

Univerzita Karlova v Praze
1. lékařská fakulta

Autoreferát dizertační práce



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

Mgr. Martina Spišáková

Praha 2010

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Buněčná a molekulární biologie, genetika a virologie

Předseda oborové rady: Prof. RNDr. Stanislav Zadražil, DrSc.

Školící pracoviště: Ústav imunologie a mikrobiologie 1.LF UK

Autor: Mgr. Martina Spišáková

Školitel: MUDr. Zora Mělková, PhD.

Oponenti:.....

.....

.....

Autoreferát byl rozeslán dne

Obhajoba se koná dne.....vhod.

kde

S dizertací je možno se před obhajobou seznámit na oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky děkanátu 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Obsah

Obsah.....	3
Súhrn	4
Summary	5
1. Úvod	5
2. Ciele a hypotézy	14
3. Materiál a metódy	14
5. Diskusia	27
6. Závery.....	32
7. Referencie	33
8. Publikácie	38

Súhrn

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 líniách 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.

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.

1. Úvod

1.1 Vírus vakcínie

Vírus vakcínie (VACV) je typickým zástupcom poxvírusov. Genóm VACV pozostáva z jednej molekuly dsDNA o veľkosti približne 195 kb, ktorá kóduje asi 200 proteínov. Replikácia VACV prebieha v cytoplazme hostiteľskej bunky.

Vďaka jeho vlastnostiam ako sú vysoká stabilita, jednoduchá a nenákladná príprava, schopnosť indukovať dlhodobú protilátkovú aj bunkovú imunitnú odpoveď a možnosť integrovať veľké časti DNA, je VACV úspešne používaný ako vektor a súčasť niekoľkých rekombinantných vakcín. Rovnako tiež, poskytuje možnosť pre štúdium interakcií s hostiteľskou bunkou (Condit a Niles, 2002; Pastoret a Vanderplassen, 2003). VACV bol úspešne používaný počas celosvetovej eradikačnej kampane pravých kiahní (smallpox (Buller a Palumbo, 1991).

VACV je morfológicky jeden z najväčších vírusov. Tvorí dve infekčné formy, vnútrobunkový zrelý virión (IMV) a extracelulárny obalený virión (EEV; (Schepis et al., 2006). Po vstupe do bunky je z viriónu uvoľňované jadro. Takmer okamžite po vstupe začína transkripcia asi 100 rôznych molekúl skoréj mRNA pomocou transkripčného mechanizmu obsiahnutého vo virióne. Skoré mRNA sú potom uvoľňované do cytoplazmy a prebieha syntéza vírusových proteínov (Schramm a Locker, 2005). Replikácia vírusovej DNA je nezávislá na jadre hostiteľskej bunky a prebieha v častiach cytoplazmy nazvaných virozómy alebo vírusové továrne (viral factories). Po replikácii DNA dochádza k syntéze mRNA z intermediárnych génov (Baldick a Moss, 1993). Následne sú exprimované neskoré gény VACV. Niektoré z neskorých

proteínov sú glykozylované, fosforylované alebo štiepené pred, alebo počas ich skladania do vírusových častíc (Buller a Palumbo, 1991). Skladanie vírusových častíc je komplexné. Postupne sú štruktúrne proteíny, enzýmy a vírusová DNA obklopané nezrelými membránovými časticami vírusu. Následne sú virióny transportované z cytoplazmy.

1.2 Vplyv infekcie vírusom vakcínie na metabolizmus hostiteľskej bunky

VACV, ako typický poxvírus, má cytopatický efekt na hostiteľské bunky, charakteristický podľa typu hostiteľskej bunky.

Infekcia VACV má významný vplyv na metabolizmus hostiteľskej bunky. Hostiteľská DNA je hydrolyzovaná endonukleázou prítomnou vo virióne a jej syntéza je zainhibovaná krátko po vstupe vírusu do bunky. Syntéza a procesing hostiteľskej RNA sú tiež zainhibované, ale k tomu dochádza až po syntéze vírusových proteínov. Polčasy hostiteľských aj vírusových RNA sú kratšie počas infekcie VACV. Samotný VACV tiež viacerými mechanizmami inhibuje syntézu hostiteľských proteínov. Miera tejto inhibície závisí na type infikovaných buniek a multiplicity infekcie (Buller a Palumbo, 1991). Naopak, infekcia VACV je tiež ovplyvňovaná metabolizmom hostiteľskej bunky (Vrbacky et al., 2003).

1.3 Interakcia vírusu s obranným systémom hostiteľskej bunky

Poxvírusy patria vďaka viacerým mechanizmom, ktorými odolávajú a prekonávajú obranu hostiteľskej bunky, medzi úspešné patogény.

VACV si vyvinul stratégiu proti komplementovému systému hostiteľskej bunky. VCP (proteín kontrolujúci komplement kódovaný VACV) je 35-kDa proteín produkovaný bunkami infikovanými VACV, ktorý inhibuje aktiváciu klasickej dráhy komplementu (Girgis et al., 2008; Kotwal et al., 1990). Tvorbou homológov receptorov interferónov (IFN) prekonávajú poxvírusy IFN systém hostiteľskej bunky. Tieto receptory sú druhovo špecifické. VACV exprimuje B8R viažuci ľudské a krysie, ale nie myšacie IFN γ , a B18R viažuci IFN α/β viacerých druhov (Alcami a Smith, 1995). Navyše, VACV tiež pôsobí počas efektórovej časti IFN-sprostredkovaných obranných mechanizmov (napr. inhibítory kódované E3L a K3L génmi VACV (Johnston a McFadden, 2003).

Proteíny VACV podobne ovplyvňujú aj ďalšie časti IFN dráh. H1L gén VACV exprimuje fosfatázu, ktorá inhibuje IFN-indukovanú aktiváciu transkripčného faktora STAT-1. Produkty VACV génov A46R a A52R obsahujú domény homológne s receptorom Toll-like/IL-1, ktoré umožňujú prerušiť signálnu dráhu IL-1 a inhibovať aktiváciu NF- κ B (Johnston a McFadden, 2003).

1.4 Apoptóza

Programovaná bunková smrť, apoptóza, hraje dôležitú úlohu v eliminácii infikovaných buniek. Infikované bunky sú kontrolované dvoma mechanizmami vedúcimi k apoptóze.

