

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



**Mgr. Jana Lišková**

**Typ buněčné smrti a blok superinfekce v buňkách infikovaných  
virem vakcinie**

Type of cell death and superinfection exclusion phenomenon in vaccinia  
virus-infected cells

Disertační práce

Školitel: MUDr. Zora Mělková, Ph.D.

Praha, 2011

**Prohlášení:**

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

V Praze, 26.5.2011

Podpis

## PODĚKOVÁNÍ

Především bych chtěla poděkovat svojí školitelce Zorce Mělkové za podporu, pomoc, velký entusiasmus a skvělé odborné vedení. Také jí patří velký dík za trpělivost, kterou se mnou měla, a za její laskavý přístup.

Kolegům z laboratoře děkuji za vytvoření přátelské a milé atmosféry a také za odborné konzultace, které mnohdy vedly k novým nápadům. Děkuji laborantkám Monice Kaplanové a Janě Kroužkové za pomoc v laboratoři. Jarmile Knitlové patří kromě osobního poděkování za milou podporu také díky za přípravu purifikovaných virů použitých v této práci.

I am very thankful to Prof. Mariano Esteban, that I could work in his laboratory for one month and use the confocal microscope there.

V neposlední řadě děkuji také své rodině a přátelům za stálou podporu a citové zázemí. Zvláště děkuji kamarádům ze souboru Moták, kteří na tréningu vždy dokázali odpoutat moji mysl od pracovních problémů.

Tato práce vznikla s podporou grantů GAČR 310/05/0477, GAČR 310/05/H533, MSM0021620806, 2010-SVV-260506 a 2011-SVV-262506.

## OBSAH

<b>ABSTRAKT</b> .....	7
<b>SUMMARY</b> .....	8
<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b> .....	9
<b>1. ÚVOD</b> .....	12
<b>2. LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	14
<b>2.1 Virus vakcinie</b> .....	14
2.1.1 Kmeny VACV .....	14
2.1.2 Biologie VACV .....	15
2.1.2.1 Vstup viru do buňky .....	16
2.1.2.2 Další události replikačního cyklu VACV .....	17
2.1.2.3 Fenomén bloku superinfekce .....	19
2.1.2.4 Interakce VACV s hostitelskou buňkou .....	20
2.1.3 Interakce VACV s imunitním systémem hostitele .....	20
2.1.3.1 Protivirové imunitní reakce spojené s interferony .....	20
2.1.3.2 VACV proteiny, které inhibují signální dráhy TLR a RLR .....	21
2.1.3.3 VACV proteiny, které inhibují signální dráhy interferonů .....	22
2.1.3.4 VACV proteiny, které vážou chemokiny .....	23
2.1.3.5 VACV proteiny, které interferují s cytokiny .....	23
2.1.3.6 VACV proteiny, které inhibují komplement .....	24
<b>2.2 Typy buněčné smrti</b> .....	24
<b>2.3 Apoptóza</b> .....	26
2.3.1 Význam apoptózy .....	26
2.3.2 Aktivace apoptózy .....	27
2.3.2.1 Vnější dráha aktivace apoptózy .....	27
2.3.2.2 Vnitřní dráha aktivace apoptózy .....	27
2.3.2.3 Apoptóza a p53 .....	29
2.3.2.4 Indukce apoptózy granzymy .....	29
2.3.2.5 Stres ER .....	30
2.3.2.6 Apoptóza a lysosomy .....	31
2.3.3 Kaspázy .....	32
2.3.3.1 Kaspáza 2 .....	34
2.3.3.2 Zánětlivé kaspázy .....	35
2.3.3.3 Buněčné inhibitory kaspáz .....	36
2.3.4 Mitochondrie a rodina Bcl-2 proteinů .....	36
2.3.5 Substráty smrti .....	39
2.3.6 VACV proteiny, které inhibují apoptózu .....	39
<b>2.4 Vliv typu buněčné smrti na regulaci imunitní odpovědi</b> .....	40
<b>2.5 Transglutamináza 2</b> .....	41
<b>3. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE</b> .....	43
<b>4. MATERIÁL A METODY</b> .....	44
<b>4.1 Materiál</b> .....	44
4.1.1 Chemikálie .....	44
4.1.2 Hmotnostní standardy .....	44
4.1.3 Roztoky .....	44

4.1.4	Buněčné linie .....	45
4.1.5	Viry .....	45
<b>4.2</b>	<b>Metody .....</b>	<b>46</b>
4.2.1	Infekce buněk .....	46
4.2.2	Superinfekce buněk .....	47
4.2.3	Stanovení titru virů .....	47
4.2.4	Průtoková cytometrie .....	47
4.2.5	Fluorescenční mikroskopie .....	48
4.2.6	Obrazová analýza .....	48
4.2.7	Konfokální mikroskopie .....	49
4.2.8	Western blot .....	49
4.2.9	Barvení DNA fluorochromy <i>in situ</i> (Hoechst 33342, PI) .....	50
4.2.10	Stanovení aktivace kaspáz (CaspACE) .....	50
4.2.11	Stanovení aktivity jednotlivých kaspáz v buněčných lyzátech .....	52
4.2.12	Stanovení obecné aktivity kaspáz (Rhodamine 110-D <sub>2</sub> ) .....	52
4.2.13	Stanovení aktivity kaspázy 3 v živých buňkách <i>in situ</i> (PhiPhiLux) .....	52
4.2.14	Stanovení mitochondriálního membránového potenciálu .....	53
4.2.15	Působení monodansylkaverinu .....	53
4.2.16	Příprava viru WR-DsRed .....	53
4.2.16.1	Příprava rekombinantního plasmidu .....	53
4.2.16.1.1	Množení plasmidové DNA .....	53
4.2.16.1.2	Izolace plasmidové DNA .....	53
4.2.16.1.3	Elektroforéza DNA .....	54
4.2.16.1.4	Postup přípravy rekombinantního plasmidu .....	54
4.2.16.2	Homologní rekombinace .....	54
4.2.16.3	Selekce rekombinovaných virů .....	55
4.2.16.4	Příprava DNA sondy značené digoxigeninem .....	55
4.2.16.5	Southern blot .....	55
4.2.17	Statistické zhodnocení výsledků .....	56
<b>5.</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>57</b>
<b>5.1</b>	<b>Typ buněčné smrti v buňkách HeLa G a BSC-40 infikovaných VACV .....</b>	<b>57</b>
5.1.1	Typ buněčné smrti buněk infikovaných VACV kmene WR .....	57
5.1.1.1	Morfologie jader a permeabilita cytoplasmatické membrány .....	57
5.1.1.1.1	Analýza morfologie jader infikovaných buněk .....	57
5.1.1.1.2	Analýza permeability cytoplasmatické membrány .....	60
5.1.1.2	Aktivace kaspáz v infikovaných buňkách .....	63
5.1.1.2.1	Detekce obecné aktivace kaspáz .....	63
5.1.1.2.1.1	Analýza aktivace kaspáz průtokovou cytometrií .....	63
5.1.1.2.1.2	Analýza aktivace kaspáz mikroskopicky .....	64
5.1.1.2.2	Aktivace jednotlivých kaspáz .....	65
5.1.1.2.2.1	Analýza aktivace jednotlivých kaspáz průtokovou cytometrií .....	65
5.1.1.2.2.2	Analýza štěpení kaspázy 3 .....	67
5.1.1.2.2.3	Analýza štěpení kaspázy 12 .....	68
5.1.1.3	Aktivita kaspáz v infikovaných buňkách .....	69
5.1.1.3.1	Aktivita kaspáz-2, 3, 4 a 12 měřená v lyzátech <i>in vitro</i> .....	69
5.1.1.3.2	Ovlivnění růstu viru vakcínie inhibitory kaspáz 2, 3, 4 .....	71
5.1.1.3.3	Obecná aktivita kaspáz měřená v lyzátech <i>in vitro</i> .....	71
5.1.1.3.4	Aktivita kaspázy 3 v živých buňkách <i>in situ</i> .....	72
5.1.1.3.5	Analýza produktů štěpení exekutorových kaspáz .....	75
5.1.1.3.5.1	Štěpení PARP .....	75
5.1.1.3.5.2	Štěpení cytokeratinu 18 .....	76

5.1.1.4	Časový průběh fluorescence buněk infikovaných virem WR-EGFP .....	77
5.1.1.5	Aktivace a aktivita jiných proteáz .....	80
5.1.1.5.1	Vliv kalpainu na detekci aktivace kaspáz v infikovaných buňkách .....	80
5.1.1.5.2	Vliv kalpainu na aktivitu kaspáz v infikovaných buňkách .....	81
5.1.1.5.3	Vliv kathepsinů na aktivaci kaspáz .....	82
5.1.2	Typ buněčné smrti buněk infikovaných kmeny Dryvax a Praha .....	83
5.1.2.1	Analýza morfologie jader .....	83
5.1.2.2	Analýza markeru štěpení kaspáz PARP .....	84
5.1.2.3	Růst VACV kmenů Dryvax a Praha v buňkách HeLa G a BSC-40 .....	85
5.1.3	Změny mitochondrií v buňkách infikovaných VACV kmene WR .....	86
5.1.3.1	Analýza morfologie mitochondrií konfokální mikroskopií .....	86
5.1.3.2	Analýza mitochondriálního membránového potenciálu průtokovou cytometrií .....	87
5.1.4	Možná role transglutaminázy v buňkách infikovaných VACV kmene WR ...	88
5.1.4.1	Výskyt vyšších forem kaspázy 3 v infikovaných buňkách .....	88
5.1.4.2	Vliv monodansylkadaverinu na růst viru vakcínie .....	89
<b>5.2</b>	<b>Možnost superinfekce buněk BSC-40 infikovaných VACV .....</b>	<b>90</b>
5.2.1	Příprava VACV exprimujícího červený fluorescenční protein DsRed .....	90
5.2.1.1	Příprava rekombinantního plasmidu .....	90
5.2.1.2	Homologní rekombinace .....	91
5.2.1.3	Selekce rekombinovaných virů .....	91
5.2.1.4	Ověření čistoty rekombinantního viru .....	92
5.2.2	Superinfekce infikovaných buněk v časových intervalech 2, 4, 6, 8, 10 h .....	94
5.2.2.1	Konfokální mikroskopie superinfikovaných buněk .....	94
5.2.2.2	Průtoková cytometrie superinfikovaných buněk .....	97
<b>6.</b>	<b>DISKUSE .....</b>	<b>99</b>
<b>6.1</b>	<b>Typ buněčné smrti buněk infikovaných VACV kmene WR .....</b>	<b>99</b>
<b>6.2</b>	<b>Aktivace a aktivita kaspáz v infikovaných buňkách .....</b>	<b>102</b>
<b>6.3</b>	<b>Typ buněčné smrti buněk infikovaných kmeny Dryvax a Praha .....</b>	<b>108</b>
<b>6.4</b>	<b>Změny mitochondrií v buňkách infikovaných VACV .....</b>	<b>110</b>
<b>6.5</b>	<b>Význam transglutaminázy v buňkách infikovaných VACV .....</b>	<b>111</b>
<b>6.6</b>	<b>Možnost superinfekce buněk infikovaných VACV .....</b>	<b>113</b>
<b>7.</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>116</b>
<b>8.</b>	<b>REFERENCE .....</b>	<b>117</b>

## ABSTRAKT

Virus vakcinie (VACV) byl v minulosti využíván v eradikační kampani proti černým neštovicím. Infekce VACV je ve většině buněčných typů, včetně epiteliálních, lytická, což odpovídá nekrotické buněčné smrti. Při infekci epiteliálních linií HeLa G a BSC-40 VACV kmenem Western Reserve (WR) však byla v naší laboratoři již dříve pozorována aktivace kaspáz, která je typická pro apoptózu. V této práci byl blíže studován typ buněčné smrti buněk HeLa G a BSC-40 infikovaných VACV a také byla charakterizována aktivace a aktivita kaspáz u těchto infikovaných buněk. U buněk HeLa G infikovaných VACV kmene WR byla identifikována apoptóza na základě kondenzace jader, aktivity kaspázy 3 a štěpení substrátů smrti. V infikovaných buňkách HeLa G byla také detekována aktivace i aktivita kaspáz 2 a 4. U buněk BSC-40 infikovaných VACV kmenem WR apoptóza ani aktivita kaspáz pozorována nebyla, aktivace kaspáz 2 a 4 však zde byla detekována také. V infikovaných buňkách obou buněčných linií byla také štěpena prokaspáza 3 a 12. Vakcinační kmeny Dryvax a Praha indukovaly apoptózu v buňkách HeLa G i BSC-40, což bylo prokázáno apoptotickou morfologií jader a také detekcí štěpení substrátu exekutorových kaspáz PARP. Naše výsledky naznačují, že typ buněčné smrti infikovaných buněk může souviset s virulencí a imunogenitou různých kmenů a isolátů VACV. Bližší poznání tohoto fenoménu může vést k lepšímu porozumění patogenezi postvakcinačních komplikací a k vývoji bezpečnějších vakcín odvozených od VACV.

V další části práce byla analyzována možnost superinfekce buněk BSC-40 infikovaných VACV kmene WR. Byl připraven rekombinantní virus, který exprimuje červený fluorescenční protein DsRed a spolu s VACV exprimujícím EGFP byl použit pro infekci, superinfekci a následnou analýzu bloku superinfekce. Bylo ukázáno, že při m.o.i. = 5 u každého viru je superinfekce v čase 2 hodiny po první infekci možná téměř u 90% buněk, ale možnost superinfekce v intervalu 4 hodiny po infekci je již omezená a její možnost v dalších intervalech dále klesá. Nicméně i v 10 hodinách po infekci je možné superinfikovat cca 20% buněk. Naše práce tedy ukazuje, že blok superinfekce u buněk infikovaných VACV není absolutní a že mezi vstupem viru do buňky a ustavením bloku superinfekce je časová prodleva.

## SUMMARY

Vaccinia virus (VACV) was formerly used in the eradication campaign against smallpox. VACV infection causes lysis of most cell types, including epithelial ones, which is equivalent to necrosis. However in our laboratory, we have previously detected activation of caspases during infection of HeLa G and BSC-40 epithelial cell lines with VACV, a typical sign of apoptosis. In this thesis, the type of cell death in HeLa G and BSC-40 cell lines infected with VACV strain WR was further studied and the activation and activity of caspases in the infected cells was characterized. In HeLa G cells infected with VACV strain WR, apoptosis was identified, as demonstrated by condensed nuclei, activity of caspase-3 and cleavage of death substrates. Additionally, activation and activity of caspase-2 and -4 was detected in infected HeLa G cells. In infected BSC-40 cells, neither apoptosis nor caspase activity were observed, but activation of caspase-2 and 4 was detected in these cells also. Finally, cleavage of procaspase-3 and -12 was detected in infected cells of both cell lines. Vaccination strains Praha and Dryvax induced apoptosis in both HeLa G and BSC-40 cells, as was demonstrated by the apoptotic morphology of nuclei and by the cleavage of PARP, substrate of the executioner caspases. Our results suggest that the type of cell death in VACV-infected cells could be related to the virulence and immunogenicity of individual strains and isolates of VACV. A more detailed knowledge of this phenomenon could lead to a better understanding to the pathogenesis of post-vaccination complications and consequently to the development of safer vaccines based on VACV.

In the second part of the thesis, the superinfection exclusion phenomenon in VACV strain WR-infected BSC-40 cells was studied. The recombinant VACV expressing DsRed, red fluorescent protein, was generated, and together with VACV expressing EGFP used for infection and superinfection of the cells. With m.o.i. = 5 for each virus, the superinfection occurred in 90% of cells at 2 h.p.i., but it was markedly reduced at 4 h.p.i. and further decreased at later time points. Nevertheless even at 10 h.p.i., superinfection occurred in approximately 20% of the cells. Our work demonstrates that in VACV-infected cells, superinfection exclusion is not absolute and that there is a substantial time delay between the virus entry and the establishment of the block of superinfection.



## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Ke každé zkratce je uveden význam v češtině, případně sousloví v angličtině, ze kterého zkratka pochází.

ADP	adenosindifosfát
ATP	adenosintrifosfát
Bcl-2	protein lymfomu B-buněk (B-cell lymphoma)
BrdU	bromodeoxyuridin
CAT	chloramfenikol-acetyltransferáza
CEV	obalený virion asociovaný s buňkou (cell-associated enveloped virion)
CrmA	modifikátor cytokinové odpovědi (cytokine response modifier A)
CIV	kalpainový inhibitor 5 (Calpain inhibitor V)
CS	kalpainový inhibitor kalpastatin peptid (calpastatin peptide)
CTL	cytotoxické T-lymfocyty
D32	plakový izolát VACV kmene Dryvax č. 32
D50	plakový izolát VACV kmene Dryvax č. 50
DAMPs	molekulární struktury spojené s patogeny (danger-associated molecular patterns)
DiOC <sub>6</sub> (3)	3,3'-dihexyloxakarbocyanin jodid
DMSO	dimetylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DsRed	červený fluorescenční protein získaný z medúzy <i>Discosoma</i>
EDTA	etylendiamintetraoctová kyselina
EEV	extracelulární obalený virion (extracellular enveloped virion)
EGFP	zelený fluorescenční protein (enhanced green fluorescent protein)
eIF2 $\alpha$	eukaryotický faktor iniciace translace (eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$ )
ER	endoplasmatické retikulum
EV	obalený virus (enveloped virus)
FasL	Fas ligand
FasR	Fas receptor
FBS	fetální bovinní sérum (fetal bovine serum)
FCCP	mesoxalonitril-4-trifluorometoxyfenylhydrazon
GDP	guanosindifosfát

GTP	guanosintrifosfát
h.p.i.	hodiny po infekci (hours post infection)
IFN	interferon
IMV	intracelulární zralý virion (intracellular mature virion)
iNOS	inducibilní NO syntáza
IPTG	isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
IRF	interferony regulující faktor (IFN regulatory factor)
kbp	tisíc párů bazí (kilo base pairs)
LacI	gen kódující represor laktózového operonu
LacZ	gen kódující $\beta$ -galaktosidázu
LB	Luria Bertani
LUC	luciferáza
MAP kináza	mitogenem aktivovaná protein kináza (mitogen-activated protein)
MDC	monodansylkadaverin
mRNA	mediátorová RNA
MV	zralý virus (mature virus)
MVA	modifikovaný VACV kmene Ankara (Modified virus Ankara)
NAD <sup>+</sup>	nikotinamidadenindinukleotid (oxidovaná forma)
NAO	nonylakridin oranž
NCS	neonatální telecí sérum (neonatal calf serum)
ot./min	otáčky za minutu
P13	plakový izolát VACV kmene Praha č. 13
P20	plakový izolát VACV kmene Praha č. 20
PAMPs	molekulární struktury asociované s patogeny (pathogen-associated molecular patterns)
PBS	fosfátový pufr (phosphate-buffered saline)
PFU	jednotky tvořící plaky (plaque forming units)
PI	propidium jodid
PKR	dsRNA dependentní protein kináza
RFU	relativní jednotky fluorescence (relative fluorescence unit)
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	kyslíkové radikály (reactive oxygen species)
S.E.M.	střední chyba průměru (standard error of mean)
SDS	dodecylsulfát sodný (sodium dodecyl sulphate)
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza provedená v přítomnosti SDS

SSC	citrátový pufr (saline-sodium citrate)
TBE	Tris-borátový pufr
TE	pufr obsahující Tris a EDTA
TEMED	tetrametyletylendiamin
TNF	faktor způsobující nekrózu nádorů (tumor necrosis factor)
TNFR	TNF receptor
Tris	tris(hydroxymetyl)aminometan
UPR	odpověď neuspořádaných proteinů (unfolded protein response)
VACV	virus vakcinie (vaccinia virus)
WR	VACV kmen Western Reserve
wt-WR	divoký typ VACV kmene WR
X-Gal	bromo-chloro-indolyl-galaktopyranosid

## 1. ÚVOD

Virus vakcinie (VACV) patří do čeledi *Poxviridae* (Poxviry) spolu se známým virem varioly, původcem černých neštovic. V minulosti byl VACV využíván v eradikační kampani proti černým neštovicím. Dnes jsou z různých kmenů VACV vyvíjeny bezpečnější vakcíny proti černým neštovicím a také rekombinantní vakcíny proti dalším onemocněním.

Poxviry jsou komplexní obalené DNA viry, jejichž replikační cyklus probíhá v cytoplasmě infikovaných buněk. VACV ovlivňuje metabolismus hostitelské buňky i hostitelského organismu na mnoha úrovních. Proteiny VACV blokují protivirové imunitní reakce spojené s interferony, inhibují signální dráhy receptorů přirozené imunity, interferují s účinkem zánětlivých cytokinů a inhibují komplement. VACV také brání apoptóze infikované buňky, a to inhibicí vnější i vnitřní dráhy aktivace apoptózy. Vnější dráha je blokována inhibicí kaspázy 8, vnitřní dráha inhibicí uvolnění cytochromu c z mitochondrií pomocí proteinů podobných proteinům Bcl-2 rodiny. Další blok apoptózy představuje inhibice antivirového systému PKR a 2'-5'-OAS.

Apoptóza infikovaných buněk představuje významný prostředek antivirové imunity. Její regulace se obvykle účastní specifické cysteinové proteázy kaspázy. Iniciační kaspázy jsou aktivovány dimerizací a následným štěpením díky stresovým signálům přicházejícím z vnějšího prostředí (vnější dráha) nebo z buňky samotné (vnitřní dráha). Kaspáza 8 přenáší signály vnější dráhy od receptorů smrti. Kaspáza 9 je aktivována na proteinovém komplexu apoptosomu díky vylití cytochromu c z mitochondrií a přenáší tak signály vnitřní dráhy aktivace apoptózy. Kaspáza 2 zřejmě signalizuje apoptózu vyvolanou poškozením DNA. Kaspáza 4 se u člověka účastní signalizace apoptózy vyvolané stresem ER podobně jako kaspáza 12 u myši, u člověka má však kaspáza 12 roli spíše v regulaci aktivity zánětlivé kaspázy 1. Iniciační kaspázy poté štěpí a tím aktivují exekutorové kaspázy 3 a 7. Tyto kaspázy štěpí řadu buněčných proteinů, tzv. substráty smrti, a tím navozují morfologickou manifestaci apoptózy.

Morfologické znaky apoptózy zahrnují kondenzaci a fragmentaci jádra, kondenzaci cytoplasmy při zachované morfologii organel, neporušenou integritu cytoplasmatické membrány a rozdělení buňky do apoptotických tělísek. Nekróza je charakterizována chyběním apoptotické morfologie buňky a porušenou permeabilitou cytoplasmatické membrány. Dříve se předpokládalo, že fagocytóza apoptotických buněk navodí tolerogenní imunitní odpověď, zatímco nekrotické buňky vyvolají zánět. Ukazuje se však, že i

apoptotické buňky mohou vysílat tzv. signály nebezpečí, pokud byla apoptóza navozena infekcí patogenem nebo určitým druhem stresu, a tyto signály nebezpečí vyvolávají také imunitní reakci.

Dřívější výsledky naší laboratoře ukázaly aktivaci kaspáz v epiteliálních buněčných liniích BSC-40 a HeLa G infikovaných VACV, což je typické pro apoptotické buňky. Je však obecně známo, že VACV infekce většiny buněčných typů bývá lytická a tedy nekrotická. Cílem této práce proto bylo identifikovat typ buněčné smrti buněk HeLa G a BSC-40 infikovaných VACV a blíže charakterizovat aktivaci a aktivitu kaspáz v těchto buňkách. Bližší charakterizace typu buněčné smrti infikovaných buněk může přispět k poznání vztahu vlastností VACV a imunogenity vakcín z něj připravených.

Dalším cílem této práce bylo blíže charakterizovat fenomén bloku superinfekce v buňkách infikovaných VACV. Blok superinfekce je fenomén, při němž již jednou infikovaná buňka neumožní vstup či replikaci dalšího viru. Mechanismus bloku superinfekce byl popsán u mnoha virů a částečně i u VACV. Význam bloku superinfekce tkví v lepším šíření a účinnějším množení viru v hostitelkém organismu.

## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 Virus vakcinie

Virus vakcinie (VACV) patří do čeledi *Poxviridae* (Poxviry), podčeledi *Chordopoxvirinae* a rodu *Orthopoxvirus*. Nejznámějším zástupcem poxvirů je virus varioly, původce černých neštovic. Zdravotnický význam VACV v minulosti spočíval právě ve vakcinaci tímto virem jako živou vakcínou proti černým neštovicím. Celosvětová vakcinační kampaň vedla k eradikaci tohoto onemocnění, poslední známý případ se objevil v roce 1977 v Somálsku (WHO, 1980). Význam VACV v současnosti se posunuje k přípravě rekombinantních vakcín proti dalším onemocněním (AIDS, tuberkulóza, malárie) (Gilbert et al., 2006; Gomez et al., 2008), vyvíjejí se bezpečnější vakcíny proti černým neštovicím použitelné i u imunosuprimovaných osob (Artenstein, 2008) a také se pracuje na možném protinádorovém působení VACV (Amato, 2010; Le Boeuf et al.). VACV slouží také jako zdroj rekombinantních vakcín ve veterinární medicíně (Yilma et al., 2010).

Původ VACV je neznámý. Edward Jenner na přelomu 18. a 19. století začal s první "vakcinací" proti černým neštovicím, k čemuž používal materiál z lézí kravských neštovic a zřejmě i z neštovic koňských, které dnes již neexistují. Virus byl v minulosti pasážován na různých zvířatech a podstoupil také řadu lidských pasáží, pravděpodobně i na pacientech trpících černými neštovicemi (Knipe, 2001). Dnes je VACV samostatný druh, který se významně liší od možných mateřských druhů. Selektce izolátů, které způsobovaly nižší nežádoucí účinky při vakcinaci, vedla postupně ke kmenům VACV používaným v nedávné minulosti.

#### 2.1.1 Kmeny VACV

Vakcíny používané v USA pocházely z kmene VACV New York City Board of Health (NYCBOH). V současnosti je v USA schválena pouze vakcína Dryvax (Wyeth), která pochází z kmene NYCBOH. (Parrino and Graham, 2006). V kmenu NYCBOH měl zřejmě také původ kmen VACV EM-63 (USSR) používaný pro vakcinaci v bývalém Sovětském svazu. V Číně byl používán kmen VACV Temple of Heaven (Tian tan). Ve Velké Británii byl používán kmen VACV Lister (Elstree). Kmen Praha byl používán k vakcinaci v bývalém Československu (vakcína VARIE, Sevac) a byl dovezen z Belgie v roce 1892 (Kutinova et al., 1995). LC168m je vakcinační kmen připravený z kmene

Lister pasážováním na králičích ledvinných buňkách. Tato vakcína byla bezpečnější než Lister a byla používána v Japonsku v 70. letech 20. století.

Ve fázi testování jsou další typy bezpečnějších vakcín, viry použité pro tyto vakcíny jsou atenuované nebo nejsou schopny se množit v odpovídajícím hostiteli. Kmen NYVAC pocházející z kmene Copenhagen byl připraven cílenou mutací 19 otevřených čtecích rámců a v lidských buňkách se nemnoží. Modified virus Ankara (MVA) pochází z kmene Ankara a byl připraven pasážováním v kuřecích embryonálních fibroblastech, takže ztratil schopnost množit se v savčích buňkách. Další kmen VACV neschopný množení mimo speciální buněčné linie je dVV-L, který pochází z kmene Lister a postrádá gen pro uracil-DNA-glykosylázu. Kmen VACV Dairen byl použit ve vakcinační kampani v Japonsku a poté z něj byl vytvořen atenuovaný kmen Dairen-I (Kennedy et al., 2009).

Kmeny VACV běžně používané v laboratořích WR a IHD měly také původ v kmenech NYCBOH (Buller and Palumbo, 1991). Kmen WR používaný v této práci byl pasážován na myší mozkové tkáni a je proto neurovirulentní (Davies et al., 2008; Williamson et al., 1990).

### 2.1.2 Biologie VACV

Poxviry jsou velké komplexní viry, mezi jejich hostitele patří řada obratlovců i bezobratlých. Celý replikační cyklus poxvirů probíhá v cytoplasmě infikovaných buněk. Genom VACV tvoří dsDNA o velikosti 195 kbp s vlásenkami na koncích. Genom kóduje kromě strukturních proteinů také řadu enzymů umožňujících transkripci a replikaci viru, celkově VACV kóduje téměř 200 proteinů. Pojmenování genů VACV bylo zavedeno před sekvenováním genomu a je založeno na fragmentech produkovaných štěpením genomu restriktivní endonukleázou *HindIII*. Tyto fragmenty byly označeny písmeny podle své velikosti, číslo značí pořadí genu v daném fragmentu a L/R směr otevřeného čtecího rámce, např. E3L (Knipe, 2001).

Virová částice měří přibližně 350 x 270 nm, zralý virion může být obalený jednou nebo více membránami (Knipe, 2001). Částice označované MV (zralý virus, mature virus, dříve IMV - intracelulární zralý virion, intracellular mature virion) mají na svém povrchu jednu membránu. MV se nacházejí v infikovaných buňkách a ven se uvolňují lýzou buňky. Částice označované EV (obalený virus, enveloped virus, dříve EEV - extracelulární obalený virion, extracellular enveloped virion) mají oproti MV další membránu. Tvoří se z částic MV dodáním dalších dvou membránových obalů pocházejících z Golgiho systému nebo z endosomů. Z infikovaných buněk se uvolňují exocytózou, tedy fúzí povrchové

membrány s cytoplasmatickou membránou. Částice MV i EV jsou plně infekční (Law et al., 2006).

### 2.1.2.1 Vstup viru do buňky

Vstup VACV do buňky je zřejmě možný více způsoby. Dosud nebyla identifikována molekula virového receptoru, který by zprostředkoval vstup viru. Byly však identifikovány struktury, na které je virus schopen se adsorbovat. Pomocí povrchových proteinů A27, D8 a H3 se VACV váže na glykosaminoglykany přítomné na povrchu hostitelských buněk, konkrétně na heparan sulfát nebo chondroitin sulfát (Hsiao et al., 1999; Lin et al., 2000), vstup VACV do buňky může být i nezávislý na glykosaminoglykanech (Bengali et al., 2009; Carter et al., 2005). Studium mechanismu vstupu viru do buňky je komplikováno existencí dvou různých forem viru, MV a EV, které mají odlišný počet obalových membrán. EV má na povrchu několik proteinů navíc oproti MV. Částice EV po adsorpci na buňku před samotným vstupem odvrhne nadbytečnou membránu díky interakci s polyanionickými molekulami na povrchu buňky (Law et al., 2006), dále se mechanismus vstupu částic EV zřejmě neliší od částic MV.

Předpokládá se, že částice MV vstupují do buněk fúzí s cytoplasmatickou membránou, a to buď přímo na povrchu buňky při neutrálním pH (Carter et al., 2005), nebo po endocytóze při nízkém pH v endosomu (Townsend et al., 2006). Podle novějšího pohledu je VACV při vstupu pohlcen makropinocytózou podobně jako apoptotická částice, kterou virus napodobuje přítomností fosfatidylserinu na svém povrchu (Laliberte and Moss, 2009; Mercer and Helenius, 2008). Makropinocytóza je forma endocytózy používaná pro pohlcení tekutiny a drobných částic, například bakterií nebo apoptotických tělísek (Mercer and Helenius, 2010). Při makropinocytóze se pomocí remodelace aktinového cytoskeletu tvoří výběžky membrány, které následně uzavírají část tekutiny do velkého váčku - makropinosomu o rozměru až 10  $\mu\text{m}$ . Tyto váčky mohou dále podstoupit acidifikaci nebo fúzovat s endosomy. Je známo, že makropinocytózu využívají ke vstupu do buňky i další patogeny, například KSHV (herpesvirus asociovaný s Kaposiho sarkomem) (Schelhaas, 2010).

Byla identifikována skupina genů, jejichž mutace způsobí neschopnost VACV vstoupit do buňky (Senkevich et al., 2005). Proteiny kódované těmito geny (A16, A21, A28, G3, G9, H2, J5, L5, F9, L1) tvoří na povrchu virionu tzv. "entry-fusion complex", komplex proteinů, které zajišťují vstup viru do buňky. Tyto proteiny jsou přítomny také na povrchu infikovaných buněk a způsobují zde fúzi těchto buněk indukovanou prostředím o nízkém pH (Gong et al., 1990). Naopak komplex proteinů A56 (hemagglutinin) a K2 (SPI-



3) přítomný na povrchu infikovaných buněk je schopen interagovat s proteiny "entry-fusion complex". Díky této interakci brání komplex A56/K2 vstupu VACV do těchto buněk a také fúzi infikovaných buněk (Turner and Moyer, 2008; Wagenaar and Moss, 2009).

Mechanismus vstupu VACV do buněk je zřejmě závislý na kmenu VACV i na buněčné linii. Vstup VACV kmene WR a Wyeth (Dryvax) probíhá zřejmě přednostně kyselou fúzí v endosomech, protože byla pozorována jeho závislost na acidifikaci endosomů. Vstup VACV kmene IHD-J, Copenhagen a Elstree byl na acidifikaci endosomů nezávislý, ale byl podmíněn vazbou na glykosaminoglykany na povrchu hostitelských buněk, takže vstup těchto virů zřejmě probíhá přímou fúzí na povrchu buňky (Bengali et al., 2009).

### **2.1.2.2 Další události replikačního cyklu VACV**

Po vstupu jsou virová core transportována s využitím mikrotubulů do oblastí cytoplasmy blíže jádru a zde probíhá transkripce a replikace viru. Transkripce se odehrává ve třech fázích: časná, intermediární a pozdní. Enzymy potřebné pro transkripci časných genů jsou obsaženy ve virionu, takže časná transkripce začíná okamžitě po vstupu a kulminuje v čase 1 - 2 hodiny po vstupu. V nedávné době bylo zjištěno, že časně geny je možné rozdělit do dvou skupin. Jedna skupina časných genů je transkribována bezprostředně po vstupu, další skupina (tzv. středně časně geny) později (Assarsson et al., 2008). Časně proteiny slouží k replikaci virové DNA, k modifikaci hostitelské buňky a k úniku před imunitním systémem hostitele. Následuje replikace genomu viru a exprese intermediárních genů. Hladiny intermediárních mRNA dosahují maxima bezprostředně po časných mRNA, okolo 2 hodin po vstupu (Baldick and Moss, 1993). Intermediárních genů je malý počet a kódují převážně regulační faktory, které umožní transkripci pozdních genů. Ta dosahuje maxima přibližně ve 4 hodinách po vstupu, poté následuje maturace virového potomstva. Pozdní proteiny jsou obsaženy ve virionu nebo napomáhají tvorbě virionu (Roberts and Smith, 2008). Transkripce intermediárních a pozdních genů je podmíněna zahájením replikace virového genomu a také rozvolněním virového "jádra" (core). Virové mRNA nepodléhají sestřihu.

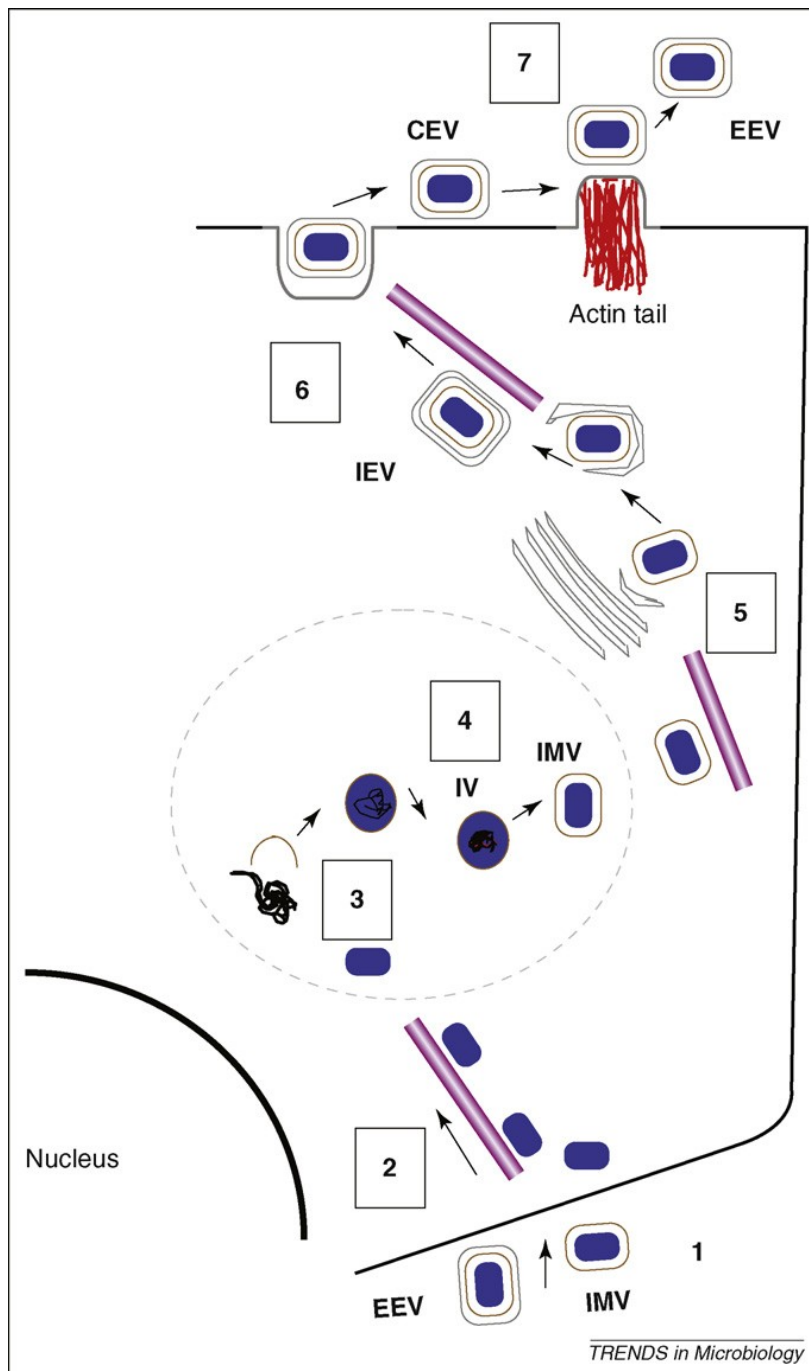
Replikace genomů se odehrává v tzv. "virových továrnách" (viral factories), které jsou lokalizovány blízko jádra, a probíhá přes velké konkatemerní meziprodukty, které jsou poté rozděleny na jednotlivé genomy (Buller and Palumbo, 1991; Knipe, 2001). Při replikaci VACV DNA dochází často k homologní rekombinaci (Ball, 1987), tento fakt je možno využít při produkci rekombinantních virů.

Maturace virových částic začíná tvořením obalových membrán, které se jeví na elektronmikroskopických snímcích jako srpkovité struktury ("crescent"). Původ této membrány je dosud neznámý, spekuluje se například o skládání z drobných váčků pocházejících z membránových organel buňky (Rodriguez et al., 1998). Do membrány se poté balí nukleoprotein a viriony dozrají. Vzniklé částice MV jsou transportovány s využitím mikrotubulů z míst "viral factories" a poté obdrží další dvě membrány (Roberts and Smith, 2008). Ven z buňky se tyto obalené viriony uvolní exocytózou, tedy fúzí s cytoplasmatickou membránou jako EV. Bylo však dokumentováno, že částice MV se mohou uvolnit z buňky pučením, čímž získají druhou membránu pocházející z cytoplasmatické membrány hostitelské buňky (Meiser et al., 2003).

Část EV zůstává přichycena na membráně buňky, takové částice se označují CEV (obalený virion asociovaný s buňkou, cell-associated enveloped virion). Poměr CEV a EEV je dán typem infikovaných buněk a také kmenem VACV, například kmen Western Reserve (WR) produkuje převážnou část CEV oproti EEV, kmen IHD naopak (Knipe, 2001). Většina kmenů VACV však produkuje převahu CEV částic. Virové potomstvo se objevuje nejdříve ve 4 - 6 hodinách po infekci a jeho produkce je maximální mezi 12 a 24 h.p.i. (Buller and Palumbo, 1991).

Částice CEV jsou schopny infikovat sousední buňky zvláštním mechanismem. Jsou tlačeny pomocí aktinových komet ("actin tails") na výběžcích buněk směrem k sousedním buňkám (Cudmore et al., 1995). Polymerace aktinu a vytvoření aktinových komet je závislé na fosforylaci VACV proteinu A36R, který se nachází v membráně infikovaných buněk (Frischknecht et al., 1999).

Částice EV zřejmě slouží k šíření infekce v hostitelském organismu, protože jsou relativně rezistentní vůči účinku neutralizačních protilátek i komplementu. Oproti tomu částice MV jsou efektivně neutralizovány protilátkami a mohou být destruovány komplementem. Viry produkující pouze částice MV jsou *in vivo* avirulentní. Komplex proteinů umožňující vstup viru ("entry-fusion complex") se vyskytuje pouze v membráně částic MV, na částicích EV je odhalen až po odvržení nadbytečné membrány (Roberts and Smith, 2008). Zdá se tedy, že VACV potřebuje další membránu k úniku před imunitním systémem hostitele.



**Obr. 1. Replikační cyklus VACV.** 1 - vstup viru do buňky, 2 - odhalené jádro viru putuje do "viral factories", 3 - replikace virových genomů, 4 - DNA viru získává proteinový obal a první membránu, 5 - obalená částice viru získává další membrány, 6 - exocytóza virových částic, 7 - virus je tlačěn výběžkem buňky s aktinovou kometou. Nucleus - jádro, Actin tail - aktinová kometa. Upraveno podle (Roberts and Smith, 2008).

### 2.1.2.3 Fenomén bloku superinfekce

Superinfekce znamená událost, kdy virus vstoupí do již infikované buňky. Je známo několik virů, které superinfekci brání různými mechanismy, obecně blokem vstupu

či pomnožení viru. Blok superinfekce zřejmě slouží jako prostředek efektivnějšího šíření infekce v organismu a efektivnějšího množení viru.

Virus chřipky brání superinfekci expresí neuraminidázy na infikovaných buňkách. Tento enzym inaktivuje buněčný receptor (kyselinu sialovou) nutný pro vstup viru (Huang et al., 2008). Herpesviry exprimují na povrchu infikovaných buněk glykoprotein D, který brání vstupu viru do buňky (Dasika and Letchworth, 2000) Retroviry exprimují na hostitelských buňkách své obalové glykoproteiny a ty blokují virový receptor (Barnard et al., 2006). Virus HIV kóduje protein Nef, který způsobuje internalizaci a degradaci CD4 molekuly, která funguje jako virový receptor (Geleziunas et al., 1994). O VACV bylo také publikováno, že brání superinfekci (Christen et al., 1990). Metodika zahrnovala superinfekci virem VACV exprimujícím LacZ a jeho titraci. V této práci bylo ukázáno, že replikace superinfikujícího viru byla snížena o 90% v intervalu superinfekce 4 hodiny a o 99% v intervalu superinfekce 6 hodin. Omezení bylo pozorováno na úrovni vstupu viru do buňky a časné transkripce.

