiny, prečo je cytokeratín 18 štiepený počas infekcie VACV a PARP nie je, však zostávajú stále neobjasnené.

Ďalším substrátom kaspáz, ktorého hladiny sme sledovali bol aktín (Obr. 13). Jeho štiepenie kaspázami prispieva k typickým morfológickým zmenám charakteristickým pre apoptózu. V našich experimentoch sme po infekcii VACV zaznamenali znižovanie hladín neštiepeného aktínu len v bunkách HeLa G. V bunkách BSC-40 neboli zaznamenané nižšie hladiny aktínu po infekcii VACV. Okrem možného štiepenia proteínov kaspázami, musíme brať do úvahy aj počas rozpadu aktínu v týchto bunkách a vplyv VACV už na úrovni mRNA. Podľa typu hostiteľskej bunky sú niektoré mRNA po infekcii VACV degradované a niektoré nie (Grun et al., 1987; Jindal a Young, 1992; Rice a Roberts, 1983).

V našich experimentoch sme okrem aktivácie kaspáz zaznamenali aj aktivitu kaspáz na úrovni štiepenia ich substrátu. Zdá sa teda, že počas infekcie VACV je aktivovaná apoptotická bunková smrť, ktorá nemôže byť pravdepodobne dokončená a bunka umiera nekroticky. Možnými vysvetleniami

môže byť inhibícia apoptózy iniciovaná VACV, ktorý kóduje viaceré inhibítory kaspáz a proteíny ovplyvňujúce apoptózu (Stewart et al., 2005; Taylor a Barry, 2006; Wasilenko et al., 2003) alebo nedostatok energetických zdrojov, ktorý ešte bude bližšie diskutovaný. Na rozdiel od nami použitých epiteliálnych bunkových línií HeLa G a BSC-40, u niektorých bunkových línií (makrofágy, dendritické bunky a B lymfocyty) má infekcia VACV za následok apoptózu (Baixeras et al., 1998; Engelmayer et al., 1999; Humlova et al., 2002). V týchto prípadoch ide pravdepodobne o stratégiu prekonávania imunitného obranného systému hostiteľa, ale poukazujú tiež na fakt, že v niektorých bunkách je pravdepodobne dostatok energetických zdrojov pre apoptotickú formu bunkovej smrti.

5.1.1 Vplyv inhibície kaspáz na infekciu VACV

Podľa našich výsledkov sa zdá, že aktivácia kaspáz zohráva nejakú úlohu pri infekcii VACV, rozhodli sme sa teda sledovať vplyv prípadnej inhibície týchto proteáz na priebeh infekcie VACV.

Výsledky titrácií stanovujúcich rast VACV ukazujú, že prídanie širokospektrálneho kaspázového inhibítora z-VAD-FMK má len malý vplyv na rast vírusu (Obr. 15). Je možné, že počas infekcie VACV, vzhľadom na viaceré inhibítory exprimované VACV, nemá už ďalšie prídanie inhibítora kaspáz veľký význam na zmenu rastu vírusu. Funkčnosť pridaného inhibítora bola overená pomocou western blotu sledujúceho hladiny PARP v bunkách BSC-40 infikovaných VACV-Bcl-2 (Obr. 17), teda v bunkách umierajúcich apoptoticky, v ktorých sme zaznamenali štiepenie PARP. Zvyšujúca sa koncentrácia z-VAD-FMK zabránila tomuto štiepeniu PARP, čo svedčí o zainhibovaní kaspáz po pridaní z-VAD-FMK.

Ďalším sledovaným parametrom počas infekcie VACV s pridaným inhibítorom kaspáz boli hladiny cytokeratínu 18 (Obr. 18). Vzhľadom na fakt, že počas infekcie VACV sme zaznamenali štiepenie tohto substrátu kaspáz, dalo by sa očakávať, že pôsobenie kaspázového inhibítora tento trend zvráti. V našich

experimentoch sme ale zistili ešte výraznejšie zníženie hladín celkového cytokeratínu 18 po pridaní z-VAD-FMK.

Mohli by sme uvažovať o možnosti, že cytokeratín 18 je v bunkách infikovaných VACV štiepený aj inými proteázami ako len kaspázami. Pre túto možnosť svedčia aj výsledky experimentu, kde sme sledovali štiepenie cytokeratínu 18 okrem protilátky DC 10 (monoklonálna protilátka detekujúca celú formu cytokeratínu 18) aj protilátkou M30 (monoklonálna protilátka detekujúca jeho neoepitop vznikajúci štiepením proteázami), a to spolu s pôsobením kaspázového inhibítora z-VAD-FMK (Obr. 5D - (Kalbacova et al., 2008)). Z hladín analyzovaných proteínov je vidieť, že vznik nového epitopu detekovaný M30 bol zainhibovaný pôsobením z-VAD-FMK a je teda závislý na aktivite kaspáz. Na druhej strane, po pôsobení z-VAD-FMK nedochádza k zvýšeniu hladín celkového cytokeratínu 18 (protilátka DC 10). Svedčí to teda o fakte, že na štiepení cytokeratínu 18 sa podieľajú aj iné proteázy ako len kaspázy a pridanie z-VAD-FMK môže ich pôsobenie podporovať (Obr. 18).

Je potrebné zmieniť, že účinok z-VAD-FMK, ako deklarovaneho širokospektrálneho inhibítora a efekt špecifických inhibítorov kaspáz sa môžu odlišovať. Charakterizovaním efektov inhibítorov jednotlivých kaspáz počas infekcie VACV sa zaoberá moja kolegyňa, Jana Lišková.

5.1.2 Inhibícia aktivity PARP a typ bunkovej smrti spôsobený VACV

Napriek morfológickým a biochemickým odlišnostiam medzi apoptózou a nekrotózou, považujú sa tieto dve formy bunkovej smrti, hlavne za patologických podmienok, za dva možné konce toho istého kontinua možných foriem bunkovej smrti (Cepeda et al., 2006; Leist et al., 1997). Medzi rozhodujúcimi činiteľmi určujúcimi formu bunkovej smrti, apoptózou alebo nekrotózou, je dostupnosť intracelulárneho ATP. Bolo ukázané, že pokiaľ bola hladina ATP redukovaná, výsledkom pôsobenia inak typicky apoptotického stimulu bola nekrotóza (Leist et al., 1997). Dôležitú úlohu v regulácii obsahu intracelulárneho ATP hraje PARP, jadrový enzým aktivovaný zlomami v reťazci DNA, ktorý následne prenáša

monomér ADP-ribózy za vzniku reťazcov poly-ADP na rôzne jadrové proteíny, vrátane seba. Keďže nadmerná aktivácia PARP vyčerpáva zásoby NAD⁺ a ATP bunky, PARP môže fungovať ako molekulárny prepínač medzi energeticky náročnou apoptotickou a energeticky nenáročnou nekrotickou formou bunkovej smrti (Cepeda et al., 2006). PARP je zároveň jedným zo substrátov kaspáz. Počas apoptózy štiepia kaspázy 7 a 3 PARP na dva fragmenty, čím oddelia DNA-viažúcu doménu od katalytickej, čo vedie k inaktivácii enzýmu (Virag a Szabo, 2002). Zablokovanie aktivity PARP je zásadné pre správne fungovanie apoptotických procesov, po jeho inaktivácii zostanú energetické zdroje v bunke zachované pre ATP-závislé procesy apoptózy (Cepeda et al., 2006).