Prvý mechanizmus je prezentácia vírusových proteínov na povrchu infikovaných buniek v komplexe s histokompatibilnými antigénmi. Komplex je potom rozpoznávaný cytotoxickými T-lymfocytmi, ktoré indukujú apoptózu infikovaných buniek. Druhý mechanizmus je spojený s kontrolou vírusovej infekcie samotnou infikovanou bunkou. Bunka rozpozná vírusom indukovanú aktiváciu proteínov bunkového cyklu a spustí proces apoptózy cez proteín p53 (O'Brien, 1998).

Zásadným dejom počas apoptózy je štiepenie a aktivácia kaspáz, cysteínových proteáz (Kumar, 2007). Kaspázy sú zapojené do iniciačnej aj efektórovej fázy apoptózy (kaspázy 8, 9, 10 a kaspázy 3, 6, 7). Výsledkom pôsobenia efektórových kaspáz je štiepenie viacerých bunkových proteínov, ktoré vedie k bunkovej smrti. Kaspázy, resp. štiepenie ich substátov, regulujú zásadné morfológické zmeny počas apoptózy (Fischer et al., 2003).

Apoptóza môže byť spustená prostredníctvom extracelulárnych alebo intracelulárnych signálov. Dráha spustená extracelulárnymi receptormi je aktivovaná väzbou ligandu na jemu prislúchajúci receptor bunkovej smrti. Po väzbe dochádza k prenosu signálu prostredníctvom adaptérových proteínov a následne je aktivovaná kaspáza 8. Aktívna kaspáza 8 môže aktivovať efektórovú kaspázu 3 a to priamo alebo prostredníctvom proteínu Bid a mitochondrií (Danial a Korsmeyer, 2004).

Intracelulárna apoptotická dráha je spúšťaná stresovými signálmi vo vnútri bunky, ktoré vedú k narušeniu funkcie mitochondrií a uvoľňovaniu cytochrómu c a/alebo faktora indukujúceho apoptózu (AIF). Uvoľnenie cytochrómu c vedie prostredníctvom jeho interakcie s adaptérovou molekulou

Apaf-1 k aktivácii kaspázy 9 v apoptozóme a následnej aktivácii efektórových kaspáz (Ghobrial et al., 2005).

Tretia, nedávno 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, čo vedie k aktivácii kaspázy 9 (Rao et al., 2004).

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 (Green a Kroemer, 2004). Uvoľňovanie týchto faktorov z mitochondrií je prísne regulované proteínmi z rodiny Bcl-2.

Poxvírusy vyvinuli viaceré mechanizmy ako priamo alebo nepriamo interferovať s procesmi apoptózy. Kódujú prvý popísaný inhibítor kaspáz, CrmA (Taylor a Barry, 2006). Tento proteín, známy tiež ako SPI-2 (serin protease inhibitor 2), inhibuje kaspázy 1 a 8. Jeho homológ, SPI-1, bráni apoptóze väzbou na katepsín G (Guo et al., 2005; Shisler et al., 1999). Medzi niekoľko ďalších proteínov, ktoré sú kódované VACV a inhibujú apoptózu patrí F1L, ktorý je jedinečný pre svoju schopnosť inhibovať znižovanie $\Delta\Psi_m$ a uvoľňovanie cytochrómu c z mitochondrií. Možný mechanizmus jeho antiapoptotického pôsobenia je interakcia s BH3-proteínmi rodiny Bcl-2 (Stewart et al., 2005; Wasilenko et al., 2003).

1.5 Redoxný systém kódovaný vírusom vakcínie

Niektoré proteíny obsiahnuté vo viriónoch VACV majú vo svojich doménach stabilné disulfidové väzby. Tvorba týchto disulfidových väzieb prebieha v cytoplazme hostiteľskej bunky vírusom-kódovanou dráhou. Dôležitosť tejto dráhy pre

úspešnú vírusovú infekciu bola ukázaná znefunkčnením ktoréhokolvek z troch proteínov dráhy, čo malo za následok zamedzenie tvorby vírusových častíc (Senkevich et al., 2002a; Su et al., 2006).

1.6 Vírus pravých kiahní (Smallpox) – možné zneužitie

Prvé pokusy o ochranu pred pravými kiahňami pochádzajú zo starého Egypta. V 18. storočí Edward Jenner zaviedol vakcináciu (Lat. vacca = krava) spočívajúcu v inokulácii materiálu získaného z lézií vzniknutých po infekcii vírusom cowpox ako prevenciu pred pravými kiahňami. VACV sa stal neoddeliteľnou súčasťou vakcín proti pravým kiahňam až na konci 19. storočia. Vakcinácia s rôznymi kmeňmi VACV umožnila eradikáciu pravých kiahní do roku 1980 (WHO, 1980). Odvtedy je očkovanie celkovej populácie pozastavené.

Avšak, v posledných rokoch vyvstala hrozba potenciálneho zneužitia vírusu pravých kiahní ako biologickej zbrane. Dopad na dnešnú populáciu by bol, vzhľadom na pozastavené očkovanie, vysokú prenosnosť a úmrtnosť, viac katastrofálny ako v minulom storočí. Na druhej strane, očkovanie VACV je spojené s vyššou pravdepodobnosťou vedľajších účinkov ako ktorákoľvek iná imunizácia a navyše, tieto efekty sú 10-násobne pravdepodobnejšie u prvoočkovaných.

Okrem hrozby zneužitia poxvírusov ako biologickej zbrane, vystupuje do popredia hrozba z prirodzeného prostredia, a to od vírusu monkeypox, ktorý spôsobuje u ľudí ochorenie podobné pravým kiahňam.

1.7 Post-vakcinačné komplikácie spôsobené vírusom vakcínie

Post-vakcinačné komplikácie spôsobené VACV sú hlavne spôsobené nadmerným množením VACV v mieste vakcinácie alebo v ďalších častiach tela.