#### **2.1.2.4 Interakce VACV s hostitelskou buňkou**

Růst VACV a tvorba virového potomstva samozřejmě zásadně ovlivňuje metabolismus hostitelské buňky. Cytopatický efekt infekce (zakulacení buňky, ztráta adheze k povrchu) je možné pozorovat již 1 - 2 hodiny po infekci (h.p.i.). Infekce VACV také způsobuje inhibici syntézy hostitelských proteinů, DNA i RNA (Buller and Palumbo, 1991; Knipe, 2001). Například byla ukázána inhibice syntézy mRNA aktinu a tubulinu v buňkách infikovaných VACV již v čase 3 h.p.i. (Rice and Roberts, 1983). Další ovlivnění hostitelské buňky a potažmo hostitelského organismu spočívá v expresi virových proteinů, které modulují imunitní reakce hostitele a také brání apoptóze, jak je uvedeno dále.

#### **2.1.3 Interakce VACV s imunitním systémem hostitele**

VACV podobně jako další poxviry je díky svému komplexnímu genomu schopen omezovat imunitní reakce hostitele na mnoha úrovních přirozené i získané imunity.

##### **2.1.3.1 Protivirové imunitní reakce spojené s interferony**

Interferony jsou secernované cytokiny, které zajišťují obranu proti virovým infekcím, mohou navodit antivirový stav neinfikovaných buněk a také podporovat Th1 odpověď.

Virová infekce je detekována receptory, které se souhrnně označují jako PRS (receptory rozeznávající patogeny, pathogen recognition receptors). Dnes jsou známy čtyři skupiny těchto receptorů: TLR (Toll-like receptors), RLR (RIG-I-like receptors (retinoic acid-inducible gene I)), NLR (NOD-like receptors (nucleotide-binding oligomerization domain)) a cytoplasmatické DNA senzory. Receptory TLR a RLR jsou důležité pro produkci interferonů typu I a zánětlivých cytokinů, receptory NLR jsou důležité pro produkci IL-1 $\beta$ .

Receptory rozeznávající patogeny aktivují transkripční faktory - IRFs (IFN regulatory factors), ATF2 (activating transcription factor 2) a NF- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B). Tyto faktory po translokaci do jádra aktivují expresi interferonů a dalších genů účastnících se interferonové odpovědi. Konkrétně IRFs aktivují expresi genů IFNA a IFNB a faktory ATF2 a NF- $\kappa$ B aktivují expresi zánětlivých cytokinů.

Exprimované interferony se vážou na interferonové receptory, které jsou přítomny na povrchu většiny buněčných typů. Tyto receptory dále aktivují Jak-Stat (Janus kinase, signal transducer activator of transcription) dráhu a nakonec transkripční faktor ISGF3 (IFN-stimulated gene factor 3), který stimuluje transkripci tzv. interferonem stimulovaných genů. Stimulace interferony může být autokrinní (stimulace téže buňky) nebo parakrinní (stimulace okolních buněk). Interferony třídy I, tedy skupina IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  a skupina dalších IFN, mohou být produkovány v mnoha typech buněk a navozují především antivirový stav buněk. Interferon třídy II, tedy IFN- $\gamma$ , je produkován aktivovanými T-lymfocyty, NK buňkami a dalšími buňkami imunitního systému a indukuje Th1 imunitní odpověď. Krátce jsou známy interferony třídy III, které se také podílejí na regulaci antivirové odpovědi.

Interferony stimulované geny mají roli v zesílení a regulaci interferonové odpovědi (RIG-I, MDA5 (melanoma differentiation-associated gene 5) a další) nebo zprostředkují antivirové mechanismy, které brání množení virů (PKR, 2'-5'-OAS (2'-5'-oligoadenylate synthetase), RNase L, ADAR (RNA-specific adenosine deaminase) a další). Protivirové reakce imunitního systému jsou podrobně shrnuty v přehledném článku (Perdiguero and Esteban, 2009).

### **2.1.3.2 VACV proteiny, které inhibují signální dráhy TLR a RLR**

NF- $\kappa$ B je transkripční faktor, který hraje centrální roli ve stimulaci vrozené i získané imunity. Signální dráhy vedoucí k aktivaci NF- $\kappa$ B jsou aktivovány TLR i RLR receptory, receptory zánětlivých cytokinů IL-1 a TNF $\alpha$  a mnoha dalšími. Signalizace od IL-1 a TLR receptorů k NF- $\kappa$ B zahrnuje aktivaci Traf6 (TNF receptor associated factor 6)

a IRAK (IL-1 receptor associated kinase), signalizace od TNF receptoru zahrnuje Traf2. Tyto nezávislé signální dráhy se stýkají u IKK (I $\kappa$ B kinase) komplexu, který reguluje NF- $\kappa$ B aktivaci. Pro TLR signální dráhy jsou důležité adaptorové proteiny obsahující TIR (Toll/IL-1 receptor) doménu, díky níž asociují s TLR, například MyD88 (myeloid differentiation factor 88) a Trif (Toll receptor-associated activator of IFN).

VACV kóduje proteiny A46, A52 a K7, které inhibují TLR a RLR signální dráhy. Dále VACV kóduje proteiny B14, N1, K1 a M2, které inhibují aktivaci transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B. Proteiny A52, K7, N1 a B14 vykazují podobnost s proteiny rodiny Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) (Bahar et al., 2011).

Protein **A46** se svojí TIR doménou váže na členy mnoha TLR signálních drah obsahující TIR doménu, například MyD88, Trif, Tram (Bowie et al., 2000). Protein **A52R** inhibuje signalizaci Irak2 a Traf6 (Harte et al., 2003). Protein **K7** kromě inhibice NF- $\kappa$ B signalizace přes TLR inhibuje také DDX3 helicázu (DEAD-box RNA helicase), čímž brání transkripci z IFNB promotoru a inhibuje tak produkci zánětlivých cytokinů (Kalverda et al., 2009). Protein **B14** inhibuje signální dráhu NF- $\kappa$ B na úrovni IKK komplexu (Chen et al., 2008). Protein **N1L** se váže k IKK komplexu i k TBK1 (Tank binding kinase 1), čímž inhibuje aktivaci NF- $\kappa$ B i IRF3 (DiPerna et al., 2004). Protein **K1** brání degradaci I $\kappa$ B $\alpha$ , což je inhibitor NF- $\kappa$ B (Shisler and Jin, 2004). Protein **M2** je lokalizován v ER a brání fosforylaci Erk2 kinázy, která by indukovala aktivaci NF- $\kappa$ B (Gedey et al., 2006).

### 2.1.3.3 VACV proteiny, které inhibují signální dráhy interferonů

Signální dráhy interferonových receptorů aktivují transkripci faktoru Stat1 (signal transducer and activator of transcription 1), který indukuje expresi antivirových genů. VACV kóduje proteiny, které fungují jako rozpustné receptory IFN třídy I i II (B19, B8), čímž brání vazbě interferonů na buněčné receptory. Dále kóduje proteiny, které inhibují signální dráhy IFN receptorů (VH1) nebo brání navození antivirového stavu buňky (E3, K3, C7).

Jedním z genů důležitých pro antivirový stav buňky je PKR. Tato kináza detekuje dsRNA produkovanou v průběhu VACV transkripce, tím se aktivuje a dále fosforyluje translační iniciační faktor eIF2 $\alpha$  (eukaryotic translation initiation factor 2 alpha). Ten je fosforylací inaktivován, dochází k zastavení proteosyntézy a k apoptóze. Dalším IFN-inducibilním proteinem je 2'-5'-OAS. Tento enzym je také aktivován dsRNA a poté syntetizuje 2'-5'-oligoadenyláty, které aktivují RNázu L. Ta poté degraduje RNA v buňce, což vede také k zastavení proteosyntézy.

VACV protein **B19** funguje jako rozpustný receptor pro IFN- $\alpha/\beta$  (Colamonici et al., 1995). Je kódován genem B19R (kmen Copenhagen) nebo B18R (kmen WR) a je secernován do okolí infikovaných buněk a zároveň je přítomen na jejich povrchu. Protein **B8** je rozpustný homodimerní receptor pro IFN- $\gamma$  (Alcami and Smith, 2002). VACV protein **VH1 (H1L)** je fosfatáza, která defosforyluje Stat1 a tím ho inaktivuje (Mann et al., 2008). VACV protein **K3L** slouží jako pseudosubstrát pro fosforylaci PKR místo eIF2 $\alpha$ , čímž tuto kinázu i dráhu vedoucí k apoptóze inhibuje (Carroll et al., 1993). Další VACV protein **E3L** váže dsRNA, čímž také nedovolí aktivaci PKR ani 2'-5'-OAS (Romano et al., 1998). E3L se také váže přímo na PKR, čímž ji inhibuje (Sharp et al., 1998). Protein **C7L** také inhibuje fosforylaci eIF2 $\alpha$  (Najera et al., 2006).

#### 2.1.3.4 VACV proteiny, které vážou chemokiny

Chemokiny jsou malé secernované proteiny, které vytvářejí koncentrační gradienty na endotelu cév a ve tkáních svojí vazbou na glykosaminoglykany na povrchu buněk. Tyto gradienty slouží ke směřování migrace leukocytů a antigen-prezentujících buněk do místa zánětu. VACV produkuje několik proteinů, které jsou secernovány infikovanými buňkami a fungují jako rozpustné receptory některých chemokinů. Proteiny **C23/B29** vážou s velkou afinitou chemokiny skupiny CC (Smith et al., 1997). Protein **A41** váže chemokiny slabě a význam této vazby není jasný (Bahar et al., 2008).

#### 2.1.3.5 VACV proteiny, které interferují s cytokiny

TNF $\alpha$  je cytokin s prozánětlivým účinkem produkováný aktivovanými makrofágy a T-lymfocyty, který může navodit antivirový stav buňky a vyvolat apoptózu v buňkách infikovaných virem. VACV kóduje dva proteiny, které fungují jako secernované receptory TNF $\alpha$ . Protein **A53** je produkován VACV kmeny Lister, USSR a Evans, přičemž některé kmeny VACV mají ve svém genomu další nefunkční geny pro TNF receptory (Alcami et al., 1999). Protein **CrnE** (Cytokine response modifier E) sdílí homologii s buněčnými TNF receptory (Graham et al., 2007).

IL-1 $\beta$  (interleukin 1 $\beta$ ) a IL-18 jsou důležité zánětlivé cytokiny. Jsou syntetizovány jako prekurzory, které jsou štěpeny kaspázou 1 na výsledné funkční produkty. IL-1 $\beta$  je exprimován v mnoha typech buněk a zprostředkovává odpověď na zranění i infekci. Po vazbě na IL-1 receptory na povrchu buněk je aktivována signální kaskáda, která vede k expresi dalších zánětlivých mediátorů. IL-18 je cytokin, který indukuje produkci IFN- $\gamma$  v imunitních buňkách. VACV protein **B16** (produkt pozdního genu B15R u kmene WR

nebo B16R u kmene Copenhagen) funguje jako rozpustný receptor IL-1 $\beta$  (Alcami and Smith, 1992). Protein **B13**, známý také jako **SPI-2** nebo **CrmA**, je inhibitor kaspázy 1, takže brání maturaci IL-1 $\beta$  i IL-18 (Kettle et al., 1997). Protein **C12L** funguje jako rozpustný receptor IL-18 (Symons et al., 2002).

Semaforiny jsou signální molekuly důležité pro vývoj nervové soustavy a imunitní regulaci. VACV protein **A39** je strukturní i funkční homolog semaforinu Sema7A. Váže se na plexin-C1 na povrchu dendritických buněk a inhibuje tak jejich migraci a fagocytózu vyvolanou chemokiny (Walzer et al., 2005).

### **2.1.3.6 VACV proteiny, které inhibují komplement**

Komplement je důležitou součástí přirozené imunity a tedy i protivirové imunity. Tvoří jej okolo 30 proteinů, a to rozpustných i vázaných na povrch buněk. Funkce komplementu lze aktivovat mnoha způsoby, společná je aktivace C3 konvertázy a následně C5 konvertázy. Produkty štěpení těchto proteolytických enzymů jsou důležité funkční nástroje komplementu, fragment C3a a C5a mají signalizační funkci, fragment C3b opsonizuje patogeny a fragment C5b zajišťuje tvorbu pórů do membrány patogenů.

Bylo ukázáno, že VACV protein **VCP** (VACV complement control protein) inaktivuje C3 a C5 konvertázu (McKenzie et al., 1992) a napomáhá také štěpení a inaktivaci C3B a C4b fragmentů (Sahu et al., 1998). Částice EEV také odolávají komplementu díky obsahu hostitelských proteinů ve vnější membráně (Vanderplasschen et al., 1998).

## **2.2 Typy buněčné smrti**

Typy buněčné smrti lze rozlišovat podle morfologie umírajících buněk nebo podle aktivity enzymů přítomných v umírajících buňkách. Také lze rozlišovat buněčnou smrt programovanou, tedy cílenou, a neprogramovanou, tedy výsledek jakéhosi nedopatření nebo nehody. V roce 2005 byla vytvořena komise, která vydala Doporučení k nomenklatuře typů buněčné smrti (Nomenclature Committee on Cell Death) (Kroemer et al., 2005). Podle tohoto dokumentu se typy buněčné smrti mají definovat podle morfologických kritérií. Molekulární a enzymologické znaky se mají používat pouze pro další charakterizaci buněčné smrti, neboť podle dosavadních znalostí neexistuje ekvivalence mezi strukturními změnami a biochemickými charakteristikami buněčné smrti.



Nejnámější typ programované buněčné smrti - **apoptóza** - byl definován přítomností fragmentace a kondenzace jádra, zakulacováním buňky, přítomností nepoškozených organel, zachováním integrity cytoplasmatické membrány a nakonec rozpadem na apoptotická tělíška (Galluzzi et al., 2007).

**Nekróza** byla definována jako buněčná smrt, při níž se ztrácí integrita cytoplasmatické membrány a buněčný obsah se posléze nekontrolovatelně uvolňuje, což může poškodit okolí buňky a vyvolat zánět. Nekrotické buňky bobtnají, na jejich povrchu se objevují bublinovité útvary ("blebs"). Membránové organely nekrotických buněk (mitochondrie, ER, lysosomy) také bobtnají a ztrácejí svou integritu. Dříve byla nekróza buňky považována za jakousi nehodu, nekontrolovatelný zánik buňky. Objevují se však pozorování, která ukazují, že i buněčná smrt jeví se morfologicky jako nekrotická může být regulována, vyvolána účelově a může být také typem programované buněčné smrti. Ukazuje se, že kináza Rip1 je iniciátorem programované nekrózy. Jako její inhibitor funguje Nec-1 (Necrostatin-1) a kináza Rip3 reguluje aktivitu Rip1. Rip1 a Rip3 mohou být štěpeny kaspázou 8 a tím inaktivovány. Problematika programované nekrózy je shrnuta v přehledném článku (Duprez et al., 2009). Nekrotická smrt buněk byla také pozorována během normálního vývoje organismu, například smrt chondrocytů během vývoje kostí nebo smrt intestinálních buněk (Galluzzi et al., 2007), což ukazuje na to, že tato buněčná smrt byla žádoucí a vyvolaná aktivně.

Nekróza může být také výsledkem nemožnosti proběhnutí apoptózy. Bylo pozorováno na mnoha modelech, že když buňky podstoupí apoptotickou signalizaci a poté mají nedostatek energetických zdrojů, typ buněčné smrti se změní z apoptózy na nekrózu (Borutaite, 2010). V experimentálních podmínkách také probíhala nekróza při vyvolání apoptózy za současné inhibice kaspáz (Galluzzi et al., 2007).

**Pyroptóza** je buněčná smrt podobná nekróze, která je způsobena aktivací kaspázy 1 po infekci některými patogeny (Bergsbaken and Cookson, 2007). Při pyroptóze dochází k vytvoření pórů v cytoplasmatické membráně, k uvolnění buněčného obsahu do okolí a k aktivaci zánětu. Podobně jako při apoptóze dochází při pyroptóze ke kondenzaci a štěpení DNA. Předpokládá se, že pyroptóza jako programovaná buněčná smrt je součástí obranného systému hostitele proti patogenům, protože dochází ke zničení hostitelské buňky a také k aktivaci zánětlivé odpovědi hostitele (Duprez et al., 2009).

Jako další typ programované buněčné smrti se často uvádí **autofagie**. Autofagie je proces důležitý pro obrat proteinů a degradaci poškozených organel. V průběhu autofagie (formálně makroautofagie) je část cytoplasmy s organelami uzavřena do váčku tvořeného dvojistou membránou (autofagosom), který posléze splývá s lysosomy a obsah váčku je

degradován. Průběh autofagie je regulován proteiny z rodiny Atg (autophagy). Známý je protein LC3 (Atg8), který se váže na autofagosomy a je proto používán jako marker probíhající autofagie.

Zdá se, že autofagie není v první řadě proces vedoucí ke smrti, ale naopak k přežití buňky, ačkoli byla pozorována v umírajících buňkách. Autofagie může prodloužit přežití apoptotických buněk (White, 2008). Autofagická buněčná smrt se v současnosti považuje spíše za smrt za účasti autofagie než za smrt způsobenou autofagií. Byly však publikovány případy, kdy inhibice autofagie znamenala i inhibici buněčné smrti (Scarlati et al., 2009).

Je také známa role autofagie v embryonálním vývoji bezobratlých i obratlovců. U bezobratlých má autofagie roli v metamorfóze. V embryonálním vývoji obratlovců funguje autofagie paralelně s apoptózou při remodelaci různých tkání (Di Bartolomeo et al., 2010).

## 2.3 Apoptóza

Apoptóza byla nejdříve popsána na základě morfologických znaků (Kerr et al., 1972) Mezi charakteristické znaky apoptózy patří kondenzace chromatinu, fragmentace jádra, smršťování a kondenzace buněčného obsahu a tvorba apoptotických tělísek. Z biochemického a fyziologického hlediska je apoptóza charakterizována aktivitou exekutorových kaspáz, internukleosomovým štěpením DNA a přítomností fosfatidylserinu na povrchu cytoplasmatické membrány. Zbytky apoptotických buněk jsou *in vivo* fagocytovány makrofágy nebo okolními buňkami díky signálu fosfatidylserinu na povrchu apoptotických buněk. *In vitro* obvykle fagocytóza nenastává a zbytky apoptotických buněk podléhají sekundární nekróze. Při sekundární nekróze se ztrácí integrita cytoplasmatické membrány, která v apoptotických buňkách zůstává zachována.

### 2.3.1 Význam apoptózy

V průběhu embryonálního vývoje je apoptóza nutná pro odstranění nadbytečných struktur a modelování orgánů, například pro vývoj oční čočky, vnitřního ucha, při morfogenezi srdce, při vývoji svalů a tvarování základů prstů. Dalším příkladem jsou neurony, které jsou produkovány v nadbytku a ty, které nezískaly svá synaptická propojení, jsou následně odstraněny. Na těchto událostech se ale podílejí i další typy programované buněčné smrti.

V dospělosti je apoptóza důležitá pro udržení homeostáze organismu, při remodelaci orgánů (prsní žláza po laktaci, folikul po ovulaci) a také je nutná pro vývoj a

fungování imunitního systému. Apoptóza je nezbytná při výběru specificky reagujících lymfocytů, a v neposlední řadě také pro odstranění buněk obsahujících nebezpečné struktury, ať už nádorových nebo infikovaných intracelulárními patogeny (Duprez et al., 2009).

Apoptóza má význam i pro řadu onemocnění. Například vývoj nádorů bývá spojen s poruchami v apoptóze. Naopak zvýšená apoptóza má zřejmě význam při vývoji neurodegenerativních chorob či imunodeficiencí (Alenzi et al., 2010).

### **2.3.2 Aktivace apoptózy**

Impulzem pro aktivaci apoptózy může být vnější (extracelulární) signalizace - vazba ligandů na receptory smrti (TNFR, FasR), která vede k aktivaci vnější dráhy apoptózy. Stejně tak může být prvním impulzem vnitřní signalizace - stres ER, poškození DNA, oxidativní stres nebo poškození dalších organel, které vede k permeabilizaci vnější membrány mitochondrií a aktivaci vnitřní - mitochondriální dráhy apoptózy.

#### **2.3.2.1 Vnější dráha aktivace apoptózy**

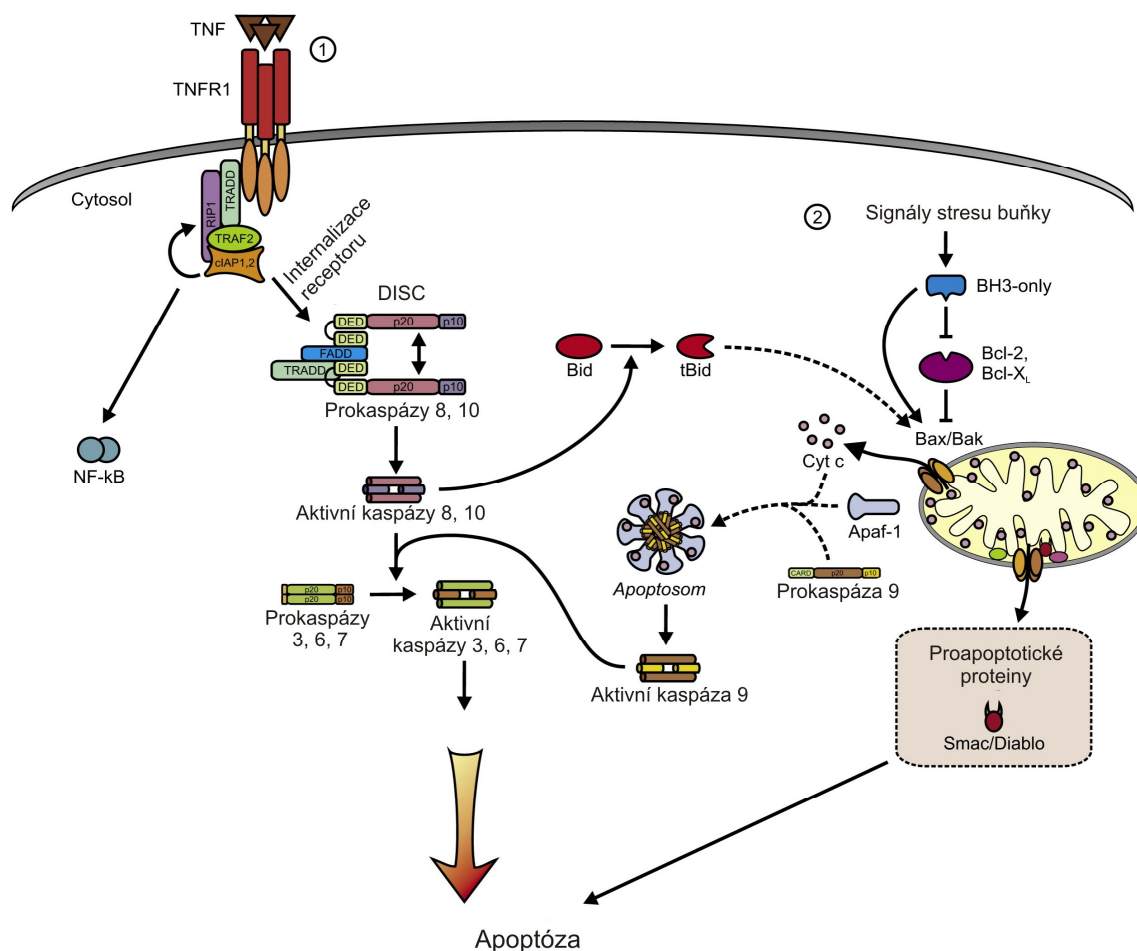
Vnější dráha začíná na receptorech smrti, které patří do rodiny TNF receptorů. Ligandy pro tyto receptory mohou být TNF, TRAIL (tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand), FasL. Po vazbě ligandu nastává oligomerizace receptoru, která vede ke konformačním změnám vnitřní části receptoru a k další signalizaci. K trimernímu receptoru smrti se váže adaptorový protein FADD (Fas-associated death domain) nebo TRADD (TNFR-associated death domain) a díky nim jsou shromážděny a aktivovány kaspázy, především kaspáza 8. Dohromady tyto proteiny tvoří signalizační komplex DISC (death-inducing signalling complex), díky němuž jsou aktivovány kaspázy. Signalizace vedoucí od Fas receptoru probíhá přímo na cytoplasmatické membráně, signalizace vedoucí od TNF receptoru k aktivaci kaspázy 8 je závislá na internalizaci (endocytóze) receptoru po navázání ligandu. Bez internalizace je ustavena odlišná signální dráha, nevzniká komplex DISC a jsou aktivovány MAP (mitogen-activated protein) kinázy a NF- $\kappa$ B (Duprez et al., 2009; Elmore, 2007).

#### **2.3.2.2 Vnitřní dráha aktivace apoptózy**

Signalizace vnitřní dráhy apoptózy začíná uvolněním cytochromu c z mitochondrií. Tento malý protein se váže na protein Apaf-1 (apoptotic peptidase activating factor 1), který se nachází volně v cytoplasmě. Po vazbě cytochromu c dochází ke štěpení ATP navázaného na Apaf-1 na ADP a k následné oligomerizaci Apaf-1, takže výsledkem je

apoptosom - kruhový heptamer Apaf-1 s navázanými molekulami cytochromu c. Na tento apoptosom se vážou molekuly prokaspázy 9 prostřednictvím svojí CARD (caspase recruitment domain) domény a aktivují se zde dimerizací.

Apaf-1 obsahuje N-koncovou CARD doménu, která má za úkol interagovat s CARD doménou kaspázy 9. Další doménou Apaf-1 jsou WD-40 repetice, které interagují s cytochromem c. Důležitá je také NB-ARC oblast, která umožní oligomerizaci Apaf-1 a má také ATP-ázovou aktivitu, takže váže ATP/ADP a katalyzuje jeho štěpení (Riedl and Salvesen, 2007).



**Obr. 2. Schéma signalizace vnější a vnitřní dráhy apoptózy. (1) Vnější dráha aktivace apoptózy.** Signalizace vnější dráhy začíná například na TNF receptoru. Na membráně se tvoří komplex, který aktivuje transkripční faktor NF- $\kappa$ B. Po internalizaci receptoru se formuje komplex, ve kterém je aktivována kaspáza 8/10. Následná aktivace exekutorových kaspáz vede ke štěpení substrátů smrti a apoptóze. **(2) Vnitřní dráha aktivace apoptózy** je aktivována na úrovni mitochondrií následkem stresu buňky. Aktivace proteinů Bax a Bak vede k uvolnění řady mediátorů apoptózy z mitochondrií. Díky uvolnění cytochromu c se formuje apoptosom, který aktivuje kaspázu 9. Štěpení proteinu Bid kaspázou 9 amplifikuje apoptotickou signalizaci vnější dráhy aktivací vnitřní dráhy. Upraveno podle (Duprez et al., 2009).

Vnější a vnitřní dráha aktivace apoptózy jsou spolu propojeny několika způsoby. Kaspáza 8 může štěpit Bid, produkt tohoto štěpení tBid poté aktivuje permeabilizaci mitochondriální membrány (Li et al., 1998). Naopak kaspáza 8 může být aktivována exekutorovou kaspázou 6 nezávisle na komplexu DISC, tedy při aktivaci vnitřní dráhy apoptózy po uvolnění cytochromu c z mitochondrií (Cowling and Downward, 2002).

### **2.3.2.3 Apoptóza a p53**

Poškození DNA vede k aktivaci proteinu p53, který je známý také jako důležitý antionkogen. Tento protein působí jako transkripční faktor pro řadu genů, jejichž produkty se účastní zastavení buněčného cyklu a senescence (exprese a aktivace genů p21, PML), opravných mechanismů DNA a také apoptózy. Při nižší úrovni stresu spojeného s poškozením DNA je navozeno zastavení buněčného cyklu a aktivovány opravné mechanismy reparace DNA. Také dochází k expresi antioxidantních genů (Sestrin1 a 2, Gpx1, Tigar) a genů účastnících se aktivace autofagie, což zřejmě vede k přežití poškozených buněk (Brady and Attardi, 2011). Při vyšší úrovni stresu a poškození DNA však dochází k aktivaci apoptózy. p53 zvyšuje expresi receptorů smrti, proapoptotických členů Bcl-2 rodiny (Bax, Puma, Noxa) a dalších proapoptotických proteinů. Také se přímo podílí na aktivaci proteinů Bax a Bak (Chipuk et al., 2004; Leu et al., 2004) a zřejmě i na permeabilizaci mitochondriální membrány (Wolff et al., 2008).

Aktivace transkripčního faktoru p53 probíhá odstraněním jeho inhibitoru Mdm2 z komplexu, v němž Mdm2 brání transkripční funkci p53. Mdm2 působí také jako E3 ubiquitin ligáza, takže v normálních podmínkách udržuje nízkou hladinu p53 tím, že ubiquitinylací determinuje p53 k degradaci (Brady and Attardi, 2011).

### **2.3.2.4 Indukce apoptózy granzymy**

Cytotoxické T-lymfocyty (CTL) indukují apoptózu u cílových buněk (nádorových nebo virem infikovaných) jednak pomocí Fas ligandu, jednak díky perforinům a proteázovému působení tzv. granzymů obsažených v cytoplasmatických granulích CTL. Po rozeznání cílové buňky dojde k exocytóze granulí z CTL. Perforiny vytvoří póry v membráně cílových buněk a obsah granulí se tak dostane do cílových buněk. Granzyme B zde štěpí a aktivuje např. kaspázu 10, kaspázu 3 a protein Bid, čímž aktivuje vnější i vnitřní dráhu apoptózy. Granzyme A se podílí na štěpení jaderné DNA (Elmore, 2007).

### 2.3.2.5 Stres ER

K signalizaci vedoucí k apoptóze může vést také stres endoplasmatického retikula (ER). ER je místem syntézy, skládání a úprav secernovaných, membránově vázaných a některých organelově specifických proteinů. Pro správné fungování ER je nutný dostatek ATP, optimální koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  a oxidační prostředí uvnitř ER. Proto je ER velmi citlivé na změny energetického a redoxního stavu buňky a na změny v hladinách  $\text{Ca}^{2+}$ . Tyto disturbance mohou snadno způsobit snížení kapacity úprav proteinů v ER, což vede k akumulaci a agregaci neupravených proteinů a vyvolává stres ER, který se také označuje jako UPR ("unfolded protein response"). Tato reakce je zprostředkována třemi transmembránovými ER proteiny - PERK (pancreatic ER kinase-like kinase), ATF6 (activating transcription factor 6) a IRE1 (inositol-requiring enzyme 1). Tyto proteiny jsou za normálních podmínek udržovány v neaktivním stavu asociací s chaperonovým proteinem GRP78/BiP (glucose-regulated protein 18 /binding protein). Reakce UPR vede obvykle ke snížení akumulace proteinových agregátů a k přežití buňky prostřednictvím snížení globální translace a zvýšení exprese proteinů spojených s metabolismem aminokyselin, oxidativním stresem, s chaperonovou funkcí a s degradací proteinů. Pokud však zlepšení situace není možné, dojde k přepnutí signalizace na proapoptotickou a k aktivaci apoptózy (Szegezdi et al., 2006).

ER slouží také jako hlavní úložiště  $\text{Ca}^{2+}$  v buňce. Uvolnění této zásoby slouží jako signalizace apoptózy následkem mnoha stimulů, například ER stresu či oxidativního stresu. Zvýšení hladiny  $\text{Ca}^{2+}$  v cytosolu může vést k aktivaci kalpainu a kalcineurinu. Proteáza kalpain může štěpit a aktivovat proapoptotické proteiny Bax, Bid a kaspázu 12 a naopak inaktivovat Bcl-2 a Bcl-xL. Nejznámější jsou dvě formy kalpainu,  $\mu$ -kalpain a m-kalpain, které jsou aktivovány mikro nebo milimolárními koncentracemi  $\text{Ca}^{2+}$ . Fosfatáza kalcineurin může aktivovat defosforylací proapoptotický Bad (Heath-Engel et al., 2008). Ionty jsou po uvolnění z ER převedeny do mitochondrií, kde mohou přispět k mobilizaci cytochromu c vázaného na cardiolipin (Petrosillo et al., 2004).

Stres ER může být regulován členy Bcl-2 rodiny, tyto proteiny bývají často lokalizovány v ER a mají vliv na uvolnění  $\text{Ca}^{2+}$  z ER (Heath-Engel et al., 2008). Antiapoptotické proteiny Bcl-2 a Bcl-xL lokalizované v ER mohou zabránit apoptóze vyvolané stresem ER (Bhatt et al., 2008), naproti tomu Bax a Bak a některé "BH3-only" proteiny mohou svojí lokalizací do ER spustit proapoptotickou signalizaci (Puthalakath et al., 2007; Zong et al., 2003).

Iniciátorové kaspázy asociované s ER jsou u myši kaspáza 12 a u člověka kaspáza 4. Obě mohou díky svojí aktivitě aktivovat kaspázu 9 nebo 3, což vede k apoptóze mechanismem nezávislým na mitochondriích (Hitomi et al., 2004a; Morishima et al., 2002). Kaspáza 12 je lokalizována v ER a bylo ukázáno, že její delece chrání před apoptózou způsobenou ER stresem (Nakagawa et al., 2000). Její aktivace při ER stresu způsobovala aktivitu dalších kaspáz (Hitomi et al., 2004b; Nakagawa et al., 2000). Kaspáza 12 je schopna štěpit sama sebe, toto štěpení však nestačí pro aktivaci apoptózy (Roy et al., 2008). Efektivní aktivaci kaspázy 12 může navodit štěpení kalpainem (Nakagawa and Yuan, 2000). Tato proteáza je aktivována zvýšením hladiny  $Ca^{2+}$  iontů, které nastává také při stresu ER. Bylo ukázáno, že štěpení kaspázy 12 je blokováno při deficienci kalpainu i při chelataci  $Ca^{2+}$  (Sanges and Marigo, 2006; Tan et al., 2006). Kaspáza 12 může být zřejmě štěpena také kaspázou 7 (Martinez et al., 2010). Kaspáza 12 u člověka je zřejmě enzymaticky neaktivní a má význam v regulaci imunitní odpovědi, viz kap. 2.3.3.2).

Lidská kaspáza 4 je částečně lokalizována v ER a je selektivně aktivována vlivem ER stresu (Hitomi et al., 2004a). Její role v signalizaci apoptózy spojené se stresem ER byla ukázána v několika pracech (Jiang et al., 2007; Lopez-Anton et al., 2006; Nawrocki et al., 2005). Kaspáza 4 také pro svoji aktivaci musí podstoupit dimerizaci a štěpení a podobně jako kaspáza 12 může být štěpena kalpainem (Heath-Engel et al., 2008).

Signalizace apoptózy způsobené ER stresem může probíhat také přes mitochondriální dráhu částečně nebo zcela nezávisle na kaspáze 12 nebo 4 (Obeng and Boise, 2005). Stres ER může vyvolat uvolnění cytochromu c z mitochondrií a aktivaci kaspázy 9. Nefunkční Apaf-1 či inhibice permeabilizace mitochondriální membrány může zabránit apoptóze vyvolané stresem ER (Heath-Engel et al., 2008).

#### **2.3.2.6 Apoptóza a lysosomy**

K aktivaci apoptózy mohou přispívat také lysosomální proteázy kathepsiny. S aktivací buněčné smrti jsou asociovány cysteinové kathepsiny a aspartátový kathepsin D. K účasti těchto proteáz na signalizaci buněčné smrti může dojít pouze po destabilizaci lysosomálních membrán například pomocí nízké koncentrace ROS. Této destabilizaci brání několik proteinů, například Hsp70 (heat shock protein 70) nebo Lamp1 a 2 (lysosome-associated membrane protein). Vysoká úroveň stresu může vést k úplnému rozpadu lysosomů a nekróze buňky, zatímco nízká úroveň stresu vede k uvolnění některých lysosomálních proteáz a aktivaci apoptózy.

Mechanismus aktivace apoptózy lysosomálními kathepsiny může vést například přes štěpení Bid nebo přes degradaci antiapoptotických členů Bcl-2 rodiny. Kathepsiny mohou také degradovat proteiny rodiny IAP (Inhibitor of apoptosis protein, kap. 2.3.3.3) a tak uvolnit aktivní kaspázy. Bylo ukázáno také štěpení kaspázy 8 kathepsinem D (shrnutí v (Repnik and Turk)).

### 2.3.3 Kaspázy

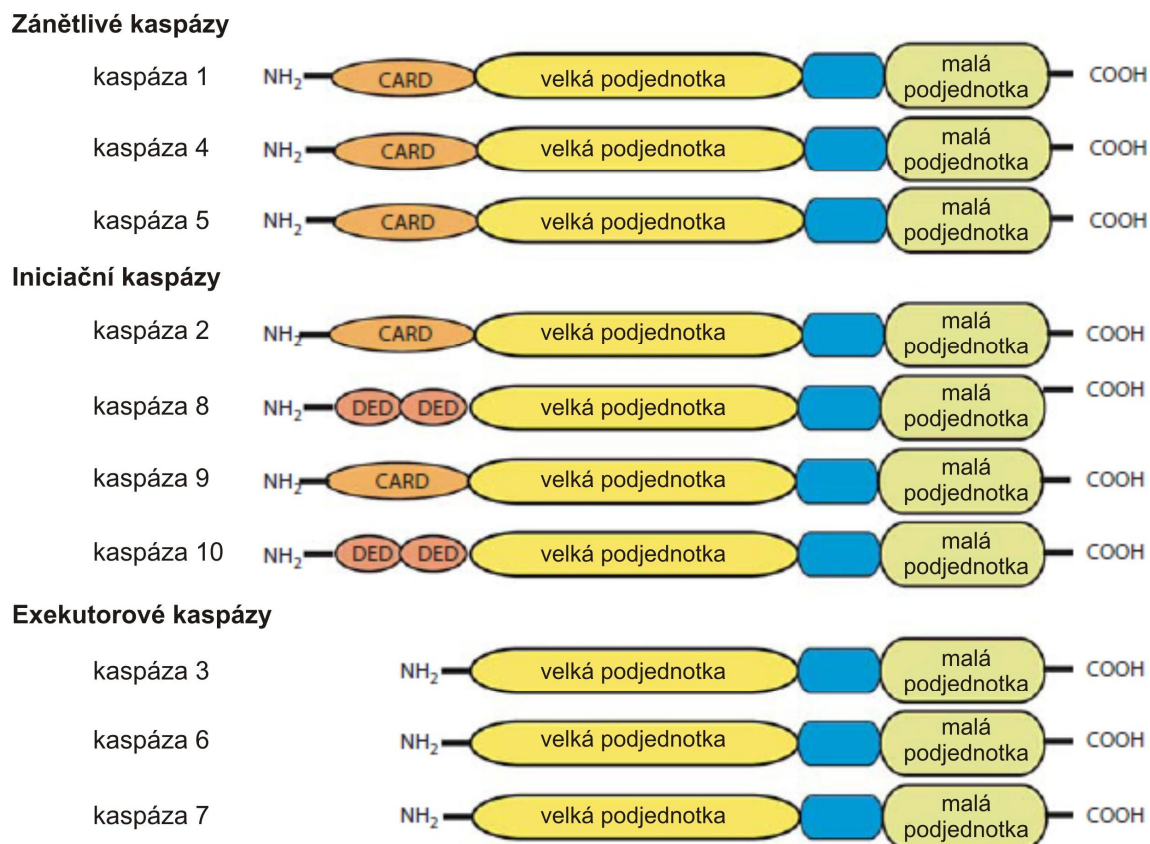
Důležitou událostí v průběhu apoptózy je aktivace kaspáz. Kaspázy jsou cysteinové proteázy, které jsou aktivovány štěpením a dimerizací. Aktivní kaspázy štěpí své substráty v místě za aspartátovým zbytkem (odtud také jejich označení - "cysteine-dependent aspartate specific protease"). Jsou to proteázy signalizační, nikoli degradační, štěpí velmi specifické sekvence buněčných proteinů, čímž proteiny modifikují, nikoli destruuji.

Kaspázy jsou exprimovány jako proenzymy (zymogeny), které se stanou aktivními enzymy teprve po dimerizaci a obvykle i po štěpení. Výsledný aktivní enzym je tedy obvykle heterotetramer obsahující dvě velké a dvě malé podjednotky. Aktivní místo enzymu je tvořeno velkou i malou podjednotkou. Prokaspázy obsahují prodoménu, a to krátkou (kaspáza 3, 6 a 7) nebo dlouhou (kaspáza 2, 4, 5, 8, 9, 10). Tato dlouhá prodoména obsahuje 2 domény DED (death effector domain) u kaspázy 8 a 10 nebo doménu CARD u kaspázy 2 a 9 a také u zánětlivých kaspáz 1, 4, 5 a 12. Pomocí těchto domén kaspázy interagují se svými aktivátory: pomocí DED domén s komplexem aktivovaných receptorů smrti (DISC), pomocí CARD domény s apoptosomem nebo inflamasomem (Yazdi et al., 2010). Struktura prokaspáz a jejich domén je znázorněna na obr. 3.

U savců bylo identifikováno 14 kaspáz, které se podle funkce dělí na zánětlivé a apoptotické kaspázy. Zánětlivé kaspázy se účastní maturace cytokinů. Patří mezi ně kaspáza 1, 4, 5 a zřejmě i kaspáza 12, a také produkty genů kódujících nefunkční kaspázy, které zřejmě funkci zánětlivých kaspáz regulují vazbou přes CARD doménu. Apoptotické kaspázy se dělí na kaspázy iniciační a exekutorové. Iniciační kaspázy přijímají první proapoptotické signály, jsou jimi aktivovány a dále svým štěpením aktivují exekutorové kaspázy. Kaspázy 8 nebo 10 jsou aktivovány po vazbě ligandu na receptory smrti a účastní se tak aktivace vnější dráhy apoptózy. Kaspáza 9 je aktivována po uvolnění proapoptotických signálů z mitochondrií a účastní se tak aktivace vnitřní dráhy apoptózy. Iniciační kaspázy poté štěpí exekutorové kaspázy 3, 6 nebo 7. Tyto kaspázy se štěpením aktivují a poté specificky štěpí řadu proteinů, které se díky tomu označují jako substráty smrti. Štěpení exekutorovými kaspázami tak odstartuje procesy, které vedou



k morfologické manifestaci apoptózy a k provedení programované buněčné smrti (kap. 2.3.5) (Chowdhury et al., 2008).