V našich experimentoch sme sa chceli pokúsiť v bunkách infikovaných VACV zmeniť formu bunkovej smrti z nekrózy na apoptózu. Naším cieľom bolo pomocou inhibítora PARP, PJ 34, zabrániť enzymovej aktivite PARP a tým ušetriť energetické zdroje v bunke pre procesy apoptózy, ktoré zdá sa prebiehajú v počiatočných štádiách infekcie VACV.

Najskôr sme sledovali vplyv pôsobenia inhibítora PARP na hladiny samotného PARP a cytokeratínu 18. Po analýze hladín PARP (Obr. 19) bol vplyv jeho inhibítora zjavný len u vzoriek neinfikovaných, kde sme videli štiepenie PARP v závislosti na zvyšujúcej sa koncentrácii PJ 34. Vzhľadom na funkciu PARP ako reparačného enzýmu, je možné, že po zainhibovaní jeho aktivity podlieha viac neinfikovaných buniek apoptóze a teda sú aktivované aj kaspázy štiepiace PARP. U buniek infikovaných VACV-Cat ani VACV-Bcl-2 sme však po pridaní PJ 34 nepozorovali žiadne zmeny v štiepení PARP. Aktivita PARP bola pravdepodobne zainhibovaná, ale inhibítory kaspáz kódované VACV mohli zabrániť jeho štiepeniu a apoptóze.

Pri sledovaní vplyvu PJ 34 na hladiny cytokeratínu 18 (Obr. 20) sme pozorovali zníženie jeho hladín po pridaní PJ 34 v bunkách HeLa G. Tento výsledok nám poukazuje na možnosť, že po zainhibovaní aktivity PARP má bunka dostupných viac energetických zdrojov, aspoň na niektoré deje spojené s apoptózou. Nevylučuje však možnosť už diskutovanú vyššie, že proteázami štiepiacimi cytokeratín 18 môžu byť iné ako kaspázy.

Vzhľadom na úzku spojitosť medzi typom bunkovej smrti a činnosťou mitochondrií bol ďalším analyzovaným parametrom $\Delta\Psi_m$ (Obr. 21). Z našich výsledkov sa nezdá, že by malo pôsobenie inhibítora PARP efekt na $\Delta\Psi_m$. Podobný výsledok sme dosiahli aj pri analýze integrity plazmatickej membrány a to, že pôsobenie PJ 34 nemalo výrazný efekt na túto charakteristiku bunky v žiadnej z analyzovaných bunkových línii (Obr. 22).

Z našich výsledkov nameraných v experimentoch s inhibítormi aktivity PARP vyplýva, že zmena formy bunkovej smrti počas infekcie VACV ovplyvnením funkcie PARP použitým inhibítormi aktivity PARP nie je možná. Vzhľadom na to, že VACV vo svojom genóme kóduje viaceré inhibítory kaspáz, stále musíme brať do úvahy aj minimálne tento faktor pri ovplyvňovaní bunkovej smrti indukovanej infekciou VACV. Inhibícia kaspáz má totiž za následok aj zabránenie štiepeniu PARP, čo potvrdzujú aj naše western blot analýzy. Neštiepený, aktívny, PARP tak pravdepodobne čerpá energetické zdroje bunky a tá, aj keby mala započatý apoptotický mechanizmus, nemá dostatok energie na jeho dokončenie a umiera nekroticky. K poklesu energetických zdrojov môže dochádzať aj v dôsledku vysokej expresie vírusových proteínov a v dôsledku inhibície funkcie mitochondrií po infekcii VACV (Vrbáček et al., 2003). Naša snaha zainhibovať funkciu PARP mohla síce zabrániť jeho aktivite a spotrebe energie týmto enzýmom, ale v konečnom dôsledku bunka infikovaná VACV aj tak podlieha nekróze vďaka ďalším zmenám metabolizmu podmieneným vírusovou infekciou, aj vďaka činnosti inhibítorov apoptózy exprimovaných z genómu vírusu. Uvedené podporuje aj fakt, že v neinfikovaných bunkách s pridaným inhibítormi aktivity PARP sme sledovali štiepenie PARP, t.j. v týchto bunkách bola spotreba energie PARP zablokovaná a činnosť kaspáz sa mohla prejavovať, keďže nebola zainhibovaná produktom VACV ako je to u buniek infikovaných. Do úvahy tiež prichádza možnosť nešpecifického efektu inhibítora v bunkovej línii – toxicita, stabilita, degradácia.

5.2 Stabilne transfekované bunkové línie

Ako už bolo spomenuté, VACV sa vďaka svojim vlastnostiam v súčasnosti úspešne používa ako vektor pre profylaktické aj experimentálne účely. Zdá sa však, že dôležitú úlohu pri prejave konkrétneho rekombinantného proteínu hraje aj interakcia VACV s hostiteľskou bunkou.

K takýmto prejavom po expresii VACV v rôznych bunkových líniách dochádza u proteínu Bcl-2. Protoonkogén Bcl-2 typicky inhibuje programovanú bunkovú smrť, pôsobí teda antiapoptoticky. Po jeho nekontrolovanej expresii dochádza k malignému procesu. Z výsledkov pochádzajúcich z prác našej skupiny vyplýva, že proteín Bcl-2 exprimovaný VACV pôsobí v niektorých bunkových líniách antiapoptoticky (HeLa G) a v iných proapoptoticky (BSC-40). Rozdiely v odlišnom pôsobení rekombinantov VACV sú zdá sa podmienené energetickým metabolizmom hostiteľskej bunky. Bcl-2 pôsobí antiapoptoticky v líniách získavajúcich energiu glykolýzou (HeLa G, glykolytické makrofágy), naopak proapoptoticky pôsobí v líniách závislých na oxidatívnej fosforylácii (BSC-40, fosforylujúce makrofágy; (Humlova, 2002; Kalbacova, 2003; Vrbacky, 2005).

Vzhľadom na to, že uvedené výsledky boli dosiahnuté po expresii Bcl-2 pomocou VACV, vzniká otázka, či je indukcia apoptózy Bcl-2 spôsobená zvýšenou expresiou Bcl-2 a jeho interakciou s intracelulárnym prostredím, alebo k nej prispievajú interakcie Bcl-2 a proteínov VACV regulujúcich apoptózu. Odlíšiť interakcie Bcl-2 s vírusom od ovplyvňovania intracelulárnym prostredím sme sa rozhodli použitím iného expresného systému pre expresiu Bcl-2 ako vírusového.

Pre naše experimenty sme zvolili expresný systém Tet-On. Ten by mal poskytovať možnosť presnej, koncentračne-závislej regulácie expresie a tiež vysokú mieru indukovanej expresie požadovaného génu. Cieľom bola príprava stabilne transfekovaných bunkových línií HeLa G a BSC-40 inducibilne exprimujúcich Bcl-2 alebo kontrolný gén.