Najčastejšou komplikáciou je náhodná infekcia iných častí kože kvôli rozšíreniu vírusu z miesta očkovania. Generalizovaná vakcínia, stav kedy sa vírus šíri krvou a vyrážky sa objavujú náhodne na navzájom izolovaných častiach tela, je menej častá a zvyčajne bez ďalších komplikácií. Obidva spôsoby šírenia vírusu môžu mať závažné následky pre ľudí s poruchami imunity. K vážnym komplikáciám po očkovaní dochádza hlavne u osôb s poruchami prirodzenej alebo špecifickej imunity. Môže dôjsť k eczema vaccinatum, progresívnej vakcínii alebo post-vakcinačnej encefalitíde. Medzi ďalšie komplikácie patria fetálna vakcínia, kožný erytém, myoperikarditída a bakteriálne superinfekcie (Bray, 2003; Fulginiti, 2003).

1.8 Terapia postvakcinačných komplikácií spôsobených vírusom vakcínie

Do 50. rokov 20. storočia, kedy boli zavedené VACV imunoglobulín (VIG) a tiosemikarbazónové deriváty, nebola dostupná žiadna špecifická terapia na postvakcinačné komplikácie spojené s očkovaním VACV. 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. Do skupiny nukleozidových analógov patrí tiež jediná látka schválená FDA USA na liečbu postvakcinačných reakcií po VACV vakcína, cidofovir

(Vistide[®], HPMPC), ktorý bol objavený prof. Holým (De Clercq et al., 1986). Nevýhodou tohto preparátu je jeho intravenózna aplikácia a nefrotoxicita (Safrin et al., 1997). Jedinečná antivírusová aktivita cidofoviru však viedla k vývoju jeho formy pre orálne podanie, CMX001 (Sliva a Schnierle, 2007) a ďalších derivátov (Krecmerova et al., 2007).

V posledných troch rokoch bola objavená skupina anti-poxvírusových látok, ktoré redukovujú šírenie vírusovej infekcie: Gleevec (STI-571, Glivec) a ST-246 (Sliva a Schnierle, 2007).

1.9 Látky reagujúce s tiolovými skupinami

Časť tejto práce je zameraná na inhibičné efekty látok reagujúcich s tiolovými skupinami na rast a replikáciu VACV, zvlášť kyseliny lipoovej (LA). Kyselina lípová (LA) je disulfidový derivát kyseliny októrovej (kaprylovej), ktorý v oxidovanej forme tvorí intramolekulovú disulfidovú väzbu. Pravdepodobným miestom jej syntézy a funkcie sú mitochondrie (Bilska a Wlodek, 2005).

Zvýšený záujem o túto látku v súčasnej medicíne vyplýva z jej unikátnej redukčnej schopnosti. Redukovaná LA sa 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).

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

Bolo ukázané, že LA inhibuje replikáciu HIV zainhibovaním aktivácie NFκB v bunkových kultúrach (Pande a Ramos, 2003).

2. Ciele a hypotézy

V tejto práci sme sa zamerali hlbšie objasnenie skôr opublikovaných výsledkov týkajúcich sa aktivácie kaspáz počas infekcie VACV a na efekty redox-modulujúcich látok na infekciu VACV.

Konkrétne ciele práce:

1. Sledovanie štiepenia substrátov proteáz počas infekcie VACV.
2. Vplyv inhibície aktivity kaspáz a PARP na infekciu VACV.
3. Príprava bunkových línií indukovateľne exprimujúcich Bcl-2 a sledovanie efektu expresie Bcl-2.
4. Charakterizácia efektu redox-modulujúcich látok, zvlášť kyseliny lipoovej, na infekciu VACV.

3. Materiál a metódy

Chemikálie. Všetky použité kultivačné médiá a rastové doplnky boli od firiem Invitrogen, Gibco alebo PAA Laboratories. Ďalšie chemikálie boli od firiem Sigma, Fluka, Promega, R&D Systems, Applied Biosystems a Molecular Probes.

Bunkové línie. Nasledujúce bunkové línie boli použité v experimentoch: ľudská epitelová línia HeLa-G, obličková línia mačička zeleného BSC-40, myšacia fibroblastová línia L929, myšacia monocytovo/makrofágová línia J774.G8 a ľudská línia Jurkat.

Príprava a skrining stabilne transfekovaných bunkových línií. Stabilne transfekované bunkové línie boli pripravené podľa protokolu výrobcu transfekčného systému Tet-On. Ako transfekčné činidlo bol použitý Superfect (Qiagen). Stabilne transfekované bunkové línie boli selektované v prítomnosti G.418 a hygromycínu. Transfekované bunky boli skrínované pomocou stanovenia luciferázovej aktivity po transientej transfekcii reportérového plazmidu alebo pomocou western blotu.

Vírusy. Wild-type VACV (WT-VACV), kmeň Western Reserve (WR; ATCC VR-119) a rekombinantný VACV exprimujúci chloramfenikol acetyltransferázu (CAT), Bcl-2, PKR, inducibilnú NO-syntetázu (iNOS) a luciferázu (Luc) boli použité v experimentoch.

Prietoková cytometria. Na analýzy prietokovou cytometriou bol použitý prietokový cytometer FACScan (Beckton Dickinson). Analýza nameraných údajov bola urobená s pomocou softvéru WinMDI v2.8.

Fluorescenčná mikroskopia. Kultivované bunky boli sledované priamo na kultivačných platniach za pomoci inverzného fluorescenčného mikroskopu Olympus IX-70.

Western blot. SDS-PAGE a Western blotting boli robené podľa publikovaných protokolov (Ausubel et al., 2002; Harlow a Lane, 1988; Laemmli, 1970).

Izolácia DNA a real-time PCR. Na real-time PCR analýzu boli bunky pripravené podľa publikovaného protokolu (Schmidtmayerova et al., 1998). Vírusová DNA bola kvantifikovaná pomocou Applied Biosystems 7300 Real-time PCR systému. Primery a sondy boli pripravené Applied Biosystems ako Custom TaqMan® Gene Expression Assay. Set primerov a sonda boli navrhnuté proti koncovej časti

genómu VACV. Výsledky boli analyzované Sequence Detection Softwérom (Applied Biosystems).

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. Lýtický charakter bunkovej smrti v bunkách infikovaných vírusom vakcínie

VACV spôsobuje vo väčšine infikovaných buniek lýzu, ekvivalent nekrózy. Bcl-2 exprimovaný VACV má dva protichodné účinky, ktoré už boli v minulosti viackrát popísané: má typický anti-apoptotický efekt v bunkách HeLa G, zatiaľ čo indukuje apoptózu v bunkách BSC-40 (Kalbacova et al., 2008; Kalbacova et al., 2003; Melkova et al., 1997; Vrbacky et al., 2003). Tieto výsledky boli rovnako potvrdené aj v tejto práci (Kalbacova et. al. 2008).