**Obr. 3. Schéma struktury prokaspáz.** Jednotlivé skupiny prokaspáz se liší přítomností prodomény. U exekutorových kaspáz prodoména chybí, u zánětlivých kaspáz prodoména představuje CARD doména, u iničiačních kaspáz prodoména obsahuje CARD doménu nebo dvě DED domény. Upraveno podle (Yazdi et al., 2010).

Exekutorové kaspázy se vyskytují jako konstitutivní dimery, i když nejsou aktivní, i jako prokaspázy. Tyto zymogeny jsou aktivovány štěpením v alespoň jedné molekule prokaspázy z dimeru. Tato aktivace je poté nevratná a exekutorová kaspáza štěpí své substráty, dokud není odstraněna (degradována) nebo inhibována (např. proteinem XIAP, kap. 2.3.3.3) (Riedl and Salvesen, 2007).

Iničiační kaspázy se naopak vyskytují ve své neaktivní formě jako monomery a jsou aktivovány dimerizací. Bylo ukázáno, že kaspáza 9 potřebuje pro svou aktivaci podstoupit dimerizaci, nikoli štěpení (Renatus et al., 2001). Tato aktivace je reverzibilní, takže systém je citlivý na koncentraci faktorů vyvolávajících apoptózu. Kaspáza 8 však zřejmě po dimerizaci musí podstoupit následné autokatalytické štěpení, aby byla plně aktivována (Keller et al., 2009). Nutným předpokladem aktivace kaspázy 8 je však také její dimerizace.

### 2.3.3.1 Kaspáza 2

Kaspáza 2 je silně konzervovanou kaspázou a její exprese byla detekována v mnoha tkáních. Bohužel o její funkci dosud nemáme příliš jasnou představu, protože fakta o kaspáze 2 platí většinou pouze pro určitý experimentální systém. Kaspáza 2 sdílí sekvenční homologii s iniciátorovými kaspázami, ale její enzymová specifita se blíží spíše exekutorovým kaspázám. Prokaspáza 2 byla detekována v cytoplasmě i v jádře různých buněčných linií a v některých případech i v ER a v Golgiho systému. Byla popsána aktivita kaspázy 2 při stresu ER i při poškození DNA a její signalizace vedoucí k apoptóze následkem těchto stimulů (Cao et al., 2008; Upton et al., 2008). Myši defektní v genu pro kaspázu 2 vykazovaly některé poruchy související se zrychleným stárnutím a buněčné linie pocházející z těchto myší byly odolnější vůči vyvolání apoptózy některými genotoxickými stimuly (Zhang et al., 2007). Některé buněčné linie měly také porušenou funkci proteinu p53 (Vakifahmetoglu et al., 2006).

Aktivace kaspázy 2 zřejmě probíhá dimerizací a následným štěpením podobně jako u kaspázy 8. CARD doména kaspázy 2 dovoluje vazbu k různým adaptorovým proteinům, které mohou mít vliv na aktivaci kaspázy 2. Bylo zjištěno, že kaspáza 2 je součástí komplexu PIDDosomu, který se dále skládá z proteinů PIDD (p53-induced protein with a death domain) a RAIDD (Rip-associated ICH-1 homologous protein with a death domain) (Tinel and Tschopp, 2004). Aktivace kaspázy 2 tímto komplexem zřejmě zprostředkuje apoptotickou signalizaci p53 proteinu jako odpověď na poškození DNA. Protein PIDD přitom může existovat ve dvou různých formách, které se liší štěpením na jeho C-konci. Jedna z těchto forem je přítomna v normálních buňkách a při spuštění opravných mechanismů DNA, druhá forma je přítomna při silném poškození DNA, asociuje s RAIDD a kaspázou 2 a zřejmě signalizuje aktivaci apoptózy. Bylo také pozorováno, že kaspáza 2 je součástí signálního komplexu TNF receptoru spolu s Rip1 a TRADD a také aktivace kaspázy 2 při apoptóze vyvolané signalizací tohoto receptoru (Guicciardi et al., 2005). V jádře byla kaspáza 2 detekována jako součást částic PML-NB (promyelocytic leukaemia protein nuclear bodies) (Tang et al., 2005). Tyto částice mají význam v regulaci mnoha buněčných dějů, například apoptózy nebo reparace DNA. Byla navržena také role kaspázy 2 v regulaci buněčného cyklu a jako tumor supresor a také role v regulaci opravných mechanismů DNA a v udržení integrity telomer. V neposlední řadě byla pozorována nižší aktivace kaspázy 1 v makrofázích defektních v genu pro kaspázu 2 (Jesenberger et al., 2000). Díky tomu lze předpokládat, že kaspáza 2 by mohla mít vliv na aktivitu inflamasyonu. Současný stav znalostí o kaspáze 2 je shrnut v přehledných člácích

(Kitevska et al., 2009; Krumschnabel et al., 2009; Vakifahmetoglu-Norberg and Zhivotovsky, 2010).

### 2.3.3.2 Zánětlivé kaspázy

Zánětlivé kaspázy mají význam pro přirozenou imunitu. U člověka mezi zánětlivé kaspázy počítáme kaspázu 1, 4, 5 a 12, u myši kaspázu 1, 11 a 12. Kaspáza 1 (a zřejmě i ostatní zánětlivé kaspázy) je aktivována pomocí proteinového komplexu inflamasomu, který je indukován díky stimulům mikrobiálního, chemického nebo endogenního původu. Inflamasom se skládá ze 3 komponent: z receptoru, adaptorového proteinu a prokaspázy 1. Receptory, například proteiny z rodiny NLR, přenášejí širokou škálu signálů nebezpečí či poškození buňky, není však známo, jakým mechanismem. Adaptorový protein je většinou protein ASC (apoptosis speck-like protein), který váže prokaspázu 1 díky svojí CARD doméně. Interakce inflamasomu a prokaspázy 1 vede k její dimerizaci a autokatalytickému štěpení, výsledkem je aktivní kaspáza 1 (Yazdi et al., 2010). Aktivace kaspázy 1 vede k produkci cytokinů IL-1 $\beta$  i IL-18, čímž aktivuje zánětlivou odpověď.

Inhibice kaspázy 1 se děje pomocí proteinů COP (CARD only protein), INCA (inhibitory CARD) 1 a 2 a ICEBERG, které obsahují CARD doménu. Tyto proteiny se díky interakci CARD domén vážou na prokaspázu 1 a brání její aktivaci. Podobně zřejmě působí i kaspáza 12. Protein POP1 a POP2 (pyrin only protein) naopak interagují s proteinem ASC a s některými NLR, čímž inhibují sestavení inflamasomu a tím i aktivaci kaspázy 1 (Yazdi et al., 2010).

Myší kaspáza 12 a lidská kaspáza 4 mají zřejmě význam v signalizaci apoptózy způsobené stresem ER (více v kap. 2.3.2.5). Lidská kaspáza 12 má naopak zřejmě význam v regulaci imunitní odpovědi. Gen pro kaspázu 12 u člověka obsahuje bodovou mutaci, která generuje stop kodon a produkt tohoto genu obsahuje pouze CARD doménu. Mutace produkující inaktivní kaspázu 12 se zřejmě rozšířila v lidské populaci díky pozitivní selekci před 60 000 až 100 000 lety (Xue et al., 2006), gen pro kaspázu 12 u šimpanze kóduje aktivní enzym (Martinon and Tschopp, 2007). Produktem nemutovaného genu u člověka je kaspáza 12 plné délky, která je však zřejmě enzymaticky neaktivní (Saleh et al., 2004), tato varianta genu je však omezena pouze na část populace afrického původu. Nositelé genu kódujícího kratší formu kaspázy 12 jsou odolnější vůči sepsi (Saleh et al., 2004). U myši bylo také ukázáno, že inaktivace kaspázy 12 vede k efektivnější imunitní odpovědi na bakteriální infekci a větší odolnosti vůči sepsi (LeBlanc et al., 2008; Saleh et al., 2006). Kaspáza 12, a u člověka její varianta plné délky, tedy zřejmě blokuje aktivaci kaspázy 1 a tím i produkci IL-1 $\beta$ . Bylo také ukázáno, že kaspáza 12 negativně ovlivňuje

imunitní odpověď pomocí dráhy NF- $\kappa$ B (Labbe et al., 2010). Naopak byla ukázána pozitivní role kaspázy 12 v antivirové odpovědi při infekci West Nile virem (Wang et al., 2010).

### 2.3.3.3 Buněčné inhibitory kaspáz

Aktivace apoptózy je regulována také přirozenými inhibitory kaspáz - rodinou molekul IAP (Inhibitor of apoptosis protein). Nejznámějším zástupcem je XIAP (X-linked IAP). Tento cytoplasmatický protein funguje jako účinný inhibitor apoptózy. Inhibuje aktivitu kaspáz 3 a 7 tím, že blokuje jejich aktivní místo (Riedl et al., 2001). Dále inhibuje aktivaci kaspázy 9 tím, že brání její dimerizaci (Sun et al., 2000). Dalšími zástupci jsou proteiny cIAP1 a cIAP2. Mechanismus inhibice apoptózy těmito proteiny je zřejmě nepřímý, předpokládá se, že mohou vázat protein Smac/Diablo, čímž zvýší počet molekul XIAP dostupný pro inhibici kaspáz. Dále mohou mít vliv na signalizaci NF- $\kappa$ B a MAP kináz nebo posílit ubiquitylaci kaspáz a tím jejich degradaci (Vaux and Silke, 2005).

Další buněčný inhibitor kaspáz c-Flip (cellular Flice (FADD-like IL-1 $\beta$ -converting enzyme) inhibitory protein; má však řadu dalších označení) vykazuje homologii s kaspázami 8 a 10. Tento protein inhibuje vazbu kaspáz 8 a 10 ke komplexu DISC signalizujícímu u receptorů smrti a tím brání jejich aktivaci (Rasper et al., 1998).

### 2.3.4 Mitochondrie a rodina Bcl-2 proteinů

Vnitřní neboli mitochondriální dráha aktivace apoptózy je aktivována řadou stimulů jako je tepelný šok, ER stres, poškození DNA, UV záření, nedostatek růstových faktorů, vliv chemoterapeutik a další (Pradelli et al., 2010). Tyto stimuly vedou k permeabilizaci vnější mitochondriální membrány a k uvolnění proapoptotických faktorů z mitochondrií. Tato událost je provázena ztrátou mitochondriálního potenciálu, zastavením procesu oxidativní fosforylace a zvýšenou tvorbou kyslíkových radikálů (Borutaite, 2010). Mitochondriální proapoptotické faktory zahrnují cytochrom c, Smac/Diablo (second mitochondria-derived activator/direct IAP-binding protein with low pI), EndoG, Omi/Htr2A (high temperature requirement protein 2) a AIF (apoptosis-inducing factor).

Mitochondrie však mají širší vliv na regulaci buněčné smrti. Kromě uvolnění proapoptotických faktorů při permeabilizaci mitochondriální membrány mohou vyslat impulz vedoucí ke smrti také ovlivněním rovnováhy cytosolárních vápníkových iontů, mohou produkovat kyslíkové nebo dusíkové radikály a mají také přímý vliv na dostupnost energetických zdrojů (ATP) (Borutaite, 2010).

Integrita mitochondrií je kontrolována členy Bcl-2 rodiny. Tyto proteiny sdílejí BH (Bcl-2 homology) domény a mají význam v indukci či inhibici apoptózy. Rodinu Bcl-2 proteinů můžeme rozdělit na antiapoptotické členy (Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, Mcl-1), multidoménové proapoptotické členy (Bax, Bak, Bok) a proapoptotické členy obsahující pouze BH3 doménu ("BH3-only" proteiny, Bid, Bad, Bim, Bmf, Puma, Noxa, Nbk/Bik). Bax se nachází v cytoplasmě buněk jako neaktivní monomer a po aktivaci proapoptotickým stimulem podstoupí konformační změnu a přesunuje se do membrány mitochondrií. Naopak Bak se nachází konstitutivně ve vnější mitochondriální membráně. Po aktivaci Bax i Bak tvoří homooligomery, jejichž formace vede k uvolnění proapoptotických faktorů z mitochondrií. Proapoptotický stimul je přenášen do mitochondrií především pomocí "BH3-only" proteinů, které vážou a aktivují Bax a Bak nebo vážou a inaktivují antiapoptotické členy Bcl-2 rodiny. Aktivace "BH3-only" proteinů probíhá různými způsoby. Cytoplasmatický protein Bid potřebuje pro svou aktivaci štěpení specifickými proteázami (např. kaspáza 8, kaspáza 3, granzyme B, kalpain, kathepsin D), jehož produktem je tzv. tBid (truncated Bid). Proteiny Puma a Noxa jsou transkripčně regulovány proteinem p53 a protein Bim zase faktorem FOXO3A (Pradelli et al., 2010). Proteiny Bim a Bad jsou aktivovány defosforylací (Repnik and Turk). Antiapoptotičtí členové mohou tvořit heterodimery s proapoptotickými členy a tím brání jejich účinku. Stabilita mitochondrií je tak zřejmě výsledkem křehké rovnováhy mezi pro- a antiapoptotickými členy Bcl-2 rodiny, tato rovnováha je narušena aktivací "BH3-only" členů proapoptotickými stimuly.

Samotné uvolnění proapoptotických faktorů z mitochondrií se může odehrát dvěma mechanismy. Podle jedné teorie Bax a Bak oligomery přímo vytvoří póry do vnější mitochondriální membrány. Podle jiné teorie Bax a Bak pouze umožní otevření již existujících pórů tvořených jinými proteiny. Předpokládá se, že ve vnější mitochondriální membráně existují kanály, které mohou způsobit její permeabilizaci. Příkladem je VDAC (voltage-dependent anion channel), který transportuje ATP a ADP. Bylo popsáno, že VDAC interaguje s členy Bcl-2 rodiny (Kroemer et al., 2007). Existuje také model, podle něhož dochází k permeabilizaci obou mitochondriálních membrán při vytvoření proteinového komplexu PTP (permeability transition pore), který zahrnuje VDAC ve vnější membráně, ANT (adenine nucleotide translocase) ve vnitřní membráně a cyklophilin D v matrix mitochondrií. Bylo však ukázáno, že molekuly VDAC a ANT nejsou nutné pro otevření pórů v mitochondriích, složení komplexu PTP je tedy stále nejasné (Borutaite, 2010). Dalším možným mechanismem permeabilizace mitochondrií je tvorba kanálů díky sfingolipidu ceramidu (Siskind, 2005). Ceramidy mohou být

generovány neutrální sfingomyelinázou, která je aktivována TNF receptorem 1 (Philipp et al., 2010).

Uvolnění cytochromu c z prostoru mezi vnější a vnitřní membránou je komplikováno faktem, že velká část cytochromu c je zde asociována v komplexu s kardiolipinem, což je lipid vnitřní mitochondriální membrány. Po peroxidaci kardiolipinu působením ROS je cytochrom c z komplexu uvolněn (Repnik and Turk). Cytochrom c se také nachází v záhybech mitochondriálních krist, které jsou od vnějšího prostoru odděleny komplexem proteinů Opa1 (optic atrophy type 1). K remodelaci krist a uvolnění cytochromu c dojde po interakci Opa1 a proteinů Bax či Bak (Yamaguchi et al., 2008). Cytochrom c se může vyskytovat v oxidované a redukované formě, přičemž fyziologicky je převážná část cytochromu c v mitochondriích v oxidované formě. Existují konfliktní data ukazující, že proapoptotický účinek má pouze oxidovaná forma nebo obě formy cytochromu c (Borutaite, 2010). Cytochrom c také po uvolnění z mitochondrií způsobuje oxidaci lipidu fosfatidylserinu, který je poté translokován z vnitřního do vnějšího listu cytoplasmatické membrány a působí zde jako signál pro fagocytózu apoptotických buněk (Bayir et al., 2006).

Morfologie mitochondrií se při apoptóze drasticky mění. Při uvolnění cytochromu c byl pozorován rozpad síťovité struktury mitochondrií a výsledkem byly malé bodovité mitochondrie (Lee et al., 2004). Proteiny Bax a Bak však mohou způsobit rozpad mitochondrií i bez uvolnění cytochromu c a bez probíhající apoptózy (Sheridan et al., 2008). Také bylo pozorováno uvolnění cytochromu c z mitochondrií bez morfologických změn (Sheridan et al., 2008). Bylo změřeno, že morfologický rozpad mitochondrií nastává následně asi 10 minut po uvolnění cytochromu c (Arnoult et al., 2005). Rozpad mitochondrií je zřejmě následkem permeabilizace mitochondriální membrány a událostí s ní spojených a zřejmě nehraje v signalizaci apoptózy důležitou roli. Naopak se zdá, že proteiny Bcl-2 rodiny jsou důležité pro morfologii a dynamiku mitochondrií (Sheridan and Martin, 2010).

Z mitochondrií je uvolňována řada proapoptotických proteinů, například Smac/Diablo. Tento protein se váže na inhibitor kaspáz XIAP a další členy rodiny IAP a tím uvolňuje již inhibované kaspázy a umožňuje jejich aktivitu (Verhagen and Vaux, 2002). Podobně funguje také serinová proteáza Omi/HtrA2. Kromě vazby a degradace členů rodiny IAP může zřejmě tato proteáza působit proapoptoticky i díky své proteázové aktivitě. Je však známo jen málo substrátů podléhajících štěpení touto proteázou (Hail et al., 2006). Proteiny IAP rodiny jsou zřejmě inhibovány řadou dalších faktorů uvolňovaných z mitochondrií (Verhagen et al., 2007).

EndoG je endonukleáza, která je po uvolnění z mitochondrií translokována do jádra a indukuje zde fragmentaci DNA. Protein AIF funguje podobně, v jádře tvoří komplex spolu s proteiny EndoG a Cyklophilin A. Tento komplex degraduje DNA nezávisle na aktivaci kaspáz (Cande et al., 2004). Má se za to, že tyto proteiny uvolněné z mitochondrií mohou způsobit programovanou buněčnou smrt nezávisle na kaspázách.

### 2.3.5 Substráty smrti

Mezi substráty smrti patří cytoskeletární a jaderné proteiny, které jsou kritické pro udržení struktury buňky, dále enzymy účastníci se metabolismu a oprav poškozených struktur (např. DNA), regulátory buněčného cyklu a další. Znamé cíle exekutorových kaspáz jsou například cytoskeletární proteiny jako aktin nebo keratiny a jaderné laminy, enzymy účastníci se syntézy a oprav DNA jako topoisomerázy nebo PARP (poly (ADP-ribose polymerase), signalizační proteiny jako I $\kappa$ B- $\alpha$ , různé kinázy, fosfolipáza A2. Štěpení a dezintegrace cytoskeletu způsobuje zakulacování buněk a zánik jejich adheze. Cytoskelet je narušen také štěpením gelsolinu, proteinu, který se váže na aktinová vlákna a způsobuje jejich zlomy. Štěpení kaspázami generuje konstitutivně aktivní fragment gelsolinu. Degradace laminů ve výsledku způsobí kondenzaci chromatinu a fragmentaci jádra (Alenzi et al., 2010). Přímý vliv na průběh apoptózy má štěpení antiapoptotických členů Bcl-2 rodiny nebo štěpení inhibitoru kaspázami aktivované DNázy (CAD, caspase-activated DNase), která poté štěpí chromosomální DNA mezi nukleosomy (Enari et al., 1998).

PARP je jaderný enzym, který signalizuje poškození DNA syntézou polyadenylátů, přičemž používá jako substrát NAD<sup>+</sup>. PARP je štěpen exekutorovými kaspázami, čímž je zřejmě urychlena apoptotická fragmentace a kondenzace DNA. Předpokládá se také, že inaktivací PARP štěpením kaspázami je cíleně zabráněno spotřebování NAD<sup>+</sup> a potažmo ATP. Tím je zachován dostatek energetických zdrojů pro dokončení apoptózy (Herceg and Wang, 2001).

### 2.3.6 VACV proteiny, které inhibují apoptózu

VACV inhibuje vnější dráhu apoptózy díky ireverzibilní inhibici kaspázy 8 proteinem **SPI-2** (produkt genu **B13R**, homolog proteinu CrmA cowpox viru). Tento protein působí také jako účinný inhibitor kaspázy 1 a proteázy Granzyme B (Dobbelstein and Shenk, 1996; Macen et al., 1998; Turner et al., 2000). Mitochondriální dráha aktivace apoptózy je inhibována VACV proteiny F1L a N1L. Protein **F1L** je lokalizován v mitochondriích, kde váže a inhibuje proapoptotické členy Bcl-2 rodiny Bim, Bax a Bak.

Brání tak změnám permeability mitochondriální membrány a uvolnění proapoptotických faktorů z mitochondrií (Stewart et al., 2005; Taylor et al., 2006; Wasilenko et al., 2005). F1L však také přímo inhibuje kaspázu 9 (Zhai et al., 2010). VACV protein **N1L** má sekundární a terciární strukturu podobnou Bcl-2 proteinům, přestože postrádá sekvenční homologii s Bcl-2 rodinou. Tento protein interaguje s proapoptotickými členy Bcl-2 rodiny - Bid, Bad, Bak a Bax (Cooray et al., 2007). Byl popsán také VACV protein **GAAP** (Golgi anti-apoptotic protein), který je lokalizován v Golgiho systému a má význam pro inhibici apoptózy infikovaných buněk. VACV bez tohoto genu má in vivo nižší virulenci. Homology GAAP byly nalezeny také u řady eukaryotických organismů (Gubser et al., 2007). Apoptóze infikovaných buněk brání také proteiny E3l a K3L popsané výše a nepřímou také další proteiny interagující s imunitním systémem hostitele (kap. 2.1.3).

## **2.4 Vliv typu buněčné smrti na regulaci imunitní odpovědi**

Donedávna se předpokládalo, že nekróza vyvolává zánětlivou imunitní odpověď, zatímco apoptóza jako jako fyziologický typ buněčné smrti navozuje toleranci imunitního systému (Majai et al., 2006). Ukazuje se však, že apoptóza může také vést k imunitní odpovědi, zatímco nekrotické buňky mohou být méně imunogenní než apoptotické (Green et al., 2009; Zitvogel et al., 2004). Imunogenita umírajících buněk je tedy určena spíše přítomností specifických signálů nebezpečí než pouhým typem buněčné smrti (Galluzzi et al., 2007). Příčiny navození imunitní odpovědi nebo tolerance antigenem jsou přitom klíčovou otázkou imunologie.

Reakce imunitního systému na umírající buňky může záviset na mnoha faktorech. Jedním z faktorů je místo, na kterém se umírající buňky nacházejí, a jejich následující osud. Buňky na povrchu těla jsou obvykle po smrti odvrženy bez reakce imunitního systému, například buňky kůže nebo sliznice střeva. Naopak umírající buňky, které jsou fagocytovány antigen-prezentujícími buňkami, mají potenciál vyvolat imunitní reakci. Navození imunitní reakce či tolerance zřejmě závisí také na cestě přijetí antigenu do organismu. Intravenózní aplikace apoptotických buněk navodí toleranci, zatímco subkutánní aplikace těchto buněk navodí imunitní odpověď. Intravenózní aplikace antigenu vede k lokalizaci tohoto antigenu ve slezině, která je důležitým tolerogenním orgánem. Oproti tomu aplikace antigenu intradermálně vede k fagocytóze antigenu kožními dendritickými buňkami, které poté vycestují do mízních uzlin a zde navodí imunitní reakci (Green et al., 2009).



Předpokládá se, že buňky umírající za stresových podmínek prezentují takzvané signály nebezpečí (DAMPs, danger-associated molecular patterns), které podobně jako signály asociované s patogeny (PAMPs, pathogen-associated molecular patterns) vyvolávají imunitní odpověď po vazbě na receptory buněk imunitního systému.

Známým signálem nebezpečí (DAMP) je expozice kalretikulinu na povrchu apoptotických buněk. Kalretikulin je protein normálně se vyskytující v ER, kde funguje jako chaperon. Jeho lokalizace na povrchu buněk funguje jako signál pro fagocytózu apoptotických tělísek dendritickými buňkami (Obeid et al., 2007). Expozice kalretikulinu je doprovázena expozicí dalšího proteinu pocházejícího z ER, ERp57, který je také nutný pro imunogenitu apoptotických buněk (Panaretakis et al., 2008).

K expozici kalretikulinu vede signální dráha, která zřejmě začíná stresem ER a  $Ca^{2+}$  signalizací. Díky tomu ER kináza PERK zprostředkuje fosforylaci eIF2a, což vede k zastavení proteosyntézy. Dalším faktorem důležitým pro translokaci kalretikulinu je aktivita kaspázy 8, která je zřejmě zajištěna degradací c-Flip díky bloku proteosyntézy. Nepostradatelná je také anterogradní dráha transportu proteinů z ER přes Golgiho systém (Galluzzi et al., 2010).

Druhým signálem posilujícím imunitní odpověď je uvolnění proteinu HMGB1 (high mobility group B1) z jader umírajících buněk do extracelulárního prostoru. Tento protein je v jádře navázán na DNA a slouží ke stabilizaci nukleosomů. Po uvolnění z umírající buňky se protein HMGB1 se váže na receptor TLR4 dendritických buněk, kde posiluje prezentaci antigenů (Apetoh et al., 2007). Dalším faktorem zvyšujícím imunogenitu umírajících buněk je uvolnění ATP, které se může vázat na receptory P2X7 na povrchu dendritických buněk, jehož signalizace vede k aktivaci inflamasomu (Ghiringhelli et al., 2009). Dalšími popsány DAMPs jsou například proteiny tepelného šoku (Hsp), RNA či DNA uvolněná z buňky a také kyselina močová, která v extracelulárním prostředí tvoří mikrokrystalky sodné soli (Kepp et al., 2009b; Kono and Rock, 2008).

## 2.5 Transglutamináza 2

Transglutaminázy jsou enzymy, které katalyzují kovalentní proteinová propojení díky transamidaci glutaminových a lysinových zbytků a vytváří tak  $\gamma$ -glutamyl- $\epsilon$ -lysinové můstky. Existuje 8 transglutamináz, a to transglutamináza 1 - 7 a FXIII. Faktor FXIII má

roli v krevní koagulaci, ostatní transglutaminázy mají většinou tkáňově specifické funkce nebo jsou jejich funkce nejasné (Elli et al., 2009).

Transglutamináza 2 neboli tkáňová transglutamináza je enzym přítomný ve všech tkáních a na mnoha místech buňky – v cytoplasmě, v jádře, na cytoplasmatické membráně i v extracelulárním prostoru. Transglutaminázová aktivita tohoto enzymu je aktivována vyšší hladinou  $\text{Ca}^{2+}$ . Transglutamináza 2 však může fungovat také jako G protein a podílí se tak například na signalizaci buněčného cyklu. Může mít také aktivitu disulfid izomerázy, předpokládá se, že vytváří disulfidové můstky v mitochondriálních proteinech. Další pozorované aktivity tohoto enzymu jsou kinázová aktivita a DNázová aktivita. V extracelulárním prostoru může transglutamináza vytvářet spojení mezi buňkou a fibronectinem, integriny a syndekanem a zprostředkuje tak signalizaci mezi mezibuněčnou hmotou a buňkou (shrnu to v (Elli et al., 2009; Park et al., 2010)).

Samotná transglutaminázová aktivita tohoto enzymu je aktivována vysokou hladinou  $\text{Ca}^{2+}$  (více než 0,5 mM) a nízkou hladinou GTP (a s ním provázanou vyšší hladinou GDP). Proto je transglutaminázová aktivita za běžných podmínek v buňce inhibována a transglutamináza funguje díky vyšší hladině GTP jako signalizační G protein. Při stresu (například produkci kyslíkových radikálů) a apoptóze dochází ke zvýšení hladiny  $\text{Ca}^{2+}$  a snížení hladiny GTP v buňce a transglutamináza poté propojuje proteiny. Má se za to, že její aktivita přispívá ke kompaktnímu uspořádání buněčného obsahu a ke kondenzaci jader při apoptóze. Její aktivita a výsledné provázané proteiny byly také ukázány při nekrotické smrti následkem stresu (Nicholas et al., 2003). Transglutaminázová aktivita je také aktivována v extracelulárním prostoru, kde transglutamináza přispívá k remodelaci a stabilizaci mezibuněčné hmoty.

Transglutamináza tedy může mít proapoptotickou i antiapoptotickou úlohu. V jádře transglutamináza interaguje s proteinem Rb (Retinoblastoma) a svojí kinázovou aktivitou jej udržuje ve fosforylovaném stavu, kdy funguje jako supresor apoptózy (Milakovic et al., 2004). Další antiapoptotická úloha transglutaminázy spočívá ve stabilizaci kontaktů mezi buňkou a mezibuněčnou hmotou. Proapoptotickou roli hraje transglutamináza pouze v cytosolu ,je-li aktivována vyšší hladinou  $\text{Ca}^{2+}$  při stresu.

Různé aktivity transglutaminázy tak hrají roli v regulaci apoptózy, signální transdukci, regulaci zánětu i buněčného cyklu. U myši defektních v genu transglutaminázy byla pozorována nedokonalá fagocytóza apoptotických buněk, není ale úplně jasné, se kterou z popsaných aktivit transglutaminázy tento defekt souvisí (Szondy et al., 2003).

### 3. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

Obecně se předpokládá, že většina buněčných typů infikovaných VACV podléhá lýze a tedy nekrotické smrti. Vzhledem k předchozím výsledkům naší laboratoře, které ukazovaly aktivaci kaspáz v buňkách HeLa G i BSC-40 infikovaných VACV (Kalbacova, 2003; Kalbacova et al., 2008), nás zajímalo, zda bude typ buněčné smrti při infekci těchto buněk i při podrobnější analýze skutečně nekrotický. Rozhodli jsme se tedy analyzovat typ buněčné smrti těchto buněk i v pozdějších časech po infekci, kdy se infikované buňky již obvykle nesledují. Chtěli jsme také blíže charakterizovat totožnost kaspáz, které se jeví jako aktivované v infikovaných buňkách, a také analyzovat, zda jsou tyto kaspázy skutečně aktivní.

Postupná infekce dvěma VACV, které exprimují dva různé fluorescenční proteiny, se jeví jako ideální nástroj ke sledování bloku superinfekce VACV. Rozhodli jsme se proto vytvořit rekombinantní viry exprimující proteiny DsRed a EGFP, přičemž vytvoření WR-EGFP bylo součástí diplomové práce Richarda Honnera. Blok superinfekce byl již dříve u VACV popsán (Christen et al., 1990). My jsme však hodlali na základě předběžných výsledků (Melkova and Esteban, 1995) tyto rekombinantní viry využít pro analýzu bloku superinfekce jiným přístupem než ve zmíněné práci.

#### **Cíle práce:**

1. Morfologicky charakterizovat typ buněčné smrti v buňkách HeLa G a BSC-40 infikovaných VACV kmene Western Reserve.
2. Stanovit aktivaci a aktivitu kaspáz, případně dalších proteáz v buňkách HeLa G a BSC-40 infikovaných VACV kmene Western Reserve a určit totožnost těchto kaspáz či jiných proteáz.
3. Charakterizovat typ buněčné smrti v buňkách HeLa G a BSC-40 infikovaných VACV kmeny Dryvax a Praha ve srovnání s kmenem Western Reserve.
4. Vytvořit rekombinantní VACV kmene WR exprimující DsRed pod časně-pozdním promotorem p7.5 (WR-DsRed).
5. Ověřit možnost superinfekce buněk BSC-40 infikovaných VACV pomocí rekombinantních virů WR-DsRed a WR-EGFP

## **4. MATERIÁL A METODY**

### **4.1 Materiál**

#### **4.1.1 Chemikálie**

Běžné chemikálie byly od firem Sigma nebo Penta. Specifikace dalších chemikálií je u popisu jednotlivých metod.

#### **4.1.2 Hmotnostní standardy**

Jako hmotnostní standard pro SDS-PAGE byl použit PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas). Jako hmotnostní standard pro elektroforézu DNA byl použit GeneRuler 1 kbp DNA Ladder (Fermentas).

#### **4.1.3 Roztoky**

Složení běžných roztoků je uvedeno níže. Složení dalších roztoků je u popisu jednotlivých metod. Při přípravě roztoků byly chemikálie rozpuštěny v Milli-Q H<sub>2</sub>O, 10x nebo 20x koncentrované roztoky byly v případě potřeby ředěny Milli-Q H<sub>2</sub>O.

10x PBS: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> do 100 ml, autoklávovat.

10x TBE: 10,8 g Tris, 5,5 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1,48 g EDTA.2Na<sup>+</sup>.2H<sub>2</sub>O do 100 ml.

TE: 1 ml roztoku 1M Tris (pH = 8), 200 µl roztoku 0,5 M EDTA (pH = 8) do 100 ml, autoklávovat.

20x SSC: 87,66 g NaCl, 44,12 g Na<sup>+</sup> citrát.2H<sub>2</sub>O do 500 ml.

1M Tris: 12,11 g Tris do 100 ml, případně upravit pH, autoklávovat.

0,5 M EDTA (pH = 8): 18,61 g EDTA.2Na<sup>+</sup>.2H<sub>2</sub>O do 100 ml, pH upravit pevným NaOH, autoklávovat.

#### 4.1.4 Buněčné linie

Epiteliální buněčné linie HeLa G (lidský cervikální karcinom) a BSC-40 (ledvinný epitel kočkodana zeleného, *Chlorocebus sabaues*) byly kultivovány v médiu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, PAA Laboratories) s obsahem glukózy 4,5 g/l, glutaminem, pyruvátém a s přidavkem 10 % NCS (neonatální telecí sérum, Gibco/Invitrogen) inaktivovaného při 65 °C, penicilinu ( $10^5$  U/l) a streptomycinu (100 mg/l). Buněčná linie 143 TK<sup>-</sup> (lidský osteosarkom) byla kultivována v médiu DMEM s obsahem glukózy 4,5 g/l, glutaminem, pyruvátém a s přidavkem 10 % FBS (fetální bovinní sérum, Gibco/Invitrogen) inaktivovaného při 65 °C, penicilinu ( $10^5$  U/l) a streptomycinu (100 mg/l). Kultivační podmínky v inkubátoru byly 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> a 95% vlhkost.

#### 4.1.5 Viry

V pokusech byl použit virus vakcinie (VACV), a to kmene Western Reserve, Dryvax a Praha. Byl použit jak divoký typ kmene Western Reserve (wt-WR), tak několik jeho rekombinant. Všechny použité rekombinanty byly připraveny homologní rekombinací do thymidin kinázového genu viru. Příprava viru exprimujícího červený fluorescenční protein pod časně-pozdním VACV promotorem p7.5 (WR-DsRed) je popsána v této práci, ostatní rekombinantní viry byly připraveny obdobným způsobem dříve. Jedná se o rekombinanty exprimující Bcl-2 (WR-Bcl2), luciferázu (WR-LUC), a iNOS (WR-NOS) pod časně-pozdním VACV promotorem p7.5, o rekombinanty exprimující chloramfenikol acetyltransferázu (WR-CAT/I), Bcl2 (WR-Bcl2/I) a dsRNA dependentní protein kinázu (WR-PKR/I) pod pozdním IPTG-inducibilním VACV promotorem p4b a o rekombinantu exprimující luciferázu (WR-LUC L) pod pozdním VACV promotorem p4b. Příprava rekombinanty exprimující EGFP (WR-EGFP) pod časně-pozdním promotorem p7.5 byla součástí diplomové práce Richarda Honnera (Honner, 2007; Liskova et al., 2011). Rekombinanty kmene WR, jejich původ a rekombinační plasmidy jsou shrnuty v tabulce 1.

U vakcinačních kmenů Dryvax (D) a Praha (P) byly použity plakové izoláty s vysokou (P13 a D50) a nízkou (P20 a D32) virulencí laskavě poskytnuté Dr. Němečkovou (Kutinova et al., 1996; Kutinova et al., 1995).

Všechny viry byly pomnoženy v buňkách BSC-40. Hrubý extrakt virů byl připraven resuspendováním infikovaných buněk v DMEM, třemi cykly zmrazení, rozmrazení a sonikace a následnou centrifugací buněčných zbytků. Tyto hrubé extrakty byly použity pro většinu pokusů, není-li uvedeno jinak. Kmeny Dryvax a Praha a kontrolní WR-LUC byly dále purifikovány sedimentací na sacharózovém gradientu (Joklik, 1962).

Purifikaci virů použitých v této práci provedla Jarmila Knitlová. Titr všech virů byl stanoven desítkovým sériovým ředěním a plakovým esejem na buňkách BSC-40.

**Tab. 1. Použité rekombinanty VACV kmene Western Reserve (WR)**

virus	promotor ozn.	promotor VACV/inducibilní	plasmid	původ rekombinanty
wt-WR	-	-	-	divoký typ
WR-LUC	p7.5	VACV časně/pozdní	pSC11	(Rodriguez et al., 1988)
WR-LUC L	p4b	VACV pozdní	pPR15	(Rodriguez and Smith, 1990)
WR-Bcl2/I	p4b	VACV pozdní, IPTG	pPR35	(Lee et al., 1993)
WR-Bcl2	p7.5	VACV časně/pozdní	pSC11	(Humlova et al., 2002)
WR-CAT/I	p4b	VACV pozdní, IPTG	pPR35	(Lee et al., 1993)
WR-NOS	p7.5	VACV časně/pozdní	pSC11	(Fujikura et al., 2009)
WR-PKR/I	p4b	VACV pozdní, IPTG	pPR35	(Lee et al., 1997)
WR-EGFP	p7.5	VACV časně/pozdní	pSC11	(Honner, 2007; Liskova et al., 2011)
WR-DsRed	p7.5	VACV časně/pozdní	pSC11	(Liskova et al., 2011)

## 4.2 Metody

### 4.2.1 Infekce buněk

Buňky byly vysety 24 hodin před infekcí na 35 mm misky v hustotě  $1,5 \times 10^6$ , na 24-jamkové destičky v hustotě  $0,3 \times 10^6$  na jamku, na 12-jamkové destičky v hustotě  $0,6 \times 10^6$  nebo na 96-jamkové destičky v hustotě  $0,05 \times 10^6$  buněk na jamku. Před infekcí byly buňky opláchnuty kultivačním médiem bez séra. K buňkám bylo přidáno virové inokulum v malém objemu média bez séra o multiplicitě infekce 2 nebo 5 PFU/buňka (není-li uvedeno jinak) a adsorpce viru probíhala v obvyklých kultivačních podmínkách 1 hodinu. Při adsorpci bylo destičkou kýváno každých 10 minut pro lepší distribuci viru. Po adsorpci bylo virové inokulum vyměněno za kultivační médium s obsahem 2 % NCS a infikované buňky byly dále kultivovány v inkubátoru. V každém pokusu byly přítomny také neinfikované kontroly (označené "neinf."), se kterými bylo zacházeno stejně jako s infikovanými vzorky, pouze k nim místo virového inokula bylo přidáno čisté DMEM. Při infekci virem s rekombinantním genem pod IPTG-inducibilním promotorem p4b (viry WR-CAT/I, WR-Bcl2/I a WR-PKR/I) bylo do virového inokula i média po infekci přidáno IPTG (finální koncentrace 1,5 mM), stejně tak k neinfikovaným kontrolám (označené "neinf./I"). Při infekci virem WR-NOS exprimujícím inducibilní NO syntázu (WR-NOS) byl do virového inokula i média po infekci přidán arginin (finální koncentrace 1 mM). Ve stanovených intervalech byly infikované buňky a neinfikované kontroly sklizeny a dále zpracovány.

Pro snímání mitochondrií konfokální mikroskopií byly buňky BSC-40 infikovány virem WR-LUC o multiplicitě infekce 5 PFU/buňka po dobu 6 hodin

#### **4.2.2 Superinfekce buněk**

Pro většinu experimentů byly použity buňky ve 24-jamkových destičkách, pouze pro konfokální mikroskopii byly použity buňky ve 35 mm miskách se skleněným dnem (Glass Bottom Culture Dish, MatTek Corporation). První infekce buněk o multiplicitě 5 byla provedena virem WR-DsRed podle standardního postupu. Superinfekce (druhá infekce) již jednou infikovaných buněk byla provedena v intervalech 2, 4, 6, 8, 10 hodin po první infekci. Při druhé infekci virem ER-EGFP bylo médium z buněk odsáto opatrně pipetou a přidáno virové inokulum v médiu bez séra o multiplicitě infekce 5. Buňky byly inkubovány v inkubátoru 1 hodinu s kýváním kultivační destičky každých 10 minut. Poté bylo virové inokulum opatrně odsáto pipetou a přidáno médium s 2% NCS. Buňky byly dále kultivovány po určený čas a poté byly hodnoceny mikroskopem přímo v destičkách nebo miskách bez dalších zásahů, nebo byly sklizeny pasážováním trypsinem (0,25% trypsin, 0,05% EDTA v PBS) pro analýzu průtokovou cytometrií.

#### **4.2.3 Stanovení titru virů**

Titr virů byl stanoven desítkovým sériovým ředěním a plakovým esejem na buňkách BSC-40. Infikované buňky byly ve stanovených intervalech sklizeny pipetováním v celém objemu kultivačního média a lyzovány třemi cykly zmrazení, rozmrazení a sonikace. Lyzáty byly naředěny desítkovým sériovým ředěním a vždy se třemi nejvíce zředěnými alikvoty každého vzorku byl proveden standardní postup infekce na 12-jamkových destičkách. Infikované destičky byly kultivovány ve 2%NCS-DMEM 36 hodin, poté byly buňky zafixovány 4% paraformaldehydem v PBS a obarveny 1% roztokem krystalové violeti v PBS. Byl stanoven počet virových plaků pro každý vzorek a titr byl vypočítán jako počet PFU/ml.

#### **4.2.4 Průtoková cytometrie**

Část experimentů (kapitoly 5.1.1.2, 5.1.1.5, 5.1.3.2, 5.2.1) byla změřena pomocí průtokového cytometru FACScan (Becton Dickinson) s argonovým laserem emitujícím při 488 nm a se třemi detektory a pomocí programu CellQuest (Becton Dickinson). Data uvedená v této práci byla měřena v kanále FL1 (535 nm) a FL2 (580 nm). Získaná data byla vyhodnocena v programu WinMDi v2.8 (Joseph Trotter, The Scripps Research Institute). Další část experimentů (kapitoly 5.1.1.4, 5.2.2.2) byla změřena pomocí

průtokového cytometru FACSCantoII (Becton Dickinson) se třemi lasery a osmi detektory. Data uvedená v této práci byla měřena v kanálech FL1 (530 nm) a FL2 (585 nm) při excitaci modrým laserem (488 nm). Získání i vyhodnocení dat probíhalo v programu BD FACSDiva 6.0 (Becton Dickinson).

Buňky byly pro měření resuspendovány pipetováním, pipetováním s přídavkem EDTA nebo pasážováním trypsinem, jak je uvedeno u jednotlivých metod. Vždy bylo měřeno 10 000 nebo 20 000 částic, tak, aby částic odpovídajících celým buňkám bylo naměřeno alespoň 5 000. Při analýze naměřených dat byly vždy hodnoceny částice odpovídající celým buňkám.