Najskôr sme do plazmidu pre vnesenie nami požadovaného génu vklonovali gén pre Bcl-2. Samotná príprava stabilne transfekovaných línií spočívala v dvoch stabilných transfekciách. V prvej sme do buniek vintegrovali regulačný plazmid Tet-On systému. Úspešné včlenenie tohto plazmidu bolo overené transientnou

transfekciou plazmidu nesúceho gén pre luciferázu, ktorý mal byť inducibilne exprimovaný za príspevia produktu z regulačného plazmidu. Expresia luciferázy bola overená zmeraním jej aktivity a porovnaním vzoriek bez indukcie so vzorkami po indukcii expresie. Približne 46-krát vyššia expresia luciferázy bola zistená po indukcii u zmesi stabilne transfekovaných buniek, čo svedčí o úspešnej integrácii regulačného plazmidu. Následne sme sa snažili niekoľkonásobným riedením na kultivačných platniach vyselektovať jednotlivé klony stabilne transfekovaných buniek. Namerané luciferázové aktivity po transientnej transfekcii plazmidu kódujúceho Luc boli u jednotlivých klonov vždy výrazne nižšie ako u zmesi buniek. Aj pre ďalšiu fázu prípravy Tet-On línie sme sa teda rozhodli použiť zmes buniek s úspešne integrovaným regulačným plazmidom.

V druhej stabilnej transfekcii sme chceli do buniek integrovať plazmid nesúci vklonovaný gén pre Bcl-2 spolu s plazmidom kódujúcim gén pre antibiotikovou rezistenciu. Ani po viacerých modifikáciách transfekčného protokolu sa nám však nepodarila úspešná kotransfekcia a integrácia oboch plazmidov. Problém sme vyriešili vklonovaním génu pre Bcl-2 do komerčne dodaného plazmidu obsahujúceho gén pre rezistenciu. Následná transfekcia bola úspešná a po selekcii na rezistenciu na antibiotikum, sme pripravili bunkovú líniu BSC-40 inducibilne exprimujúcu Bcl-2 (Obr. 23).

Problém, ktorý ostal zatiaľ nevyriešený bola príprava línie HeLa G stabilne exprimujúca Bcl-2. Do tejto bunkovej línie sa nám napriek viacerým modifikáciám transfekčných protokolov (transfekčné činidlá – SuperFect, Fugene, Fugene HD; elektroporácia) nepodarilo úspešne integrovať ani regulačný plazmid Tet-On systému.

Po úspešnej príprave bunkovej línie BSC-40 inducibilne exprimujúcej Bcl-2 po pôsobení Dox sme chceli charakterizovať jeho efekt na procesy súvisiace s bunkovou smrťou. Morfológicky sa bunky exprimujúce a neexprimujúce Bcl-2 nelíšili (Obr. 24). Bcl-2 exprimované v nami pripravenej bunkovej líni na tejto úrovni nepôsobí ako Bcl-2 exprimované VACV. Podobne ako v morfológii buniek, žiadny rozdiel sme nepozorovali ani v integrite plazmatickej membrány ani v $\Delta\Psi_m$

u buniek bez a po indukcii expresie Bcl-2 (Obr. 25, 26). V bunkách exprimujúcich Bcl-2 pomocou VACV mal Bcl-2 proapoptotický efekt čo sa týka bunkovej smrti a stabilizujúci efekt na $\Delta\Psi_m$. Je možné, že kooperácia Bcl-2 a VACV viedla k apoptóze hostiteľskej bunky prostredníctvom ovplyvnenia hladín ATP.

Možným dôvodom prečo sme nepozorovali žiadny efekt u Bcl-2 exprimovaného bunkovou líniou pod kontrolou Tet-On promotora by mohla byť nižšia expresia v porovnaní s VACV expresným systémom. Pre odlišenie efektov Bcl-2 nezávislých na VACV by bolo teda vhodnejšie použiť iný expresný systém poskytujúci vyššiu mieru expresie, napr. iný vírusový systém.

Zásadným problémom, kvôli ktorému sme v plánovaných experimentoch nepokračovali bola strata expresie Bcl-2 po niekoľkých málo pasážach. Do úvahy prichádza možnosť, že vyššia expresia Bcl-2 bunkám BSC-40 škodí, podobne ako u expresie pomocou VACV. Ako možnosť sa ponúka inhibícia expresie na úrovni DNA modifikácii (napr. jej metylácia).

5.3 Ovplyvnenie rastu vírusu vakcínie pôsobením redox-modulujúcich látok

V poslednej časti práce sme sa zamerali na bližšie charakterizovanie predtým nepopísaných inhibičných efektov LA na infekciu VACV. Najskôr sme experimentálne stanovovali efekt piatich rôznych redox-modulujúcich látok, β -merkaptoetanolu, DTT, kyseliny askorbovej, LA a EA, na infekciu VACV. Na základe meranej aktivity luciferázy exprimovanej rekombinantom VACV sme zaznamenali inhibičný efekt na infekciu VACV len po pôsobení LA a EA. Účinok bol koncentračne závislý, účinné koncentrácie sa u LA pohybovali v stovkách mikromolov, u EA to boli nízko mikromolárne koncentrácie (do 50 μ M). Vzhľadom na odlišné chovanie jednotlivých látok, LA by mala fungovať ako antioxidant, na druhej strane EA by mala pôsobiť pro-oxidatívne, sa len ťažko hľadá vysvetlenie pre spoločný možný princíp inhibičného ovplyvnenia VACV (Bilska a Wlodek, 2005; Packer et al., 2001; Tew et al., 1997).

Jedným možným vysvetlením je nimi ovplyvnená tvorba disulfidických väzieb. Možný je jednak vplyv na redox závislé proteíny VACV a jednak na ovplyvnenie redox prostredia v bunke reakciou s antioxidantmi. Morfogenéza

VACV je závislá na disulfidických väzbách. Konkrétne sa na ich tvorbe podieľajú proteíny E10, A2,5 a G4, ktoré svojou činnosťou tvoria dráhu tvorby disulfidických väzieb na viacerých vírusových proteínoch v cytoplazme hostiteľskej bunky. Vyradenie z funkcie ktoréhokoľvek z týchto proteínov má za následok pozastavenie správnej maturácie vírusových častíc (Su et al., 2006).

Dá sa uvažovať aj o znižovaní rastu VACV inhibíciou NF- κ B, musíme ale podotknúť, že už VACV samotný inhibuje aktiváciu NF- κ B (Graham et al., 2008). Obidve testované látky, EA aj LA, inhibujú dráhy NF- κ B, aj keď rôznymi mechanizmami. Bolo opublikované, že EA inhibuje aktiváciu dráhy NF- κ B na viacerých miestach, modifikáciou NF- κ B priamo alebo inhibíciou jeho väzby na DNA (Han et al., 2005). LA môže inhibovať aktiváciu NF- κ B znižovaním redoxného stresu v bunke (Kiemer et al., 2002; Petersen Shay et al., 2008).

Práve blokovaním aktivácie NF- κ B v bunkových kultúrach v 2 mM koncentrácii zabránila LA aj replikácii HIV. Niektoré práce ukázali tiež synergistický efekt LA spolu s ďalšími terapeutikami, ako napr. zidovudine, proti HIV (Baur et al., 1991; Pande a Ramos, 2003).

Opačný efekt ako s LA a EA sme zaznamenali po pôsobení β -merkaptoetanolu, DTT a kyseliny askorbovej, u ktorých sme sledovali nárast v luciferázovej aktivite exprimovanej rekombinantom VACV. Tieto látky napomáhajú k vzniku redukčného prostredia v bunke a ich efekt je možno spôsobený aj vplyvom na redox-ovplyvňujúcu dráhu kódovanú VACV.