4.2. Aktivita kaspáz počas lýtickej infekcie vírusom vakcínie

V bunkách HeLa G a BSC-40 infikovaných VACV bola prietokovou cytometriou pozorovaná aktivácia a/aktivita kaspáz (Kalbacova et al., 2008; Kalbacova et al., 2003).

Vzhľadom na to, že tieto 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.

Na základe našich výsledkov môžeme zhrnúť, že indukcia apoptózy ionomycínom a staurosporínom viedla k významne zvýšenej aktivácii/aktivite kaspáz. Miera aktivácie a aktivity kaspáz v tomto neinfekčnom usporiadaní je porovnateľná s mierou v bunkách infikovaných VACV (Kalbacova et al., 2008).

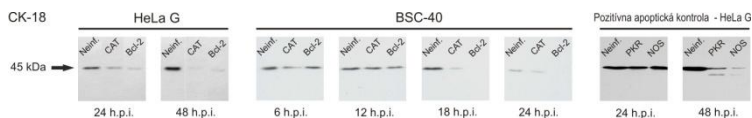
4.3. Štiepenie substrátov kaspáz počas infekcie vírusom vakcínie

Pre doplnenie meraní prietokovou cytometriou, rozhodli sme sa charakterizovať aktivitu kaspáz analýzou štiepenia substrátov kaspáz pomocou western blotu.

4.3.1. Cytokeratín 18

Najskôr sme analyzovali štiepenie cytokeratínu 18. Zjavný pokles hladín neštiepeného cytokeratínu 18 bol pozorovaný v bunkách HeLa G a BSC-40 infikovaných VACV (Obr. 1).

Môžeme uzavrieť, že infekcia oboma použitými rekombinantmi VACV viedla k poklesu hladín cytokeratínu 18 v oboch testovaných bunkových líniiach.

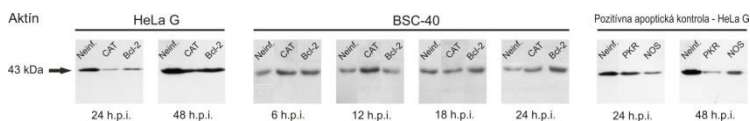


Obr. 1. Analýza štiepenia cytokeratínu 18 vo VACV infikovaných bunkách pomocou western blotu.

4.3.2. Aktín

Aktín, jedna zo súčastí cytoskeletu bunky, je tiež substrátom kaspáz. Jeho štiepená forma prispieva k apoptotickým zmenám morfológie buniek (Chang a Yang, 2000; Stroh a Schulze-Osthoﬀ, 1998).

Infekcia s obidvoma použitými rekombinantmi VACV viedla k poklesu hladín aktínu v bunkách HeLa G v 24 h.p.i. (hodinách od infekcie). Infekcia VACV nevedla k žiadnym zmenám v hladinách aktínu v bunkách BSC-40 (Obr. 2).



Obr. 2. Analýza štiepenia aktínu vo VACV infikovaných bunkách pomocou western blotu.

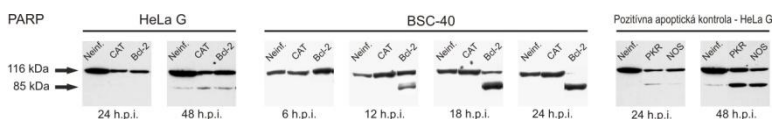
4.3.3. PARP

Ďalej sme tiež analyzovali štiepenie proteínu PARP (poly-(ADP-ribózo) polymeráza), typického substrátu kaspáz. PARP je počas apoptózy inaktívovaný štiepením na 85 kDa fragment (Kaufmann et al., 1993).

Žiadne významné štiepenie PARP vo VACV-infikovaných bunkách HeLa G v porovnaní s neinfikovanými kontrolami sme nezaznamenali (Obr. 3). Podobne, PARP nebol štiepený ani v neinfikovaných a VACV-CAT infikovaných bunkách BSC-40. Naopak, 85 kDa fragment PARP bol pozorovaný v bunkách BSC-40 infikovaných VACV-Bcl-2.

Tento výsledok korešponduje s apoptotickou morfológiou týchto buniek od 12 h.p.i.

Získané výsledky ukazujú, že štiepenie PARP typické pre apoptotické bunky bolo pozorované len u tých buniek infikovaných VACV, ktoré vykazujú morfológické známky apoptózy.

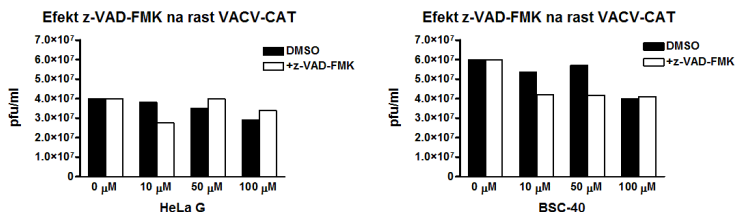


Obr. 3. Analýza štiepenia PARP vo VACV infikovaných bunkách pomocou western blotu.

4.4. Vplyv inhibície kaspáz na infekciu vírusom vakcínie

Na základe predchádzajúcich výsledkov sa zdá, že kaspázy zohrávajú určitú úlohu počas rastového cyklu VACV. Rozhodli sme sa teda sledovať efekt pôsobenia inhibície kaspáz na infekciu VACV.

Obr. 4 ukazuje, že pridanie širokospektrálneho kaspázového inhibítora z-VAD-FMK nemá žiadny štatisticky významný vplyv na infekciu VACV v bunkách HeLa G ani BSC-40.



Obr. 4. Vplyv širokospektrálneho kaspázového inhibítora z-VAD-FMK na rast VACV.

Ďalšie analýzy štiepenia cytokeratínu 18 v prítomnosti z-VAD-FMK ukázali, že cytokeratín 18 je pravdepodobne štiepený inými proteázami ako kaspázy.