#### **4.2.5 Fluorescenční mikroskopie**

Buňky byly zobrazovány přímo v kultivačních destičkách pomocí invertovaného fluorescenčního mikroskopu Olympus IX-70 a CCD kamery CoHU 4912 se softwarem LUCIA 4.6 (Laboratory Imaging Ltd., Czech Republic). Morfologie buněk byla hodnocena pomocí fázového kontrastu. Barvení DNA pomocí Hoechst 33342 bylo pozorováno v UV kanálu, zelená fluorescence EGFP a CaspACE<sup>TM</sup> byla pozorována pomocí modrého filtru (515 nm), červená fluorescence PhiPhiLux<sup>®</sup>-G<sub>2</sub>D<sub>2</sub> a PI byla pozorována pomocí zeleného filtru (590 nm). Všechny prezentované i analyzované obrázky byly získány při originálním zvětšení 100x.

#### **4.2.6 Obrazová analýza**

Fluorescence buněk byla vyhodnocena obrazovou analýzou pomocí programu NIS-Elements AR 3.0 (Nikon). Plocha se silnou a slabou fluorescencí nebo celkovou fluorescencí daného indikátoru byla v celém obrázku vymezena od pozadí na základě intenzity. Poté byla tato plocha změřena a vyjádřena v počtu pixelů. Byla hodnocena plocha slabé (normální jádra) a silné (apoptotická jádra) modré fluorescence Hoechst 33342, slabé a silné červené fluorescence PI a zelené fluorescence EGFP. Procento Hoechst-pozitivních (apoptotických) jader bylo vyjádřeno jako procento z plochy všech jader (100%). Procento plochy silné a slabé červené fluorescence PI a procento plochy zelené fluorescence EGFP bylo rovněž vztahováno k ploše všech jader (100%). Pro každý parametr byly do analýzy zahrnuty nejméně tři experimenty a v každém experimentu byly hodnoceny nejméně dvě fotografie každého vzorku z odlišných míst jamky v kultivační destičce. Rozdíly mezi jednotlivými obrázky byly charakterizovány pomocí S.E.M.



#### 4.2.7 Konfokální mikroskopie

Pro kultivaci buněk pro konfokální mikroskopii byly použity 3,5 mm misky se skleněným dnem (Glass Bottom Culture Dish, MatTek Corporation). Byl použit konfokální mikroskop Bio-Rad Radiance 2100 a Lasersharp 2000 software. Tato měření byla provedena během stáže v Madridu v laboratoři prof. Mariano Estebana (Cellular and Molecular Biology Department, Centro Nacional de Biotecnología, Universidad Autónoma de Madrid) v období září - říjen 2007.

Superinfekce byla provedena standardním postupem na buňkách BSC-40. Infikované buňky byly snímány bez dalších zásahů přímo v kultivačních miskách při originálním zvětšení 62,5x. Pro kvantitativní vyhodnocení možnosti superinfekce byly na obrázcích počítány buňky obsahující pouze červenou, pouze zelenou nebo červenou i zelenou fluorescenci. Pro každý interval superinfekce bylo hodnoceno tolik obrázků, aby bylo získáno alespoň 500 buněk. Poté bylo pro každý interval superinfekce vypočítáno procento zelených buněk ze všech buněk (G), červených buněk ze všech buněk (R) a procento buněk obsahujících červenou i zelenou fluorescenci ze všech červených buněk (RG/R). Rozdíly mezi jednotlivými obrázky byly charakterizovány pomocí S.E.M.

. Snímání mitochondrií bylo provedeno přímo v kultivačních miskách (při originálním zvětšení 125x) po barvení NAO (přidáno do média ve finální koncentraci 500 nM po dobu 20 minut, Molecular Probes), jako morfologická kontrola bylo přidáno FCCP (finální koncentrace 1  $\mu$ M, přidáno spolu s NAO, Sigma).

#### 4.2.8 Western blot

SDS-PAGE a western blot byly provedeny podle standardních publikovaných postupů (Harlow and Lane, 1988; Laemmli, 1970) a podle návodu výrobce aparatury. Pro přípravu polyakrylamidových gelů byl použit 30% roztok akrylamidu a N, N'-methylenbisakrylamidu v poměru 37,5:1 (Serva Electrophoresis). Separační gel (8 nebo 10%) dále obsahoval 5x koncentrovaný pufr A (1,875 M Tris.HCl, 0,5% SDS, pH = 8,8), 2,7% glycerol, 0,07% TEMED (Sigma), 0,14% persíran amonný (Sigma). Zaostřovací gel (4,1%) dále obsahoval 5x koncentrovaný pufr B (0,625 M Tris.HCl, 0,5 % SDS, pH = 6,8), 0,15% TEMED, 0,5% persíran amonný. Pro elektroforézu byl použit Tris-glycinový pufr (10x koncentrovaný: 30,3 g Tris, 144,1 g glycinu, do 1000 ml) s 1% SDS. Pro přípravu gelů a elektroforézu byla použita aparatura Mini-Protean 3 (BioRad), pro přenos proteinů na nitrocelulosoovou membránu (BioRad) byla použita aparatura Trans-Blot Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (BioRad).

Buňky byly sklizeny pipetováním, promyty PBS, lyzovány v denaturujícím vzorkovém pufru podle Laemliho (62,5 mM Tris.HCl pH = 6,8, 5% β-merkptoethanol, 2% SDS, 10% glycerol, 0,005% bromfenolová modř). Vzorky byly denaturovány varem 3 minuty, rychle zchlazeny, centrifugovány 6 minut při maximálních otáčkách a bezprostředně naneseny na gel. Standardizace množství vzorku byla na počet buněk. Proteiny byly rozděleny na 8% polyakrylamidovém gelu pro analýzu PARP a na 10% polyakrylamidovém gelu pro analýzu ostatních proteinů. Po přenesení vzorků na membránu (45 mA/gel po dobu 45 minut) byla membrána obarvena roztokem barvy Ponceau (0,2% Ponceau S (Sigma), 3% kyselina trichloroctová) pro kontrolu nanášky a účinnosti blotování. Barva Ponceau byla poté odmyta promytím v PBS.

Protein **PARP** byl detekován králičí polyklonální protilátkou proti aminokyselinám 764-1014 (detekce 116/85 kDa, ředění 1:500; Santa Cruz Biotechnology). **Cytokeratin 18** byl detekován myšími monoklonálními protilátkami DC-10 (ředění 1:500; Exbio) a M30 (ředění 1:250, Exbio). **Kaspáza 3** byla detekována králičí polyklonální protilátkou proti celé délce proteinu (ředění 1:500, Santa Cruz Biotechnology). **Kaspáza 12** byla detekována králičí polyklonální protilátkou proti aminokyselinám 2 - 17 (ředění 1:1 000, Stratagene). **Sekundární** protilátkou pro protilátky detekující PARP, kaspázu 3 a kaspázu 12 byla kozí proti-králičí protilátka konjugovaná s peroxidázou (PARP - ředění 1:20 000, kaspáza 3 a 12 - ředění 1:10 000, Cappel Research Products), sekundární protilátkou pro protilátky detekující cytokeratin 18 byla kozí proti-myší protilátka konjugovaná s peroxidázou (ředění 1:10 000, Sigma). Pro detekci byl použit chemiluminiscenční substrát West Femto (Pierce) a rentgenové filmy (Medix XBU, Foma).

#### **4.2.9 Barvení DNA fluorochromy *in situ* (Hoechst 33342, PI)**

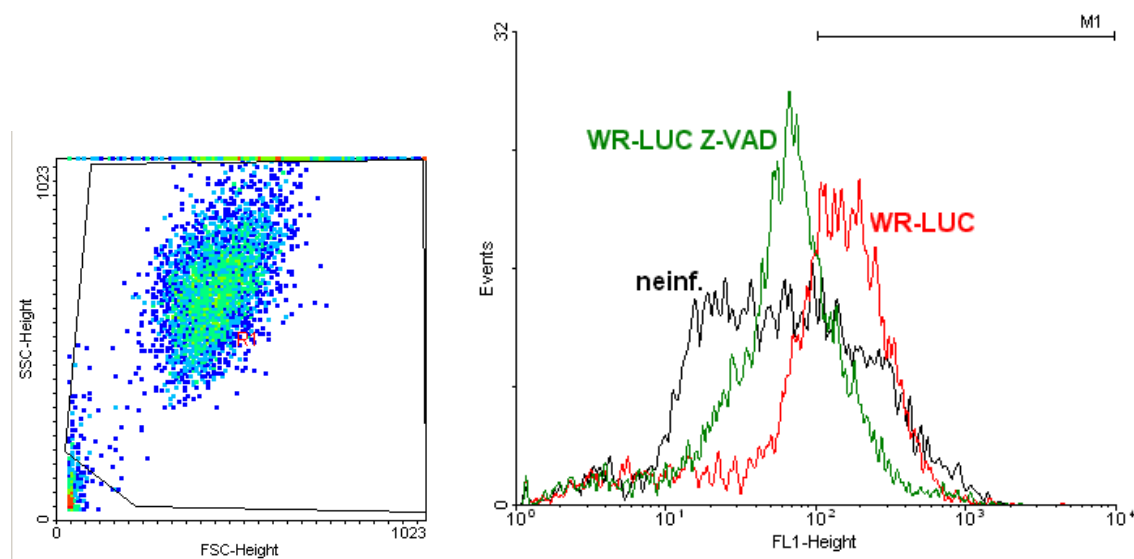
Barvení fluorochromy Hoechst 33342 a PI bylo provedeno na buňkách přímo v kultivačních destičkách v původním kultivačním médiu bez dalších zásahů, indikátory byly pouze přidány spolu s částí kultivačního média a médium v jamkách bylo promícháno nakláněním destičky. Destičky s buňkami byly poté 5 minut kultivovány v inkubátoru a fluorescence buněk v destičkách byla hodnocena na fluorescenčním mikroskopu. Hoechst 33342 (Intergen) byl použit ve výsledné koncentraci 0,1 µg/ml, PI (Sigma) ve výsledné koncentraci 0.2 µg/ml.

#### **4.2.10 Stanovení aktivace kaspáz (CaspACE)**

Buňky byly inkubovány 3 minuty po přidání 6 mM EDTA v kultivačním médiu kvůli šetrnému uvolnění přisedlých buněk. Poté byly buňky sklizeny opatrným

pipetováním. K suspenzi  $1.2 \times 10^5$  buněk byly přidány kompetující inhibitory ( $50 \mu\text{M}$  Z-VAD-FMK a inhibitory jednotlivých kaspáz,  $2 \mu\text{M}$  calpastatin;  $10 \mu\text{M}$  Calpain inhibitor V,  $50 \mu\text{M}$  pepstatin A) a buňky byly inkubovány 10 minut v inkubátoru. Poté byl k buňkám přidán CaspACE™ (FITC-VAD-FMK, Promega) v koncentraci  $0,05 \mu\text{M}$  a vzorky byly dále inkubovány 20 minut. Poté byly buňky dvakrát promyty PBS a resuspendovány ve  $200 \mu\text{l}$  PBS. Fluorescence buněk byla analyzována průtokovou cytometrií v kanále FL1. Příklad analýzy dat z průtokového cytometru je na obr. 4. Inhibitory jednotlivých kaspáz (Caspase Inhibitor Sample Pack) i CaspACE™ byly od R&D Systems, inhibitory kalpainu byly od Calbiochem, Pepstatin A byl od Sigma. Zásobní roztok calpastatinu peptidu byl připraven ve vodě, zásobní roztoky ostatních inhibitorů byly připraveny v DMSO.

Pro detekci obecné aktivity kaspáz mikroskopicky byly buňky ponechány bez manipulací v kultivačních destičkách a do média byl přidán CaspACE (finální koncentrace  $10 \mu\text{M}$ ) po dobu 20 minut. Buňky byly poté v kultivačních jamkách dvakrát promyty PBS, jádra buněk byla dobarvena Hoechst 33342 ( $0,1 \mu\text{g/ml}$ ) a buňky byly hodnoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu.



**Obr. 4. Příklad analýzy dat získaných průtokovou cytometrií.** Do analýzy byly vzaty celé buňky (R1). Fluorescence buněk byla hodnocena v kanálu FL1 jako procento buněk pod markerem M1. Všechny vzorky byly obarveny CaspACE, esej ve vzorku označeném WR-LUC Z-VAD byl kompetován kaspázovým inhibitorem Z-VAD-FMK, neinf. – neinfikovaná kontrola. Marker M1 byl umístěn mezi populace pozitivních infikovaných buněk a negativních buněk kompetovaných Z-VAD-FMK. Data byla analyzována programem WinMDI v2.8.

#### **4.2.11 Stanovení aktivity jednotlivých kaspáz v buněčných lyzátech**

Pro stanovení aktivity jednotlivých kaspáz byly použity kity Caspase Fluometric Assay Kit (BioVision) pro kaspázy 2, 3, 4, 12. Buňky byly lyzovány lyzačním pufrem z kitu přímo v kultivačních destičkách na ledu po dobu 10 minut. Poté byly lyzáty sklizeny a zamraženy v - 80 °C. Kaspázový esej byl proveden podle pokynů výrobce: lyzáty byly přidány do reakční směsi s odpovídajícím kaspázovým substrátem ve finální koncentraci 50 μM, případně s jednotlivými inhibitory ve finální koncentraci 50 μM. Vzorky byly inkubovány ve 37 °C 2 hodiny a poté byla jejich fluorescence analyzována na destičkovém fluorimetru Victor1420-012 (PerkinElmer) s použitím 405 nm pro excitaci a 535 nm filtru pro emisi. Kaspázové substráty byly peptidy specifické pro štěpení jednotlivých kaspáz konjugované s AFC (7-amino-4-trifluoromethylkumarin).

#### **4.2.12 Stanovení obecné aktivity kaspáz (Rhodamine 110-D<sub>2</sub>)**

Byly použity lyzáty buněk připravené pro stanovení aktivity jednotlivých kaspáz. Reakční směs byla připravena stejně jako při stanovení aktivity jednotlivých kaspáz, jako substrát byl však přidán Rhodamine 110-D<sub>2</sub> (Rhodamine 110 bis-(L-aspartic acid amide), Molecular Probes) ve finální koncentraci 50 μM. Do kontrolních vzorků byl přidán obecný kaspázový inhibitor Z-VAD-FMK ve finální koncentraci 50 μM. Vzorky byly inkubovány ve 37 °C 30 minut a poté byla jejich fluorescence analyzována na destičkovém fluorimetru Victor1420-012 (PerkinElmer) s použitím 490 nm pro excitaci a 535 nm filtru pro emisi.

#### **4.2.13 Stanovení aktivity kaspázy 3 v živých buňkách *in situ* (PhiPhiLux)**

Pro stanovení aktivity kaspázy 3 v živých buňkách *in situ* byl použit PhiPhiLux<sup>®</sup>-G<sub>2</sub>D<sub>2</sub>, což je specifický substrát kaspázy 3 (sekvence štěpeného peptidu DEVDGI, Oncoimmunin, Inc.), který proniká membránou buňky. Štěpený substrát generuje červenou fluorescenci. Substrát byl přidán přímo k buňkám narostlým v 96-jamkových destičkách v kultivačním médiu ve výsledné koncentraci 5 μM a buňky byly kultivovány 1 hodinu. Pro kontrolu specifity byl 10 minut před substrátem přidán do kultivačního média obecný inhibitor kaspáz Z-VAD-FMK ve výsledné koncentraci 50 μM a ponechán i při následné kultivaci se substrátem. Poté byly buňky omyty médiem, jádra byla dobarvena DNA indikátorem Hoechst 33342 a buňky byly pozorovány fluorescenčním mikroskopem.

#### **4.2.14 Stanovení mitochondriálního membránového potenciálu**

Buňky byly resuspendovány opatrným pipetováním a v kultivačním médiu inkubovány s DiOC<sub>6</sub> (3) (finální koncentrace 20 nM, Fluka) 15 minut v inkubátoru. Poté byly analyzovány průtokovou cytometrií v kanále FL1. V populaci celých buněk byla poté vyhodnocena populace s normálním mitochondriálním potenciálem oproti populaci s nízkým mitochondriálním potenciálem.

#### **4.2.15 Působení monodansylkadaverinu**

Inhibitor transglutaminázy monodansylkadaverin (MDC, Fluka) byl přidán do média k buňkám 1 h před infekcí, do virového inokula při infekci a do média k buňkám po infekci až do sklizení. Byly použity koncentrace 100, 200, 300, 400 µM a jako kontrola odpovídající množství solventu DMSO.

#### **4.2.16 Příprava viru WR-DsRed**

##### **4.2.16.1 Příprava rekombinantního plasmidu**

###### **4.2.16.1.1 Množení plasmidové DNA**

Veškerá množení plasmidů probíhala v bakteriích *Escherichia coli* kmene DH5α. Tyto bakterie byly pěstovány na LB agaru nebo v LB médiu (Roth). Kompetentní *E. coli* byly připraveny z kultury v exponenciální fázi růstu působením roztoku 50 mM CaCl<sub>2</sub> na ledu po dobu 2 x 10 minut a následným zamražením do -80 °C v roztoku 50 mM CaCl<sub>2</sub> a 15% glycerolu. Transformace kompetentních bakterií probíhala tepelným šokem 42 °C po dobu 90 vteřin, následně byly bakterie inkubovány v LB médiu bez antibiotika 1 hodinu a poté vysety na plotny LB agaru s antibiotikem. Pro selekci přítomnosti plasmidu pSC11 byl použit ampicilin (Pliva) o koncentraci 100 µg/ml, pro selekci přítomnosti plasmidu pDsRed2-Bid byl použit kanamycin (Fisher Scientific) o koncentraci 30 µg/ml.

###### **4.2.16.1.2 Izolace plasmidové DNA**

Izolace malého množství plasmidů ("miniprep") probíhala nejprve resuspendováním sklizených bakterií z 5 ml kultury v 700 µl lyzačního pufru (8% sacharosa, 5% triton X-100, 0,05 M EDTA, 0,05 M Tris, pH = 8,0), pak bylo přidáno 50 µl roztoku lyzozymu (10 mg/ml, Sigma) a následovalo vaření vzorků 2x 45 vteřin. Po centrifugaci (14 000 ot./min, 10 min, 4°C) byly pelety buněčných zbytků odstraněny a plasmidová DNA byla vysrážena stejným objemem isopropanolu, inkubována 30 min při

-20°C a centrifugována (14 000 ot./min, 10 min, 4°C). Pelet DNA byl rozpuštěn ve 150 µl TE, DNA byla znovu vysrážena 1 ml etanolu a 350 µl 7,5 M roztoku acetátu amonného a inkubována 30 min při -20°C. Po centrifugaci (14 000 ot./min, 10 min, 4°C) byl pelet DNA 2x promyt 70% etanolem (500 µl) a po usušení rozpuštěn v 50 µl TE.

#### **4.2.16.1.3 Elektroforéza DNA**

Elektroforéza v agarózovém gelu (0,8% nebo 1%) probíhala v pufru TBE. Byla použita agaróza od firmy Biozym a ethidium bromid (Boehringer Mannheim) v gelu o výsledné koncentraci 0,01 µg/ml. Pro přípravu k nanášení vzorků na gel byl použit 10x koncentrovaný vzorkový pufr (25% Ficoll, 0,1 M Tris, 1 mM EDTA, 0,25% bromophenol blue, pH = 7,5) a 10x koncentrovaný roztok RNasy A (10 mg/ml).

#### **4.2.16.1.4 Postup přípravy rekombinantního plasmidu**

Do *SmaI* místa vektoru pSC11 (Rodriguez et al., 1988) byla jako inzert vložena cDNA genu DsRed pocházející z plasmidu pDsRed2-Bid (Clontech Laboratories). Vektor byl nejprve linearizován restrikční endonukleázou *SmaI* (Gibco), poté defosforylován pomocí enzymu Shrimp Alkaline Phosphatase (USB Corp.) a izolován po elektroforéze z agarózového gelu pomocí kitu GenElute Minus EtBr Spin Columns (Sigma). Inzert byl vyštěpen pomocí restrikčních endonukleáz *SmaI* a *HpaI* (Gibco) a izolován po elektroforéze z agarózového gelu. Ligace natupo byla provedena pomocí enzymu T4 DNA ligázy (Gibco) při 14 °C přes noc. Vzniklé ligační produkty byly pomnoženy po transformaci kompetentních bakterií *E. coli*. Totožnost a směr inzertu v jednotlivých koloniích bakterií byly ověřeny restrikční analýzou. Pro další použití byl výsledný plasmid pSC11-DsRed namnožen a izolován pomocí kitu Plasmid Midi Kit (Quiagen) a koncentrace a čistota izolované DNA byla stanovena fotometricky.

#### **4.2.16.2 Homologní rekombinace**

Buňky BSC-40 byly nejprve standardně infikovány wt-WR o multiplicitě infekce 0,5 PFU/buňka. Směs pro transfekci obsahující 2 µg plasmidové DNA (pSC11-DsRed) a 10 µl SuperFect Transfection Reagent (Quiagen) v 600 µl DMEM s 2% NCS byla připravena podle návodu výrobce. Po adsorpci viru byly buňky omyty DMEM, byla k nim přidána transfekční směs a buňky byly inkubovány v inkubátoru za občasného promíchání 3 hodiny. Poté byla transfekční směs vyměněna za DMEM s 2% NCS a buňky byly inkubovány 24 hodin. Poté byly buňky sklizeny pipetováním, lyzovány třemi cykly

zmražení, rozmražení, vortexování a sonikace. Výsledný lyzát infikovaných buněk byl použit pro infekci buněk 143 TK- a následnou selekci rekombinovaných virů.

#### **4.2.16.3 Selektce rekombinovaných virů**

Byla použita selekce na základě působení BrdU (25 µg/ml, Sigma), což je mutagenní analog thymidinu, který musí být fosforylován thymidinkinázou. Při množení viru v buňkách 143 TK- za přítomnosti BrdU tak bylo umožněno pouze množení virů bez funkční thymidin kinázy. Dále byla použita selekce vypichováním modrých plaků pod agarem (0,95%) po přidání X-Gal (0,06 mg/ml, Sigma) díky přítomnosti genu LacZ v rekombinantním viru. Sklizené buňky nebo vypíchnuté plaky v 0,5 ml DMEM byly vždy lyzovány třemi cykly zmražení, rozmražení, vortexování a sonikace a použity pro další infekci. Proběhla tři kola selekce, přičemž v každém kole byly nejprve infikovány buňky 143 TK- pod agarem na 35 mm plotnách v přítomnosti BrdU. Po 96 hodinách byly misky převrstveny agarem s X-Gal a inkubovány po dalších 24 hodin. Získané modré plaky byly použity k selektivnímu pomnožení v buňkách 143 TK- za přítomnosti BrdU po dobu 5 dní (s výměnou média 3. den). Infekce probíhala vždy podle standardního protokolu. Po každém kole selekce byly také infikovány buňky BSC-40 pro ověření exprese proteinu DsRed průtokovou cytometrií, červená fluorescence buněk byla měřena v kanále FL2. Červená fluorescence infikovaných buněk byla také průběžně ověřována fluorescenční mikroskopií.

#### **4.2.16.4 Příprava DNA sondy značené digoxigeninem**

DNA sonda proti fragmentu vakciniového genomu *HindIII* J byla připravena pomocí kitu DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche). DNA fragment pro přepis sondy *HindIII* J byl vyštěpen z plazmidu pBR322-*HindIII* J. Fragment byl izolován po elektroforéze z agarózového gelu pomocí kitu GenElute Minus EtBr Spin Columns (Sigma). Koncentrace fragmentu byla určena odhadem podle porovnání intenzity fluorescence pruhů fragmentů po elektroforéze s fragmentem DNA markeru o známé koncentraci. Asi 16 µg DNA bylo poté použito jako templát pro syntézu značené sondy podle návodu výrobce.

#### **4.2.16.5 Southern blot**

Buňky BSC-40 na 6-jamkových destičkách o hustotě  $3 \times 10^6$  buněk na jamku byly infikovány vybranými izoláty viru WR-DsRed a kontrolními viry (wt-WR, WR-LUC) o

multiplicitě infekce 1 PFU/buňka podle standardního postupu. V čase 24 h.p.i. byly infikované buňky sklizeny pipetováním, omyty PBS a inkubovány přes noc ve 37°C lyzačním pufru (proteináza K 100 µg/ml, SDS 1%, EDTA 0,1 M, Tris pH=8 50 mM). Poté byla izolována vysokomolekulární DNA fenol-chloroformovou extrakcí. Tato extrakce probíhala nejprve s 300 µl směsí fenol-chloroform-isoamylalkohol (25:24:1), následovala centrifugace (14 000 ot./min, 5 min, pokojová teplota), odebrání vodné fáze a extrakce s 300 µl chloroformu. Po centrifugaci (14 000 ot./min, 5 min, pokojová teplota) byla DNA ve vodné fázi precipitována 900 µl směsí etanolu a isopropanolu (1:1) a inkubována v -20°C přes noc. Po centrifugaci (14 000 ot./min, 10 min, 4°C) byl pelet DNA 2x promyt 70% etanolem (500 µl) a po usušení rozpuštěn ve 100 µl Milli-Q H<sub>2</sub>O. Koncentrace DNA byla změřena fotometricky.

5 µg DNA bylo štěpeno restriční endonukleázou *Hind*III (Gibco) přes noc. Vzorky byly poté rozděleny elektroforézou na agarózovém gelu (0,8%) a DNA byla přenesena na nylonovou membránu (Nytran 0,45 µm, Schleicher and Schuell) blotováním vzlínáním ve 20x SSC přes noc. DNA na membráně byla fixována teplem 2 hodiny při 80 °C. Sonda byla před hybridizací denaturována při 68 °C 10 minut a ochlazená na ledu. Hybridizace se sondou probíhala při 42 °C přes noc v hybridizačním pufru obsaženém v kitu DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche). Posthybridizační oplach membrány probíhal postupně v roztocích 2x SSC (pokojová teplota), 0,5x SSC (65 °C), 0,1x SSC (65 °C) v 0,1% SDS. Poté byla na membránu navázána protilátka proti digoxigeninu konjugovaná s peroxidázou (ředění 1:10 000 v blokovacím pufru obsaženém v tomtéž kitu), která byla poskytnuta ve výše zmíněném kitu. Signál byl detekován chemiluminiscencí pomocí substrátu CSPD pocházejícího také ze zmíněného kitu a na rentgenových filmech (Medix XBU, Foma).

#### **4.2.17 Statistické zhodnocení výsledků**

Výsledky jsou prezentovány jako průměry ± S.E.M. (střední chyba průměru). Statistické rozdíly mezi skupinou vzorků a kontrol nebo mezi dvěma skupinami vzorků byly hodnoceny pomocí párového t-testu. V případě prezentace výsledků jako procenta kontrol byly statistické analýzy provedeny na původních naměřených hodnotách.



## **5. VÝSLEDKY**

### **5.1 Typ buněčné smrti v buňkách HeLa G a BSC-40 infikovaných VACV**

#### **5.1.1 Typ buněčné smrti buněk infikovaných VACV kmene WR**

Pro většinu pokusů v naší laboratoři používáme laboratorní kmen VACV Western Reserve (WR).

##### **5.1.1.1 Morfologie jader a permeabilita cytoplasmatické membrány**

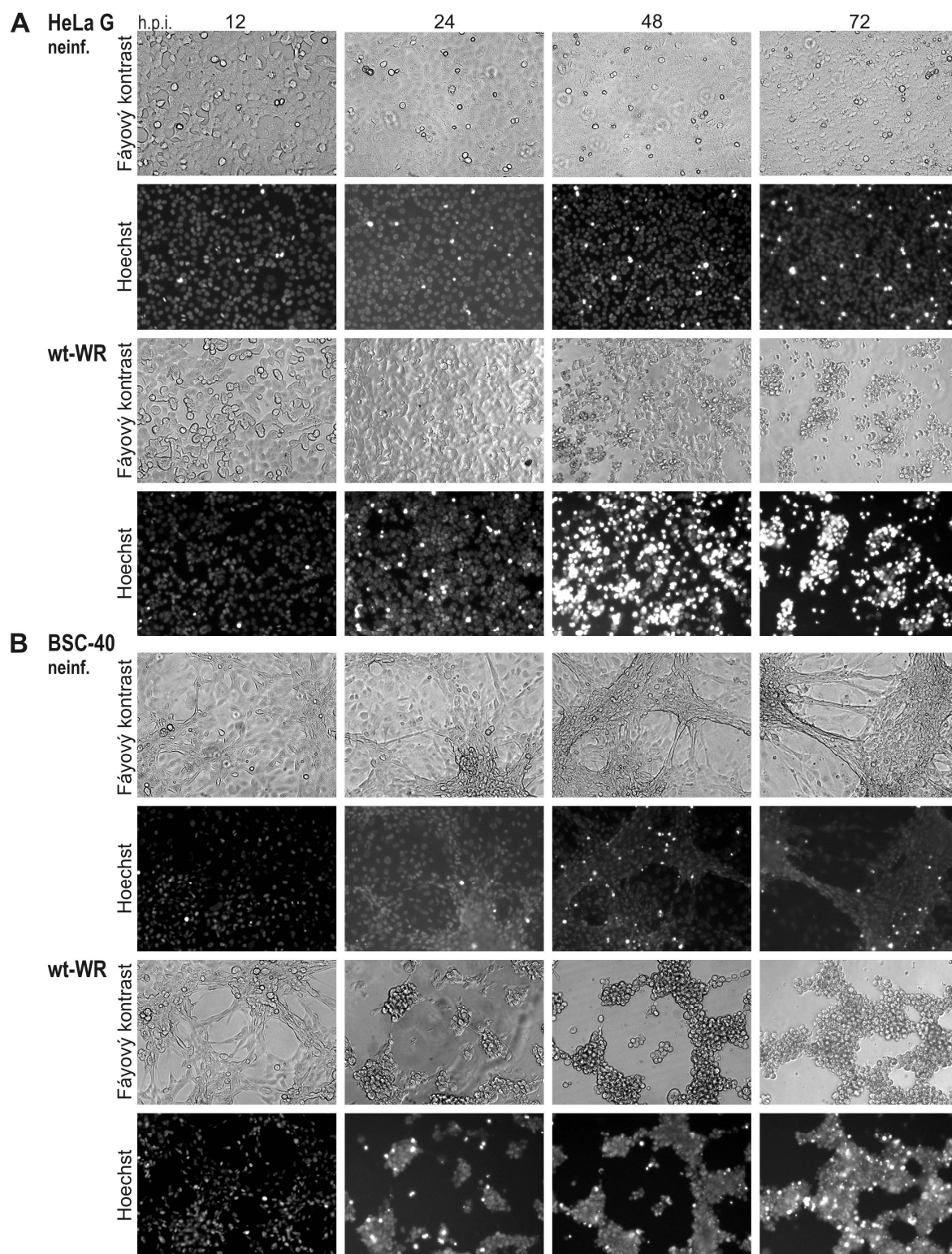
Hodnotila jsem typ buněčné smrti infikovaných buněk podle morfologie jader a permeability cytoplasmatické membrány pomocí fluorescenční mikroskopie a fázového kontrastu a také následnou analýzou obrazu. Infikované buňky jsem sledovala v časných i pozdějších intervalech infekce, a to ve 12, 24, 48, 72, 96 h.p.i.

###### **5.1.1.1.1 Analýza morfologie jader infikovaných buněk**

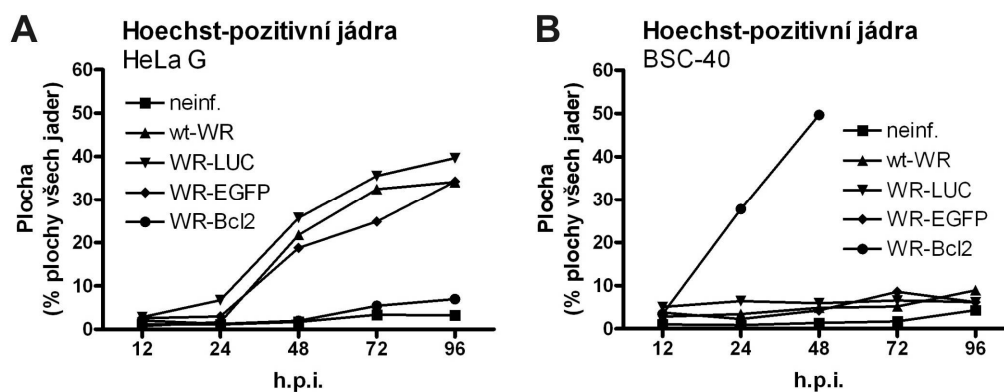
Morfologii jader jsem analyzovala pomocí fluorescenčního indikátoru DNA Hoechst 33342. Tento indikátor volně proniká do buněk a váže se na DNA. Poté kondenzovaná DNA vykazuje vysokou fluorescenci a rozvolněná DNA slabou fluorescenci, takže je možné odlišit apoptotická kondenzovaná a fragmentovaná jádra, která jasně září (Hoechst-pozitivní jádra). Získané obrázky jsem dále hodnotila obrazovou analýzou, při níž jsem stanovila v každém obrázku plochu Hoechst-pozitivních jader a plochu všech jader. Procento Hoechst-pozitivních, tedy apoptotických jader jsem poté vyjádřila ve vztahu k ploše všech jader (100%). Průměry hodnot plochy Hoechst-pozitivních jader a odpovídající hodnoty S.E.M. jsou v tab. 2.

U infikovaných HeLa G buněk se v průběhu infekce zvyšoval podíl apoptotických jader (Obr. 5). Procento Hoechst-pozitivních jader (ve vztahu ke všem jádrům) stoupalo přibližně z 5% ve 24 h.p.i. přes 25% ve 48 h.p.i. až ke 40% v 96 h.p.i. (Obr. 6). U neinfikovaných kontrol se přitom procento Hoechst-pozitivních jader významně nezvyšovalo, u negativní kontroly, což jsou HeLa G buňky infikované WR-Bcl2, také ne. U infikovaných BSC-40 buněk zůstávalo procento Hoechst-pozitivních buněk na úrovni pozadí (podobné jako u neinfikovaných buněk, do 10%, Obr. 6). Jako pozitivní apoptotická kontrola byly použity buňky BSC-40 infikované WR-Bcl2, které díky paradoxnímu pro-apoptotickému efektu exprese Bcl-2 pomocí VACV podléhají apoptóze (Kalbacova et al., 2002). Tato kontrola vykazovala velké procento Hoechst-pozitivních jader (Obr. 6). Buňky

zobrazené fázovým kontrastem svojí morfologií odpovídaly pozorované apoptóze, infikované neapoptotické buňky vykazovaly cytopatický efekt (Obr. 5).



**Obr. 5. Analýza morfologie jader *in situ*.** Buňky **(A)** HeLa G a **(B)** BSC-40 byly infikovány WR-LUC (2 PFU/buňka) a v časech 12, 24, 48, 72, 96 h.p.i. byly obarveny DNA indikátorem Hoechst 33342 (0,1 µg/ml). Fluorescence jader a fázový kontrast buněk byly snímány fluorescenčním mikroskopem při zvětšení 100x. Obrázky reprezentují data z 5 pokusů.



**Obr. 6. Shrnutí analýzy morfologie jader in situ.** Fotografie buněk **(A)** HeLa G a **(B)** BSC-40 obarvených Hoechst 33342 v uvedených časech infekce (viz Obr. 5) byly vyhodnoceny pomocí obrazové analýzy a bylo vyjádřeno procento plochy Hoechst-pozitivních jader z plochy všech jader (100%). V grafech jsou vyneseny průměry hodnot z 5 pokusů, v každém pokusu byly hodnoceny alespoň 2 fotografie daného vzorku. Průměry a hodnoty S.E.M. jsou shrnuty v tabulce 2.

**Tab. 2 Hodnoty standardní chyby průměru (S.E.M.) k obr. 6**

**Tab. 2 A Průměry a S.E.M. k obr. 6A**

HeLa G	12 h.p.i.		24 h.p.i.		48 h.p.i.		72 h.p.i.		96 h.p.i.	
	% Hoechst-pozitivních jader	S.E.M.	% Hoechst-pozitivních jader	S.E.M.	% Hoechst-pozitivních jader	S.E.M.	% Hoechst-pozitivních jader	S.E.M.	% Hoechst-pozitivních jader	S.E.M.
Neinf.	1.16	0.54	1.13	0.29	1.72	0.58	3.36	0.58	3.24	0.92
wt-WR	0.79	0.40	1.69	0.54	21.78	5.62	32.49	6.20	34.13	3.28
WR-LUC	2.84	1.22	6.73	0.89	25.71	2.38	35.55	2.17	39.66	3.54
WR-EGFP	2.58	0.73	2.99	0.59	18.79	2.29	24.87	1.56	34.24	2.64
WR-Bcl2	2.05	1.27	1.27	0.87	1.96	0.67	5.41	1.83	6.99	2.04

**Tab. 2 B Průměry a S.E.M. k obr. 6B**

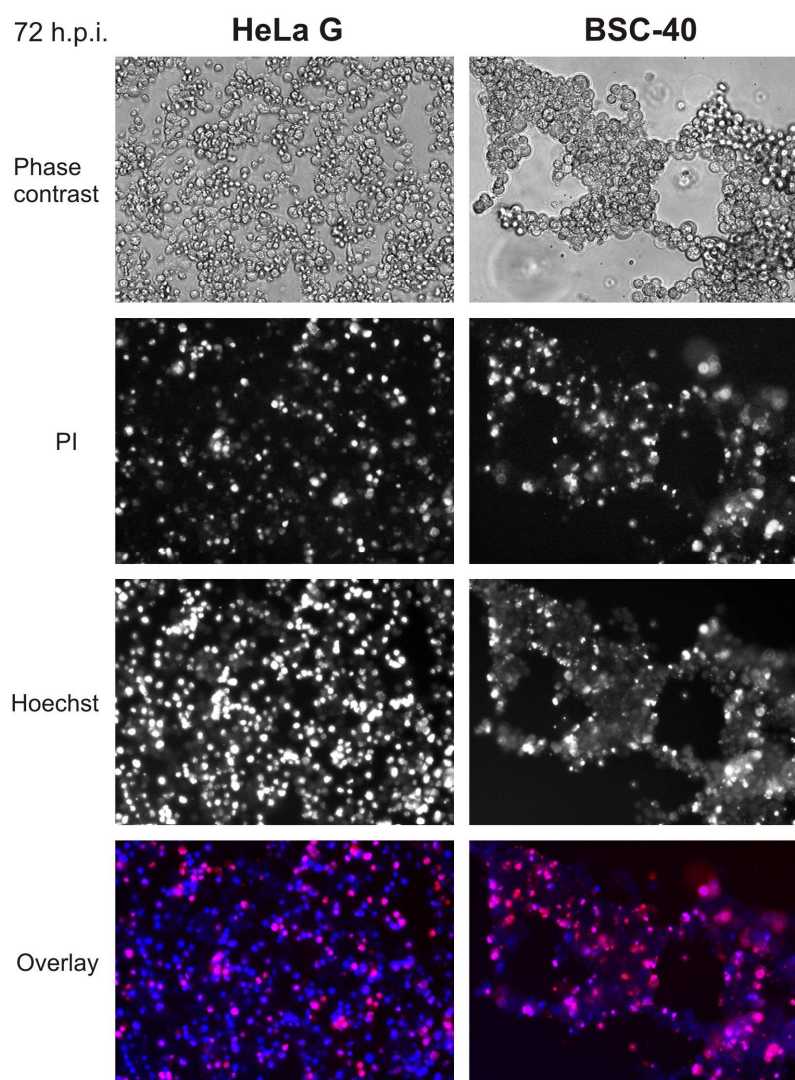
BSC-40	12 h.p.i.		24 h.p.i.		48 h.p.i.		72 h.p.i.		96 h.p.i.	
	% Hoechst-pozitivních jader	S.E.M.	% Hoechst-pozitivních jader	S.E.M.	% Hoechst-pozitivních jader	S.E.M.	% Hoechst-pozitivních jader	S.E.M.	% Hoechst-pozitivních jader	S.E.M.
Neinf.	1.01	0.29	0.86	0.38	1.38	0.47	1.70	0.65	4.34	1.71
wt-WR	2.82	0.97	3.42	2.00	4.89	0.65	5.15	0.84	8.93	0.13
WR-LUC	5.08	2.50	6.42	1.55	5.91	0.81	6.60	1.87	6.20	0.35
WR-EGFP	3.79	0.68	2.25	1.04	4.29	0.87	8.58	0.84	6.16	0.82
WR-Bcl2	3.44	1.69	27.75	5.04	49.65	14.70	N	–	N	–

N – nebylo stanoveno

Tyto výsledky ukazují, že u HeLa G buněk infikovaných VACV dochází v pozdějších časech infekce (48 h.p.i.) k apoptóze, která je pozorovatelná díky zřetelné kondenzaci jader. Naproti tomu infikované BSC-40 buňky v těchto intervalech apoptóze téměř nepodléhají, není u nich pozorovatelná kondenzace jader v míře vyšší než u neinfikovaných kontrol.

### 5.1.1.1.2 Analýza permeability cytoplasmatické membrány

Volná propustnost cytoplasmatické membrány pro PI se obvykle používá k odlišení mrtvých buněk. V kombinaci s vyloučením apoptózy (a sekundární nekrózy) můžeme PI-pozitivní buňky považovat za nekrotické. PI-pozitivitu buněk jsem hodnotila v kombinaci s Hoechst-pozitivitou fluorescenční mikroskopií. Získané fotografie jsem podrobila analýze obrazu a stanovila procento plochy slabé fluorescence PI a plochy silné fluorescence PI ve vztahu k celkové ploše jader (100%) stejně jako procento plochy Hoechst-pozitivních jader (kap. 5.1.1.1.1). Příklad detekce permeability cytoplasmatické membrány pomocí PI je na Obr. 7., zobrazeny jsou buňky HeLa G i BSC-40 infikované virem WR-LUC v čase 72 h.p.i.