Ako už bolo zmienené táto práca je zameraná hlavne na efekty LA. Po zistení inhibičného vplyvu na jednej bunkovej línii (Obr. 28), rozhodli sme sa tento overiť na bunkových líniiach rôzneho embryonálneho pôvodu (epiteliálne HeLa G a BSC-40, fibroblasty, makrofágy, T-lymfocyty; Obr. 29, 31). Okrem už spomenutého stanovenia luciferázovej aktivity sme do experimentov zahrnuli aj stanovenie rastu vírusu titráciou na bunkovej línii BSC-40 a okrem rekombinantov VACV bol do analýzy efektov LA zahrnutý aj WT VACV. Podľa hodnôt titrácie VACV sme u LA potvrdili inhibičný efekt na rast vírusu vo všetkých testovaných bunkových líniiach. Rovnaký efekt bol zjavný aj po stanovení luciferázovej aktivity

luciferázy exprimovanej VACV, u všetkých testovaných línií sme zaznamenali štatisticky významný pokles po pôsobení LA.

Navyše, podľa výsledkov MTT testu nemá LA, v použitých koncentráciách, cytotoxický efekt na väčšinu infikovaných buniek. Z hodnôt dosiahnutých titrov a luciferázových aktivít boli vypočítané inhibičné koncentrácie LA pre jednotlivé bunkové línie (Tab. 2). Podľa nich sú hodnoty IC₅₀ vypočítané z titrov nižšie u rekombinantov VACV ako u WT VACV a rovnako nižšie hodnoty počítané z titrov vírusu v porovnaní s luciferázovou aktivitou. Celkovo sa hodnoty IC₅₀ v našich experimentoch pohybujú v rozpätí 500-800 μ M pre WT VACV a 200-500 μ M pre titer vírusu a 300-850 μ M pre luciferázovú aktivitu u rekombinantov VACV. Publikované hodnoty IC₅₀ cidofovíru, jediného schváleného preparátu pôsobiaceho proti VACV, sa líšia, IC₅₀=3,09 μ g/ml, t. j. 9,8 μ M, pre ľudské embryonálne fibroblasty HEL a VACV kmeň Lederle (Krecmerova et al., 2007), 54 a 62 μ M pre Vero bunky, 18 a 28 μ M v ľudských kožných fibroblastoch HFF a <50 μ M pre BSC-40 a VACV kmeň WR (Becker et al., 2008). Aj keď sa hodnoty získané inými testami a za iných podmienok dajú porovnávať len s určitou rezervou, nami stanovené hodnoty LA sú v tomto porovnaní pravdepodobne terapeuticky nezaujímavé. Cieľom práce však bolo priblížiť nový možný mechanizmus inhibičného pôsobenia na VACV, porovnať ho s mechanizmom EA a objasniť novú vlastnosť LA.

Po zistení inhibičného vplyvu LA na infekciu VACV sme sa rozhodli objasniť v ktorej fáze rastového cyklu VACV k inhibícii dochádza. Najskôr sme chceli odlíšiť, či k inhibícii dochádza pred alebo po syntéze DNA, t.j. na úrovni expresie skorých alebo neskorých proteínov VACV (Obr. 32). Toto nám umožnilo použitie dvoch rekombinantov VACV exprimujúcich luciferázu pod dvoma rôznymi promotormi VACV, skorým/neskorým (VACV-Luc E/L) a neskorým (VACV-L), v kombinácii s pridaným inhibítorom DNA syntézy VACV, AraC. Namerané luciferázové aktivity a hladiny luciferázy stanovené western blotom (Obr. 32, 33) potvrdili koncentračne závislý inhibičný vplyv LA na obidva analyzované rekombinanty VACV. Po zainhibovaní syntézy VACV DNA bola luciferázová aktivita exprimovaná VACV-Luc L zainhibovaná na úroveň pozadia,

čo potvrdzuje expresiu luciferázy z neskorého promotora týmto rekombinantom. Aktivita luciferázy exprimovanej VACV-Luc E/L bola zainhibovaná menej a jej stanovené hodnoty boli niekoľkonásobne vyššie než VACV-Luc L, čo ukazuje na expresiu luciferázy v tomto rekombinante ešte pred syntézou VACV DNA. Hodnoty namerané z VACV-Luc E/L po pridaní AraC neukazovali na žiadny inhibičný efekt indukovaný LA, z čoho sa dá usudzovať, že LA nemá inhibičný efekt na syntézu skorých proteínov VACV. Expresia luciferázy po pridaní AraC nebola už na western blote detekovateľná, citlivosť dvoch nami použitých prístupov detekcie luciferázy je odlišná.

Aj ďalší experiment, v ktorom sme sledovali hladiny celkových VACV proteínov pomocou western blot analýzy potvrdil predchádzajúci záver (Obr. 34). Pozorovali sme zníženie hladín vírusových proteínov po pôsobení najvyššej použitej koncentrácie LA, ale celkový vzor VACV proteínov ostal nezmenený, zodpovedal teda syntéze neskorých proteínov.

Na základe týchto výsledkov bolo možné usudzovať, že úroveň inhibície je na úrovni syntézy DNA alebo v ešte neskorších fázach rastového cyklu VACV. Následná kvantifikácia VACV DNA pomocou real-time PCR v priebehu 24 hodinového časového intervalu ukázala, že syntéza vírusovej DNA nie je inhibovaná po pridaní LA, pričom titrácia VACV z tých istých vzoriek potvrdila inhibíciu rastu VACV (Obr. 35, 36). Tieto výsledky ukazovali na to, že miestom inhibičného pôsobenia LA v rastovom cykle VACV je expresia neskorých génov VACV, ku ktorej dochádza až po syntéze DNA, alebo morfogéniza viriónov.

O tom, že k inhibícii indukovanej LA dochádza až v neskorších fázach rastového cyklu vírusu svedčí aj náš experiment, kedy sme sledovali vplyv LA na infekciu VACV v závislosti na čase pridaní LA (Obr. 37). Výsledky ukázali, že k najvýraznejšej inhibícii dochádza pokiaľ je LA pridaná do 4 hodín od začiatku infekcie, ale aj LA pridaná 8 hodín od začiatku infekcie, čo je už po fáze syntézy vírusovej DNA, mala za následok štatisticky významné zainhibovanie rastu VACV.

Uvedené výsledky ukazujú na možné využitie LA v terapii proti VACV. LA je dobre absorbovaná z čreva a dobre prechádza aj hematoencefalickou

bariérou, je netoxická aj vo vysokých koncentráciach a je používaná ako potravinový doplnok. Vzhľadom na to, že inhibičné koncentrácie LA nie sú tak nízke ako iných látok testovaných proti VACV, nedá sa o LA uvažovať ako o samostatnej liečbe proti tomuto vírusu, ale určite poskytuje možnosť použitia ako podpornej terapie v kombinácii s inou účinnou látkou.

6. Záver

Práca bola zameraná na podrobnejšiu analýzu skôr sledovaných dejov prebiehajúcich počas infekcie VACV v hostiteľskej bunke a na nové inhibičné vlastnosti niektorých redox-modulujúcich látok. Výsledky sa dajú stručne zhrnúť nasledovne:

1. V experimentoch sledujúcich štiepenie substrátov kaspáz, proteáz typických pre apoptózu, počas lýtickej infekcie buniek HeLa G a BSC-40 vírusom vakcínie sme potvrdili štiepenie cytokeratínu 18. Na druhej strane však štiepenie typického substrátu kaspáz, PARP, nebolo pozorované. Výsledky ukazujú na možnosť aktivácie dráh apoptózy počas infekcie VACV, tá ale následne nemôže byť ukončená a bunka umiera nekroticky.
2. Experimenty sledujúce vplyv inhibície kaspáz počas infekcie VACV boli zamerané na efekt pridávaného širokospektrálneho inhibítora kaspáz z-VAD-FMK. Avšak tento inhibítor vykazoval len okrajový efekt na rast vírusu vakcínie a naopak, indukoval zvýšené štiepenie cytokeratínu 18. Na štepení tohto proteínu tak zrejme participujú ďalšie proteázy.