4.5. Vplyv inhibície aktivity PARP na infekciu vírusom vakcínie

Na základe predchádzajúcich výsledkov môžeme uvažovať o možnosti, že počas infekcie VACV dochádza k zmene v prebiehajúcej bunkovej smrti. Začínajúca apoptóza, o ktorej svedčí aktivácia kaspáz, sa, zdá sa, mení a pokračuje ako nekróza. Je možné, že k zmene dochádza v dôsledku zníženia dostupných energetických zdrojov. 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 nekrózu. 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, je pravdepodobne aktívny. Jeho farmakologické zainhibovanie by mohlo mať teda za následok uchovanie ATP, a tým aj možnosť bunkovej smrti

apoptózou. Na zablokovanie aktivity PARP sme zvolili jeho účinný inhibítor PJ 34.

V bunkách s pridaným inhibítorom sme nepozorovali žiadne zmeny v štiepení PARP. Naopak, pozorovali sme štiepenie cytokeratínu 18 v bunkách HeLa G infikovaných VACV s pridaným PJ 34. Keďže infekcia VACV indukuje znižovanie $\Delta\Psi_m$ a/alebo znižovanie celkových hladín ATP, analyzovali sme tiež zmeny funkcie mitochondrií v prítomnosti PJ 34. Avšak, pridanie inhibítora aktivácie PARP počas infekcie VACV nemalo významný vplyv na zmeny $\Delta\Psi_m$ indukované VACV.

Súhrnne, neukázali sme žiadny významný vplyv inhibície aktivácie PARP na infekciu VACV a typ bunkovej smrti. Antiapoptotické mechanizmy kódované VACV pravdepodobne ovplyvňujú bunkovú smrť hostiteľskej bunky viac a ich úloha je významnejšia ako vplyv PJ 34.

4.6. Stabilne transfekované bunkové línie

Unikátna pro-apoptotická aktivita protoonkogénu Bcl-2 exprimovaného VACV (Kalbacova et al., 2008; Kalbacova et al., 2002) môže byť daná proteínom samotným a jeho chovaním v špecifickom bunkovom prostredí, rovnako ako aj expresným systémom. Pokúsili sme sa preto objasniť chovanie Bcl-2 za využitia expresie tohto proteínu iným expresným systémom ako VACV. Zvolili sme expresný systém Tet-On, ktorý by mal mať vysokú mieru expresie v porovnaní s bazálnou expresiou a koncentračne závislú reguláciu expresie.

4.6.1. Vplyv inducibilnej expsie Bcl-2 na bunky BSC-40 infikované vírusom vakcínie

Pripravili sme stabilne transfekovanú bunkovú líniu BSC-40 exprimujúcu Bcl-2 pod inducibilným promotorm Tet-On. Indukcia Bcl-2 však nevedla k žiadnym významným morfológickým zmenám v stabilne transfekovanej bunkovej línii BSC-40 a bunky vykazovali typickú morfológiu buniek BSC-40.

Analyzovali sme tiež vplyv expsie Bcl-2 na infekciu VACV. Analýza integrity plazmatickej membrány prietokovou cytometriou ukázala zmeny typické pre lýtickú infekciu VACV. Avšak, žiadne významné zmeny spôsobené inducibilnou expresiou Bcl-2 systémom Tet-On sme nepozorovali. Podobne sme nezaznamenali žiadne zmeny v $\Delta\Psi_m$ po inducibilnej expresii Bcl-2.

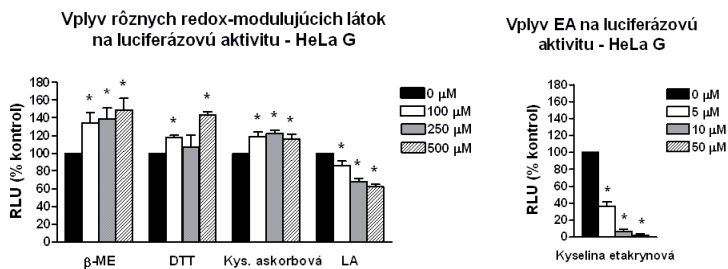
Na základe našich výsledkov môžeme uzavrieť, že v našom experimentálnom usporiadaní a s mierou expsie dosiahnutou expresným systémom Tet-On, nemala expresia Bcl-2 žiadny významný efekt na morfológiu stabilne transfekovanej bunkovej línie BSC-40 ani na infekciu VACV.

4.7. Vplyv redox-modulujúcich látok na infekciu vírusom vakcínie

Štruktúra VACV je závislá na disulfidických väzbách vznikajúcich počas morfogenézy 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 infekciu VACV.

4.7.1. Vplyv rôznych redox-modulujúcich látok na infekciu vírusom vakcínie

V našich experimentoch sme analyzovali efekt piatich rôznych redox-modulujúcich látok (β -merkaptetoetanol, DTT, kyselina askorbová, LA a kyselina etakrynová) na infekciu VACV (Spisakova et al., 2009). Vplyv na rast VACV sme najskôr charakterizovali luciferázovou aktivitou v bunkách infikovaných rekombinantom VACV exprimujúcim luciferázu (Obr. 5). U troch testovaných látok - β -merkaptetoetanolu, DTT a kyseliny askorbovej, sme namerali štatisticky významné zvýšenie luciferázovej aktivity. Ďalšie dve analyzované látky, LA a kyselina etakrynová, mali naopak za následok štatisticky významné zníženie luciferázovej aktivity.



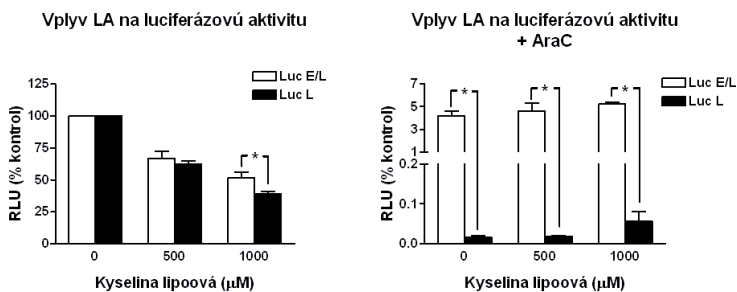
Obr. 5. Vplyv rôznych redox-modulujúcich látok na infekciu VACV.

Na základe zistených výsledkov sme sa rozhodli bližšie charakterizovať inhibičný efekt LA na infekciu VACV. V sérii experimentov s LA sme potvrdili jej inhibičný efekt na rast VACV v bunkových líniiach rôzneho pôvodu.