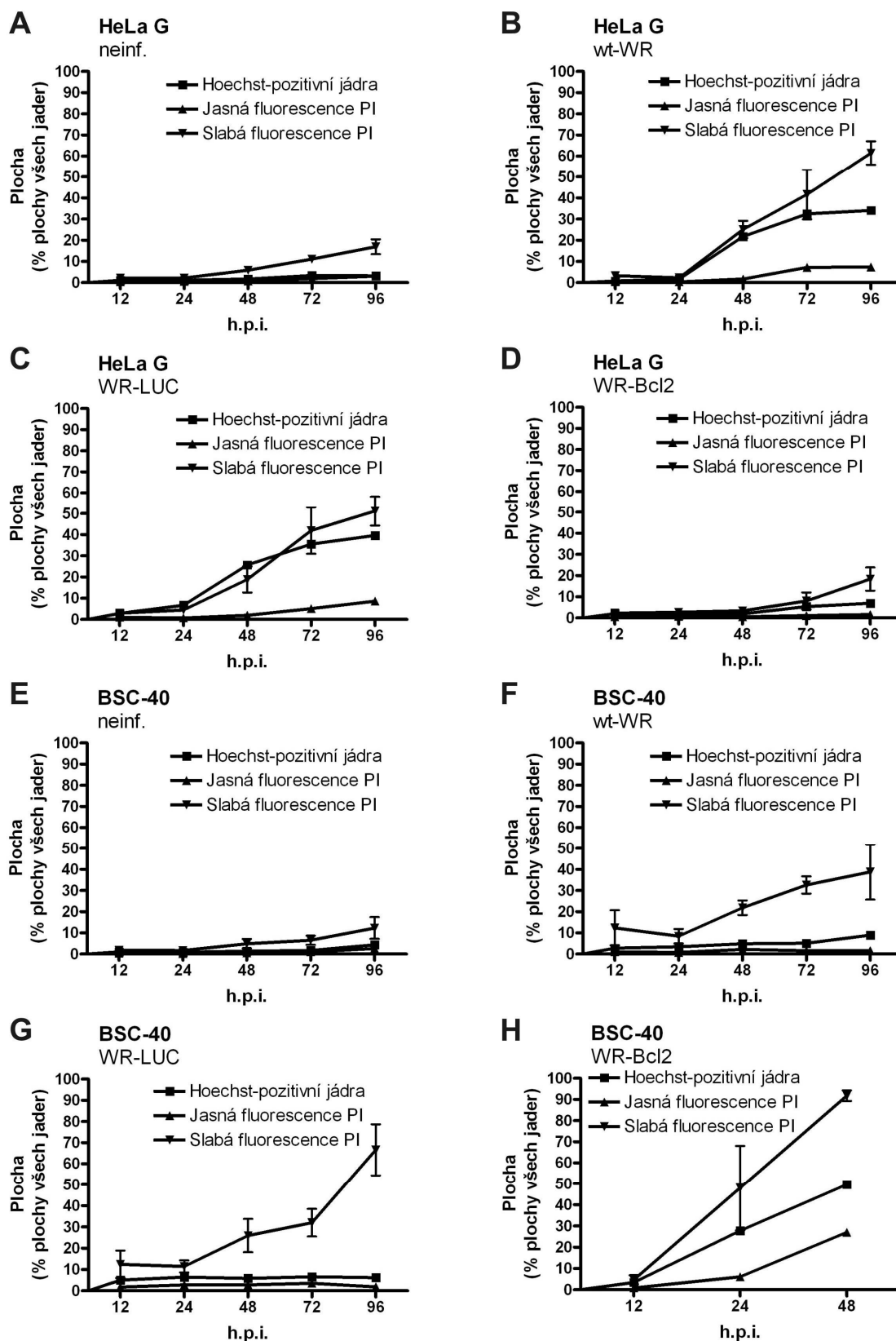


**Obr. 7. Příklad detekce permeability cytoplasmatické membrány.** Buňky HeLa G a BSC-40 byly infikovány virem WR-LUC (2 PFU/buňka) a v čase 72 h.p.i. byly obarveny DNA indikátory PI (0,2  $\mu\text{g/ml}$ ) a Hoechst 33342 (0,1  $\mu\text{g/ml}$ ). Fázový kontrast, fluorescence PI a Hoechst byly snímány fluorescenčním mikroskopem při zvětšení 100x. PI - červená, Hoechst - modrá. Obrázky reprezentují data z 5 pokusů.

U infikovaných HeLa G buněk se procento plochy slabé fluorescence PI zvyšovalo v čase a dosahovalo podobných hodnot jako jako procento Hoechst-pozitivních jader (Obr. 8). Slabá fluorescence PI však byla pozorována kromě jader částečně i v cytoplasmě buněk (Obr. 7). Silná fluorescence PI byla pozorována pouze v některých kondenzovaných (Hoechst-pozitivních) jádrech buněk jako důsledek sekundární nekrózy. Procento silně PI-pozitivní plochy se také zvyšovalo v čase, maximálně však k 10% (Obr. 8). HeLa G buňky infikované WR-Bcl2 sloužily jako negativní kontrola apoptózy. V těchto buňkách téměř chyběla PI- i Hoechst-pozitivita, z hlediska těchto parametrů byly srovnatelné s neinfikovanými buňkami (Obr. 8).

U infikovaných BSC-40 se podíl plochy slabé fluorescence PI také zvyšoval v čase, ovšem bez zvýšené Hoechst-pozitivity (Obr. 8). Slabá fluorescence PI dosahovala 40 - 70% v nejpozdějším zkoumaném intervalu 96 h.p.i. Podíl plochy silné fluorescence PI byl stále nízký, okolo 5%. U pozitivní apoptotické kontroly, buněk BSC-40 infikovaných WR-Bcl2, se procento slabé fluorescence PI zvýšilo ke 100%, procento silné fluorescence PI se zvýšilo na 25% v návaznosti na Hoechst pozitivitu, která se zvýšila na 50% plochy všech jader ve 48 h.p.i. (Obr. 8).

Z těchto výsledků lze shrnout, že infikované HeLa G buňky odpovídají v pozdějších intervalech infekce apoptotickým buňkám, později u nich dochází k sekundární nekróze. Infikované BSC-40 buňky v pozdějších intervalech infekce pravděpodobně postupně podléhají nekrotické smrti. Ani v 96 h.p.i. však nevykazují všechny infikované buňky PI-pozitivitu, jelikož zde procento plochy slabé fluorescence PI dosahuje pouze přibližně 40 - 60% plochy všech jader.



**Obr. 8. Permeabilita cytoplasmatické membrány buněk.** Buňky (A - D) HeLa G a (E - H) BSC-40 byly infikovány virem (B, F) wt-WR, (C, G) WR-LUC, (D, H) WR-Bcl2 (2 PFU/buňka) nebo (A, E) neinfikovány a v časech 12, 24, 48, 72, 96 h.p.i. byly obarveny DNA indikátorem PI (0,2 µg/ml) spolu s Hoechst 33342 (0,1 µg/ml, viz obr. 5, 6). Fázový kontrast, fluorescence PI a Hoechst byly snímány fluorescenčním mikroskopem při zvětšení 100x. Fotografie buněk obarvených PI byly vyhodnoceny pomocí obrazové analýzy a bylo vyjádřeno procento plochy jasné a slabé PI fluorescence spolu s procentem Hoechst-pozitivních jader z plochy všech jader (100%). V grafech

jsou vyneseny průměry hodnot z 5 pokusů, v každém pokusu byly hodnoceny alespoň 2 fotografie daného vzorku. Hodnoty S.E.M. pro jasnou fluorescenci PI byly pod 1%, hodnoty S.E.M. pro slabou PI fluorescenci jsou vyneseny v grafech a hodnoty S.E.M. pro Hoechst-pozitivní jádra jsou v tabulce 2.

### **5.1.1.2 Aktivace kaspáz v infikovaných buňkách**

V této práci rozlišuji aktivaci a aktivitu kaspáz. Aktivace znamená přítomnost aktivního místa kaspázy, které lze detekovat vazbou značeného inhibitoru. Přítomnost proteázy v aktivní konformaci však ještě nutně nemusí znamenat, že je přítomna také enzymová aktivita této proteázy. Proteáza může být například blokována buněčným nebo virovým inhibitorem, který však může být vytěsněn syntetickým inhibitorem s větší afinitou. Proto jsem dále analyzovala enzymovou aktivitu proteáz v buněčných lyzátech a také přímo na živých buňkách.

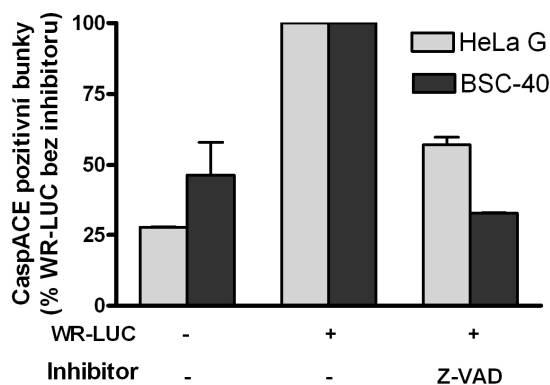
#### **5.1.1.2.1 Detekce obecné aktivace kaspáz**

Dřívější výsledky naší laboratoře ukazovaly obecnou aktivaci kaspáz v buňkách HeLa G i BSC-40 infikovaných VACV, které jsou všeobecně považovány za nekrotické (Kalbacova, 2003; Kalbacova et al., 2008). Proto jsem charakterizovala aktivaci kaspáz u buněčných linií HeLa G a BSC-40 infikovaných VACV více metodami.

##### **5.1.1.2.1.1 Analýza aktivace kaspáz průtokovou cytometrií**

Obecnou aktivaci kaspáz v infikovaných buňkách jsem nejprve charakterizovala pomocí CaspACE, což je obecný kaspázový inhibitor Z-VAD-FMK značený FITC. CaspACE je schopen proniknout cytoplasmatickou membránou, váže se kovalentně do aktivního centra kaspáz v živých buňkách a poté jsou značené buňky detekovány průtokovou cytometrií. Časové intervaly infekce pro hodnocení kaspázové aktivace a aktivity byly vybrány na základě předešlých výsledků (Kalbacova, 2003; Kalbacova et al., 2008) jako 12 h.p.i. u BSC-40 a 24 h.p.i. u HeLa G. V těchto časových intervalech se signál infikovaných buněk výrazně lišil od signálu buněk neinfikovaných. Pro ověření specifity eseje byly buňky inkubovány s neznačeným inhibitorem Z-VAD-FMK před přidáním CaspACE, čímž došlo ke kompetici a obsazení aktivního místa kaspáz neznačeným inhibitorem. Data získaná průtokovou cytometrií byla vyhodnocena způsobem ukázaným na obr. 4 (kap. 4.2.10). Byl určen počet CaspACE-pozitivních buněk a poté byl vyjádřen jako procento hodnoty infikovaných buněk bez inhibitoru (100%).

V liniích HeLa G i BSC-40 infikovaných VACV byla esejem CaspACE detekována obecná aktivace kaspáz, a to asi 4x (HeLa G) a 2x (BSC-40) vyšší než u neinfikovaných buněk (Obr. 9). Kompetice obecným kaspázovým inhibitorem Z-VAD-FMK tento signál snížila, což ukazuje na selektivní vazbu CaspACE do aktivního centra kaspáz.



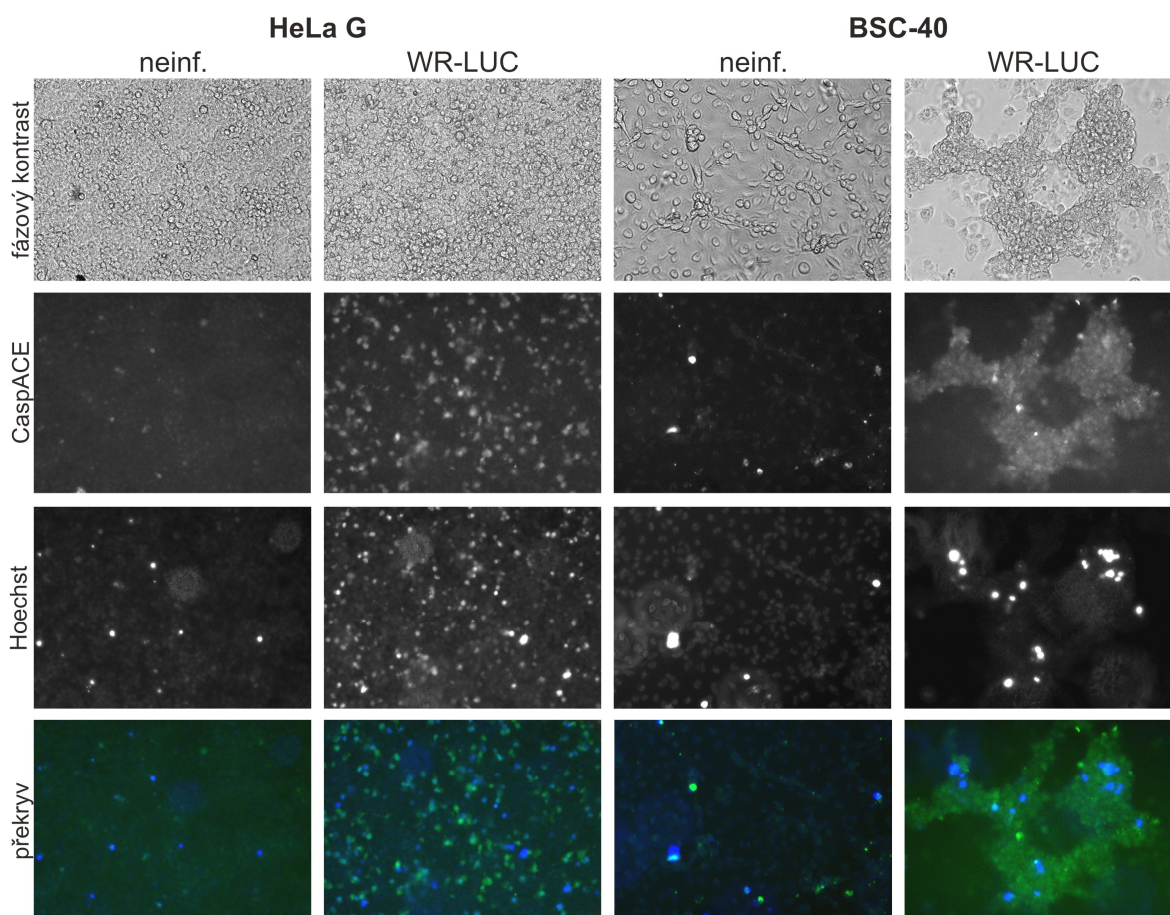
**Obr. 9. Aktivace kaspáz v buňkách infikovaných VACV.** Buňky HeLa G a BSC-40 byly infikovány WR-LUC (2 PFU/buňka) a v čase 24 h.p.i. (HeLa G) nebo 12 h.p.i. (BSC-40) byly sklizeny pro CaspACE esej. Esej byl v kontrolních vzorcích kompetován pomocí Z-VAD-FMK (50  $\mu$ M). Fluorescence buněk byla hodnocena průtokovou cytometrií, CaspACE pozitivita byla vyjádřena jako procenta hodnoty infikovaných buněk bez inhibitoru (100%). V grafu jsou vyneseny průměry ze 3 pokusů provedených v duplikátech, chybové úsečky ukazují hodnoty S.E.M.

#### 5.1.1.2.1.2 Analýza aktivace kaspáz mikroskopicky

Výsledky získané pomocí průtokové cytometrie jsem ověřila také mikroskopicky *in situ*. CaspACE se tedy vázal na buňky přímo v kultivačních destičkách bez pipetování buněk i dalších manipulací. Postup a promytí byly stejné jako při přípravě vzorků pro průtokovou cytometrii, pouze vše probíhalo v jamkách kultivačních destiček. Nakonec byla jádra buněk dobarvena fluorescenčním indikátorem Hoechst 33342.

Obrázek 10 ukazuje, že infikované HeLa G i BSC-40 buňky mají vyšší signál zelené fluorescence v porovnání s neinfikovanými buňkami, což znamená větší množství CaspACE navázané na infikované buňky a tedy pravděpodobně více aktivovaných kaspáz v infikovaných buňkách. Tento výsledek odpovídá výsledkům získaným pomocí průtokové cytometrie. Signál však nebylo možné snížit kompeticí CaspACE se Z-VAD-FMK (50  $\mu$ M). Důvodem bylo pravděpodobně to, že pro mikroskopii byla použita vyšší koncentrace CaspACE (10  $\mu$ M) než pro průtokovou cytometrii kvůli detekci fluorescence.



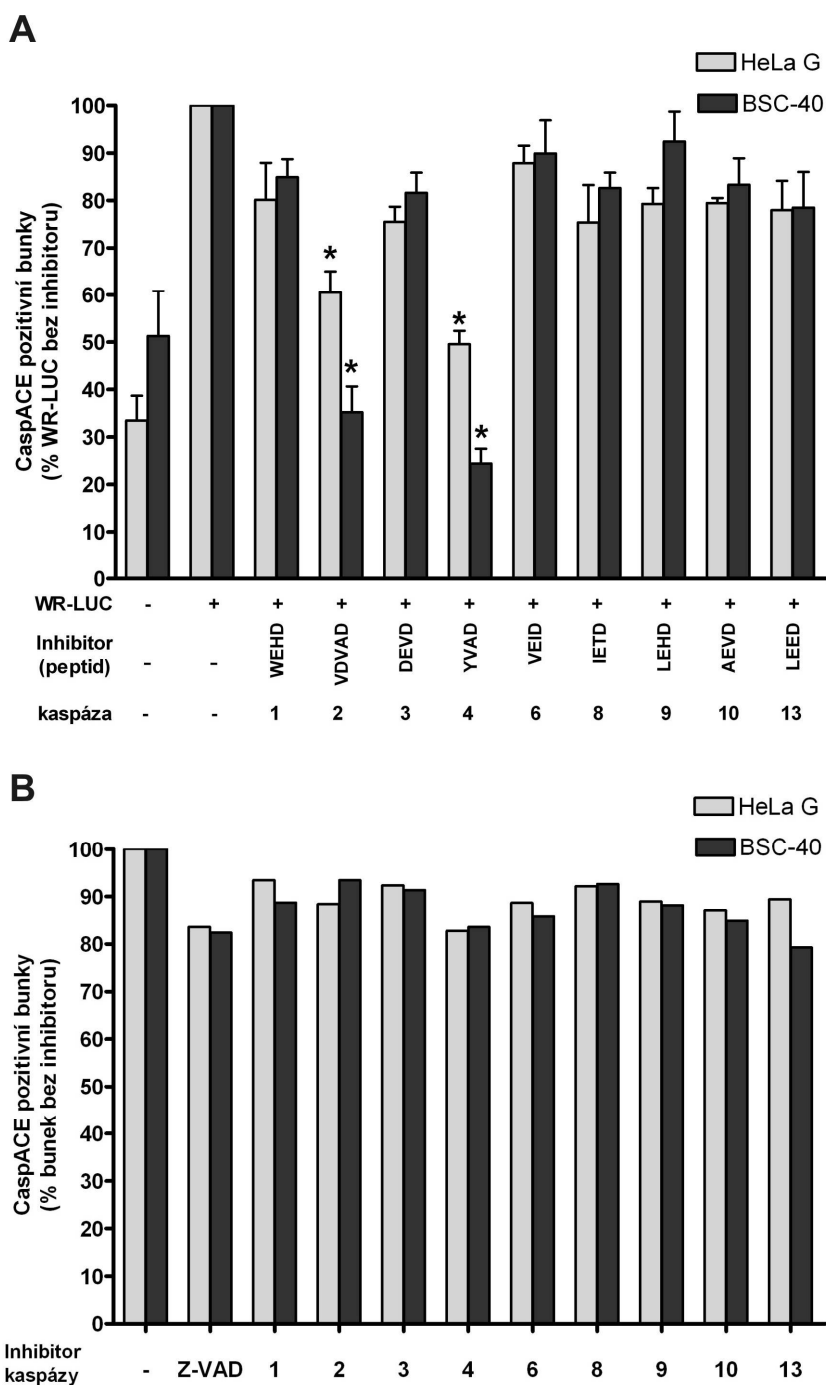


**Obr. 10. Aktivace kaspáz v buňkách infikovaných VACV.** Buňky HeLa G a BSC-40 byly infikovány WR-LUC (2 PFU/buňka) a v čase 24 h.p.i. (HeLa G) nebo 12 h.p.i. (BSC-40) byl proveden CaspACE esej přímo v kulturačních destičkách. Buňky byly v jamkách dobarveny DNA indikátorem Hoechst 33342 (0,1 µg/ml) a fluorescence a fázový kontrast buněk byly snímány fluorescenčním mikroskopem. Obrázky reprezentují 2 pokusy. CaspACE – zelená, Hoechst – modrá.

### 5.1.1.2.2 Aktivace jednotlivých kaspáz

#### 5.1.1.2.2.1 Analýza aktivace jednotlivých kaspáz průtokovou cytometrií

Aktivaci jednotlivých kaspáz v buňkách infikovaných VACV jsem charakterizovala opět pomocí eseje CaspACE za použití kompetice tohoto eseje specifickými inhibitory jednotlivých kaspáz. Suspenze buněk byla nejprve preinkubována s jednotlivými inhibitory kaspáz (1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 13) a posléze byl přidán CaspACE. Signál navázaného CaspACE byl detekován průtokovou cytometrií.



**Obr. 11. Aktivace jednotlivých kaspáz v buňkách infikovaných VACV.** Buňky HeLa G a BSC-40 byly **(A)** infikovány WR-LUC (2 PFU/buňka) nebo **(B)** neinfikovány. V čase 24 h.p.i. (HeLa G) nebo 12 h.p.i. (BSC-40) byly sklizeny pro CaspACE esej. Esej byl v označených vzorcích kompetován pomocí uvedených inhibitorů kaspáz (50  $\mu$ M). Fluorescence buněk byla hodnocena průtokovou cytometrií. **(A)** CaspACE pozitivita byla vyjádřena jako procenta hodnoty infikovaných buněk bez inhibitoru (100%). V grafu jsou vyneseny průměry ze 3 pokusů provedených v duplikátech, chybové úsečky ukazují hodnoty S.E.M. \* - Vzorky se statisticky signifikantně liší od vzorků preinkubovaných s ostatními inhibitory ( $p = 0,05$ ). **(B)** CaspACE pozitivita byla vyjádřena jako procenta hodnoty buněk bez inhibitoru (100%). V grafu jsou vyneseny průměry z 1 pokusu provedeného v duplikátech.

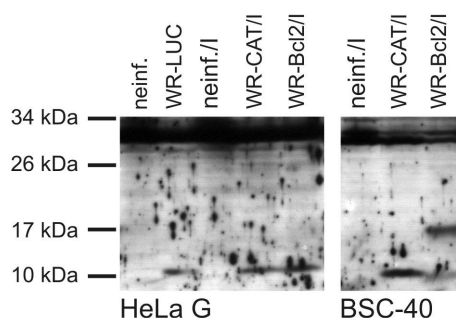
K výraznému snížení signálu (40 – 70%) došlo u obou buněčných linií ve vzorcích kompetovaných inhibitory kaspáz 2 a 4. (Obr. 11A). Toto snížení se statisticky

signifikantně lišilo od snížení vyvolaného kompeticí ostatními inhibitory. Tyto výsledky ukazují na možnou aktivaci kaspázy 2 a 4 v buňkách infikovaných VACV.

Stejným způsobem jsem provedla také kontrolní experimenty s neinfikovanými buňkami HeLa G a BSC-40. Kompetice inhibitory jednotlivých kaspáz zde způsobuje pouze mírný pokles signálu CaspACE (Obr. 11B), pozorovaná aktivace kaspáz 2 a 4 je tedy specifická pro infikované buňky. Snížení signálu způsobené kompeticí CaspACE s ostatními inhibitory je podobné u infikovaných i neinfikovaných buněk (10 – 15%).

#### 5.1.1.2.2 Analýza štěpení kaspázy 3

Zajímá nás také stav exekutorové kaspázy 3 v buňkách infikovaných VACV. Proto jsem analyzovala aktivaci prokaspázy 3, respektive její štěpení, western blotem. Prokaspáza 3 odpovídá molekulové hmotnosti 32 kDa a je štěpena na fragmenty o velikosti 20 kDa, 17 kDa a 11 kDa. Fragmenty o velikosti 17 a 11 kDa přitom tvoří výsledný aktivní heterotetramer kaspázy 3. Buňky HeLa G a BSC-40 byly infikovány několika rekombinanty VACV a sklizeny v čase 15 h.p.i. pro western blot.



**Obr. 12. Štěpení kaspázy 3.** Buňky HeLa G a BSC-40 byly infikovány uvedenými virem (2 PFU/buňka) a v čase 15 h.p.i. byly sklizeny pro western blot (10% SDS-PAGE). Neinf./I – neinfikované buňky v přítomnosti IPTG. I - rekombinantní protein je exprimován z IPTG-inducibilního promotoru p4b v přítomnosti IPTG. Obrázky reprezentují výsledky 8 pokusů.

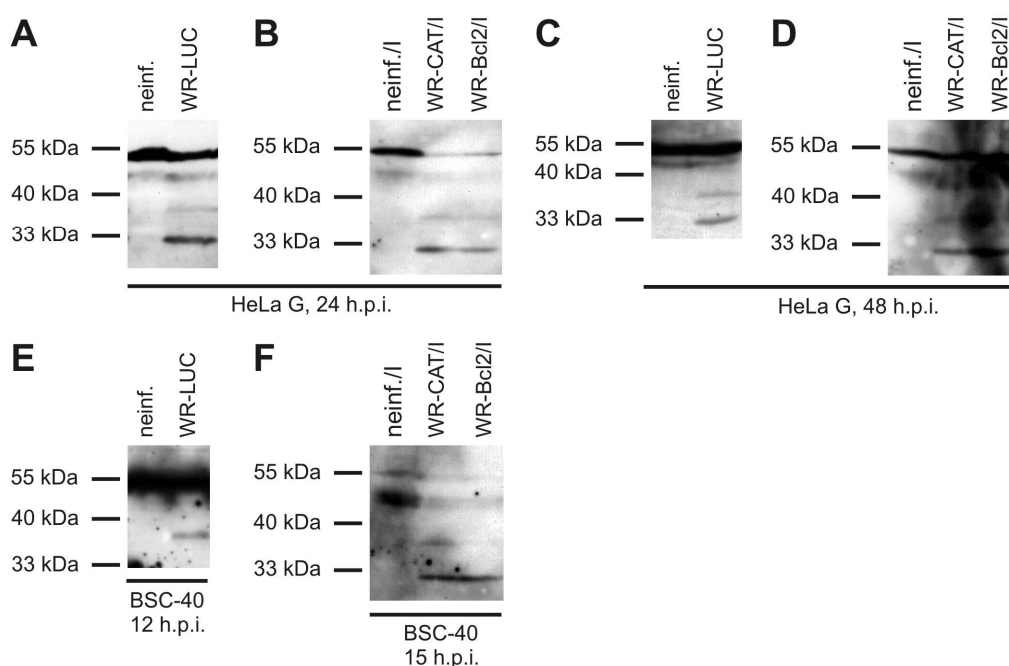
V infikovaných HeLa G buňkách bylo pozorováno štěpení kaspázy 3 při infekci WR-LUC, WR-CAT/I i WR-Bcl2/I, byl však přítomen pouze fragment o přibližné velikosti 11 kDa (Obr. 12). V infikovaných BSC-40 buňkách bylo pozorováno štěpení kaspázy 3 při infekci WR-CAT/I a WR-Bcl2/I (Obr. 12). V pozitivní apoptotické kontrole, buňkách BSC-40 infikovaných WR-Bcl2/I, byly výrazně přítomné fragmenty o velikosti odpovídající 17 i 11 kDa, tedy aktivním fragmentům kaspázy 3 (Kalbacova et al., 2002). V buňkách BSC-40 infikovaných virem WR-CAT/I byl detekován pouze fragment kaspázy 3 o velikosti 11 kDa. V dalších pokusech byly pozorovatelné slabé proužky odpovídající fragmentu o velikosti 11 kDa i při infekci buněk BSC-40 virem WR-LUC. V čase infekce

18 h.p.i. byl také pozorovatelný fragment 11 kDa v buňkách BSC-40 infikovaných virem WR-CAT/I (není ukázáno).

Z těchto výsledků vyplývá, že při infekci VACV dochází k aktivaci kaspázy 3 v buňkách HeLa G i BSC-40, a to nezávisle na morfologické manifestaci apoptózy.

### 5.1.1.2.3 Analýza štěpení kaspázy 12

Jelikož hlavní způsoby aktivace apoptózy (vnější a vnitřní dráha) by v buňkách infikovaných VACV měly být blokovány díky exprimovaným antiapoptotickým faktorům, rozhodli jsme se analyzovat aktivaci kaspázy 12, která do těchto drah nenáleží a mohla by aktivovat exekutorové kaspázy nezávisle na vnější i vnitřní dráze. Štěpení této kaspázy jsem analyzovala western blotem pomocí protilátky, která reaguje s neštěpenou (45 kDa) i štěpenou formou této kaspázy. Fragment kaspázy 12 o přibližné velikosti 38 kDa bývá považován za výsledek štěpení kalpainem, fragment o přibližné velikosti 35 kDa zase za výsledek štěpení kaspázami 3/7 (Martinez et al., 2010). Infikované HeLa G a BSC-40 buňky a neinfikované kontroly byly sklizeny pro western blot v různých časových intervalech infekce. V neinfikovaných kontrolách nebylo štěpení kaspázy 12 pozorováno



**Obr. 13. Štěpení kaspázy 12.** Buňky HeLa G a BSC-40 byly infikovány uvedenými viry (2 PFU/buňka) a v různých časech byly sklizeny pro western blot (10% SDS-PAGE). **(A, B)** HeLa G, 24 h.p.i. **(C, D)** HeLa G, 48 h.p.i. **(E)** BSC-40, 12 h.p.i. **(F)** BSC-40, 15 h.p.i. Neinf./I – neinfikované buňky v přítomnosti IPTG. I – rekombinantní protein je exprimován z IPTG-inducibilního promotoru p4b v přítomnosti IPTG. Obrázky reprezentují výsledky 9 pokusů.

nikdy. V infikovaných HeLa G buňkách bylo štěpení kaspázy 12 detekováno v čase 24 a 48 h.p.i. (Obr. 12). V infikovaných BSC-40 buňkách bylo štěpení kaspázy 12 pozorováno v čase 12, 15, 18 h.p.i. (Obr. 12 a není ukázáno). Štěpení kaspázy 12 bylo pozorováno také v buňkách 143 TK- infikovaných VACV (není ukázáno). Na štěpení kaspázy 12 detekované western blotem v infikovaných buňkách nemělo vliv působení inhibitorů kalpainu přidaných k buňkám během infekce. Inhibitory kalpainu (calpastatin peptid a Calpain inhibitor V) byly k buňkám přidány stejným způsobem jako v kapitole 5.1.1.5.2.

### **5.1.1.3 Aktivita kaspáz v infikovaných buňkách**

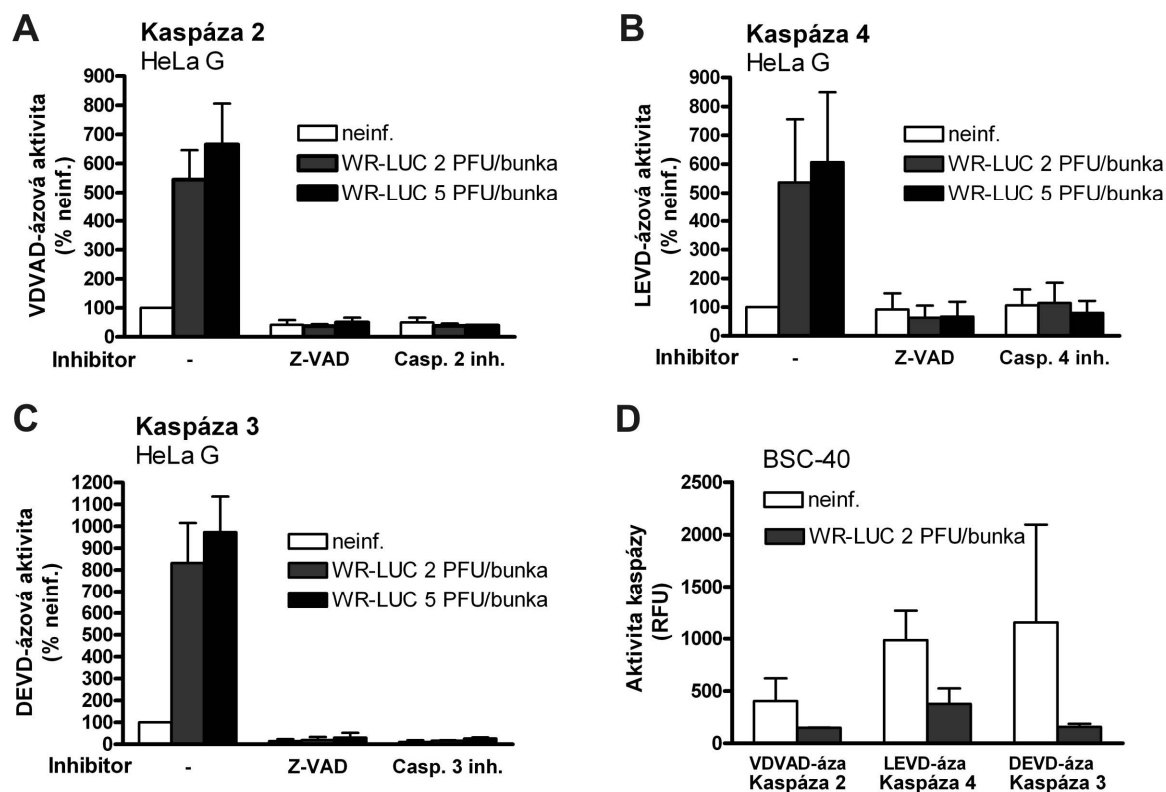
Po stanovení aktivace kaspáz v infikovaných buňkách jsem chtěla stanovit také enzymovou aktivitu kaspáz. Konkrétně jsem chtěla stanovit specifickou aktivitu kaspáz 2, 4, 3 a také 12, u nichž byla již pozorována aktivace, a také aktivitu kaspáz pomocí eseje Rhodamine 110-D<sub>2</sub>, což odpovídá stanovení obecné aktivace kaspáz esejem CaspACE. Sledovala jsem také aktivitu exekutorových kaspáz pomocí štěpení jejich substrátů PARP a cytokeratin 18.

#### **5.1.1.3.1 Aktivita kaspáz-2, 3, 4 a 12 měřená v lyzátech *in vitro***

Specifickou enzymovou aktivitu jednotlivých kaspáz jsem prověřila s použitím fluorogenních substrátů jednotlivých kaspáz. Tyto substráty jsem použila pro eseje *in vitro* na buněčných lyzátech. Použila jsem eseje pro aktivitu kaspáz 2, 4 a 3. Aktivaci kaspáz 2 a 4 ukázal esej CaspACE a kaspáza 3 byla původně zahrnuta jako kontrola, neboť esej CaspACE její výraznou aktivaci neukázal (kap. 5.1.1.2.2.1). Aktivita kaspáz byla stanovena ve stejných intervalech po infekci jako aktivace kaspáz, tedy 12 h.p.i. pro buňky BSC-40 a 24 h.p.i. pro buňky HeLa G.

V buněčné linii HeLa G byla aktivita všech tří měřených kaspáz výrazně vyšší než u neinfikovaných buněk (obr. 14), při použití vyšší multiplicity infekce (m.o.i. = 5) byly aktivity kaspáz mírně vyšší než při použití nižší multiplicity infekce. Tuto aktivitu bylo možné inhibovat specifickým inhibitorem určité kaspázy i obecným kaspázovým inhibitorem Z-VAD-FMK. V buněčné linii BSC-40 byla aktivita těchto tří kaspáz velmi nízká, dokonce nižší v lyzátech infikovaných buněk než v lyzátech neinfikovaných buněk (Obr. 14D). Jako pozitivní kontrolu pro tyto eseje jsem použila lyzáty apoptotických buněk. Apoptóza v těchto buňkách byla vyvolána působením staurosporinu o koncentraci 500 nM po dobu 15 h. Tyto apoptotické lyzáty měly výrazně vyšší signál oproti lyzátem z normálních (neinfikovaných) buněk, a to u HeLa G buněk 23 krát pro kaspázu 2, 28 krát

pro kaspázu 4, 22 krát pro kaspázu 3, u BSC-40 buněk 24 krát pro kaspázu 2, 5 krát pro kaspázu 4, 22 krát pro kaspázu 3.



**Obr. 14. Aktivita kaspáz 2, 3, 4 v buňkách infikovaných VACV.** Buňky HeLa G a BSC-40 byly infikovány virem WR-LUC (2 nebo 5 PFU/buňka) a v čase 24 h.p.i. (HeLa G) nebo 12 h.p.i. (BSC-40) byly sklizeny pro eseje na aktivitu jednotlivých kaspáz v lyzátech. Kontrolní eseje byly provedeny v přítomnosti Z-VAD-FMK nebo odpovídajících specifických inhibitorů kaspáz (50  $\mu$ M). Stanovení aktivity (A) kaspázy 2, (B) kaspázy 4 a (C) kaspázy 3 v buňkách HeLa G. (D) Stanovení aktivity kaspáz 2, 4 a 3 v buňkách BSC-40. (A, B, C) Fluoresce vzorků byla vyjádřena jako procento fluorescence neinfikovaných kontrol bez inhibitoru (100%). (D) Fluorescence vzorků byla vyjádřena přímo, RFU – relativní jednotky fluorescence. V grafech jsou vyneseny průměry ze 3 pokusů provedených v duplikátech, chybové úsečky ukazují hodnoty S.E.M.

Aktivitu kaspázy 12 v buněčných lyzátech infikovaných buněk HeLa G ani BSC-40 se prokázat nepodařilo. Testy byly provedeny stejným způsobem jako u kaspáz 2, 3 a 4 s použitím specifického substrátu kaspázy 12 (BioVision, sekvence peptidu ATAD). Aktivita kaspázy 12 nebyla naměřena ani ve vzorcích, ve kterých byl použit jako pozitivní kontrola lyzát z buněk, v nichž byla vyvolána apoptóza staurosporinem.

Uvedené výsledky ukazují, že kaspázy 2, 3 a 4 jsou aktivní v HeLa G buňkách infikovaných VACV, ale infikované BSC-40 buňky nevykazují aktivitu žádné z těchto kaspáz. V pozitivních apoptotických kontrolách přitom jsou tyto kaspázy aktivní v obou buněčných liniích.

### 5.1.1.3.2 Ovlivnění růstu viru vakcinie inhibitory kaspáz 2, 3, 4

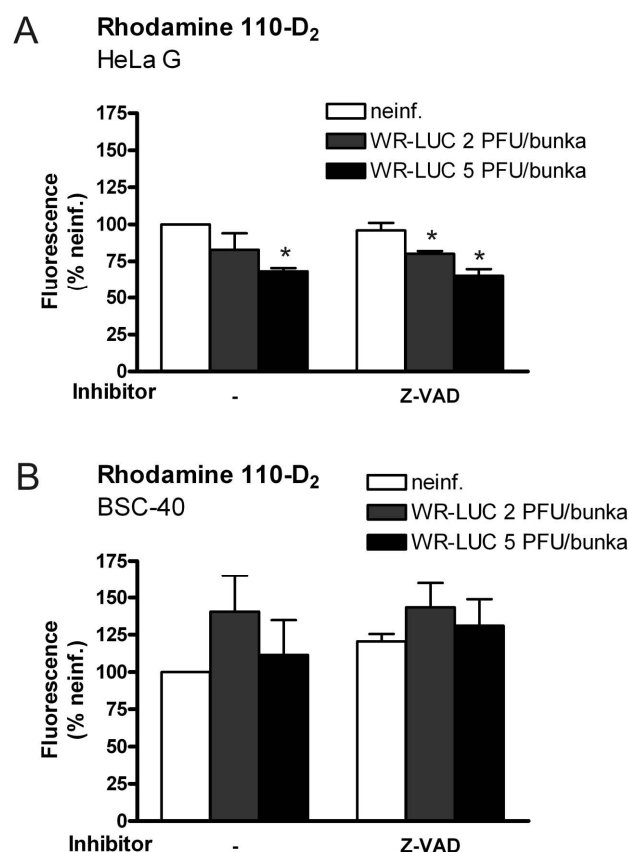
Vzhledem k pozorované aktivaci a aktivitě kaspáz 2, 3, 4 v infikovaných buňkách (kapitoly 5.1.1.2.2.1, 5.1.1.3.1) jsem také ověřovala, zda inhibice aktivity kaspáz 2, 3, 4 nebo aktivity kaspáz obecně má vliv na růst VACV. Buňky HeLa G nebo BSC-40 byly infikovány VACV o nízké multiplicitě infekce (0,01 PFU/buňka) za přítomnosti uvedených specifických inhibitorů kaspáz a obecného inhibitoru kaspáz Z-VAD-FMK ve finální koncentraci 50  $\mu$ M, tedy stejné koncentraci, jako byla použita k inhibici provedených esejů. Po 48 hodinách byly infikované buňky sklizeny a titr viru byl stanoven plakovým esejem. Výsledky shrnuté v tabulce 3 ukazují, že žádný z testovaných inhibitorů neměl vliv na růst viru vakcinie. Výsledky byly podobné v obou testovaných buněčných liniích.

buňky	inhibitor					
	0	DMSO	Z-VAD	casp. 2	casp. 3	casp. 4
<b>HeLa G</b>	7,43	7,28	7,41	7,32	7,27	7,39
<b>BSC-40</b>	7,81	7,74	7,73	7,82	7,76	7,85

**Tab. 3. Ovlivnění růstu viru vakcinie inhibitory kaspáz 2, 3, 4.** Buňky na 24-jamkových destičkách byly infikovány virem WR-LUC (m.o.i. = 0,01) za přítomnosti uvedených inhibitorů (finální koncentrace 50  $\mu$ M nebo odpovídající množství DMSO) po dobu 48 hodin. Titr virů byl stanoven plakovým esejem a vyjádřen jako dekadický logaritmus PFU/ml. Uvedené výsledky jsou průměry 2 pokusů v duplikátech (BSC-40) nebo 1 pokusu v duplikátech (HeLa G).

### 5.1.1.3.3 Obecná aktivita kaspáz měřená v lyzátech *in vitro*

Pokusila jsem se také stanovit obecnou aktivitu kaspáz odpovídající stanovení obecné aktivity kaspáz. Obecnou aktivitu kaspáz jsem stanovovala pomocí substrátu Rhodamine 110-D<sub>2</sub>, o kterém bylo publikováno, že slouží jako obecný substrát kaspáz, zvláště kaspáz 3 a 7 (Hug et al., 1999). V naší laboratoři byl tento esej rovněž používán pro detekci aktivity kaspáz na celých buňkách průtokovou cytometrií (Kalbacova et al., 2008). Eсей byl proveden v buněčných lyzátech sklizených v časech po infekci odpovídajících ostatním stanovením, jako kontrola byl přidán obecný inhibitor kaspáz Z-VAD-FMK. Výsledky ukazují podobný signál u infikovaných buněk i neinfikovaných kontrol (statistický rozdíl na úrovni  $p = 0,05$  pouze ve vzorcích infikovaných HeLa G buněk, kde je signál nižší oproti neinfikovaným kontrolám, viz obr. 15). Navíc se získaný signál statisticky neliší při přidání obecného inhibitoru kaspáz Z-VAD-FMK. To znamená, že esej bohužel není specifický pro aktivitu kaspáz, zřejmě ukazuje nescificky i aktivitu jiných proteáz. Obecnou aktivitu kaspáz proto tímto způsobem měřit nelze.