Pokusy zamerané na inhibíciu aktivity PARP s cieľom zmeniť formu bunkovej smrti počas lýtickej infekcie vírusom vakcínie na apoptózu boli neúspešné. Ukázali, že ovplyvnenie typu bunkovej smrti hostiteľskej bunky pomocou inhibície aktivity PARP použitým inhibítorom nie je možné a že efekty anti-apoptotických faktorov kódovaných VACV hrajú významnejšiu úlohu.

3. Z plánovaných dvoch bunkových línií, HeLa G a BSC-40, indukateľne exprimujúcich Bcl-2 expresným systémom Tet-On, sa nám podarilo pripraviť len jednu, BSC-40. Experimenty sledujúce efekt

takto exprimovaného Bcl-2 neukázali žiadny vplyv na typ bunkovej smrti, avšak experimenty sa nám kvôli vytrácajúcej sa expresii Bcl-2 nepodarilo uzavrieť. Vyššia expresia Bcl-2 pravdepodobne škodí bunkám BSC-40.

4. Z piatich sledovaných redox-modulujúcich látok sme pozorovali jednak stimulačný efekt na infekciu vírusom vakcínie u β -merkaptoetanolu, DTT a kyseliny askorbovej, jednak koncentračne závislý inhibičný efekt u kyseliny lipoovej a etakrynovej. Podľa experimentov podrobnejšie charakterizujúcich mechanizmus inhibície kyselinou lipoovou sa zdá, že k nej dochádza na úrovni expresie neskorých génov VACV alebo morfogenézy vírusových častíc.

7. Referencie

1. Alcami, A. a Smith, G.L. (1995a) Cytokine receptors encoded by poxviruses: a lesson in cytokine biology. *Immunol Today* 16(10), 474-8.
2. Alcami, A. a Smith, G.L. (1995b) Vaccinia, cowpox, and camelpox viruses encode soluble gamma interferon receptors with novel broad species specificity. *J Virol* 69(8), 4633-9.
3. Arness, M.K., Eckart, R.E., Love, S.S., Atwood, J.E., Wells, T.S., Engler, R.J., Collins, L.C., Ludwig, S.L., Riddle, J.R., Grabenstein, J.D. a Tornberg, D.N. (2004) Myopericarditis following smallpox vaccination. *Am. J. Epidemiol.* 160(7), 642-51.
4. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. a Struhl, K. (2002) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons.
5. Baixeras, E., Cebrian, A., Albar, J.P., Salas, J., Martinez, A.C., Vinuela, E. a Revilla, Y. (1998) Vaccinia virus-induced apoptosis in immature B lymphocytes: role of cellular Bcl-2. *Virus. Res.* 58(1-2), 107-13.

-
6. Baldick, C.J., Jr. a Moss, B. (1993) Characterization and temporal regulation of mRNAs encoded by vaccinia virus intermediate-stage genes. *J Virol* 67(6), 3515-27.
 7. Baur, A., Harrer, T., Peukert, M., Jahn, G., Kalden, J.R. a Fleckenstein, B. (1991) Alpha-lipoic acid is an effective inhibitor of human immunodeficiency virus (HIV-1) replication. *Klin Wochenschr* 69(15), 722-4.
 8. Beaud, G. (1995) Vaccinia virus DNA replication: a short review. *Biochimie* 77(10), 774-9.
 9. Becker, M.N., Obratsova, M., Kern, E.R., Quenelle, D.C., Keith, K.A., Prichard, M.N., Luo, M. a Moyer, R.W. (2008) Isolation and characterization of cidofovir resistant vaccinia viruses. *Virol J* 5, 58.
 10. Bilska, A. a Wlodek, L. (2005) Lipoic acid - the drug of the future? *Pharmacol Rep* 57(5), 570-7.
 11. Brasier, A.R., Tate, J.E. a Habener, J.F. (1989) Optimized use of the firefly luciferase assay as a reporter gene in mammalian cell lines. *Biotechniques* 7(10), 1116-22.
 12. Bray, M. (2003) Pathogenesis and potential antiviral therapy of complications of smallpox vaccination. *Antiviral Res* 58(2), 101-14.
 13. Bray, M. a Wright, M.E. (2003) Progressive vaccinia. *Clin. Infect. Dis.* 36(6), 766-74.
 14. Buller, R.M. a Palumbo, G.J. (1991) Poxvirus pathogenesis. *Microbiol Rev* 55(1), 80-122.
 15. Burg, M.B. (1976) Tubular chloride transport and the mode of action of some diuretics. *Kidney Int* 9(2), 189-97.
 16. Cepeda, V., Fuertes, M.A., Castilla, J., Alonso, C., Quevedo, C., Soto, M. a Perez, J.M. (2006) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitors in cancer chemotherapy. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 1(1), 39-53.
 17. Condit, R.C. a Niles, E.G. (2002) Regulation of viral transcription elongation and termination during vaccinia virus infection. *Biochim Biophys Acta* 1577(2), 325-36.
-

-
18. Cooray, S., Bahar, M.W., Abrescia, N.G., McVey, C.E., Bartlett, N.W., Chen, R.A., Stuart, D.I., Grimes, J.M. a Smith, G.L. (2007) Functional and structural studies of the vaccinia virus virulence factor N1 reveal a Bcl-2-like anti-apoptotic protein. *J. Gen. Virol.* 88(Pt 6), 1656-66.
 19. Cory, S., Huang, D.C. a Adams, J.M. (2003) The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22(53), 8590-607.
 20. Danial, N.N. a Korsmeyer, S.J. (2004) Cell death: critical control points. *Cell* 116(2), 205-19.
 21. De Clercq, E. (2001) Vaccinia virus inhibitors as a paradigm for the chemotherapy of poxvirus infections. *Clin Microbiol Rev* 14(2), 382-97.
 22. De Clercq, E. (2002) Cidofovir in the treatment of poxvirus infections. *Antiviral Res* 55(1), 1-13.
 23. De Clercq, E., Holy, A., Rosenberg, I., Sakuma, T., Balzarini, J. a Maudgal, P.C. (1986) A novel selective broad-spectrum anti-DNA virus agent. *Nature* 323(6087), 464-7.
 24. Degli Esposti, M. a Dive, C. (2003) Mitochondrial membrane permeabilisation by Bax/Bak. *Biochem Biophys Res Commun* 304(3), 455-61.
 25. Duraffour, S., Snoeck, R., de Vos, R., van Den Oord, J.J., Crance, J.M., Garin, D., Hruby, D.E., Jordan, R., De Clercq, E. a Andrei, G. (2007) Activity of the anti-orthopoxvirus compound ST-246 against vaccinia, cowpox and camelpox viruses in cell monolayers and organotypic raft cultures. *Antivir Ther* 12(8), 1205-16.
 26. Engelmayer, J., Larsson, M., Subklewe, M., Chahroudi, A., Cox, W.I., Steinman, R.M. a Bhardwaj, N. (1999) Vaccinia virus inhibits the maturation of human dendritic cells: a novel mechanism of immune evasion. *J. Immunol.* 163(12), 6762-8.
 27. Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B. a Martinou, J.C. (2000) Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* 20(3), 929-35.
-