4.7.2. Vplyv kyseliny lipoovej na expresiu skorých a neskorých génov vírusu vakcínie

Najskôr sme charakterizovali v ktorej fáze rastového cyklu VACV k inhibícii LA dochádza. Na rozlíšenie vplyvu na syntézu skorých alebo neskorých génov VACV, boli použité rekombinanty VACV exprimujúce luciferázu pod dvoma rôznymi promotormi VACV (skorý/neskorý – VACV E/L a neskorý – VACV L). K vzorkám bol pridaný inhibítor DNA polymerázy, cytozín arabinozid (Ara C). Keďže Ara C inhibuje DNA syntézu VACV, nedochádza po jeho pridaní k expresii neskorých génov VACV. Preto sme mohli v prítomnosti Ara C odlišiť aktivitu luciferázy exprimovanej len pod skorým VACV promotocom.

Výsledky ukázali, že LA nemá inhibičný efekt na expresiu skorých génov VACV po zablokovaní expresie neskorých génov (Obr. 6).



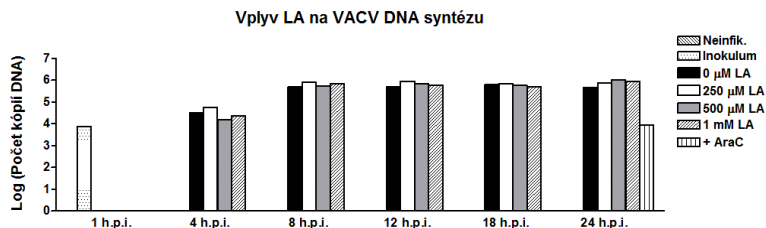
Obr. 6. Vplyv LA na expresiu skorých a neskorých génov VACV.

4.7.3. Vplyv kyseliny lipoovej na celkovú expresiu proteínov vírusu vakcínie

V ďalšom experimente sme western blotom analyzovali vplyv LA na celkovú expresiu VACV proteínov v bunkách HeLa G. Pridanie 250 a 500 μM LA nemalo viditeľný efekt na hladiny VACV proteínov v oboch použitých rekombinantoch. Po pôsobení 1 mM LA sme zaznamenali len mierne zníženie hladín proteínov. 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.

4.7.4. Vplyv kyseliny lipoovej na replikáciu DNA vírusu vakcínie

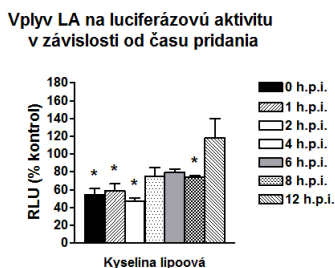
Vplyv LA na replikáciu VACV DNA sme analyzovali pomocou real-time PCR. Výsledky na Obr. 7 ukazujú, že LA nemá inhibičný vplyv na syntézu vírusovej DNA. Na základe toho sa dá predpokladať, že LA má efekt na procesy prebiehajúce ešte neskoršie počas rastového cyklu VACV, na úrovni expresie neskorých génov VACV alebo morfogénzy.



Obr. 7. Vplyv LA na DNA syntézu VACV.

4.7.5. Vplyv kyseliny lipoovej na infekciu vírusom vakcínie v závislosti od času pridania

Aby sme mohli potvrdiť efekt LA na jednotlivé časti rastového cyklu VACV, rozhodli sme sa ešte zanalyzovať závislosť vplyvu LA na čase pridania k infikovaným bunkám. Obr. 8 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. Keďže už replikácia DNA dovedy prebehla, výsledky podporujú predchádzajúce závery, že LA inhibuje rast VACV na úrovni expresie neskorých proteínov VACV.



Obr. 8. Vplyv LA na infekciu VACV v závislosti od času pridania.

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

5. Diskusia

5.1. Typ bunkovej smrti indukovaný infekciou vírusom vakcínie

VACV spôsobuje u väčšiny infikovaných buniek lýzu, ktorá je považovaná za ekvivalent nekrózy. Morfológia buniek v nami používaných epiteliálnych bunkových líniiach po infekcii VACV potvrdzuje nekrotický charakter bunkovej smrti. Výnimkou je apoptóza indukovaná po infekcii VACV-Bcl-2 v bunkách BSC-40. V tomto prípade ide ale o fenomén proapoptotického pôsobenia Bcl-2 exprimovaného VACV. Nekróza a apoptóza sa líšia viacerými morfológickým a biochemickými procesmi. Najviac charakteristicky počas apoptózy, na rozdiel od nekrózy, dochádza k aktivácii kaspáz. Moja kolegyňa, Marie Kalbáčová, zaznamenala aktiváciu kaspáz počas lýtickej infekcie VACV (Kalbacova et al., 2008). Vzhľadom na pozorované neočakávané aktivovanie kaspáz počas lýtickej infekcie, rozhodli sme sa ďalej analyzovať typ bunkovej smrti spôsobenej infekciou VACV.

Štiepenie špecifických substrátov kaspáz v bunkách infikovaných VACV bolo sledované pomocou western blotu. Naše výsledky potvrdili štiepenie cytokeratínu 18 počas lýtickej infekcie VACV v oboch testovaných bunkových líniiach, zatiaľ čo opačné výsledky boli pozorované u PARP. Nezaznamenali sme žiadne štiepenie PARP v žiadnej bunkovej línii infikovanej VACV. Preto môžeme predpokladať, že PARP je aktívny v týchto bunkách a prispieva k spotrebúvaniu bunkového ATP, čo vedie k nekróze infikovaných buniek. Avšak, dôvody prečo cytokeratín 18 je štiepený a PARP nie je počas infekcie VACV, ostávajú stále nevysvetlené.