**Obr. 15. Detekce aktivity kaspáz substrátem Rhodamine 110-D<sub>2</sub>.** Buňky (A) HeLa G a (B) BSC 40 byly infikovány virem WR-LUC (2 PFU/buňka) a sklizeny v čase 24 h.p.i. (HeLa G) nebo 12 h.p.i. (BSC-40) pro esej Rhodamine 110-D<sub>2</sub>. V kontrolních vzorcích byl esej inhibován pomocí Z-VAD-FMK (Z-VAD, 50 μM). Fluorescence vzorků je vyjádřena jako procento fluorescence neinfikovaných kontrol (100%). \* Vzorky se statisticky signifikantně liší od příslušných neinfikovaných kontrol ( $p = 0,05$ ). V grafech jsou vyneseny průměry hodnot ze 2 pokusů provedených v duplikátech, chybové úsečky znázorňují S.E.M.

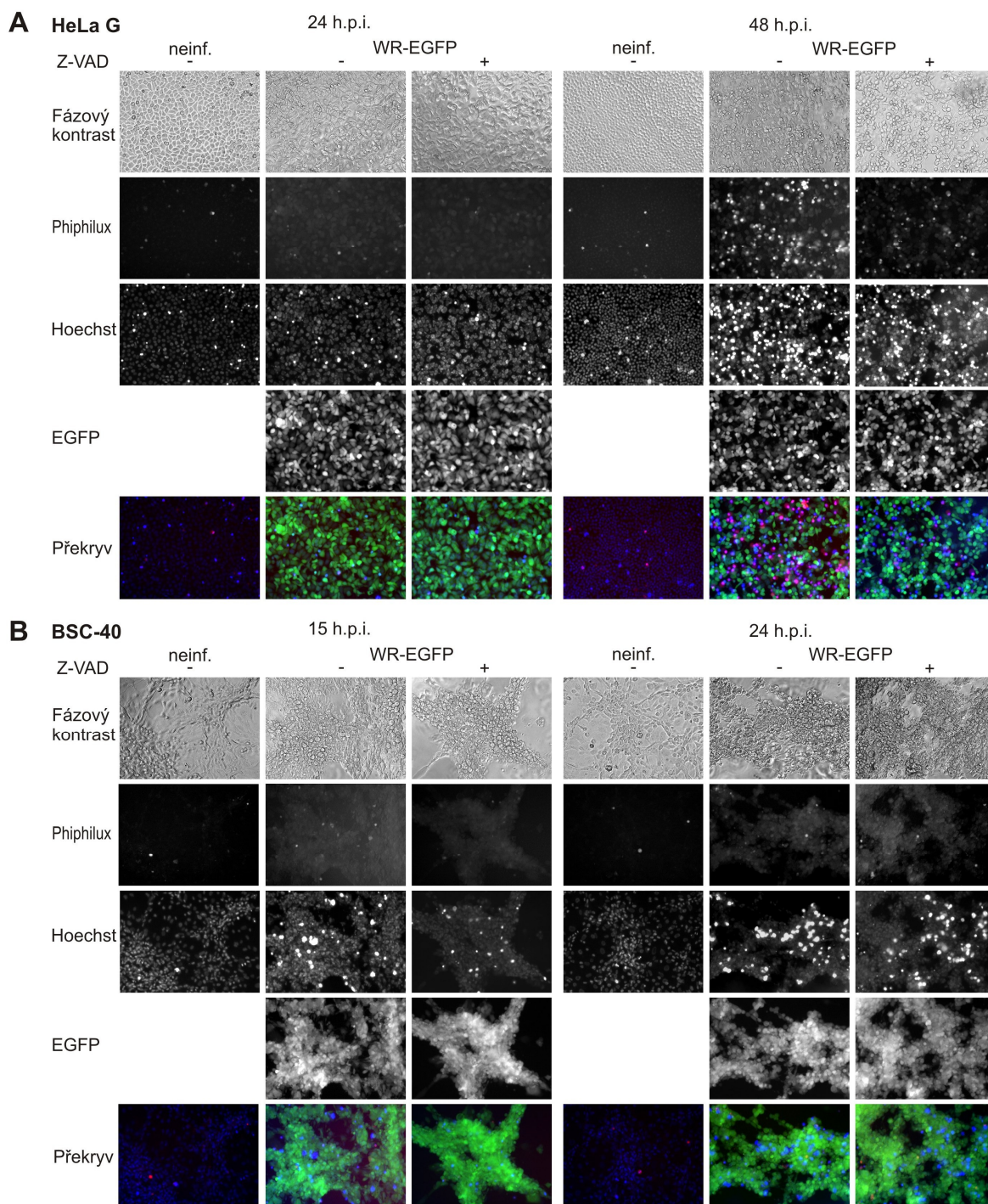
#### 5.1.1.3.4 Aktivita kaspázy 3 v živých buňkách *in situ*

Analyzovala jsem také aktivitu kaspázy 3 v živých buňkách bez dalších manipulací jako důkaz probíhající apoptózy. Permeabilní substrát kaspázy 3 PhiPhiLux-G<sub>2</sub>D<sub>2</sub> byl přidán k médiu buněk v kultivačních destičkách, jako kontrola specifity eseje byl použit inhibitor kaspáz Z-VAD-FMK přidáný 10 minut před substrátem. Jádra buněk byla nakonec dobarvena fluorescenčním indikátorem Hoechst 33342 a buňky v kultivačních destičkách byly hodnoceny pomocí fluorescenční mikroskopie. Esej byl proveden v časových intervalech odpovídajících stanovení aktivace kaspáz (CaspACE) a v pozdějších intervalech, t.j. 24 a 48 h.p.i. u HeLa G buněk, 12 a 24 h.p.i. u BSC-40 buněk.

Ve vzorcích buněk HeLa G infikovaných WR-EGFP nebo WR-LUC (není ukázáno) bylo ve 48 h.p.i. pozorovatelných mnoho buněk vykazujících aktivitu kaspázy 3 (Obr. 16A). Tento signál bylo možné do velké míry inhibovat preinkubací s kaspázovým inhibitorem Z-VAD-FMK. Intenzita signálu byla srovnatelná s pozitivní apoptotickou

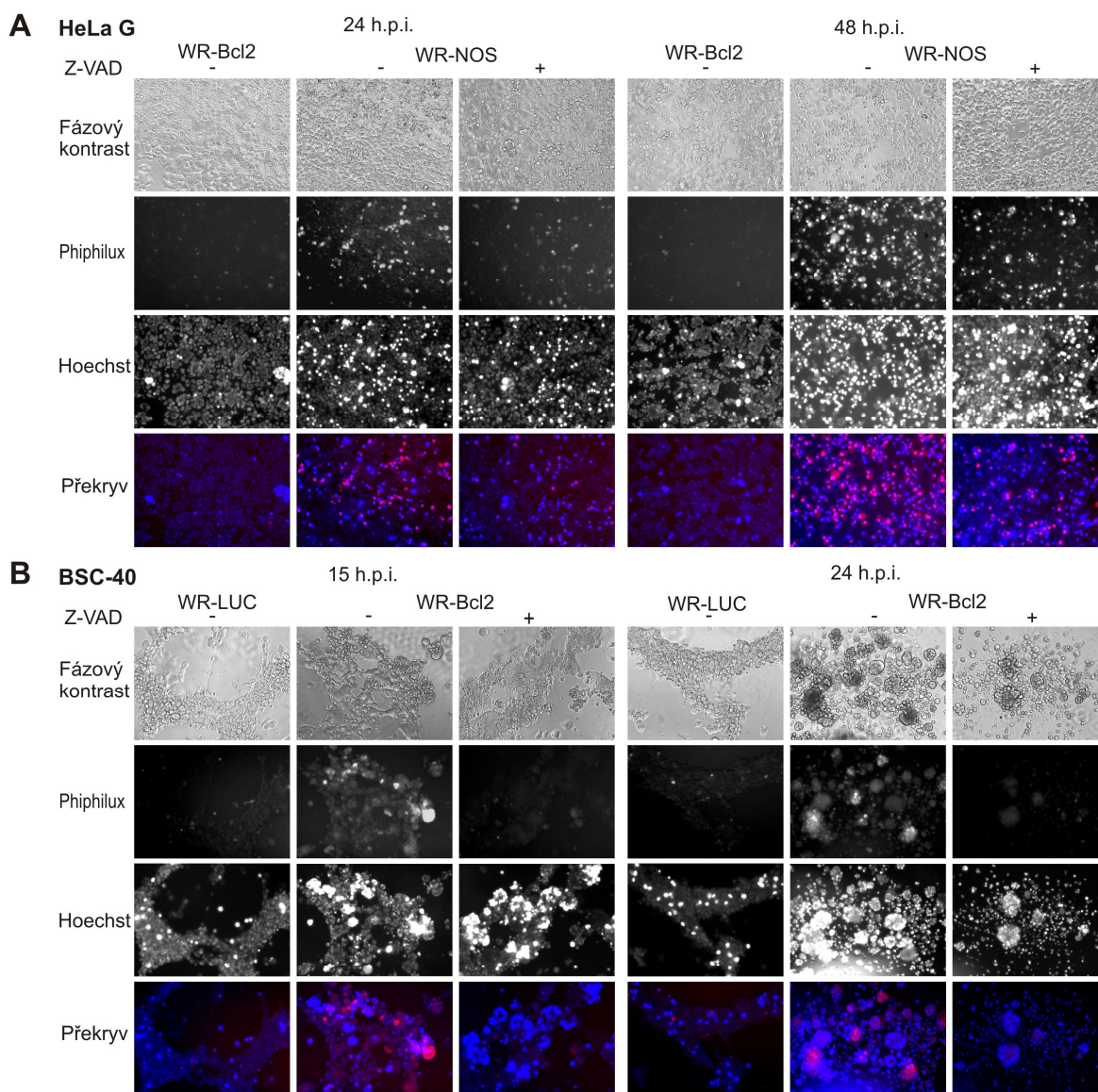


kontrolou, buňkami HeLa G infikovanými WR-NOS (Obr. 17). Buňky BSC-40 infikované virem WR-EGFP nebo WR-LUC (není ukázáno) nevykazovaly aktivitu kaspázy 3 (Obr. 16B) ve srovnání s pozitivní apoptotickou kontrolou, buňkami BSC-40 infikovanými WR-Bcl2 (Obr. 17).



**Obr. 16. Aktivita kaspázy 3 detekovaná in situ.** Buňky (A) HeLa G a (B) BSC-40 byly infikovány virem WR-EGFP (2 PFU/buňka V čase 24 a 48 h.p.i. (HeLa G) nebo 15 a 24 h.p.i. (BSC-40) byl proveden esej PhiPhiLux přímo v kulturačních destičkách. V kontrolních vzorcích byla aktivita kaspáz inhibována přidáním Z-VAD-FMK (50  $\mu$ M) před esejem. Jádra buněk byla dobarvena DNA indikátorem Hoechst 33342 (0,1  $\mu$ g/ml) a fluorescence a fázový kontrast buněk byly snímány fluorescenčním mikroskopem při zvětšení 100x. PhiPhiLux – červená, Hoechst – modrá, EGFP – zelená. Obrázky reprezentují výsledky ze 4 pokusů.

Tyto výsledky ukazují, že v průběhu infekce buněk HeLa G je aktivní exekutorová kaspáza 3, zatímco v průběhu infekce buněk BSC-40 tato kaspáza aktivní není. Aktivita kaspázy 3 však je pozorovatelná pouze v části infikovaných buněk.



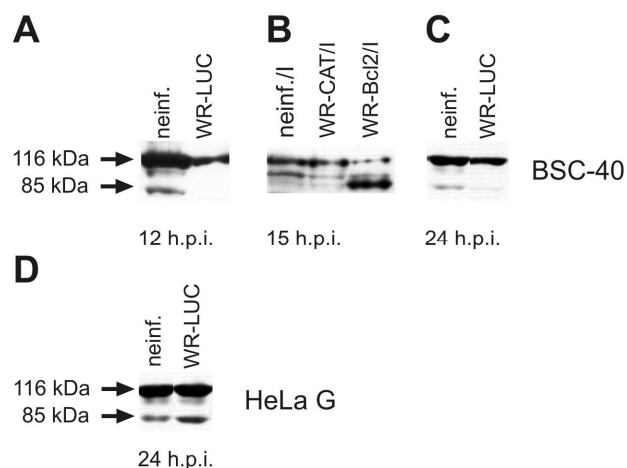
**Obr. 17. Aktivita kaspázy 3 detekovaná in situ – pozitivní a negativní kontroly.** Buňky (A) HeLa G a (B) BSC-40 byly infikovány uvedenými viry (2 PFU/buňka). V čase 24 a 48 h.p.i. (HeLa G) nebo 15 a 24 h.p.i. (BSC-40) byl proveden esej PhiPhiLux přímo v kultivačních destičkách. V kontrolních vzorcích byla aktivita kaspáz inhibována přidáním Z-VAD-FMK (50  $\mu$ M) před esejem. Jádra buněk byla dobarvena DNA indikátorem Hoechst 33342 (0,1  $\mu$ g/ml) a fluorescence a fázový kontrast buněk byly snímány fluorescenčním mikroskopem při zvětšení 100x. PhiPhiLux – červená, Hoechst – modrá. Obrázky reprezentují výsledky ze 4 pokusů.

### 5.1.1.3.5 Analýza produktů štěpení exekutorových kaspáz

#### 5.1.1.3.5.1 Štěpení PARP

PARP (poly-(ADP-ribose)-polymeráza) patří mezi substráty smrti. Štěpení tohoto proteinu se proto používá jako ukazatel aktivity exekutorových kaspáz 3 a 7. Původní PARP protein o velikosti 116 kDa je štěpen na fragment o velikosti 85 kDa.

Štěpení PARP jsem analyzovala western blotem ve stejných časových intervalech infekce jako aktivitu a aktivaci kaspáz a také v dalších časových intervalech. Štěpení PARP v dřívějších časech po infekci (12, 15, 24 h.p.i.) při infekci rekombinantami WR-LUC (buňky HeLa G a BSC-40), WR-CAT/I a WR-Bcl2/I (buňky BSC-40) ukazuje obr. 18. Štěpení PARP v pozdějších časech infekce (48 a 72 h.p.i.) při infekci WR-LUC je ukázáno také na obr. 26 (kap. 5.1.2.2) spolu se vzorky infikovanými viry Dryvax a Praha. Obrázek 23 (kap. 5.1.1.5.2) ukazuje štěpení PARP v infikovaných buňkách ve srovnání s neinfikovanými kontrolami a také štěpení PARP v infikovaných buňkách při působení inhibitorů kalpainu. Tyto vzorky byly také sklizeny ve stejných časech infekce jako vzorky pro CaspACE eseje a eseje na aktivitu kaspáz.



**Obr. 18. Štěpení PARP.** Buňky HeLa G (**D**) a BSC-40 (**A**, **B**, **C**) byly infikovány uvedenými viry (2 PFU/buňka) a v čase 12 h.p.i. (**A**) 15 h.p.i. (**B**) nebo 24 h.p.i. (**C**, **D**) byly sklizeny pro western blot (8% SDS-PAGE). Neinf./I – neinfikované buňky v přítomnosti IPTG. I - rekombinantní protein je exprimován z IPTG-inducibilního promotoru p4b v přítomnosti IPTG. Obrázky reprezentují výsledky 11 pokusů (BSC-40) nebo 6 pokusů (HeLa G).

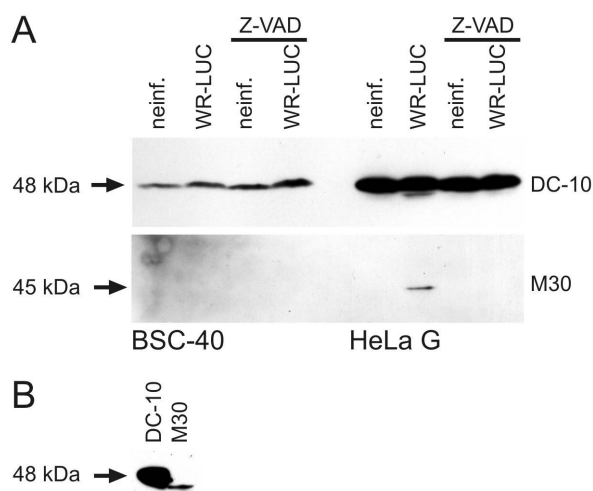
V buněčné linii HeLa G dochází ve 24 h.p.i. k vyššímu štěpení PARP ve srovnání s neinfikovanou kontrolou (Obr. 18). Bylo ukázáno, že toto štěpení je možné selektivně potlačit působením kaspázového inhibitoru Z-VAD-FMK ((Liskova et al., 2011) – experiment J. Knitlové). V buněčné linii BSC-40 ve 12 h.p.i. bylo štěpení PARP výrazně slabší v infikovaných buňkách oproti bazálnímu štěpení v neinfikovaných buňkách (Obr. 18). Působení Z-VAD-FMK nemělo na toto štěpení vliv ((Liskova et al., 2011) -

experiment J. Knitlové ). V dalších časových intervalech infekce se výsledky podobají, v buňkách BSC-40 infikovaných VACV je štěpení PARP vždy slabší či srovnatelné se štěpením v neinfikovaných kontrolách, zatímco v buňkách HeLa G je štěpení PARP vždy silnější než v neinfikovaných kontrolách. Buňky BSC-40 infikované virem WR-Bcl2/I sloužily jako pozitivní apoptotická kontrola a štěpení PARP v nich bylo silné.

Tyto výsledky ukazují na aktivitu exekutorových kaspáz 3/7 v HeLa G infikovaných VACV. Naproti tomu se zdá, že v BSC-40 infikovaných VACV kaspázy 3/7 aktivní nejsou.

#### 5.1.1.3.5.2 Štěpení cytokeratinu 18

Další substrát smrti podléhající štěpení exekutorovými kaspázami je cytokeratin 18. Štěpení cytokeratinu 18 jsem analyzovala western blotem pomocí dvou protilátek: protilátka produkovaná klonem DC-10 reaguje s neštěpenou (48 kDa) i štěpenou (45 kDa) formou proteinu, protilátka produkovaná klonem M30 reaguje pouze s neoepitopem vytvořenému štěpením kaspázami (45 kDa) (Caulin et al., 1997). Pro western blot byly použity buňky HeLa G i BSC-40 infikované VACV a sklizené v intervalech infekce 24 h.p.i. (HeLa G) a 12 h.p.i. (BSC-40). Kontrolní vzorky byly infikovány za přítomnosti obecného inhibitoru kaspáz Z-VAD-FMK.



**Obr. 19. Štěpení cytokeratinu 18. (A)** Buňky HeLa G a BSC-40 byly infikovány virem WR-LUC (2 PFU/buňka) v přítomnosti Z-VAD-FMK (Z-VAD, výsledná koncentrace 50  $\mu$ M) nebo DMSO. V čase 24 h.p.i. (HeLa G) nebo 12 h.p.i. (BSC-40) byly sklizeny pro western blot (10% SDS-PAGE). Detekce cytokeratinu 18 byla provedena protilátkami DC-10 a M30. Obrázky reprezentují 14 (HeLa G) nebo 10 (BSC-40) pokusů provedených v různých časových intervalech. **(B)** Buňky HeLa G byly infikovány virem WR-CAT/I (2 PFU/buňka) v přítomnosti IPTG a v čase 48 h.p.i. byly sklizeny pro western blot. Po přeblotování byl vzorek na membráně rozdělén na poloviny a cytokeratin 18 byl detekován na jedné polovině protilátkou DC-10 a na druhé polovině protilátkou M30. Obrázek reprezentuje 2 pokusy.

V infikovaných HeLa G buňkách byl kromě celého proteinu zřetelný pruh velikostí odpovídající štěpenému cytokeratinu 18 (Obr. 19A). Tento pruh nebyl přítomný v kontrolním vzorku, v němž byly inhibovány kaspázy pomocí Z-VAD-FMK. Protilátka M30 detekovala neoepitop cytokeratinu 18 také pouze ve vzorku z infikovaných buněk, ne již ve vzorku z infikovaných buněk s inhibovanými kaspázami. V infikovaných BSC-40 se nepodařilo detekovat štěpení cytokeratinu 18 (Obr. 19A) ani vznik neoepitopu M30. Podobné výsledky ukázala analýza vzorků buněk sklizených v různých časech infekce (HeLa G 48 h.p.i., BSC-40 15, 24 h.p.i.) i při infekci jinými rekombinanty VACV (WR-CAT/I, WR-Bcl2/I u HeLa G). Tyto výsledky ukazují, že v infikovaných HeLa G buňkách je štěpen substrát smrti cytokeratin 18 kaspázami, v infikovaných BSC-40 buňkách štěpen cytokeratin 18 nebylo nalezeno.

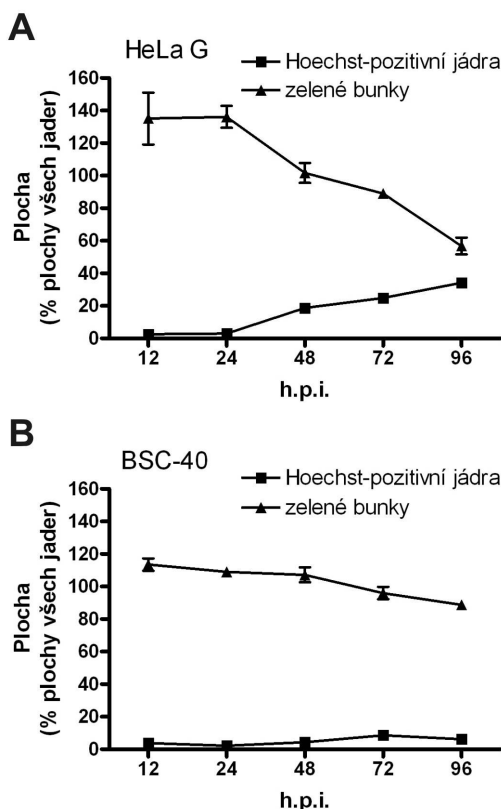
Pro ověření totožnosti obou proužků detekovaných protilátkami proti cytokeratinu 18 jsem použila vzorek se štěpeným cytokeratinem 18 rozdělený SDS-PAGE a přebílený na membránu. Tuto membránu se vzorkem jsem rozdělila na dvě části a inkubovala každou část s jinou protilátkou. Obr. 19B ukazuje, že slabší pruh rozeznávaný protilátkou DC-10 koreluje svou velikostí s pruhem rozeznávaným protilátkou M30.

#### **5.1.1.4 Časový průběh fluorescence buněk infikovaných virem WR-EGFP**

Analyzovala jsem také fluorescenci EGFP u buněk infikovaných WR-EGFP, který tento protein exprimuje pod časně-pozdním promotorem p7.5. Důvodem pro tuto analýzu byla skutečnost, že apoptotická jádra a aktivita kaspázy 3 (esej PhiPhiLux) byla pozorována často v buňkách HeLa G, které nevykazovaly zelenou fluorescenci. Přitom ve 24 h.p.i. byly téměř všechny buňky zjevně zelené, a tedy infikované (Obr. 16). Proto jsem se rozhodla zdokumentovat časový průběh podílu fluorescenčních buněk v buňkách infikovaných virem WR-EGFP. Pomocí obrazové analýzy jsem určila plochu zelené fluorescence v každém obrázku. Procento plochy fluorescenčních buněk jsem opět vyjádřila ve vztahu k ploše všech jader (100%).

U infikovaných HeLa G buněk se plocha zelené fluorescence v čase výrazně snižovala, od 135% ve 24 h.p.i. k 57% v 96 h.p.i. (Obr. 20A). U infikovaných BSC-40 se podíl zelené fluorescence snižoval jen mírně, od 110 % ve 24 h.p.i. k 89% v 96 h.p.i. (Obr. 20B). V souvislosti s ostatními výsledky lze předpokládat, že EGFP ztrácí fluorescenci v mrtvých, apoptotických buňkách u infikovaných HeLa G. Mírný pokles plochy zelené fluorescence v buňkách BSC-40 infikovaných WR-EGFP je způsoben spíše cytopatickým efektem infekce.

Kvantifikovala jsem také procento infikovaných buněk při infekci virem WR-EGFP pomocí průtokové cytometrie. Buňky HeLa G a BSC-40 byly infikovány WR-EGFP s multiplicitou 2 nebo 5 a v čase 4, 6, 12 a 24 h.p.i. byly sklizeny a změřeny průtokovou cytometrií. Bylo vyjádřeno procento infikovaných buněk, tedy buněk vykazujících zelenou fluorescence, ze všech buněk (100%). Také byla vyjádřena intenzita fluorescence zelených buněk jako průměrná hodnota fluorescence této populace.



**Obr. 20. Vývoj EGFP fluorescence v čase u buněk infikovaných WR-EGFP.** Buňky (A) HeLa G a (B) BSC-40 byly infikovány WR-EGFP (2 PFU/buňka) a v časech 12, 24, 48, 72, 96 h.p.i. byly obarveny indikátorem Hoechst 33342 (0,1 µg/ml). Fluorescence buněk byla snímána fluorescenčním mikroskopem při zvětšení 100x. Obrázky zelené fluorescence buněk jader obarvených Hoechst byly vyhodnoceny pomocí obrazové analýzy a bylo vyjádřeno procento plochy zelené fluorescence a procento plochy Hoechst-pozitivních jader z plochy všech jader (100%). V grafech jsou vyneseny průměry hodnot z 5 pokusů, v každém pokusu byly hodnoceny alespoň 2 obrázky daného vzorku. Hodnoty S.E.M. pro fluorescenci EGFP jsou vyneseny v grafech a hodnoty S.E.M. pro Hoechst-pozitivní jádra jsou v tabulce 2 (kap. 5.1.1.1.1).

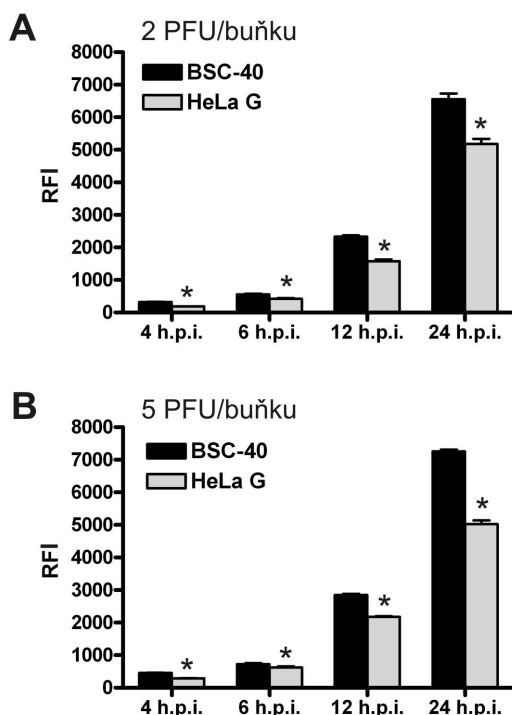
Výsledky analýzy procenta infikovaných buněk jsou v tabulce 4. Obě buněčné linie byly v čase 12 a 24 h.p.i. infikovány téměř 100%. Primární infekci je možné odhadnout z údajů naměřených ve 4 a 6 h.p.i. jako přibližně 64% u HeLa G a 63% u BSC-40 při m.o.i. = 2. Procento sekundárně infikovaných buněk bylo 35% u HeLa G buněk ve 24 h.p.i. a 37% u BSC-40 ve 12 h.p.i. při m.o.i. = 2.

Výsledky analýzy intenzity zelené fluorescence jsou znázorněny v grafech na obr. 21. Intenzita zelené fluorescence je vždy nižší u HeLa G buněk ve srovnání s odpovídající

intenzitou buněk BSC-40, tento rozdíl je ve všech případech statisticky signifikantní ( $p = 0,05$ ). Intenzita fluorescence proteinu EGFP je ukazatelem míry exprese tohoto proteinu pod časně-pozdním vakciniovým promotorem p7.5, zdá se tedy, že v infikovaných buňkách BSC-40 dochází k vyšší expresi VACV proteinů než v infikovaných HeLa G buňkách.

	2 PFU/buňka		5 PFU/buňka	
	HeLa G	BSC-40	HeLa G	BSC-40
4 h.p.i.	59.35 ± 1.29	58.30 ± 0.66	77.70 ± 0.58	69.40 ± 0.93
6 h.p.i.	67.90 ± 3.03	65.40 ± 1.19	80.85 ± 4.96	79.28 ± 1.47
12 h.p.i.	93.33 ± 1.78	98.78 ± 0.12	98.88 ± 0.06	99.40 ± 0.04
24 h.p.i.	98.95 ± 0.10	99.98 ± 0.02	98.93 ± 0.09	100.0 ± 0.00

**Tab. 4. Procento infikovaných buněk při infekci WR-EGFP.** Buňky HeLa G a BSC-40 byly infikovány WR-EGFP (2 nebo 5 PFU/buňka) a v časech 4, 6, 12, 24 h.p.i. byly sklizeny opatrným pasážováním. Zelená fluorescence buněk byla změřena průtokovou cytometrií v kanále FL1. Procento infikovaných buněk bylo vyjádřeno jako procento zelených buněk ze všech buněk (100%). Uvedené výsledky jsou průměry ze 2 pokusů v duplikátech ± S.E.M.



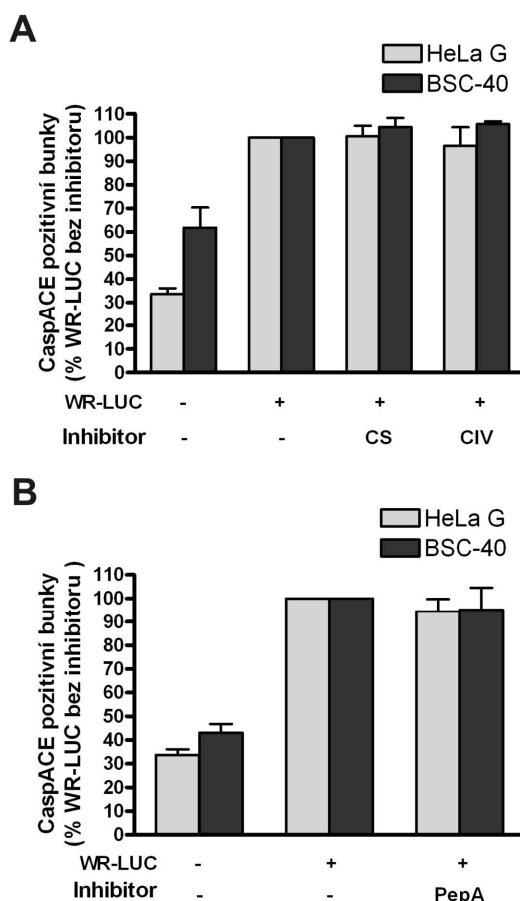
**Obr. 21. Intenzita fluorescence EGFP v buňkách infikovaných WR-EGFP.** Buňky HeLa G a BSC-40 byly infikovány WR-EGFP (**A**) 2 PFU/buňka nebo (**B**) 5 PFU/buňka a v časech 4, 6, 12, 24 h.p.i. byly sklizeny pasážováním. Zelená fluorescence buněk byla změřena průtokovou cytometrií v kanále FL1. V populaci buněk vykazujících zelenou fluorescenci byla kvantifikována intenzita fluorescence jako průměr hodnot fluorescence. RFI - relativní intenzita fluorescence. \* Vzorky buněk HeLa G se statisticky signifikantně liší od příslušných vzorků buněk BSC-40 ( $p = 0,05$ ). Uvedené výsledky jsou průměry ze 2 pokusů v duplikátech ± S.E.M.

### 5.1.1.5 Aktivace a aktivita jiných proteáz

Mnoho produktů genů VACV inhibuje přímo či nepřímo aktivaci či aktivitu mnoha kaspáz, my však přesto pozorujeme obecnou aktivaci kaspáz v infikovaných buňkách. Uvažovali jsme proto také o možnosti aktivace jiných proteáz v buňkách infikovaných VACV, například kalpainu a kathepsinů, a o jejich vlivu na pozitivitu eseje CaspACE a na další známky aktivity kaspáz.

#### 5.1.1.5.1 Vliv kalpainu na detekci aktivace kaspáz v infikovaných buňkách

Zkoumala jsem ovlivnění vazby CaspACE v infikovaných buňkách kalpainovými inhibitory. Ukázalo se (Obr. 22), že inhibitory kalpainu, konkrétně calpastatin peptid a Calpain inhibitor V, svojí kompeticí vazbu CaspACE neovlivňují. To znamená, že esej CaspACE se neváže do aktivního místa kalpainu, a je tedy specifický pro aktivní místa



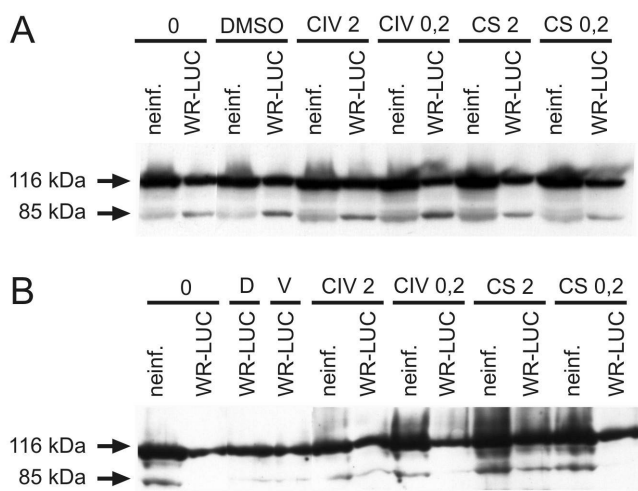
**Obr. 22. Vliv inhibitorů kalpainu a kathepsinů na detekci aktivace kaspáz.** Buňky HeLa G a BSC-40 byly infikovány WR-LUC (2 PFU/buňka) a v čase 24 h.p.i. (HeLa G) nebo 12 h.p.i. (BSC-40) byly sklizeny pro CaspACE esej. Esej byl v označených vzorcích kompetován pomocí **(A)** inhibitorů kalpainu nebo **(B)** inhibitoru kathepsinů. Fluorescence buněk byla hodnocena průtokovou cytometrií, CaspACE pozitivita byla vyjádřena jako procenta hodnoty infikovaných buněk bez inhibitoru (100%). CS - calpastatin peptid ve 2  $\mu$ M koncentraci, CIV - Calpain inhibitor V v 10  $\mu$ M koncentraci, PepA - pepstatin A v 50  $\mu$ M koncentraci. V grafech jsou vyneseny průměry ze 2 pokusů provedených v duplikátech, chybové úsečky ukazují hodnoty S.E.M.



kaspáz. Byly provedeny také pokusy, při nichž byly inhibitory kalpainu ve stejných koncentracích jako při kompetičních experimentech přidány do média infikovaných buněk. Buňky byly ve stejném čase po infekci sklizeny a byl u nich proveden esej CaspACE. Ani takováto dlouhodobá inhibice kalpainu nepřinesla žádné změny v signálu CaspACE v ani jedné z testovaných buněčných linií (není ukázáno). Z toho vyplývá, že inhibice proteázy kalpainu nemá vliv na pozorovanou aktivaci kaspáz v infikovaných buňkách.

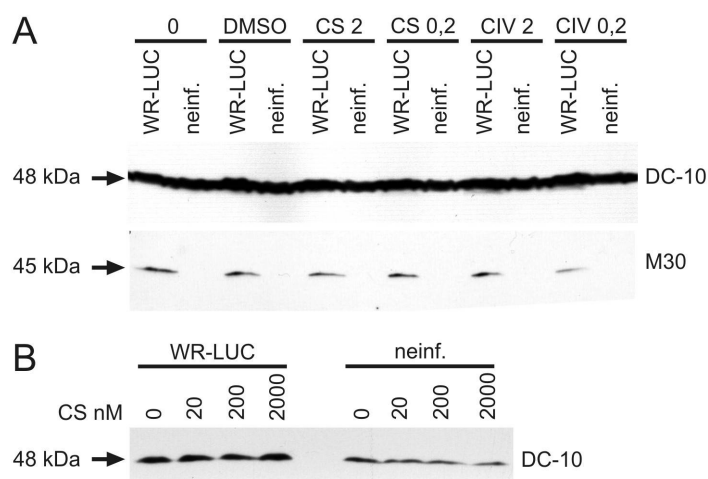
#### 5.1.1.5.2 Vliv kalpainu na aktivitu kaspáz v infikovaných buňkách

Spekulovali jsme, že proteázy z rodiny kalpainů by mohly být aktivní v buňkách infikovaných VACV. Chtěla jsem proto zjistit, zda inhibice kalpainu bude mít vliv na štěpení substrátů smrti PARP a cytokeratin 18 v buňkách infikovaných VACV v odpovídajících intervalech. Infikované buňky proto byly během infekce inkubovány s inhibitory kalpainu a v čase 24 h.p.i. (HeLa G) nebo 12 h.p.i. (BSC-40) sklizeny pro western blot. Výsledky štěpení PARP ukazuje Obr. 23. Inhibitory kalpainu caspastatin peptid a Calpain inhibitor V neměly vliv na štěpení PARP v infikovaných HeLa G a BSC-40. To naznačuje, že aktivita kalpainu se nepodílí (přímo ani nepřímo) na štěpení PARP pozorovaném v infikovaných HeLaG a neovlivňuje ani nízkou úroveň štěpení PARP v infikovaných BSC-40. Podobné výsledky byly získány i v dalších časech infekce v obou buněčných liniích.



**Obr. 23. Vliv inhibitorů kalpainu na štěpení PARP.** Buňky **(A)** HeLa G a **(B)** BSC-40 byly infikovány virem WR-LUC (2 PFU/buňka) a v čase 24 h.p.i. (HeLa G) nebo 12 h.p.i. (BSC-40) byly sklizeny pro western blot (8% SDS-PAGE). K buňkám byly po dobu infekce přidány inhibitory kalpainu v uvedených koncentracích nebo solvent DMSO. CIV - Calpain inhibitor V ve 2  $\mu\text{M}$  (CIV 2) nebo 0,2  $\mu\text{M}$  (CIV 0,2) koncentraci. CS - calpastatin peptid ve 2  $\mu\text{M}$  (CS 2) nebo 0,2  $\mu\text{M}$  (CS 0,2) koncentraci (zásobní roztok ve vodě). D - DMSO, V - Z-VAD-FMK (50  $\mu\text{M}$ ). Kontrola pro vzorky s přidáním CIV jsou vzorky s přidáním DMSO, kontrola pro vzorky s přidáním CS jsou vzorky bez přidání dalších látek (0). Obrázky reprezentují 5 (HeLa G) nebo 8 (BSC-40) pokusů provedených v různých časových intervalech infekce.

Štěpení cytokeratinu 18 jsem analyzovala western blotem pomocí dvou protilátek: protilátka produkovaná klonem DC-10 reaguje s neštěpenou i štěpenou formou proteinu, protilátka produkovaná klonem M30 reaguje pouze s neoepitopem vytvořeným štěpením kaspázami. Pro western blot byly použity buňky HeLa G i BSC-40 infikované VACV nebo neinfikované a sklizené v čase infekce 24 h.p.i. (HeLa G) nebo 18 h.p.i. (BSC-40). V buňkách HeLa G infikovaných VACV nemělo působení inhibitorů kalpainu vliv na množství neštěpené formy proteinu ani na štěpení cytokeratinu 18 zjištěné pomocí obou protilátek (obr. 24). V buňkách BSC-40 neměly inhibitory kalpainu vliv na množství neštěpené formy cytokeratinu 18 zobrazené protilátkou DC-10 (obr. 24). Tvorbu neoepitopu M30 se v infikovaných BSC-40 nepodařilo zachytit (kap. 5.1.1.3.5) a působení kalpainových inhibitorů nemělo vliv ani zde. Aktivita proteázy kalpainu se tedy nepodílí ani na štěpení cytokeratinu 18 v infikovaných buňkách HeLa G a BSC-40 a neovlivňuje pozitivně ani negativně množství neštěpené formy tohoto proteinu.



**Obr. 24. Vliv inhibitorů kalpainu na štěpení cytokeratinu 18.** Buňky **(A)** HeLa G a **(B)** BSC-40 byly infikovány virem WR-LUC (2 PFU/buňka) a v čase 24 h.p.i. (HeLa G) nebo 18 h.p.i. (BSC-40) byly sklizeny pro western blot (10% SDS-PAGE). K buňkám byly po dobu infekce přidány inhibitory kalpainu v uvedených koncentracích nebo solvent DMSO. Detekce cytokeratinu 18 byla provedena protilátkami DC-10 a M30. CIV - Calpain inhibitor V ve 2  $\mu\text{M}$  (CIV 2) nebo 0,2  $\mu\text{M}$  (CIV 0,2) koncentraci. CS - calpastatin peptid ve 2  $\mu\text{M}$  (CS 2) nebo 0,2  $\mu\text{M}$  (CS 0,2) koncentraci nebo **(B)** v uvedených nM koncentracích. Kontrola pro vzorky s přidáním CIV jsou vzorky s přidáním DMSO, kontrola pro vzorky s přidáním CS jsou vzorky bez přidání dalších látek (0). Obrázky reprezentují 5 (HeLa G) nebo 8 (BSC-40) pokusů provedených v různých časových intervalech infekce.

### 5.1.1.5.3 Vliv kathepsinů na aktivaci kaspáz

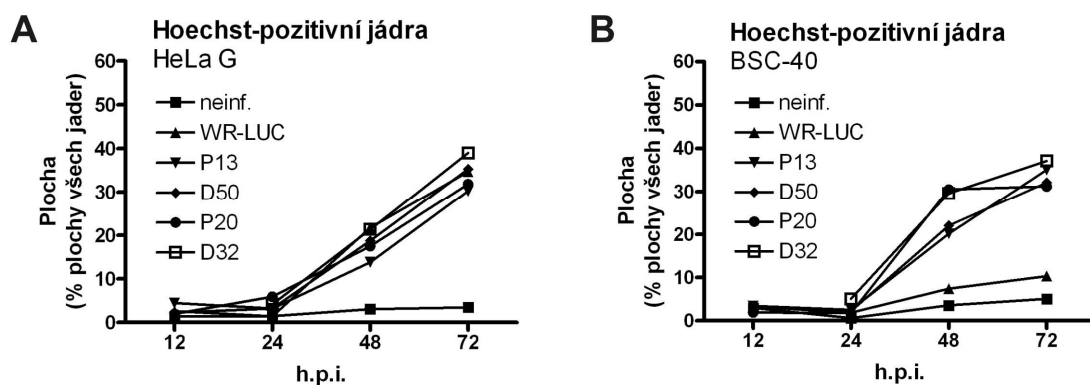
Provedla jsem také zkoušku specifity CaspACE s inhibitorem kathepsinů D a E, Pepstatinem A. Pepstatin A také vazbu CaspACE do infikovaných buněk nesnížil (Obr. 22), což ukazuje na specifitu CaspACE esaje pro kaspázy a nikoli pro kathepsiny. Také byl

testován vliv dlouhodobé inhibice kathepsinu D a E na výsledek eseje CaspACE. Pepstatin A byl přidán do média infikovaných buněk ve stejné koncentraci jako pro kompetici CaspACE. Buňky byly v odpovídajícím čase po infekci sklizeny pro esej CaspACE, tato dlouhodobá inhibice kathepsinů však také nepřinesla změny v signálu CaspACE v žádné testované buněčné linii (není ukázáno). Kathepsiny D a E proto nemají vliv na pozorovanou aktivaci kaspáz.