-
28. Everett, H., Barry, M., Lee, S.F., Sun, X., Graham, K., Stone, J., Bleackley, R.C. a McFadden, G. (2000) M11L: a novel mitochondria-localized protein of myxoma virus that blocks apoptosis of infected leukocytes. *J Exp Med* 191(9), 1487-98.
 29. Everett, H. a McFadden, G. (2002) Poxviruses and apoptosis: a time to die. *Curr Opin Microbiol* 5(4), 395-402.
 30. Fischer, S.F., Ludwig, H., Holzapfel, J., Kvensakul, M., Chen, L., Huang, D.C., Sutter, G., Knese, M. a Hacker, G. (2006) Modified vaccinia virus Ankara protein F1L is a novel BH3-domain-binding protein and acts together with the early viral protein E3L to block virus-associated apoptosis. *Cell Death Differ* 13(1), 109-18.
 31. Fischer, U., Janicke, R.U. a Schulze-Osthoff, K. (2003) Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ.* 10(1), 76-100.
 32. Foo, C.H., Lou, H., Whitbeck, J.C., Ponce-de-Leon, M., Atanasiu, D., Eisenberg, R.J. a Cohen, G.H. (2009) Vaccinia virus L1 binds to cell surfaces and blocks virus entry independently of glycosaminoglycans. *Virology* 385(2), 368-82.
 33. Fulginiti, V.A. (2003) Risks of smallpox vaccination. *JAMA* 290(11), 1452; author reply 1452.
 34. Ghobrial, I.M., Witzig, T.E. a Adjei, A.A. (2005) Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA. Cancer J. Clin.* 55(3), 178-94.
 35. Girgis, N.M., Dehaven, B.C., Fan, X., Viner, K.M., Shamim, M. a Isaacs, S.N. (2008) Cell surface expression of the vaccinia virus complement control protein is mediated by interaction with the viral A56 protein and protects infected cells from complement attack. *J Virol* 82(9), 4205-14.
 36. Graham, S.C., Bahar, M.W., Cooray, S., Chen, R.A., Whalen, D.M., Abrescia, N.G., Alderton, D., Owens, R.J., Stuart, D.I., Smith, G.L. a Grimes, J.M. (2008) Vaccinia virus proteins A52 and B14 Share a Bcl-2-like fold but have evolved to inhibit NF-kappaB rather than apoptosis. *PLoS Pathog* 4(8), e1000128.
-

-
37. Green, D.R. a Kroemer, G. (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305(5684), 626-9.
 38. Grun, J., Kroon, E., Zoller, B., Krempien, U. a Jungwirth, C. (1987) Reduced steady-state levels of vaccinia virus-specific early mRNAs in interferon-treated chick embryo fibroblasts. *Virology* 158(1), 28-33.
 39. Guo, Z.S., Naik, A., O'Malley, M.E., Popovic, P., Demarco, R., Hu, Y., Yin, X., Yang, S., Zeh, H.J., Moss, B., Lotze, M.T. a Bartlett, D.L. (2005) The enhanced tumor selectivity of an oncolytic vaccinia lacking the host range and antiapoptosis genes SPI-1 and SPI-2. *Cancer Res* 65(21), 9991-8.
 40. Gupta, S., Agrawal, A., Agrawal, S., Su, H. a Gollapudi, S. (2006) A paradox of immunodeficiency and inflammation in human aging: lessons learned from apoptosis. *Immun Ageing* 3, 5.
 41. Han, Y., Englert, J.A., Delude, R.L. a Fink, M.P. (2005) Ethacrynic acid inhibits multiple steps in the NF-kappaB signaling pathway. *Shock* 23(1), 45-53.
 42. Harlow, E. a Lane, D. (1988) Immunoblotting. In: E. Harlow a D. Lane (Eds), *Antibodies: A Laboratory Manual*, pp. 471-510. Cold Spring Harbor New York.
 43. Huang, D.C. a Strasser, A. (2000) BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* 103(6), 839-42.
 44. Huang, S., Hendriks, W., Althage, A., Hemmi, S., Bluethmann, H., Kamijo, R., Vilcek, J., Zinkernagel, R.M. a Aguet, M. (1993) Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science* 259(5102), 1742-5.
 45. Hug, H., Los, M., Hirt, W. a Debatin, K.M. (1999) Rhodamine 110-linked amino acids and peptides as substrates to measure caspase activity upon apoptosis induction in intact cells. *Biochemistry* 38(42), 13906-11.
 46. Humlova, Z. (2002) Apoptosis in macrophages infected by vaccinia virus. PhD. Thesis, 1st Medical Faculty Charles University.
 47. Humlova, Z., Vokurka, M., Esteban, M. a Melkova, Z. (2002) Vaccinia virus induces apoptosis of infected macrophages. *J. Gen. Virol.* 83(Pt 11), 2821-32.
-

-
48. Chang, H.Y. a Yang, X. (2000) Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64(4), 821-46.
 49. Jindal, S. a Young, R.A. (1992) Vaccinia virus infection induces a stress response that leads to association of Hsp70 with viral proteins. *J Virol* 66(9), 5357-62.
 50. Johnston, J.B. a McFadden, G. (2003) Poxvirus immunomodulatory strategies: current perspectives. *J Virol* 77(11), 6093-100.
 51. Joklik, W.K. (1962) The purification fo four strains of poxvirus. *Virology* 18, 9-18.
 52. Kaeppler, U., Stiefl, N., Schiller, M., Vicik, R., Breuning, A., Schmitz, W., Rupprecht, D., Schmuck, C., Baumann, K., Ziebuhr, J. a Schirmeister, T. (2005) A new lead for nonpeptidic active-site-directed inhibitors of the severe acute respiratory syndrome coronavirus main protease discovered by a combination of screening and docking methods. *J Med Chem* 48(22), 6832-42.
 53. Kalbacova, M. (2003) Effects of Bcl-2 expression by vaccinia virus on cell metabolism and apoptosis. PhD. Thesis, 1st Medical Faculty Charles University.
 54. Kalbacova, M., Spisakova, M., Liskova, J. a Melkova, Z. (2008) Lytic infection with vaccinia virus activates caspases in a Bcl-2-inhibitable manner. *Virus Res* 135(1), 53-63.
 55. Kalbacova, M., Vrbacky, M., Drahota, Z. a Melkova, Z. (2003) Comparison of the effect of mitochondrial inhibitors on mitochondrial membrane potential in two different cell lines using flow cytometry and spectrofluorometry. *Cytometry A* 52(2), 110-6.
 56. Kalbacova, M., Vrbacky, M., Humlova, Z. a Melkova, Z. (2002) Protooncogene Bcl-2 induces apoptosis in several cell lines. *Folia Biol. (Praha)* 48(1), 15-27.
 57. Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N.E. a Poirier, G.G. (1993) Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase:
-