Zdá sa teda, že apoptóza je aktivovaná počas infekcie VACV, ale nemôže byť dokončená a bunka umiera nekroticky. Možné vysvetlenie je iniciácia apoptotického programu infekciou VACV, ale neskôr je apoptóza inhibovaná rôznymi inhibítormi kaspáz a ďalšími proteínmi ovplyvňujúcimi apoptózu, ktoré sú kódované a exprimované VACV (Stewart et al., 2005; Taylor et al., 2006; Wasilenko et al., 2003). Infekcia VACV spôsobuje apoptózu v niektorých imunitných bunkách (makrofágy, dendritické bunky a B lymfocyty) (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 vírusom vakcínie

Podľa našich výsledkov sa zdá, že aktivácia kaspáz zohráva nejakú úlohu pri infekcii VACV, rozhodli sme sa teda sledovať vplyv prípadnej inhibície kaspáz na priebeh infekcie VACV. Avšak, získané výsledky potvrdili len okrajový efekt širokospektrálneho kaspázového inhibítora na rast VACV. V našich experimentoch sme ale zistili ešte výraznejšie zníženie hladín celkového cytokeratínu 18 po zainhibovaní kaspáz. Zdá sa teda, že cytokeratín 18 je v bunkách infikovaných VACV štiepený aj inými proteázami ako len kaspázami.

5.1.2. Vplyv inhibície PARP na bunkovú smrť indukovanú vírusom vakcínie

Dostupnosť intracelulárneho ATP je rozhodujúcim činiteľom o forme bunkovej smrti. Bolo ukázané, že pokiaľ bola hladina ATP redukovaná, výsledkom pôsobenia, inak typicky apoptotického stimulu, bola nekróza (Leist et al., 1997). Dôležitú úlohu v regulácii obsahu intracelulárneho ATP hraje PARP, ktorý je pravdepodobne aktivovaný poškodením DNA indukovaným VACV.

Naším cieľom bolo pomocou inhibítora PARP, PJ 34, zabrániť enzýmovej aktivite PARP a tým ušetriť energetické zdroje v bunke pre procesy apoptózy. Analýzou western blotom sme ale neukázali žiadne zmeny v hladinách PARP, alebo v jeho štiepení, v bunkách infikovaných VACV s pridaným inhibítorm PARP. Rovnako tiež neboli pozorované žiadne známky apoptózy. V realizovaných experimentoch je pravdepodobné, že aktivita PARP bola zainhibovaná, ale farmakologická inhibícia tohto jedného proteínu nestačila na zmenu formy bunkovej smrti. Príspevie rôznych inhibítorov apoptózy kódovaných VACV je pravdepodobne významnejšie ako vplyv inhibítora PARP.

5.2. Stabilne transfekované bunkové línie

Dôležitú úlohu pri prejave konkrétneho rekombinantného proteínu hraje aj interakcia VACV s hostiteľskou bunkou. Prejav proteínu Bcl-2 po expresii VACV sa líši podľa typu bunkovej línie a metabolizmu. Preto sme sa pre odlišenie efektov interakcie Bcl-2 a VACV od efektu odlišného bunkového prostredia rozhodli použiť iný expresný systém ako vírusový.

Po úspešnej príprave bunkovej línie BSC-40 inducibilne exprimujúcej Bcl-2 pod kontrolou promotora indukovateľného doxycyklínom sme chceli charakterizovať jeho efekt na procesy apoptózy. Naše pokusy nepotvrdili žiadny vplyv exprimovaného Bcl-2 na morfológiu buniek, zmeny metabolizmu ani infekciu VACV stabilne transfekovaných buniek. Avšak, bližšiu charakterizáciu vplyvu overexpresie Bcl-2 sme nemohli urobiť kvôli nízkym a vytrácajúcim sa hladinám exprimovaného Bcl-2. Vyššia expresia Bcl-2 bunkám BSC-40 pravdepodobne škodí, podobne ako to bolo s pozorovanou apoptózou v bunkách BSC-40 infikovaných VACV-Bcl-2.

Dôvod, prečo sme nepozorovali žiadny efekt Bcl-2 exprimovaného stabilne transfekovanou bunkovou líniou, môže byť nízka miera expresie v porovnaní s expresným systémom VACV. Preto by bolo vhodnejšie, na sledovanie efektov Bcl-2 nezávislých na VACV, použiť silnejší expresný systém, napr. adenovírusový.

5.3. Vplyv redox-modulujúcich látok na rast vírusu vakcínie

V poslednej časti práce sme sa zamerali na bližšie charakterizovanie efektov redox-modulujúcich látok, zvlášť LA, na infekciu VACV. Najskôr sme experimentálne stanovovali efekt piatich rôznych redox-modulujúcich látok, β -merkaptobetanolu, DTT, kyseliny askorbovej, LA a kyseliny etakrynovej na infekciu VACV. Inhibičný efekt na infekciu VACV sme zaznamenali len po pôsobení LA a EA. Účinok bol koncentračne závislý, účinné koncentrácie sa u LA pohybovali v stovkách mikromolov. Mechanizmom inhibičného efektu sprostredkovaného LA je možno vplyv na tvorbu disulfidových väzieb a/alebo reakcia so zložkami

ovplyvňujúcimi redox prostredie v bunke. LA má jednak vplyv na redox závislé proteíny VACV a jednak na redox prostredie v bunke a to reakciou s antioxidantmi. Morfogenéza VACV je závislá na redoxnej dráhe kódovanej VACV, ktorá pozostáva z postupnej tvorby disulfidických väzieb. Vyraďenie ktoréhokoľvek z troch kľúčových proteínov VACV z funkcie má za následok pozastavenie správnej maturácie vírusových častíc (Su et al., 2006).

K inhibícii indukovanej LA môže tiež dochádzať inhibíciou aktivácie NF- κ B znižovaním hladín voľných kyslíkových radikálov. Musíme ale podotknúť, že už VACV samotný inhibuje aktiváciu NF- κ B a jeho presun do jadra (Graham et al., 2008).

V našich experimentoch sme potvrdili inhibičný efekt LA v bunkových líniiach rôzneho pôvodu. Tiež sme MTT ukázali, že účinné koncentrácie LA nemajú toxický účinok v testovaných bunkových líniiach. IC₅₀ LA stanovené pre titer VACV boli v rozmedzí 200-500 μ M. Publikované hodnoty IC₅₀ cidofoviru pre VACV sú 9,8 μ M pre ľudské embryonálne fibroblasty a 54 - 62 μ M pre Vero bunky. 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 opísať nový inhibičný efekt LA na rast VACV a bližšie charakterizovať fázu rastového cyklu VACV, ktorá je inhibovaná.