Byla provedena také analýza štěpení PARP v infikovaných buňkách při inhibici kathepsinů D a E Pepstatinem A. Inhibice kathepsinů však neměla vliv na výsledek štěpení PARP v buňkách HeLa G ani BSC-40 infikovaných WR-LUC ((Liskova et al., 2011) - experimenty J. Knitlové).

### 5.1.2 Typ buněčné smrti buněk infikovaných kmeny Dryvax a Praha

Rozhodli jsme se porovnat typ buněčné smrti vyvolaný infekcí VACV kmene Western Reserve s typem buněčné smrti vyvolaným infekcí vakcinačními kmeny VACV Dryvax a Praha. Z obou kmenů byly použity plakové izoláty s malou (P20, D32) a velkou (P13, D50) virulencí, které byly izolovány dříve (Kutinova et al., 1995) a naše laboratoř je získala díky laskavosti Dr. Němečkové.



**Obr. 25. Analýza morfologie jader *in situ* po infekci buněk VACV kmene Dryvax a Praha.** Buňky (A) HeLa G a (B) BSC-40 byly infikovány viry WR-LUC, Dryvax (D50, D32) a Praha (P13, P20) (2 PFU/buňka) a v časech 12, 24, 48 a 72 h.p.i. byly obarveny DNA indikátorem Hoechst 33342 (0,1 µg/ml). Fluorescence jader a fázový kontrast buněk byly snímány fluorescenčním mikroskopem při zvětšení 100x. Obrázky buněk obarvených Hoechst 33342 byly vyhodnoceny pomocí obrazové analýzy a bylo vyjádřeno procento plochy Hoechst-positivních jader z plochy všech jader (100%). V grafech jsou vyneseny průměry hodnot ze 4 pokusů, v každém pokusu byly hodnoceny alespoň 2 obrázky daného vzorku. Průměry a hodnoty S.E.M. jsou shrnuty v tabulce 5.

#### 5.1.2.1 Analýza morfologie jader

Morfologii jader infikovaných buněk jsem analyzovala podobně jako v kapitole 5.1.1.1.1. U infikovaných HeLa G buněk byly výsledky podobné jako při infekci kmenem

Western Reserve (Obr. 25A). Procento Hoechst-pozitivních, apoptotických buněk se zvyšovalo ke 40% v 72 h.p.i. U infikovaných BSC-40 buněk však infekce kmeny Dryvax a Praha způsobila podobné zvýšení Hoechst-pozitivních jader ke 35% v 72 h.p.i. (Obr. 25B). Přitom infekce málo virulentními izoláty obou virů (P20, D32) působila apoptózu výrazněji (viz interval 48 h.p.i.), tento rozdíl však nebyl statisticky signifikantní ( $p = 0,05$ ). Stav infikovaných buněk nebylo možné dokumentovat v čase 96 h.p.i., neboť buňky infikované virem Praha a Dryvax byly v tuto dobu již ve velmi špatném stavu, zřejmě ve stádiu sekundární nekrózy. Průměry hodnot plochy Hoechst-pozitivních jader a odpovídající hodnoty S.E.M. jsou v tab. 5.

**Tab. 5. Hodnoty standardní chyby průměru (S.E.M.) k obr. 25**

**Tab. 5 A. Průměry a S.E.M. k obr. 25 A**

HeLa G	12 h.p.i.		24 h.p.i.		48 h.p.i.		72 h.p.i.	
	% Hoechst-pozitivních jader	S.E.M.	% Hoechst-pozitivních jader	S.E.M.	% Hoechst-pozitivních jader	S.E.M.	% Hoechst-pozitivních jader	S.E.M.
Neinf.	1.42	0.80	1.45	0.43	3.08	0.44	3.47	0.68
WR-LUC	2.61	1.40	1.41	0.38	21.79	3.25	34.73	2.76
P13	4.49	1.36	3.21	1.04	13.81	1.40	30.29	3.99
D50	2.26	0.47	3.21	0.98	18.80	1.58	35.31	2.98
P20	1.96	0.93	5.91	0.59	17.54	5.72	31.86	1.76
D32	N	–	4.18	1.43	21.40	5.39	39.00	0.83

**Tab. 5 B. Průměry a S.E.M. k obr. 25 B**

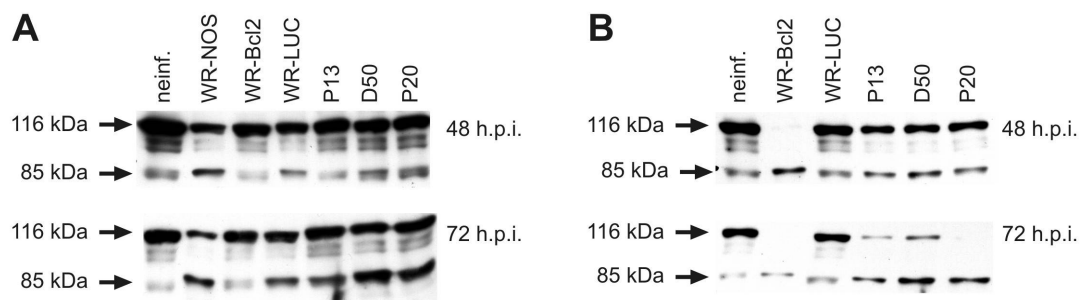
BSC-40	12 h.p.i.		24 h.p.i.		48 h.p.i.		72 h.p.i.	
	% Hoechst-pozitivních jader	S.E.M.	% Hoechst-pozitivních jader	S.E.M.	% Hoechst-pozitivních jader	S.E.M.	% Hoechst-pozitivních jader	S.E.M.
Neinf.	2.99	1.53	0.62	0.19	3.60	1.37	5.05	1.71
WR-LUC	3.26	1.26	1.85	0.62	7.45	0.83	10.33	1.28
P13	3.44	2.24	2.55	0.67	20.16	2.13	35.10	3.39
D50	3.41	1.35	2.20	0.55	22.09	2.19	32.12	3.44
P20	1.93	1.32	1.76	0.64	30.50	10.17	31.23	10.93
D32	N	–	5.07	2.04	29.60	1.57	37.13	8.12

N – nebylo stanoveno

### 5.1.2.2 Analýza markeru štěpení kaspáz PARP

Analyzovala jsem také štěpení substrátu smrti PARP při infekci VACV kmeny Praha a Dryvax. Štěpení bylo hodnoceno ve stejných intervalech jako morfologie jader, tedy ve 48 a 72 h.p.i. V buňkách HeLa G i BSC-40 infekce těmito virem vyvolala výrazné štěpení PARP v souladu s morfologickou analýzou (Obr. 26). Toto štěpení bylo slabší než štěpení PARP v pozitivních apoptotických kontrolách (WR-NOS v HeLa G buňkách, WR-

Bcl2 v BSC-40 buňkách), ale silnější než štěpení PARP v negativních kontrolách (WR-Bcl2 v HeLa G buňkách, WR-LUC v BSC-40 buňkách).



**Obr. 26. Štěpení PARP v buňkách infikovaných VACV kmene Dryvax a Praha.** Buňky (A) HeLa G a (B) BSC-40 byly infikovány uvedenými viry (2 PFU/buňka) a v uvedených h.p.i. byly sklizeny pro western blot (8% SDS-PAGE).

### 5.1.2.3 Růst VACV kmenů Dryvax a Praha v buňkách HeLa G a BSC-40

Chtěli jsme porovnat růst VACV kmene Dryvax a Praha s kmenem Western Reserve a jeho používanými rekombinantami. Pro toto srovnání jsem infikovala buňky HeLa G a BSC-40 dříve použitými plakovými izoláty kmenů Dryvax a Praha a také rekombinantními viry kmene Western Reserve. Pokusy byly provedeny na 96-jamkových destičkách a virové inokulum bylo po adsorpci viru ponecháno v jamkách spolu s přidáním médiem. Infikované buňky byly sklizeny v časech 24, 48 a 72 h.p.i. a titr virů byl určen plakovou esejí.

Získané titry pro interval 24 h.p.i. jsou uvedeny v tabulce 6. Titry v dalších intervalech se výrazně nelišily od titrů získaných v tomto intervalu, a proto zde nejsou uvedeny. Nejvyšší titry byly získány při infekci wt-WR, o málo nižší titry při infekci jeho rekombinantami. Nižší titry poskytly virulentní plakové izoláty P13 a D50 a nejnižší titry byly získány při infekci atenuovanými plakovými izoláty P20 a D32. Rozdíl mezi nejvyšším titrem (wt-WR) a nejnižším titrem (D32) byl větší než 2 logaritmy. Titry získané při infekci WR-Bcl2 byly nízké podobně jako u atenuovaných izolátů, exprimovaný Bcl-2 má zřejmě vliv na energetický metabolismus buňky (Kalbacova, 2003; Vrbacký, 2005; Vrbacky et al., 2003). Výsledky byly podobné pro obě buněčné linie. Kdyby se virus za podmínek těchto experimentů vůbec nemnožil, výsledný titr by byl  $10^6$  PFU/ml. I nejnižší dosažené titry virů tedy odpovídají namnožení viru přibližně 10x.

Z těchto výsledků vyplývá, že VACV kmene Dryvax a Praha se v buňkách HeLa G a BSC-40 chovají jako atenuované ve srovnání s kmenem Western Reserve, ovšem stále se v těchto buňkách množí.

virus	Pokus č. 1		Pokus č. 2	
	BSC-40	HeLa G	BSC-40	HeLa G
<b>wt-WR</b>	7,69	8,00	9,34	9,13
<b>WR-LUC</b>	N	N	8,36	8,48
<b>WR-EGFP</b>	7,32	7,51	8,18	8,18
<b>D50</b>	6,95	7,38	8,08	7,95
<b>P13</b>	6,56	7,56	7,90	8,11
<b>WR-Bcl2</b>	N	N	7,35	7,48
<b>P20</b>	6,53	7,37	7,29	7,41
<b>D32</b>	6,42	6,53	7,10	7,11

**Tab. 6. Růst VACV kmenů Dryvax a Praha v buňkách HeLa G a BSC-40.** Buňky na 96-jamkových destičkách byly infikovány uvedenými viry (m.o.i. = 2) po dobu 24 hodin. Titr virů byl stanoven plakovým esejem a vyjádřen jako dekadický logaritmus PFU/ml. Uvedené výsledky reprezentují 2 pokusy. N - nebylo stanoveno.

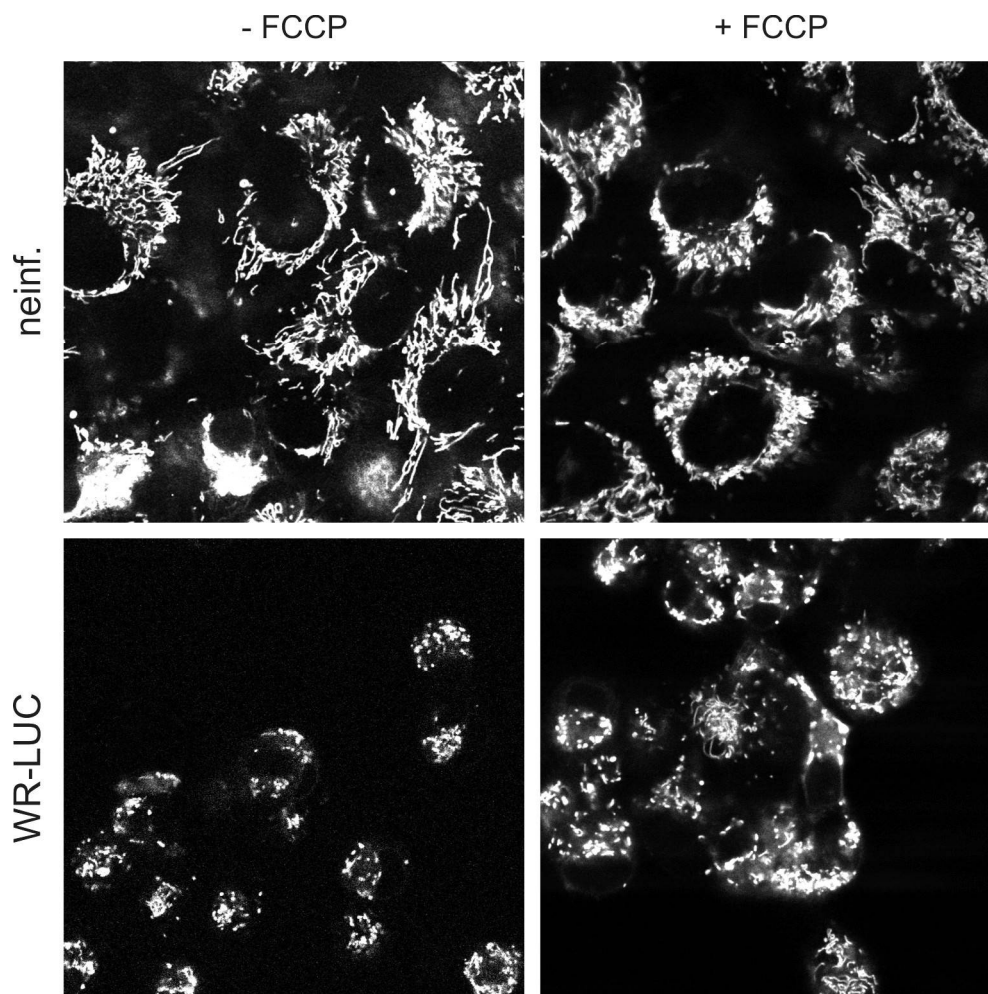
### 5.1.3 Změny mitochondrií v buňkách infikovaných VACV kmene WR

Jako doplnění analýzy typu buněčné smrti buněk infikovaných VACV jsme se rozhodli prověřit také stav mitochondrií těchto buněk, neboť při apoptóze často dochází k depolarizaci mitochondriálního membránového potenciálu a k dalším změnám.

#### 5.1.3.1 Analýza morfologie mitochondrií konfokální mikroskopií

Pro analýzu morfologie mitochondrií byly buňky BSC-40 na plotnách určených pro konfokální mikroskopií infikovány virem WR-LUC o vyšší multiplicitě infekce (5 PFU/buňka) po dobu 6 hodin. K médiu buněk byl poté přidán mitochondriální indikátor NAO (váže se nezávisle na membránovém potenciálu mitochondrií) a jako morfologická kontrola také FCCP (mitochondriální rozpřahovač). Po 20-timinutovém barvení byly buňky hodnoceny konfokální mikroskopií.

U neinfikovaných buněk byly pozorovány sítě mitochondrií s vysoce organizovanou strukturou (Obr. 27). Rozpřahovač FCCP způsobil změny této struktury, depolarizované mitochondrie byly fragmentované. V infikovaných buňkách organizované sítě mitochondrií nebyly přítomny, mitochondrie měly spíše tvar bodů podobně jako ve vzorcích depolarizovaných přidáním FCCP.



**Obr. 27. Morfologie mitochondrií u buněk infikovaných VACV.** Buňky BSC-40 byly infikovány virem WR-LUC (5 PFU/buňka) a v čase 6 h.p.i. byly mitochondrie obarveny NAO (0,5  $\mu$ M), ke kontrolním vzorkům bylo přidáno FCCP (1  $\mu$ M). Fluorescence NAO byla snímána konfokálním mikroskopem při zvětšení 125x. Obrázky reprezentují 3 pokusy.

### 5.1.3.2 Analýza mitochondriálního membránového potenciálu průtokovou cytometrií

Jako kontrolu analýzy morfologie mitochondrií jsem změřila také mitochondriální membránový potenciál buněk infikovaných za stejných podmínek, t.j. v čase 6 h.p.i. a při infekci 5 PFU/buňka, a pro srovnání také v pozdějším čase 12 h.p.i.

Mitochondriální membránový potenciál infikovaných buněk BSC-40 se v čase 6 h.p.i. snížil na 87% neinfikovaných kontrol, v čase 12 h.p.i. na 58% neinfikovaných kontrol. Mitochondriální membránový potenciál infikovaných buněk HeLa G se v čase 6 h.p.i. snížil na 74% neinfikovaných kontrol, v čase 12 h.p.i. na 53% neinfikovaných kontrol. Výsledky jsou v souladu s předchozími analýzami (Kalbacova, 2003; Kalbacova et al., 2008).

čas měření	HeLa G		BSC-40	
	neinf.	WR- DsRed	neinf.	WR- DsRed
6 h.p.i.	100 %	73,99 %	100 %	86,68 %
12 h.p.i.	100 %	53,21 %	100 %	58,43 %

**Tab. 7. Pokles membránového potenciálu mitochondrií u buněk infikovaných VACV.** Buňky HeLa G a BSC-40 byly infikovány virem WR-DsRed (5 PFU/buňka) a v čase 6 nebo 12 h.p.i. byly sklizeny, obarveny indikátorem DiOC<sub>6</sub> (3) a fluorescence buněk byla změřena průtokovou cytometrií. Při analýze cytometrických dat bylo vyjádřeno procento buněk s pozitivním mitochondriálním potenciálem. V tabulce jsou vyjádřeny tyto hodnoty jako procento hodnot neinfikovaných buněk (100 %). Tyto hodnoty jsou průměry z 1 pokusu provedeného v duplikátech.

#### 5.1.4 Možná role transglutaminázy v buňkách infikovaných VACV kmene WR

V naší laboratoři byly již dříve pozorovány vyšší formy proteinů přítomné v buňkách infikovaných VACV. Tyto proteiny měly molekulovou hmotnost odpovídající konjugátům základních forem těchto proteinů (2 a více molekul). Příkladem je protein Bax, jehož molekulová hmotnost je 19 kDa, ale v infikovaných buňkách (BSC-40 i HeLa G) analýza western blotem opakovaně ukázala proteiny o přibližné molekulové hmotnosti 40 kDa (Zdeněk Čížek a Zora Mělková, nepublikované výsledky). Spekulovali jsme proto, že v buňkách infikovaných VACV by mohl být aktivní enzym transglutamináza, který vytváří takové konjugáty.

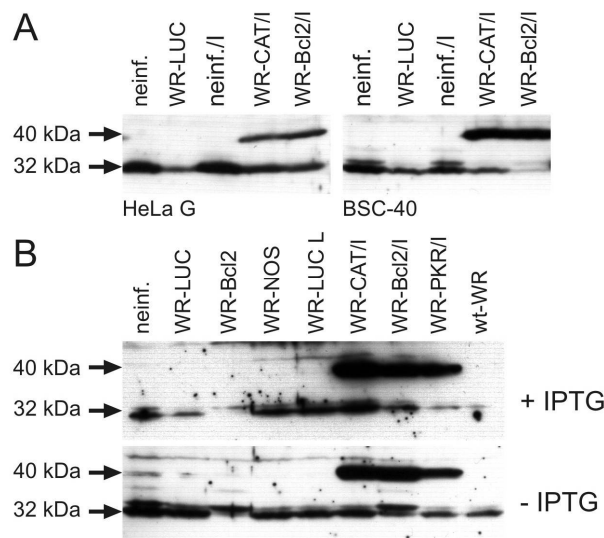
##### 5.1.4.1 Výskyt vyšších forem kaspázy 3 v infikovaných buňkách

Dalším proteinem, u kterého jsme pozorovali přítomnost forem s vyšší molekulovou hmotností v infikovaných buňkách, byla kaspáza 3. V infikovaných HeLa G i BSC-40 buňkách se objevují formy o přibližné molekulové hmotnosti 40 kDa, což odpovídá dvěma molekulám štěpené kaspázy 3 o hmotnosti 19 kDa (Yamaguchi and Wang, 2006). Na obr. 28A je příklad infikovaných HeLa G a BSC-40 buněk sklizených v čase 15 h.p.i. Vyšší molekulové hmotnosti kaspázy 3 byly pozorovány i v dalších intervalech infekce (12 h.p.i., 18 h.p.i.).

Na obrázku 28A je patrné, že vyšší formy kaspázy 3 jsou přítomny pouze ve vzorcích buněk infikovaných virem WR-CAT/I a WR-Bcl2/I, nikoli ve vzorcích buněk infikovaných virem WR-LUC. U virů označených /I jsou rekombinantní proteiny exprimovány pod promotorem p4b, který je IPTG-inducibilní. Virus WR-LUC exprimuje luciferázu pod promotorem p7.5, což je časně-pozdní VACV promotor a jeho exprese se neindukuje. Rozhodli jsme se proto prověřit výskyt vyšších forem kaspázy 3 v buňkách infikovaných různými rekombinantami i wt-WR v přítomnosti nebo bez přítomnosti IPTG.



Výsledek (Obr. 28B) ukazuje, že vyšší formy kaspázy 3 se vyskytují pouze v buňkách infikovaných WR-CAT/I, WR-Bcl2/I a WR-PKR/I nezávisle na přítomnosti IPTG a tedy i nezávisle na expresi rekombinantních proteinů. Další virus s vloženým genem pod p4b promotorem (WR-LUC L) výskyt vyšších forem kaspázy 3 nezpůsobuje.



**Obr. 28. Detekce vyšších molekulových hmotností kaspázy 3.** Buňky HeLa G a BSC-40 byly infikovány uvedenými viry (2 PFU/buňka) a v čase 15 h.p.i. byly sklizeny pro western blot (10% SDS-PAGE). **(A)** HeLa, BSC-40, **(B)** BSC-40. Neinf./I – neinfikované buňky v přítomnosti IPTG. I - rekombinantní protein je exprimován z IPTG-inducibilního promotoru p4b. **(A)** Ke vzorkům WR-CAT/I, WR-Bcl2/I bylo přidáno IPTG. **(B)** IPTG bylo přidáno ke všem vzorkům (+ IPTG) nebo nebylo přidáno k žádnému vzorku (- IPTG). Obrázky reprezentují výsledky **(A)** 8 pokusů nebo **(B)** 1 pokusu.

Zdá se, že výskyt proteinů o vyšších molekulových hmotnostech detekovaných protilátkou proti kaspáze 3 v buňkách infikovaných VACV nezávisí na expresi rekombinantního proteinu, na přítomnosti IPTG ani na typu promotoru vloženého genu. Divoký typ VACV wt-WR také výskyt vyšších forem kaspázy 3 nezpůsobuje. Další možností vysvětlení je přítomnost okolních sekvencí vložených společně s žádaným genem do rekombinantních virů (více v Diskusi, kap. 6.5).

#### 5.1.4.2 Vliv monodansylkadaverinu na růst viru vakcínie

Chtěli jsme prověřit možnost, že aktivita transglutaminázy má určitou úlohu v životním cyklu VACV. Proto jsem působila na infikované buňky inhibitorem transglutaminázy monodansylkadaverinem (MDC). Buňky BSC-40 byly infikovány viry WR-LUC nebo WR-CAT/I v přítomnosti MDC. Po 18 hodinách růstu viru byly infikované buňky sklizeny a růst virů byl kvantifikován plakovou esejí. Zároveň byla životaschopnost buněk hodnocena morfoloicky pod mikroskopem.

Logaritmy titrů virů jsou v tabulce 8. Při působení uvedených koncentrací MDC zůstávaly infikované i neinfikované buňky živé, při vyšší koncentraci 400  $\mu\text{M}$  již u neinfikovaných i infikovaných buněk docházelo morfologicky k apoptóze. Přesto při použití koncentrace MDC 300  $\mu\text{M}$  dochází ke snížení titru virů přibližně logaritmus nebo více. Růst viru WR-LUC byl vlivem působení MDC snížen o 0,86 logaritmu, virus WR-CAT/I o 1,4 logaritmu. Růst VACV je tedy působením MDC inhibován. Je tedy možné, že transglutamináza nebo enzymy s podobnou aktivitou hrají určitou roli v růstovém cyklu VACV.

virus	MDC				
	0	DMSO	100 $\mu\text{M}$	200 $\mu\text{M}$	300 $\mu\text{M}$
<b>WR-LUC</b>	8,62	N	8,36	8,24	7,76
<b>WR-CAT/I</b>	7,38	7,39	7,27	7,10	5,98

**Tab. 8. Vliv MDC na růst VACV.** Buňky BSC-40 na 24-jamkových destičkách byly infikovány virem WR-LUC nebo WR-CAT/I (m.o.i. = 2) za přítomnosti MDC v uvedených koncentracích (nebo odpovídajícího množství DMSO) po dobu 18 hodin. Titr virů byl stanoven plakovou esejí a vyjádřen jako dekadický logaritmus PFU/ml. Uvedené výsledky reprezentují 2 pokusy. N - nebylo stanoveno.

## 5.2 Možnost superinfekce buněk BSC-40 infikovaných VACV

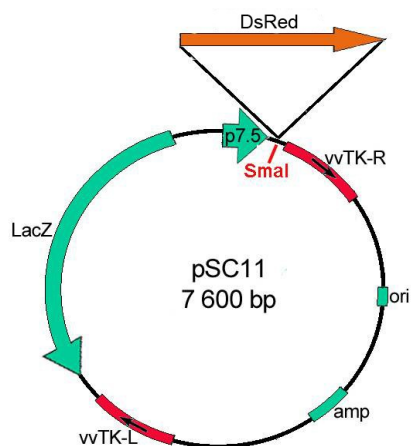
### 5.2.1 Příprava VACV exprimujícího červený fluorescenční protein DsRed

Pro studium možnosti superinfekce jsme potřebovali rekombinantní viry exprimující dva různé fluorescenční proteiny. Připravila jsem rekombinantní virus exprimující červený fluorescenční protein (WR-DsRed). Příprava rekombinantního viru exprimujícího zelený fluorescenční protein (WR-EGFP) byla součástí diplomové práce Richarda Honnera (Honner, 2007).

#### 5.2.1.1 Příprava rekombinantního plasmidu

Plasmid pro homologní rekombinaci a vložení genu DsRed do genomu VACV jsem připravila klonováním. Jako výchozí vektor jsem použila plasmid pSC11, který obsahuje sekvenci vakciniového genu pro thymidin kinázu rozdělenou na dvě části. Mezi nimi je vložen markerový gen LacZ pod promotorem p11, dále vakciniový časně-pozdní promotor p7.5 a za ním několik restričních míst. Mapa tohoto plasmidu s označeným místem vložení fragmentu je na obrázku 29. Do restričního místa *SmaI* za promotorem p7.5 jsem vložila cDNA genu pro červený fluorescenční protein DsRed, která pocházela z plasmidu pDsRed-Bid (Clontech Laboratories). Správné vložení inzertu jsem ověřila restriční

analýzou a připravený vektor pSC11-DsRed jsem poté izolovala ve větším množství a v čisté formě, aby byl vhodný pro transfekci buněčných kultur.



**Obr. 29. Mapa plasmidu pSC11 s vloženým genem pro DsRed.** amp - gen pro ampicilinovou rezistenci, ori - replikační počátek, vTK-R a vTK-L - pravá a levá polovina thymidinkinázového genu VACV, LacZ - gen pro  $\beta$ -D-galaktosidázu.

### 5.2.1.2 Homologní rekombinace

Homologní rekombinace mezi sekvencemi DNA a genomem viru vakcinie nastává při současné infekci buňky virem vakcinie a transfekci DNA obsahující homologní sekvenci. Zde se jednalo o homologní rekombinaci do genu thymidin kinázy, který byl tímto vyřazen z funkce ("knock-out").

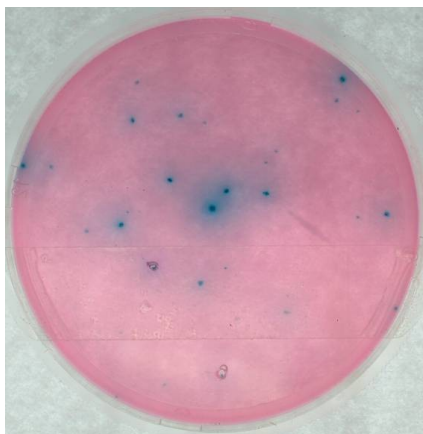
Buňky BSC-40 byly nejprve infikovány virem vakcinie kmene Western Reserve (wt-WR) a poté transfekovány vektorem pSC11-DsRed. Po 24 hodinách byly buňky sklizeny a zamrazeny.

### 5.2.1.3 Selektce rekombinovaných virů

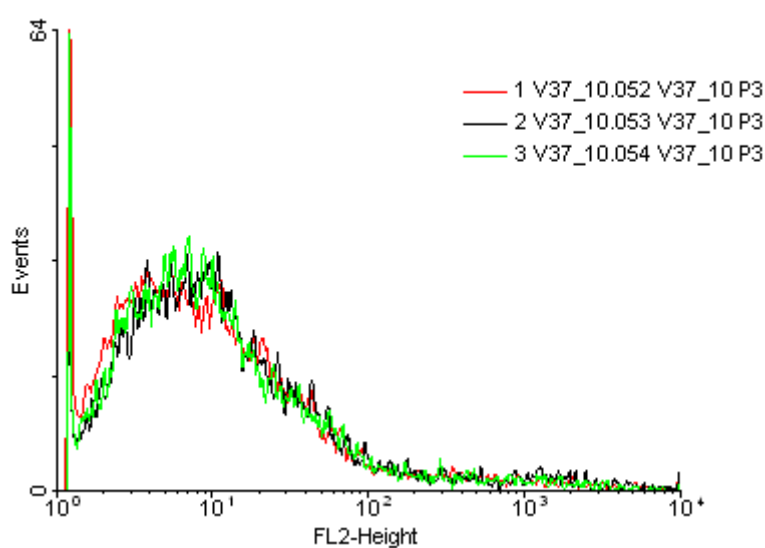
Buněčný lyzát připravený koinfekcí wt-WR a kotransfekcí vektorem pSC11-DsRed byl použit k infekci buněk 143 TK- za selektce pomocí BrdU. Viry s funkční thymidin kinázou (a tedy bez vloženého genu) se při této selekci nemohou množit.

Buňky s takto pomnoženými viry byly sklizeny a lyzáty z těchto buněk byly použity pro infekci buněk 143 TK- za přítomnosti BrdU pod agarem. Později byla přidána X-Gal pro identifikaci virových plaků s funkčním genem LacZ (exprimujícím  $\beta$ -D-galaktosidázu) a tedy s vloženým inzertem. Modré plaky (příklad na obr. 30) byly poté vypichovány a virus z nich byl použit pro selektivní pomnožení na buňkách 143 TK- za přítomnosti BrdU. Proběhla tři kola této selektce a následné pomnožení vybraných virových

izolátů. Tyto izoláty byly vybrány na základě předběžné analýzy exprese červeného fluorescenčního proteinu průtokovou cytometrií (příklad analýzy na obr. 31).



**Obr. 30. Příklad misky s modrými virovými plaky.** Buňky 143TK byly infikovány lyzátem buněk obsahujícím rekombinovaný virus WR-DsRed nebo izoláty viru WR-DsRed. Po adsorpci viru byly buňky překryty 2% FBS - DMEM s agarem (0,95%). Po 96-ti hodinové inkubaci byly misky převrstveny agarem s X-Gal (výsledná koncentrace 0,06 mg/ml) a po 24 hodinách bylo možno pozorovat a izolovat modré plaky rekombinantního viru.



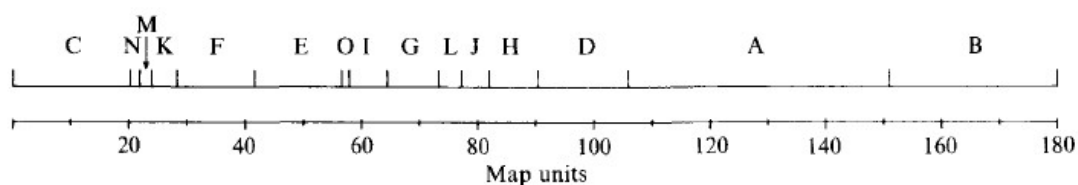
**Obr. 31. Příklad kontrolní analýzy plakových izolátů viru WR-DsRed průtokovou cytometrií.** Buňky BSC-40 byly infikovány plakovými izoláty viru DsRed a v čase 48 h.p.i. byla červená fluorescence exprimovaného proteinu měřena průtokovou cytometrií infikovaných buněk v kanále FL2. Na histogramu jsou vyneseny vzorky tří různých plakových izolátů, nejsou odděleny žádné populace.

#### 5.2.1.4 Ověření čistoty rekombinantního viru

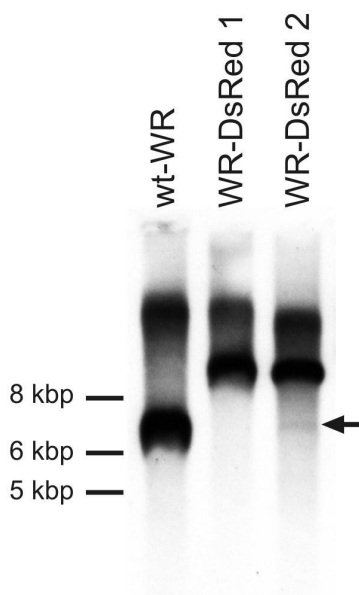
K ověření čistoty rekombinantního viru jsem použila techniku Southern blot, přičemž jsem použila sondu proti fragmentu *Hind*III J genomu VACV. Tento fragment obsahuje gen pro thymidin kinázu a pokud je v tomto genu vložena další sekvence,

velikost fragmentu *Hind*III J je větší. Přibližná *Hind*III restrikční mapa genomu VACV je na obr. 32. Nejprve jsem připravila sondu prepisem odpovídajícího fragmentu DNA za přítomnosti nukleotidů značených digoxigeninem.

Buňky BSC-40 jsem infikovala izoláty viru WR-DsRed po třech kolech selekce BrdU a plakové purifikace. Po 24 hodinách jsem infikované buňky sklídila a izolovala z nich vysokomolekulární DNA. Tuto DNA jsem poté štěpila restrikční endonukleázou *Hind*III. Štěpenou DNA jsem rozdělila elektroforézou na agarózovém gelu, přeblotovala na membránu a tuto membránu jsem hybridizovala s připravenou sondou. Po hybridizaci jsem navázanou sondu zviditelnila protilátkou proti digoxigeninu značenou peroxidázou a chemiluminiscencí. Příklad ověření čistoty rekombinantního viru je na obr. 33.



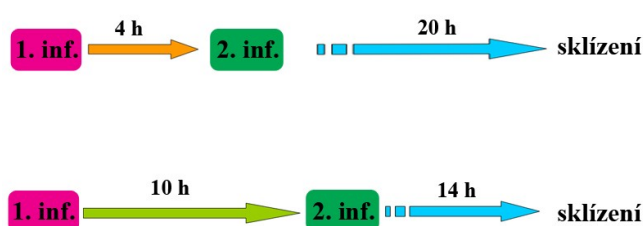
**Obr. 32. *Hind*III-restrikční mapa genomu VACV kmene WR.** A - O - fragmenty označené podle velikosti, čísla označují velikost v kbp. Převzato z (Boursnell et al., 1988).



**Obr. 33. Příklad analýzy *Hind*III J fragmentu genomu VACV southern blotem.** Buňky BSC-40 byly infikovány kontrolním virem wr-WR (1 PFU/buňka) a plakovými izoláty rekombinantního viru WR-DsRed (1 a 2). Vysokomolekulární DNA izolovaná z infikovaných buněk byla štěpena restrikční endonukleázou *Hind*III a analyzována southern blotem pomocí sondy proti *Hind*III J fragmentu. Šipka označuje přítomnost fragmentu *Hind*III J bez vloženého genu v plakovém izolátu WR-DsRed 2, tento fragment odpovídá velikostí fragmentu viru wt-WR.

## 5.2.2 Superinfekce infikovaných buněk v časových intervalech 2, 4, 6, 8, 10 h

Pro analýzu bloku superinfekce u viru vakcínie byly použity rekombinantní viry kmene Western Reserve exprimující červený (WR-DsRed) a zelený (WR-EGFP) fluorescenční protein pod časně-pozdním promotorem p7.5. Pro první infekci byl použit WR-DsRed, pro druhou infekci (superinfekci) byl kvůli vyššímu výtěžku fluorescence použit WR-EGFP. Druhá infekce byla uskutečněna v intervalech 2, 4, 6, 8 a 10 hodin po první infekci. Oba viry byly v této analýze použity o multiplicitě infekce 5 PFU/buňka. Schéma pokusů je na obr. 34. V čase 24 hodin po první infekci byla hodnocena červená i zelená fluorescence buněk konfokální mikroskopií nebo průtokovou cytometrií.

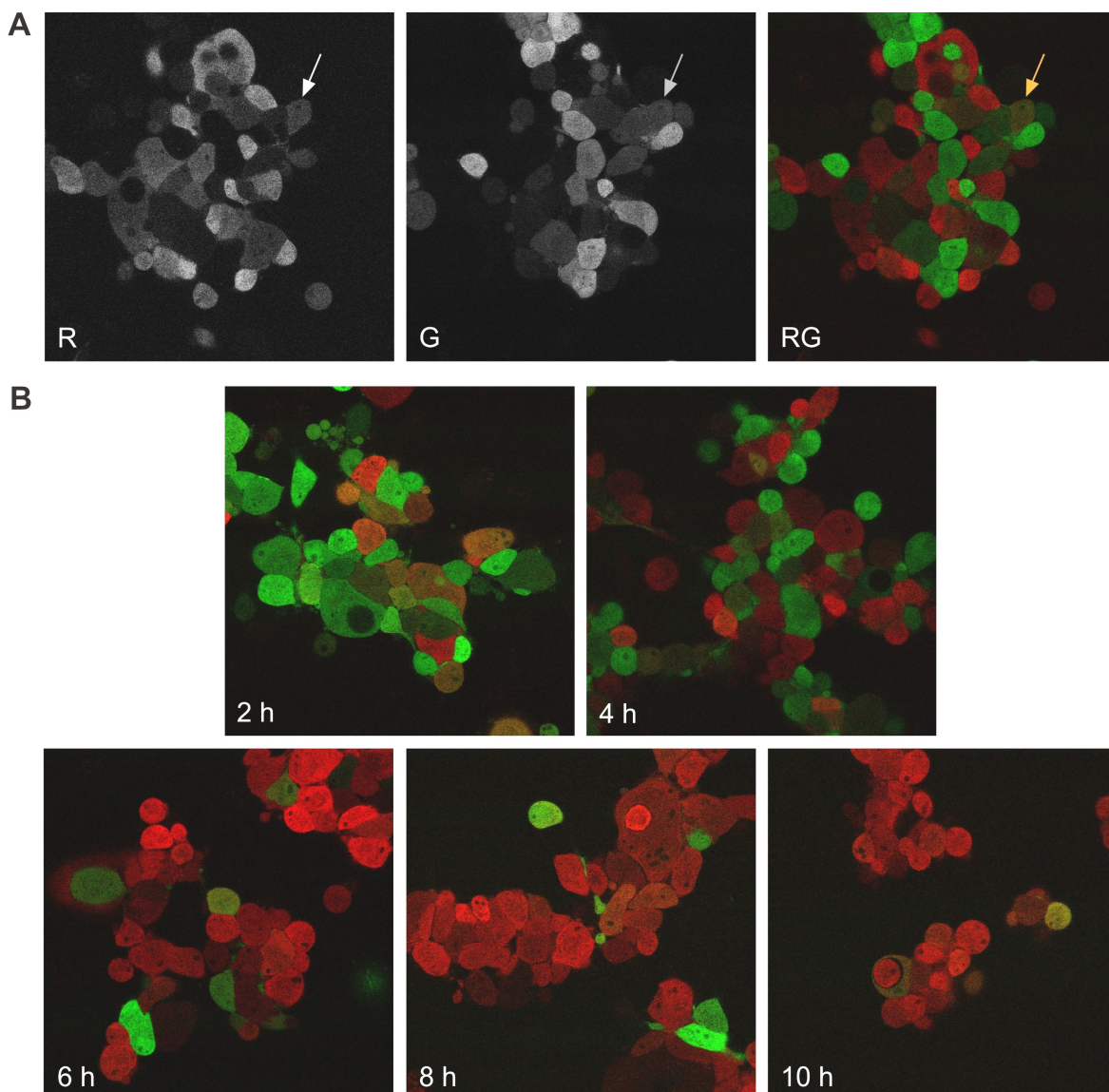


**Obr. 34. Analýza superinfekce - schéma pokusů.** 1. inf. - buňky BSC-40 byly infikovány virem WR-DsRed (5 PFU/buňka). 2. inf. - po 2, 4, 6, 8, 10 hodinách byly buňky superinfikovány virem WR-EGFP (5 PFU/buňka). V čase 24 h.p.i. po první infekci byla červená a zelená fluorescence buněk snímána konfokálním mikroskopem nebo měřena průtokovou cytometrií.

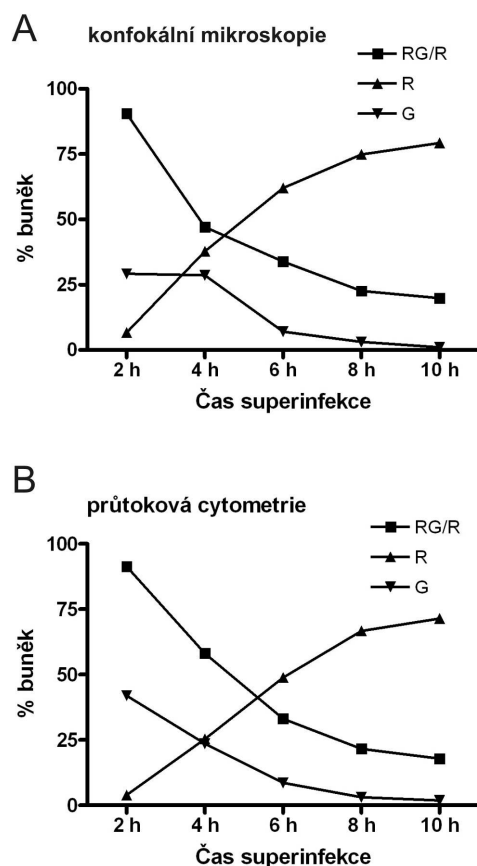
### 5.2.2.1 Konfokální mikroskopie superinfikovaných buněk

Buňky byly bez jakékoli manipulace snímány přímo v kultivačních plotnách. Reprezentativní příklady obrázků z jednotlivých intervalů superinfekce jsou na Obr. 35. Na obrázcích byly počítány buňky vykazující pouze zelenou fluorescenci, buňky vykazující pouze červenou fluorescenci a buňky vykazující oba typy fluorescence. Poté bylo pro každý interval superinfekce vyjádřeno procento superinfikovaných buněk, tedy procento buněk obsahujících červenou i zelenou fluorescenci ze všech červených buněk (jako 100% byl vzat součet buněk obsahujících pouze červenou anebo červenou i zelenou fluorescenci). Také bylo vyjádřeno procento čistě červených a čistě zelených buněk ze všech buněk. Výsledky kvantitativního hodnocení obrázků jsou v tabulce 9A a v grafu na Obr. 36. Procento superinfikovaných buněk výrazně klesá od 90 % ve 2 hodinách ke 47 % ve 4 hodinách. Další pokles je postupný, z 34 % v 6 hodinách k asi 20 % v 8 a 10 hodinách. Také procento čistě zelených buněk (tedy neinfikovaných při první infekci) klesá od 29 % ve 2 a 4 hodinách k 1 % v 10 hodinách. Naopak procento čistě červených

buněk (tedy nesuperinfikovaných) stoupá od 7 % ve 2 hodinách přes 38% ve 4 hodinách a 62 % v 6 hodinách k 79 % v 10 hodinách.