-
- an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* 53(17), 3976-85.
58. Kern, E.R., Hartline, C., Harden, E., Keith, K., Rodriguez, N., Beadle, J.R. a Hostetler, K.Y. (2002) Enhanced inhibition of orthopoxvirus replication in vitro by alkoxyalkyl esters of cidofovir and cyclic cidofovir. *Antimicrob Agents Chemother* 46(4), 991-5.
59. Kiemer, A.K., Muller, C. a Vollmar, A.M. (2002) Inhibition of LPS-induced nitric oxide and TNF-alpha production by alpha-lipoic acid in rat Kupffer cells and in RAW 264.7 murine macrophages. *Immunol Cell Biol* 80(6), 550-7.
60. Kotwal, G.J., Isaacs, S.N., McKenzie, R., Frank, M.M. a Moss, B. (1990) Inhibition of the complement cascade by the major secretory protein of vaccinia virus. *Science* 250(4982), 827-30.
61. Krecmerova, M., Holy, A., Pohl, R., Masojidkova, M., Andrei, G., Naesens, L., Neyts, J., Balzarini, J., De Clercq, E. a Snoeck, R. (2007) Ester prodrugs of cyclic 1-(S)-[3-hydroxy-2-(phosphonomethoxy)propyl]-5-azacytosine: synthesis and antiviral activity. *J Med Chem* 50(23), 5765-72.
62. Ku, N.O., Liao, J. a Omary, M.B. (1997) Apoptosis generates stable fragments of human type I keratins. *J Biol Chem* 272(52), 33197-203.
63. Kumar, S. (2007) Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ* 14(1), 32-43.
64. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259), 680-5.
65. Lee, S.B., Melkova, Z., Yan, W., Williams, B.R., Hovanessian, A.G. a Esteban, M. (1993) The interferon-induced double-stranded RNA-activated human p68 protein kinase potently inhibits protein synthesis in cultured cells. *Virology* 192(1), 380-5.
66. Lee, S.B., Rodriguez, D., Rodriguez, J.R. a Esteban, M. (1997) The apoptosis pathway triggered by the interferon-induced protein kinase PKR requires the third basic domain, initiates upstream of Bcl-2, and involves ICE-like proteases. *Virology* 231(1), 81-8.
-

-
67. Leist, M., Single, B., Castoldi, A.F., Kuhnle, S. a Nicotera, P. (1997) Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 185(8), 1481-6.
 68. Locker, J.K. a Griffiths, G. (1999) An unconventional role for cytoplasmic disulfide bonds in vaccinia virus proteins. *J. Cell. Biol.* 144(2), 267-79.
 69. Locker, J.K., Kuehn, A., Schleich, S., Rutter, G., Hohenberg, H., Wepf, R. a Griffiths, G. (2000) Entry of the two infectious forms of vaccinia virus at the plasma membrane is signaling-dependent for the IMV but not the EEV. *Mol Biol Cell* 11(7), 2497-511.
 70. Lu, C. a Bablanian, R. (1996) Characterization of small nontranslated polyadenylated RNAs in vaccinia virus-infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(5), 2037-42.
 71. McLennan, A.G. (2007) Decapitation: poxvirus makes RNA lose its head. *Trends Biochem Sci* 32(7), 297-9.
 72. Melkova, Z. a Esteban, M. (1994) Interferon-gamma severely inhibits DNA synthesis of vaccinia virus in a macrophage cell line. *Virology* 198(2), 731-5.
 73. Melkova, Z. a Esteban, M. (1995) Inhibition of vaccinia virus DNA replication by inducible expression of nitric oxide synthase. *J. Immunol.* 155(12), 5711-8.
 74. Melkova, Z., Lee, S.B., Rodriguez, D. a Esteban, M. (1997) Bcl-2 prevents nitric oxide-mediated apoptosis and poly(ADP-ribose) polymerase cleavage. *FEBS Lett.* 403(3), 273-8.
 75. Mercer, J. a Helenius, A. (2008) Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science* 320(5875), 531-5.
 76. Moini, H., Packer, L. a Saris, N.E. (2002) Antioxidant and prooxidant activities of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Toxicol Appl Pharmacol* 182(1), 84-90.
 77. Moss, B. (2006) Poxvirus entry and membrane fusion. *Virology* 344(1), 48-54.

-
78. Moss, B., Ahn, B.Y., Amegadzie, B., Gershon, P.D. a Keck, J.G. (1991) Cytoplasmic transcription system encoded by vaccinia virus. *J Biol Chem* 266(3), 1355-8.
 79. Naesens, L., Balzarini, J., Bischofberger, N. a De Clercq, E. (1996) Antiretroviral activity and pharmacokinetics in mice of oral bis(pivaloyloxymethyl)-9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine, the bis(pivaloyloxymethyl) ester prodrug of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine. *Antimicrob Agents Chemother* 40(1), 22-8.
 80. Nicotera, P. a Leist, M. (1997) Mitochondrial signals and energy requirement in cell death. *Cell Death Differ* 4(6), 516.
 81. O'Brien, V. (1998) Viruses and apoptosis. *J Gen Virol* 79 (Pt 8), 1833-45.
 82. Packer, L., Kraemer, K. a Rimbach, G. (2001) Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition* 17(10), 888-95.
 83. Packer, L., Witt, E.H. a Tritschler, H.J. (1995) alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic. Biol. Med.* 19(2), 227-50.
 84. Paez, E. a Esteban, M. (1984) Resistance of vaccinia virus to interferon is related to an interference phenomenon between the virus and the interferon system. *Virology* 134(1), 12-28.
 85. Pande, V. a Ramos, M.J. (2003) Nuclear factor kappa B: a potential target for anti-HIV chemotherapy. *Curr Med Chem* 10(16), 1603-15.
 86. Pastoret, P.P. a Vanderplasschen, A. (2003) Poxviruses as vaccine vectors. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 26(5-6), 343-55.
 87. Petersen Shay, K., Moreau, R.F., Smith, E.J. a Hagen, T.M. (2008) Is alpha-lipoic acid a scavenger of reactive oxygen species in vivo? Evidence for its initiation of stress signaling pathways that promote endogenous antioxidant capacity. *IUBMB Life* 60(6), 362-7.
 88. Pinton, P., Ferrari, D., Rapizzi, E., Di Virgilio, F., Pozzan, T. a Rizzuto, R. (2002) A role for calcium in Bcl-2 action? *Biochimie* 84(2-3), 195-201.
 89. Rahbar, R., Murooka, T.T., Hinek, A.A., Galligan, C.L., Sassano, A., Yu, C., Srivastava, K., Plataniias, L.C. a Fish, E.N. (2006) Vaccinia virus
-

-
- activation of CCR5 invokes tyrosine phosphorylation signaling events that support virus replication. *J Virol* 80(14), 7245-59.
90. Rao, R.V., Ellerby, H.M. a Bredesen, D.E. (2004) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death. Differ.* 11(4), 372-80.
 91. Reed, J.C. (1998) Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 17(25), 3225-36.
 92. Rice, A.P. a Roberts, B.E. (1983) Vaccinia virus induces cellular mRNA degradation. *J Virol* 47(3), 529-39.
 93. Rodriguez, J.F., Rodriguez, D., Rodriguez, J.R., McGowan, E.B. a Esteban, M. (1988) Expression of the firefly luciferase gene in vaccinia virus: a highly sensitive gene marker to follow virus dissemination in tissues of infected animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85(5), 1667-71.
 94. Rodriguez, J.F. a Smith, G.L. (1990) Inducible gene expression from vaccinia virus vectors. *Virology* 177(1), 239-50.
 95. Safrin, S., Cherrington, J. a Jaffe, H.S. (1997) Clinical uses of cidofovir. *Rev Med Virol* 7(3), 145-156.
 96. Sandvig, K. a van Deurs, B. (2008) Cell biology: Viruses in camouflage. *Nature* 453(7194), 466-7.
 97. Scorrano, L. a Korsmeyer, S.J. (2003) Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Biophys Res Commun* 304(3), 437-44.
 98. Seet, B.T., Johnston, J.B., Brunetti, C.R., Barrett, J.W., Everett, H., Cameron, C., Sypula, J., Nazarian, S.H., Lucas, A. a McFadden, G. (2003a) Poxviruses and immune evasion. *Annu Rev Immunol* 21, 377-423.
 99. Seet, B.T., McCaughan, C.A., Handel, T.M., Mercer, A., Brunetti, C., McFadden, G. a Fleming, S.B. (2003b) Analysis of an orf virus chemokine-binding protein: Shifting ligand specificities among a family of poxvirus viroceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(25), 15137-42.
 100. Senkevich, T.G., Koonin, E.V. a Buller, R.M. (1994) A poxvirus protein with a RING zinc finger motif is of crucial importance for virulence. *Virology* 198(1), 118-28.
-