Získané výsledky - LA indukovaná inhibícia expresie neskorých génov VACV alebo vírusovej morfogenézy, ukazujú na novú možnosť inhibície poxvírusovej infekcie. Hoci sú koncentrácie LA účinné proti VACV vysoké, má LA viaceré pozitívne vlastnosti, ktoré ju robia zaujímavým cieľom pre budúce skúmania a vývoj. LA je dobre absorbovaná

z čreva a dobre prechádza aj hematoencefalickou bariérou, je netoxická aj vo vysokých koncentráciách a je používaná ako potravinový doplnok. Hoci sa o LA nedá uvažovať ako o samostatnej liečbe proti poxvírusovej infekcii, určite však poskytuje možnosť použitia ako podpornej terapie v kombinácii s inou účinnou látkou.

6. Závěry

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

1. V experimentoch sledujúcich štiepenie substrátov kaspáz, 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 dokončená a bunka umiera nekroticky.

2. Experimenty sledujúce vplyv inhibície kaspáz počas infekcie VACV boli získané po pridaní širokospektrálneho inhibítora kaspáz z-VAD-FMK. Tento inhibítor však vykazoval len okrajový efekt na rast VACV a naopak, indukoval zvýšené štiepenie cytokeratínu 18, čo ukazuje na fakt, že na štiepení cytokeratínu 18 zrejme participujú iné proteázy ako kaspázy.

Pokusy zamerané na inhibíciu aktivity PARP s cieľom zmeniť formu bunkovej smrti z nekrotickej na apoptózu počas infekcie VACV boli neúspešné. Efekty anti-apoptotických

faktorov kódovaných VACV hrajú významnejšiu úlohu ako inhibícia aktivity PARP.

3. Pripravili sme stabilne transfekovanú bunkovú líniu BSC-40 exprimujúcu Bcl-2 pod kontrolou inducibilného expresného systému Tet-On. V pokusoch sme po expresii Bcl-2 neukázali žiadne významné zmeny v type bunkovej smrti. Avšak, bližšie sledovanie vplyvu overexpresie Bcl-2 nebolo dokončené kvôli nízkym a vytrácajúcim sa hladinám exprimovaného Bcl-2. Vyššia expresia Bcl-2 pravdepodobne škodí bunkám BSC-40.

4. V experimentoch zameraných na vplyv piatich redox-modulujúcich látok na rast VACV sme pozorovali jednak stimulačný efekt u β -merkaptopetanolu, DTT a kyseliny askorbovej, jednak koncentračne závislý inhibičný efekt u kyseliny lipoovej a etakrynovej. Podľa experimentov podrobnejšie charakterizujúcich mechanizmus inhibície LA sa zdá, že k nej dochádza na úrovni expresie neskorých génov VACV alebo morfogénézy vírusových častíc.

7. Referencie

1. Alcami, A. a Smith, G.L. (1995) Cytokine receptors encoded by poxviruses: a lesson in cytokine biology. *Immunol Today* 16(10), 474-8.
2. 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.
3. 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.

4. 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.
5. Bilaska, A. a Wlodek, L. (2005) Lipoic acid - the drug of the future? *Pharmacol Rep* 57(5), 570-7.
6. Bray, M. (2003) Pathogenesis and potential antiviral therapy of complications of smallpox vaccination. *Antiviral Res* 58(2), 101-14.
7. Buller, R.M. a Palumbo, G.J. (1991) Poxvirus pathogenesis. *Microbiol Rev* 55(1), 80-122.
8. 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.
9. Danial, N.N. a Korsmeyer, S.J. (2004) Cell death: critical control points. *Cell* 116(2), 205-19.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Fulginiti, V.A. (2003) Risks of smallpox vaccination. *JAMA* 290(11), 1452; author reply 1452.
14. 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.
15. 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.
16. 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.

17. Green, D.R. a Kroemer, G. (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305(5684), 626-9.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. Chang, H.Y. a Yang, X. (2000) Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64(4), 821-46.
22. Johnston, J.B. a McFadden, G. (2003) Poxvirus immunomodulatory strategies: current perspectives. *J Virol* 77(11), 6093-100.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. Krecmerova, M., Holy, A., Pohl, R., Masojdkova, 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.
29. Kumar, S. (2007) Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ* 14(1), 32-43.
 30. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259), 680-5.
 31. Leist, M., Single, B., Castoldi, A.F., Kühnle, 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.
 32. 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.
 33. 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.
 34. Nicotera, P. a Leist, M. (1997) Mitochondrial signals and energy requirement in cell death. *Cell Death Differ* 4(6), 516.
 35. O'Brien, V. (1998) Viruses and apoptosis. *J Gen Virol* 79 (Pt 8), 1833-45.
 36. 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.
 37. Pastoret, P.P. a Vanderplasschen, A. (2003) Poxviruses as vaccine vectors. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 26(5-6), 343-55.
 38. 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.
 39. Safrin, S., Cherrington, J. a Jaffe, H.S. (1997) Clinical uses of cidofovir. *Rev Med Virol* 7(3), 145-156.
 40. 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.
 41. 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.
 42. 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.

43. 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.
44. 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.
45. Schramm, B. a Locker, J.K. (2005) Cytoplasmic organization of POXvirus DNA replication. *Traffic* 6(10), 839-46.
46. Sliva, K. a Schnierle, B. (2007) From actually toxic to highly specific--novel drugs against poxviruses. *Virol. J.* 4, 8.
47. 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.
48. 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.
49. 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.
50. 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.
51. Taylor, J.M. a Barry, M. (2006) Near death experiences: poxvirus regulation of apoptotic death. *Virology* 344(1), 139-50.
52. Taylor, J.M., Quilty, D., Banadyga, L. a Barry, M. (2006) The vaccinia virus protein F1L interacts with Bim and inhibits activation of the pro-apoptotic protein Bax. *J. Biol. Chem.* 281(51), 39728-39.
53. Vrbacky, M., Krijt, J., Drahota, Z. a Melkova, Z. (2003) Inhibitory effects of Bcl-2 on mitochondrial respiration. *Physiol. Res.* 52(5), 545-54.
54. 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.
55. WHO. (1980) *Wkly. Epidem. Rep. - Releve Epidem. Hebd. WHO.* 55. May 16, 1980.

8. 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
- Martina Spišáková, Marie Kalbáčová, Jana Lišková and Zora Mělková: Caspase activation during lytic infection by Vaccinia virus. New frontiers in the research of PhD students: Conference of Medical Schools in the Czech and Slovak Republics: Hradec Králové, December 8-9.2005, p.73-76.