-
101. Senkevich, T.G., Ojeda, S., Townsley, A., Nelson, G.E. a Moss, B. (2005) Poxvirus multiprotein entry-fusion complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102(51), 18572-7.
 102. Senkevich, T.G., White, C.L., Koonin, E.V. a Moss, B. (2002a) Complete pathway for protein disulfide bond formation encoded by poxviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99(10), 6667-72.
 103. Senkevich, T.G., White, C.L., Weisberg, A., Granek, J.A., Wolffe, E.J., Koonin, E.V. a Moss, B. (2002b) Expression of the vaccinia virus A2.5L redox protein is required for virion morphogenesis. *Virology* 300(2), 296-303.
 104. Senkevich, T.G., Wolffe, E.J. a Buller, R.M. (1995) Ectromelia virus RING finger protein is localized in virus factories and is required for virus replication in macrophages. *J Virol* 69(7), 4103-11.
 105. Sharp, T.V., Moonan, F., Romashko, A., Joshi, B., Barber, G.N. a Jagus, R. (1998) The vaccinia virus E3L gene product interacts with both the regulatory and the substrate binding regions of PKR: implications for PKR autoregulation. *Virology* 250(2), 302-15.
 106. Shisler, J.L., Isaacs, S.N. a Moss, B. (1999) Vaccinia virus serpin-1 deletion mutant exhibits a host range defect characterized by low levels of intermediate and late mRNAs. *Virology* 262(2), 298-311.
 107. Schepis, A., Schramm, B., de Haan, C.A. a Locker, J.K. (2006) Vaccinia virus-induced microtubule-dependent cellular rearrangements. *Traffic* 7(3), 308-23.
 108. Schmidtayerova, H., Alfano, M., Nuovo, G. a Bukrinsky, M. (1998) Human immunodeficiency virus type 1 T-lymphotropic strains enter macrophages via a CD4- and CXCR4-mediated pathway: replication is restricted at a postentry level. *J. Virol.* 72(6), 4633-42.
 109. Schramm, B. a Locker, J.K. (2005) Cytoplasmic organization of POXvirus DNA replication. *Traffic* 6(10), 839-46.
 110. Sliva, K. a Schnierle, B. (2007) From actually toxic to highly specific--novel drugs against poxviruses. *Virol. J.* 4, 8.
-

-
111. Smith, G.L., Symons, J.A. a Alcami, A. (1999) Immune modulation by proteins secreted from cells infected by vaccinia virus. *Arch Virol Suppl* 15, 111-29.
 112. Sodeik, B., Griffiths, G., Ericsson, M., Moss, B. a Doms, R.W. (1994) Assembly of vaccinia virus: effects of rifampin on the intracellular distribution of viral protein p65. *J Virol* 68(2), 1103-14.
 113. Spisakova, M., Cizek, Z. a Melkova, Z. (2009) Ethacrynic and alpha-lipoic acids inhibit vaccinia virus late gene expression. *Antiviral Res* 81(2), 156-65.
 114. Stewart, T.L., Wasilenko, S.T. a Barry, M. (2005) Vaccinia virus F1L protein is a tail-anchored protein that functions at the mitochondria to inhibit apoptosis. *J. Virol.* 79(2), 1084-98.
 115. Stroh, C. a Schulze-Osthoff, K. (1998) Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates. *Cell Death Differ.* 5(12), 997-1000.
 116. Su, H.P., Lin, D.Y. a Garboczi, D.N. (2006) The structure of G4, the poxvirus disulfide oxidoreductase essential for virus maturation and infectivity. *J Virol* 80(15), 7706-13.
 117. Taylor, J.M. a Barry, M. (2006) Near death experiences: poxvirus regulation of apoptotic death. *Virology* 344(1), 139-50.
 118. Tegnell, A., Wahren, B. a Elgh, F. (2002) Smallpox--eradicated, but a growing terror threat. *Clin Microbiol Infect* 8(8), 504-9.
 119. Tew, K.D., Dutta, S. a Schultz, M. (1997) Inhibitors of glutathione S-transferases as therapeutic agents. *Adv Drug Deliv Rev* 26(2-3), 91-104.
 120. Turner, P.C. a Moyer, R.W. (1995) Orthopoxvirus fusion inhibitor glycoprotein SPI-3 (open reading frame K2L) contains motifs characteristic of serine proteinase inhibitors that are not required for control of cell fusion. *J Virol* 69(10), 5978-87.
 121. Vandenabeele, P., Orrenius, S. a Zhivotovsky, B. (2005) Serine proteases and calpains fulfill important supporting roles in the apoptotic tragedy of the cellular opera. *Cell Death Differ.* 12(9), 1219-24.
-

-
122. Vanderplasschen, A., Hollinshead, M. a Smith, G.L. (1997) Antibodies against vaccinia virus do not neutralize extracellular enveloped virus but prevent virus release from infected cells and comet formation. *J Gen Virol* 78 (Pt 8), 2041-8.
 123. Virag, L. a Szabo, C. (2002) The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* 54(3), 375-429.
 124. Virology, F. (2001) *Fields Virology*, edited by D. Knipe, M. a P. Howley, M. Lippincott Williams & Wilkins.
 125. Vrbacky, M. (2005) Bcl-2 oncoprotein and its effects on mitochondrial metabolism and cell death. PhD. Thesis, 1st Medical Faculty Charles University.
 126. Vrbacky, M., Krijt, J., Drahota, Z. a Melkova, Z. (2003) Inhibitory effects of Bcl-2 on mitochondrial respiration. *Physiol. Res.* 52(5), 545-54.
 127. Wasilenko, S.T., Stewart, T.L., Meyers, A.F. a Barry, M. (2003) Vaccinia virus encodes a previously uncharacterized mitochondrial-associated inhibitor of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100(24), 14345-50.
 128. Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B. a Korsmeyer, S.J. (2001) Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292(5517), 727-30.
 129. WHO. (1980) *Wkly. Epidem. Rep. - Releve Epidem. Hebd. WHO.* 55. May 16, 1980.

8. Prílohy - Publikácie

- Spisakova, M., Cizek, Z. a Melkova, Z. (2009) Ethacrynic and alpha-lipoic acids inhibit vaccinia virus late gene expression. Antiviral Res 81(2), 156-65.
IF: 3.613

- Kalbacova, M., Spisakova, M., Liskova, J., Melkova, Z., 2008. Lytic infection with vaccinia virus activates caspases in a Bcl-2-inhibitable manner. Virus Res. 135, 53-63.
IF: 2.429