**Obr. 35. Červená a zelená fluorescence buněk superinfikovaných v různých intervalech.** Buňky BSC-40 byly infikovány virem WR-DsRed (5 PFU/buňka) a po 2, 4, 6, 8, 10 hodinách byly superinfikovány virem WR-EGFP (5 PFU/buňka). V čase 24 h.p.i. po první infekci byla fluorescence buněk snímána přímo v kultivačních miskách konfokálním mikroskopem při zvětšení 62,5x. **(A)** Příklad červené (R) a zelené (G) fluorescence buněk a jejich překryv (RG), interval superinfekce 4 hodiny. Šipka ukazuje buňku obsahující červenou i zelenou fluorescenci. **(B)** Příklady obrázků buněk superinfikovaných v uvedených intervalech. Obrázky reprezentují výsledky 5 pokusů.



**Obr. 36. Kvantitativní vyhodnocení možnosti superinfekce.** Buňky BSC-40 byly infikovány virem WR-DsRed (5 PFU/buňka) a po 2, 4, 6, 8, 10 hodinách byly superinfikovány virem WR-EGFP (5 PFU/buňka). V čase 24 h.p.i. po první infekci byla fluorescence buněk (A) snímána konfokálním mikroskopem nebo (B) měřena průtokovou cytometrií. Pro každý interval superinfekce bylo vyjádřeno procento superinfikovaných buněk (RG/R) jako procento buněk obsahujících červenou i zelenou fluorescenci ze všech červených buněk (100%), dále procento buněk obsahujících pouze červenou fluorescenci (R) a procento buněk obsahujících pouze zelenou fluorescenci (G) ze všech buněk (100%). **(A)** Kvantitativní vyhodnocení obrázků buněk superinfikovaných v uvedených intervalech (viz Obr. 35). Data reprezentují 5 pokusů, v každém intervalu superinfekce bylo počítáno celkem alespoň 500 buněk. Průměry a hodnoty S.E.M. jsou shrnuty v tabulce 9A. **(B)** Průtoková cytometrie superinfikovaných buněk. V grafu jsou vyneseny průměrné hodnoty z 6 pokusů provedených v duplikátech. Průměry a hodnoty S.E.M. jsou shrnuty v tabulce 9B.

**Tab. 9. Hodnoty standardní chyby průměru (S.E.M.) obr. 36**

**Tab. 9 A. Průměry a S.E.M. k obr. 36 A**

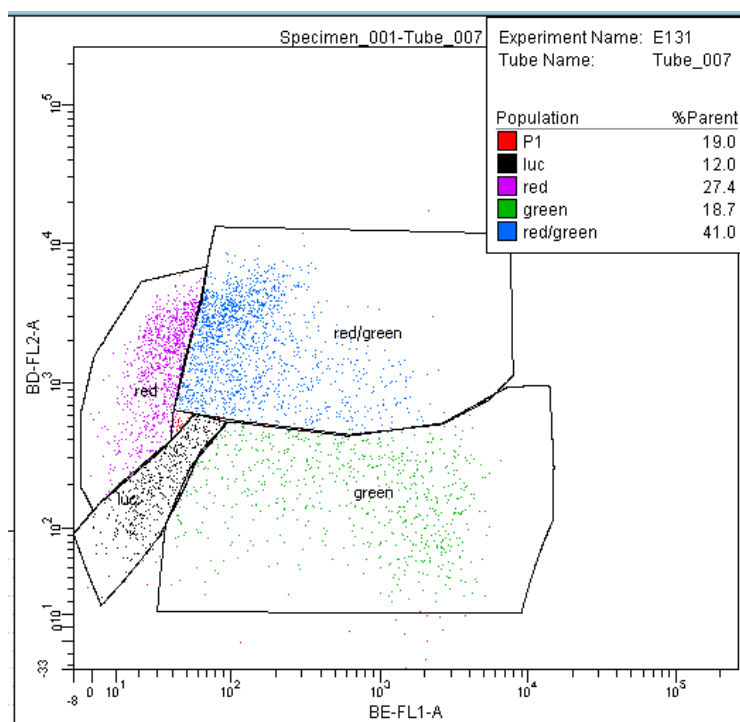
Čas superinf.	RG/R		R		G	
	% buněk	S.E.M.	% buněk	S.E.M.	% buněk	S.E.M.
2 h	90,56	2,17	6,72	1,70	29,19	4,29
4 h	47,15	2,25	37,78	2,51	28,59	3,57
6 h	33,86	4,88	62,02	5,51	7,00	2,63
8 h	22,59	2,22	74,85	1,73	3,16	1,12
10 h	19,86	2,57	79,33	2,68	1,05	0,45



**Tab. 9 B. Průměry a S.E.M. k obr. 36 B**

Čas superinf.	RG/R		R		G	
	% buněk	S.E.M.	% buněk	S.E.M.	% buněk	S.E.M.
2 h	91,39	2,96	3,94	1,44	41,98	6,59
4 h	58,14	2,35	25,34	4,29	23,60	6,39
6 h	33,15	3,59	48,85	6,81	8,62	3,71
8 h	21,62	0,93	66,70	3,10	3,11	1,57
10 h	17,89	2,51	71,45	3,99	1,90	0,91

### 5.2.2.2 Průtoková cytometrie superinfikovaných buněk



**Obr. 37. Příklad analýzy dat z průtokové cytometrie superinfikovaných buněk.** Do analýzy nebyly zahrnuty dublety buněk ani buněčná drť, pouze celé buňky (region P1, není ukázán). Regiony red (červené buňky), green (zelené buňky), red/green (buňky vykazující červenou i zelenou fluorescenci) a luc (buňky bez fluorescence) byly nastaveny podle jednobarevných kontrol (buňky infikované pouze WR-DsRed, WR-EGFP) a nebarevné kontroly (buňky infikované WR-LUC). Data byla analyzována v programu BD FACSDiva 6.0.

Superinfikované buňky byly sklizeny opatrným pasážováním, aby došlo k co nejmenšímu poškození křehkých buněk a mohly být hodnoceny pokud možno všechny. Poté byla průtokovou cytometrií měřena červená a zelená fluorescence buněk. Příklad analýzy dat získaných průtokovou cytometrií superinfikovaných buněk je na obr. 37, při analýze byly rozlišeny buňky obsahující pouze červenou, pouze zelenou nebo červenou i zelenou fluorescenci. Průtoková cytometrie ukázala podobný pokles superinfikovaných buněk v čase jako analýza obrázků. Počet čistě červených buněk byl však pravděpodobně podhodnocen, protože jejich procento je ve všech intervalech superinfekce menší než

procento čistě červených buněk získané analýzou obrázků. Výsledky analýzy průtokovou cytometrií v porovnání s výsledky kvantitativního hodnocení obrázků jsou na Obr. 36.

Tyto výsledky ukazují, že k bloku superinfekce dochází v čase mezi 2 a 4 hodinami po první infekci, ne však dříve než ve 2 hodinách.

## 6. DISKUSE

### 6.1 Typ buněčné smrti buněk infikovaných VACV kmene WR

V minulosti byl na základě změn permeability cytoplasmatické membrány popsán lytický charakter buněk infikovaných poxviru (Carrasco and Esteban, 1982; Schumperli et al., 1978). Dřívější výsledky naší laboratoře však ukazovaly aktivaci a aktivitu kaspáz v buňkách infikovaných VACV (Kalbacova, 2003; Kalbacova et al., 2008), což je naopak typické pro apoptotické buňky. Na základě tohoto pozorování aktivace kaspáz jsme se rozhodli ověřit typ buněčné smrti v infikovaných buňkách HeLa G a BSC-40 v pozdějších časech infekce pomocí morfologie jader a detekce permeability cytoplasmatické membrány.

Jádra jsem barvila DNA flurochromem Hoechst 33342, který v použité koncentraci barví normální jádra slabě a kondenzovaná jádra se jeví jako silně fluorescenční. Podíl apoptotických jader jsem hodnotila jako procento plochy silné fluorescence fluorochromu Hoechst z plochy všech jader (100%). Tento přístup jsem zvolila jako nejpřesnější odhad počtu jader na obrázcích, neboť jádra infikovaných buněk na obrázcích nelze spočítat kvůli cytopatickému efektu a shlukování buněk. Buňky HeLa G infikované VACV kmene WR vykazovaly apoptotickou morfologii jader v čase 48 h.p.i. a později, a to kondenzovaná a fragmentovaná jádra (kap.5.1.1.1.1). Infikované buňky BSC-40 měly v těchto intervalech infekce jádra nekondenzovaná a podíl apoptotických jader byl porovnatelný se stavem u neinfikovaných buněk.

Permeabilitu cytoplasmatické membrány jsem hodnotila pomocí DNA indikátoru PI, který není pro svou polárnost schopen volně procházet membránami a prochází pouze do buněk s permeabilní cytoplasmatickou membránou. Na obrázcích bylo možné rozlišit slabou fluorescenci PI, která se jevila v jádře a částečně i v cytoplasmě buněk, a silnou fluorescenci PI, kterou vykazovala pouze jádra. Původ slabé fluorescence PI v cytoplasmě nebyl studován, ale v cytoplasmě infikovaných buněk se nachází velké množství virové DNA díky vznikajícímu potomstvu VACV.

Slabá fluorescence PI vzrůstala s časem infekce v infikovaných HeLa G i BSC-40 buňkách (kap. 5.1.1.1.2). Silná fluorescence PI vzrůstala v infikovaných HeLa G pouze mírně, zřejmě jako důsledek sekundární nekrózy apoptotických buněk. Podobná situace byla u pozitivní apoptotické kontroly, buněk BSC-40 infikovaných VACV exprimující Bcl-2. Zde apoptóza probíhala rychleji a výrazněji než v infikovaných HeLa G buňkách a procento sekundárně nekrotických jader se silnou fluorescencí PI vzrůstalo rychleji. Slabá

fluorescence PI v těchto buňkách ovšem vzrůstala také. V infikovaných buňkách BSC-40 vzrůstala silná fluorescence PI také pouze mírně. Tyto buňky nevykazovaly vysoké procento PI-pozitivity, kritérium nekrózy, ani v pozdních intervalech infekce (96 h.p.i.). Otázka klasifikace buněčné smrti infikovaných buněk BSC-40 tedy zůstává otevřená.

Hodnocení buněčné smrti podle morfologie jader a permeability cytoplasmatické membrány bylo v této práci provedeno *in situ* přímo v kultivačních destičkách bez jakékoli manipulace s buňkami. Fluorescenční indikátory byly pouze přidány k buňkám s částí média a médium bylo promícháno pomalým nakláněním destičky. Naše dřívější experimenty stanovující PI- pozitivitu zahrnovaly pipetování buněk a průtokovou cytometrii. Buňky byly těmito manipulacemi vystaveny stresu a možnému poškození cytoplasmatické membrány. Dříve naměřená vysoká PI-pozitivita infikovaných buněk (Kalbacova et al., 2008) proto může být ovlivněná nutnými manipulacemi při měření buněk průtokovou cytometrií. Stejně tak mohou být ovlivněny i další parametry související se stresem a buněčnou smrtí, které se měří průtokovou cytometrií na živých buňkách, například mitochondriální membránový potenciál nebo stanovení aktivace kaspáz esejem CaspACE.

Při morfologické analýze buněčné smrti *in situ* mikroskopem však na druhou stranu může dojít k podhodnocení počtu apoptotických buněk. Část apoptotických buněk totiž se uvolňuje do média a není proto pozorovatelná ve vrstvě přisedlých buněk a nemůže být ani dokumentována. Tento jev je výraznější u buněčné linie HeLa G než u buněk BSC-40. Touto chybou však nejsou zatíženy výsledky eseje CaspACE ani výsledky analýzy western blotem, neboť pro tyto analýzy byly sklizeny všechny buňky včetně populace plovoucí v médiu.

Rozdíl mezi buněčnými liniemi HeLa G a BSC-40, který vede k odlišnému průběhu infekce VACV, tkví patrně mimo jiné v odlišném energetickém metabolismu těchto dvou buněčných linií. Naší laboratoří bylo ukázáno, že buňky BSC-40 získávají ATP převážně oxidativní fosforylací, zatímco HeLa G glykolýzou (Kalbacova et al., 2003; Vrbacky et al., 2003). VACV se v prvních 24 hodinách po infekci množí rychleji v buňkách BSC-40, kde bylo ve 12 h.p.i. dosaženo titru  $2 \times 10^7$  PFU/ml při m.o.i. = 2. Za stejných podmínek byl titr infikovaných HeLa G pouze  $5 \times 10^6$  PFU/ml. Ve 24 h.p.i. byly již titry získané v obou buněčných liniích srovnatelné (Kalbacova et al., 2008). Pro rozdílnou kinetiku infekce byly v těchto buněčných liniích také zvoleny odlišné časové intervaly hodnocení aktivace a aktivity kaspáz. V této práci i jinde je také ukázáno, že exprese VACV proteinů monitorovaná expresí EGFP pod časně-pozdním VACV promotorem p7.5 je ve 24 h.p.i. 1,5 x silnější v buňkách BSC-40 oproti HeLa G (kap. 5.1.1.4, obr. 21 a (Liskova et al.,

2011) - výsledky Z. Mělkové). Množství inhibitorů apoptózy exprimovaných VACV bude proto pravděpodobně také vyšší v infikovaných BSC-40 než v infikovaných HeLa G buňkách. VACV narušuje funkci mitochondrií v infikovaných HeLa G i BSC-40 buňkách, jak bylo ukázáno v této práci i v předešlých publikacích naší laboratoře (Kalbacova, 2003; Kalbacova et al., 2008; Vrbacký, 2005; Vrbacky et al., 2003). V této práci byl pozorován jak pokles mitochondriálního potenciálu, tak i destrukce struktury mitochondrií (kap.5.1.3). V buněčné linii BSC-40 má narušení funkce mitochondrií zřejmě vážnější důsledky vzhledem k jejich závislosti na oxidativní fosforylaci jako zdroji ATP. Je tedy možné, že v infikovaných buňkách BSC-40 posléze není dost energetických zdrojů na dokončení apoptózy, jejíž signalizace byla díky virové infekci započata. Naproti tomu buňky HeLa G pravděpodobně mohou udržovat potřebné hladiny ATP glykolýzou.

Případy apoptózy indukované infekcí VACV byly pozorovány již dříve. Apoptóza probíhala v buňkách nepermissivních pro infekci VACV, kde se zřejmě nemohly projevit antiapoptotické účinky proteinů kódovaných VACV, například v CHO buňkách (Ramsey-Ewing and Moss, 1998), v B-lymfocytech (Baixeras et al., 1998), dendritických buňkách (Engelmayer et al., 1999) a také při infekci VACV, který měl delecii v genu E3L (Lee and Esteban, 1994). Apoptóza však byla pozorována také v buňkách, ve kterých docházelo ke množení VACV, například v makrofázích (Humlova et al., 2002) nebo v buňkách BSC-40 infikovaných VACV exprimujícím Bcl-2 (Kalbacova et al., 2002). Zdá se tedy, že antivirový efekt apoptózy infikovaných buněk záleží na načasování apoptózy vzhledem k replikačnímu cyklu viru.

Apoptóza probíhající v HeLa G buňkách infikovaných VACV zdokumentovaná v této práci probíhá příliš pozdě na to, aby mohla mít výrazný vliv na množení viru. Pokud obdoba tohoto jevu probíhá *in vivo*, může mít spíše vliv na imunitní odpověď proti VACV. V poslední době se ukazuje, že i apoptotické buňky mohou být imunogenní, pokud obsahují tzv. signály nebezpečí spojené se stresem nebo patogeny (DAMPs nebo PAMPs) (Green et al., 2009). Zda jsou tyto signály nebezpečí přítomny v apoptotických buňkách HeLa G, může být předmětem dalšího výzkumu. Ve VACV infikovaných buňkách však dochází také k disbalancím hladin  $Ca^{2+}$  a zřejmě i ke stresu ER (Kalbacova, 2003), takže expozice kalretikulinu jako důležitého DAMP je zde pravděpodobná. Nevíme ovšem, zda některý z proteinů kódovaných komplexním genomem VACV expozici kalretikulinu specificky neblokuje.

Rozhodně se zdá být důležité i to, jaký typ buněčné smrti probíhá v buňkách infikovaných VACV *in vivo*. Charakterizace typu buněčné smrti infikovaných buněk HeLa G a BSC-40 má význam i proto, že tyto dvě buněčné linie jsou velmi často používané pro

experimenty i množení VACV. Mělo by proto být známo, jaké charakteristiky má infekce těchto buněk i v pozdějším čase po infekci.

## 6.2 Aktivace a aktivita kaspáz v infikovaných buňkách

Dále jsem chtěla lépe charakterizovat dříve pozorovanou aktivaci kaspáz v buňkách infikovaných VACV. Pro experimenty jsem zvolila časové intervaly infekce, ve kterých byly v předchozí práci (Kalbacova, 2003; Kalbacova et al., 2008) získány nejvýraznější rozdíly mezi neinfikovanými a infikovanými buňkami v esejí na aktivaci kaspáz CaspaTag. Tyto intervaly byly 12 h.p.i. u BSC-40 a 24 h.p.i. u HeLa G. Odlišná kinetika růstu VACV v těchto dvou buněčných liniích podmiňuje i titry získané v prvních 24 h.p.i., které byly v infikovaných buňkách BSC-40 v čase 12 h.p.i. přibližně 4x vyšší než v infikovaných buňkách HeLa G, ale ve 24 h.p.i. již došlo k relativnímu vyrovnání titrů v obou buněčných liniích (Kalbacova et al., 2008), kap. 6.1).

V buňkách podléhajících lytické virové infekci není aktivace kaspáz příliš očekávaným jevem. Zaměřila jsem se proto na testování specifity esejí CaspACE, což je strukturálně obecný kaspázový inhibitor Z-VAD-FMK označený FITC (podobně jako esej CaspaTag používaný v předchozích pracích naší laboratoře (Kalbacova, 2003; Kalbacova et al., 2008)). Tento značený inhibitor prochází membránami, ireverzibilně se váže do aktivního centra kaspáz a nenavázaný CaspACE se poté odmyje ven z buňky. Fluorescenční signál buněk je poté detekován průtokovou cytometrií nebo mikroskopicky. Bylo však publikováno, že u esejů založených na inhibitech kaspáz označených fluorescenční značkou může docházet k nespecifické vazbě na buňky, zřejmě díky fluorescenční značce. Takové vazbě pak není možné zabránit preinkubací s neznačeným inhibitorem (Pozarowski et al., 2003). V kompetičních experimentech jsem proto bránila vazbě CaspACE do aktivního centra kaspáz preinkubací s neznačeným inhibitorem Z-VAD-FMK. Tato kompetice vazbu CaspACE detekovanou průtokovou cytometrií v infikovaných buňkách výrazně snížila (kap.5.1.1.2.1.1) v obou testovaných buněčných liniích infikovaných VACV. Zdá se tedy, že esej CaspACE se v našem systému zřejmě váže specificky do aktivního centra kaspáz.

VACV exprimuje několik proteinů, které blokují vnější i vnitřní dráhu aktivace apoptózy. Proteiny F1L a N1L brání uvolnění cytochromu c z mitochondrií a tím i aktivaci kaspázy 9, protein B13R (SPI-2, analog CrmA) inhibuje aktivitu kaspáz, především kaspázy 8 a kaspázy 1 (Taylor and Barry, 2006). Je tedy pravděpodobné, že v buňkách

infikovaných VACV mohou být aktivní jiné proteázy než kaspázy. Ověřovala jsem proto, zda pozitivita eseje CaspACE není ovlivněna aktivitou proteáz kalpainu a kathepsinů D a E, které mohou také hrát roli v regulaci apoptózy. Inhibitory těchto proteáz však neměly vliv na výsledek eseje CaspACE ani při kompetičním uspořádání, ani při dlouhodobé inkubaci s infikovanými buňkami (kap. 5.1.1.5). Inhibitory těchto proteáz neměly vliv ani na známky aktivity kaspáz v infikovaných buňkách, tedy na štěpení PARP a cytokeratinu 18 při dlouhodobé inkubaci (kap. 5.1.1.5). Zdá se tedy, že esej CaspACE je specifický pro kaspázy. Na aktivaci kaspáz v infikovaných HeLa G a BSC-40 buňkách nemá vliv inhibice kalpainu a kathepsinů D a E, na pozorovanou aktivitu exekutorových kaspáz v infikovaných buňkách HeLa G tyto inhibitory také neměly vliv.

Eseje CaspACE a kompetice neznačenými inhibitory jsem využila pro určení totožnosti kaspáz aktivovaných v buňkách infikovaných VACV. Použila jsem sadu specifických inhibitorů kaspáz, která obsahovala inhibitory kaspázy 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10 a 13 (R&D). Při preinkubaci testovaných buněk s těmito inhibitory snižovaly signál CaspACE v infikovaných buňkách výrazně inhibitory kaspáz 2 a 4 v obou buněčných liniích (kap. 5.1.1.2.2.1). Signál vzorků kompetovaných inhibitory kaspáz 2 a 4 se statisticky signifikantně lišil od signálu vzorků kompetovaných ostatními specifickými inhibitory kaspáz. Snížení signálu CaspACE ostatními inhibitory bylo podobné jako v kontrolních neinfikovaných buňkách (10 - 15% oproti kontrole), takže aktivaci ostatních kaspáz jsme považovali za nevýznamnou.

Výpovědní hodnota těchto experimentů je ovšem závislá na specifitě použitých inhibitorů. Firma R&D uvádí, že použité inhibitory jsou specifické pro kaspázu 1 (sekvence aminokyselin WEHD) a 4 (sekvence aminokyselin YVAD). Jiné prameny však uvádějí, že oba tyto inhibitory mají řádově vyšší afinitu k aktivnímu centru kaspázy 1 než kaspázy 4 (Silverman and Lomas, 2007). Aktivní místo kaspázy 1 by ovšem v buňkách infikovaných VACV mělo být obsazeno proteinem B13R, který se stejně jako CrmA váže k aktivovaným kaspázám, především ke kaspáze 1 a 8. Protein CrmA se do aktivního místa kaspáz váže kovalentní vazbou (Cassens et al., 2003; Dobo et al., 2006; Kettle et al., 1997). Afinita CrmA je přitom řádově vyšší ke kaspáze 1 než ke kaspáze 4. Inhibitor kaspázy 1 (WEHD) však signál CaspACE téměř nesnižoval, zatímco inhibitor kaspázy 4 (YVAD) jej výrazně snížil. Inhibitor kaspázy 2 je relativně dost specifický díky 5 aminokyselinám v aktivním místě (VDVAD) místo 4 aminokyselin u ostatních použitých inhibitorů kaspáz. Bylo však publikováno, že inhibitor kaspázy 2 může inhibovat i aktivitu kaspázy 3 (a 7) a substráty založené na tomto peptidu mohou být štěpeny i kaspázou 3 (McStay et al., 2008). Není proto jasné, zda za pozitivními esejí ukazujícími aktivaci a aktivitu kaspázy 2 nestojí

aktivita kaspázy 3, která byla rovněž pozorována v infikovaných HeLa G buňkách. Celkově není takovýto postup testování přítomnosti aktivovaných kaspáz příliš kvantitativní díky odlišné afinitě kompetujících inhibitorů k jednotlivým kaspázám. Z velikosti snížení signálu CaspACE preinkubací se specifickými kaspázovými inhibitory nelze proto příliš jistě usuzovat, v jakém množství jsou jednotlivé aktivované kaspázy v buňkách zastoupeny.

Aktivaci některých kaspáz jsem charakterizovala také detekcí štěpení prokaspáz pomocí analýzy western blotem. Produkty štěpení prokaspázy 3 jsem detekovala v infikovaných HeLa G i BSC-40 buňkách v různých časech po infekci (15 a 18 h.p.i.) a při infekci různými rekombinantními viry (kap. 5.1.1.2.2.2). V buňkách BSC-40 bylo výrazné štěpení kaspázy 3 při infekci virem exprimujícím Bcl-2, kde i morfologicky probíhá apoptóza. Zde byly detekovatelné fragmenty kaspázy 3 o přibližné velikosti 11 kDa a 17 kDa, které tvoří aktivní tetramer kaspázy. V buňkách BSC-40 infikovaných virem WR-CAT/I a WR-LUC byl detekován pouze fragment kaspázy 3 o velikosti 11 kDa, stejně jako v buňkách HeLa G infikovaných viry WR-LUC, WR-CAT/I a WR-Bcl2/I. Fragment o velikosti 17 kDa zde chybí, což může znamenat, že byl degradován. V čase 15 h.p.i. není morfologicky pozorovatelná apoptóza v infikovaných BSC-40 ani HeLa G buňkách, takže zde zřejmě není aktivní ani kaspáza 3. Štěpení a aktivace kaspázy 3 v pozdějších časových intervalech infekce HeLa G buněk pravděpodobně vede i k morfologickým projevům apoptózy.

Testovala jsem také aktivaci a aktivitu kaspázy 12 v buňkách infikovaných VACV. Rozhodli jsme se zaměřit na tuto kaspázu, neboť je to teoreticky jedna z mála kaspáz, která by neměla být inhibována známými antiapoptotickými proteiny VACV. O kaspáze 12 bylo publikováno, že se účastní signalizace stresu ER (Hitomi et al., 2004b) a také regulace aktivace zánětlivé kaspázy 1 (Saleh et al., 2006). Předpokládá se, že kaspáza 12 u člověka nemá enzymatickou aktivitu, ani v případech, kdy je přítomna ve své nezkrácené formě. U většiny populace je však přítomna alela genu kaspázy 12, u níž mutací zavedený stop kodon vede k expresi zkrácené formy proteinu (Saleh et al., 2004). Z naší analýzy western blotem vyplývá, že lidská buněčná linie HeLa G obsahuje nezkrácenou verzi kaspázy 12 (protein o velikosti 53 kDa). Buněčná linie BSC-40 pochází z kočkodana zeleného a kaspáza 12 je v těchto buňkách také exprimována v plné délce.

V infikovaných buňkách obou buněčných linií bylo pozorováno štěpení kaspázy 12 při infekci různými rekombinantními VACV. Byla detekována přítomnost fragmentu o přibližné velikosti 38 kDa, který je považován za produkt štěpení kalpainem, a také fragment o velikosti 32 kDa, který odpovídá produktu štěpení kaspázami 3/7 (Martinez et



al., 2010). O aktivaci kaspázy 12 jsme spekulovali v souvislosti s disbalancemi v hladinách  $\text{Ca}^{2+}$  v infikovaných buňkách (Kalbacova, 2003) a předpokládaným stresem ER v buňkách infikovaných VACV. Bylo ukázáno, že při stresu ER může být vyššími hladinami  $\text{Ca}^{2+}$  aktivován kalpain, a ten může štěpit a tím aktivovat kaspázu 12 (Nakagawa and Yuan, 2000). Působení inhibitory kalpainu však nemělo na štěpení kaspázy 12 vliv (kap. 5.1.1.2.2.3), takže aktivita kalpainu zde zřejmě není příčinou štěpení kaspázy 12. V infikovaných buňkách BSC-40 nebyla pozorována aktivita exekutorových kaspáz (kap. 5.1.1.3), ale kaspáza 12 zde štěpena byla. Není tedy jasné, která proteáza kaspázu 12 v buňkách infikovaných VACV štěpí.

Význam pozorovaného štěpení kaspázy 12 také není jasný. Kaspáza 12 u člověka zřejmě není enzymaticky aktivní, v našem systému její aktivita nebyla detekovatelná v buňkách HeLa G ani BSC-40. Je však možné, že kaspáza 12 v infikovaných buňkách hraje úlohu v aktivaci kaspázy 1. Bylo totiž publikováno, že pro ovlivnění aktivace kaspázy 1 není nutná enzymatická aktivita kaspázy 12 (Saleh et al., 2006). Kaspáza 12 zřejmě spíše díky své CARD doméně tvoří heterodimery s kaspázou 1, a brání tak její aktivaci. Je otázkou, jestli na tuto roli má vliv štěpení kaspázy 12. Bylo také publikováno, že kaspáza 12 pozitivně ovlivňuje antivirovou odpověď (Wang et al., 2010). Její štěpení by mohlo tento efekt blokovat, což by mohl být způsob interakce VACV s antivirovou imunitou.

Analyzovala jsem také specifickou aktivitu kaspáz 2, 3 a 4 v lyzátech získaných z buněk infikovaných VACV (kap.5.1.1.3.1); substráty pro štěpení kaspázami 2 a 4 bohužel nebyly dostupné v permeabilní formě. Infikované buňky a neinfikované kontroly byly sklizeny ve stejných časových intervalech po infekci, ve kterých byly provedeny CaspACE eseje. V infikovaných buňkách HeLa G byla potvrzena aktivita kaspáz 2, 4 i 3. Pozitivita těchto esejí byla specificky inhibovatelná obecným inhibitorem kaspáz Z-VAD-FMK i inhibitorem specifickým pro příslušnou kaspázu. V infikovaných buňkách BSC-40 nebyla detekovatelná zvýšená aktivita těchto kaspáz oproti buňkám neinfikovaným, naopak byla vždy nižší. Důvodem tohoto rozdílu mezi buněčnými liniemi HeLa G a BSC-40 nejspíše nebude rozdílný obsah buněčných inhibitorů kaspáz nebo těchto kaspáz samotných v HeLa G a BSC-40 buňkách, protože po vyvolání apoptózy staurosporinem byla naměřena vysoká aktivita kaspáz 2, 3 i 4 v obou buněčných liniích. Je však možné uvažovat o tom, že kaspázové inhibitory exprimované VACV (zejména protein B13R) se v infikovaných buňkách BSC-40 nacházely v jiných kompartmentech než aktivované kaspázy. Po zrušení kompartmentalizace v buněčném lyzátu však kaspázy mohly být těmito inhibitory inhibovány. V této práci bylo také ukázáno, že exprese VACV proteinů je v buňkách BSC-40 vyšší než v buňkách HeLa G (kap. 5.1.1.4). Dá se proto předpokládat,

že koncentrace kaspázového inhibitoru B13R i dalších inhibitorů apoptózy byla v infikovaných buňkách HeLa G nižší než v infikovaných BSC-4.

Aktivitu kaspázy 3 bylo možné analyzovat také na živých nemanipulovaných buňkách *in situ*, protože byl dostupný její substrát PhiPhiLux schopný pronikat membránami. Zaměřila jsem se na stejné časové intervaly infekce, které byly zkoumány v ostatních experimentech, a také na intervaly pozdější, tedy u buněk HeLa G 24 a 48 h.p.i. a u buněk BSC-40 12 a 24 h.p.i (kap. 5.1.1.3.4). Infikované buňky HeLa G vykazovaly vysokou aktivitu kaspázy 3, téměř srovnatelnou s pozitivní apoptotickou kontrolou. Pozitivní signál eseje PhiPhiLux bylo možné inhibovat preinkubací buněk s obecným inhibitorem kaspáz Z-VAD-FMK, byl tedy specifický. Naproti tomu infikované buňky BSC-40 nevykazovaly vyšší aktivitu kaspázy 3 ve srovnání s neinfikovanými buňkami.

Detekci aktivity kaspázy 3 jsem prováděla v buňkách infikovaných WR-EGFP, tedy virem, který exprimuje EGFP pod časně-pozdním promotorem, aby bylo možné sledovat infekci buněk. Ve 24 h.p.i. byla zelená fluorescence ukazující infekci VACV pozorovatelná prakticky ve všech buňkách, infekce 100% buněk byla také detekována ve 12 a 24 h.p.i. průtokovou cytometrií u infikovaných HeLa G i BSC-40 buněk (Tab 4, kap. 5.1.1.4). Aktivita kaspázy 3 byla však u infikovaných HeLa G ve 48 h.p.i. detekována převážně v buňkách, které nevykazovaly zelenou fluorescenci, ale měly kondenzovaná apoptotická jádra (kap. 5.1.1.3.4, obr. 16). Je tedy pravděpodobné, že všechny buňky byly původně infikovány, ale v umírajících buňkách se v pozdějších fázích infekce zelená fluorescence EGFP ztrácela. Analyzovala jsem proto plochu zelené fluorescence buněk HeLa G i BSC-40 infikovaných WR-EGFP v časných i pozdních fázích infekce (kap. 5.1.1.4). U infikovaných BSC-40 byl úbytek plochy zelené fluorescence minimální a odpovídal pravděpodobně pouze cytopatickému efektu a následnému shlukování buněk. U infikovaných HeLa G byl pokles plochy zelené fluorescence s časem infekce výrazný a odpovídal časově zvýšení výskytu apoptotických jader. Zdá se tedy, že umírající, pravděpodobně apoptotické, infikované HeLa G buňky ztrácejí fluorescenci EGFP exprimovaného VACV. Tomu odpovídá fakt, že u infikovaných buněk BSC-40 nebyl pozorován ani výrazný nárůst výskytu apoptotických jader, ani výrazné snížení fluorescence exprimovaného EGFP v pozdějších fázích infekce.

Snažila jsem se také stanovit obecnou aktivitu kaspáz esejem Rhodamine 110-D<sub>2</sub> a také ověřit specifitu tohoto eseje pro kaspázy (kap. 5.1.1.3.3). Tento substrát by měl díky dvěma aspartátům sloužit jako nespecifický substrát štěpení kaspáz účastnících se signalizace apoptózy (Hug et al., 1999). V našem systému však zřejmě nedochází k detekci aktivity kaspáz tímto substrátem, ale pravděpodobně jiných proteáz, protože detekovaný

signál v lyzátech neinfikovaných i infikovaných buněk nebylo možné snížit přidáním inhibitoru kaspáz Z-VAD-FMK. Rozdíly v signálu mezi infikovanými a neinfikovanými buňkami nebyly statisticky signifikantní až na snížení signálu v infikovaných buňkách HeLa G oproti neinfikovaným kontrolám. V kontrolních lyzátech připravených z apoptotických buněk sice došlo ke zvýšení signálu, ale ani zde tento signál nebyl inhibovatelný Z-VAD-FMK. Signál eseje Rhodamine 110-D<sub>2</sub> v infikovaných buňkách nebylo možné inhibovat Z-VAD-FMK ani při testování pomocí průtokové cytometrie (Kalbacova et al., 2008). Zdá se tedy, že substrát Rhodamine 110-D<sub>2</sub> není v našem systému použitelný pro detekci aktivity kaspáz.

Aktivita exekutorových kaspáz v infikovaných HeLa G buňkách byla ověřena detekcí štěpení substrátů exekutorových kaspáz PARP a cytokeratin 18. Oba tyto substráty byly štěpeny v infikovaných HeLa G buňkách, jejich štěpení však bylo velmi slabé nebo nedetekovatelné v infikovaných buňkách BSC-40 (kap. 5.1.1.3.5). Tyto výsledky jsou v souladu s morfologickou detekcí apoptózy pouze v infikovaných HeLa G buňkách. Takto monitorovaná aktivita exekutorových kaspáz nebyla ovlivněna inhibicí proteáz kalpainu a kathepsinů D a E (kap. 5.1.1.5), ale přidání kaspázového inhibitoru Z-VAD-FMK toto štěpení PARP i cytokeratinu 18 zablokovalo (kap. 5.1.1.3.5 a (Liskova et al., 2011) - výsledky J. Knitlové).

Vzhledem k detekované aktivaci a aktivitě kaspáz 2, 3 a 4 v buňkách infikovaných VACV nás zajímalo, zda inhibitory těchto kaspáz budou mít vliv na množení VACV. Specifické inhibitory těchto kaspáz ani obecný kaspázový inhibitor však neměly vliv na titry VACV získané inkubací infikovaných buněk v přítomnosti těchto inhibitorů, a to podobně v obou buněčných liniích. Zdá se tedy, že pozorovaná aktivace kaspáz nemá pozitivní ani negativní vliv na množení VACV *in vitro*, a to konkrétně v buněčných liniích HeLa G a BSC-40. Je však možné, že aktivita těchto kaspáz má význam při infekci VACV či imunitní odpovědi *in vivo*, což nebylo testováno.

Kaspáza 2 má zřejmě roli v signalizaci poškození DNA, v signalizaci buněčného cyklu a funguje také jako tumor supresor (Kitevska et al., 2009). Je tedy spojena s proteinem p53 a signalizací apoptózy díky aktivaci tohoto proteinu. Kaspáza 4 má roli v signalizaci apoptózy vyvolané ER stresem a je také homologem kaspázy 1, takže se může podílet na regulaci produkce zánětlivých cytokinů (Martinon and Tschopp, 2007). Je známo, že infekce VACV způsobuje poškození DNA (Knipe, 2001), ovlivňuje hladiny p53 (Marques et al., 2005; Santos et al., 2004), zasahuje do regulace buněčného cyklu (Wali and Strayer, 1999; Yoo et al., 2008) a také pravděpodobně způsobuje stres ER (Kalbacova, 2003; Kepp et al., 2009a). Aktivace kaspáz 2 a 4 v buňkách infikovaných VACV se proto

zdá být odpovídající situaci a mohla by hrát roli v signalizaci pozorované apoptózy. Zbývá ovšem stanovit, zda tyto kaspázy jsou skutečně aktivní i v živých buňkách infikovaných VACV a zda jsou zodpovědné za pozorovanou apoptózu.

Aktivita kaspázy 3 stanovená esejem PhiPhiLux i díky štěpení substrátů exekutorových kaspáz v buňkách HeLa G infikovaných VACV je v souladu s pozorováním morfologie apoptózy v těchto buňkách (kap. 5.1.1.1) a přispívá tak k bližšímu určení typu buněčné smrti u infikovaných buněk HeLa G jako apoptotické.

### **6.3 Typ buněčné smrti buněk infikovaných kmeny Dryvax a Praha**

Následně jsme se rozhodli ověřit typ buněčné smrti po infekci VACV ještě u dalších kmenů VACV. Použila jsem plakové izoláty vakcinačních kmenů Praha a Dryvax, a to vždy plakový izolát s vysokou a nízkou virulencí. Analýza morfologie jader ukázala, že infekce VACV kmeny Dryvax a Praha způsobuje apoptózu v HeLa G i v BSC-40 buňkách (kap. 5.1.2). Toto pozorování bylo potvrzeno i analýzou štěpení substrátu exekutorových kaspáz PARP. Ačkoli bylo procentuelní zastoupení apoptotických jader u HeLa G buněk podobné při infekci VACV kmene WR i Dryvax a Praha, buňky infikované kmeny Dryvax a Praha byly zřejmě více negativně ovlivněné, protože je narozdíl od buněk infikovaných kmenem WR nebylo možné dokumentovat v čase 96 h.p.i. kvůli špatné kvalitě buněk. Porovnávala jsem také růst plakových izolátů kmene Dryvax a Praha s růstem viru wt-WR a jeho rekombinant (kap. 5.1.2.3). Získaný titr kmenů Dryvax a Praha byl o logaritmus až dva logaritmy nižší než titr viru wt-WR. Infekce virulentními izoláty kmenů Dryvax a Praha produkovala vyšší titry než infekce atenuovanými izoláty. Rozdíly v růstu virů byly zřejmě zesíleny uspořádáním pokusů, neboť virové inokulum bylo ponecháno na buňkách spolu s přidaným médiem po celou dobu infekce. I nejnižší naměřený titr však stále znamená, že se virus množil. Apoptóza způsobená kmeny VACV Dryvax a Praha tedy také nastává až po vzniku určitého množství virového potomstva.

Bylo publikováno, že protilátková odpověď na použité plakové izoláty VACV kmene Dryvax a Praha koreluje s jejich virulencí (Kutinova et al., 1996; Kutinova et al., 1995). Bohužel nebylo publikováno přímé srovnání protilátkové odpovědi na imunizaci VACV kmeny WR, Dryvax a Praha. Bylo však publikováno, že kmen WR je značně více virulentní než kmen Dryvax (Williamson et al., 1990). Při porovnání protilátkové odpovědi po imunizaci VACV kmeny WR, Dryvax a MVA byla nejširší protilátková odpověď po imunizaci kmenem WR (Davies et al., 2008). Zdá se tedy, že imunogenita těchto kmenů

VACV by mohla pozitivně korelovat s virulencí. Z výsledků uvedených v této práci lze tedy vyvodit, že virulence VACV by mohla souviset s typem buněčné smrti infikovaných buněk, neboť viry, které způsobovaly účinně apoptózu infikovaných buněk, dosahovaly nižších titerů a jsou také méně virulentní. Typ buněčné smrti infikovaných buněk tedy může mít vliv na virulenci i výslednou imunogenitu viru.

Definovat rozdíly mezi kmeny WR, Dryvax a Praha, které by mohly stát za odlišným průběhem infekce v buňkách BSC-40, je těžké, protože genom virů Dryvax a Praha dosud nebyl publikován. Nelze tedy přesně určit, jaké jsou rozdíly v genetické výbavě těchto virů. VACV kmene WR má původ ve kmeni NYCBOH stejně jako kmen Dryvax. Kmen WR byl však jako laboratorní kmen pasážován na mozcích myši a podstoupil také mnoho pasáží v různých typech buněčných linií (Davies et al., 2008). Je proto neurovirulentní a je také schopen se množit v mnoha buněčných typech pocházejících z různých druhů včetně člověka. Oproti tomu kmen Dryvax byl pasážován na kůži telat, takže jeho virulence pro lidského hostitele byla omezena (Osborne et al., 2007). Vakcinační kmen Praha podstoupil také mnoho pasáží na telatech a také lidských pasáží (Kutinová et al., 1995). Kmeny Dryvax i Praha mají tedy oba ve své historii pasážování na kůži telat, což by mohlo představovat společný selekční tlak, který by vedl k podobným biologickým vlastnostem a k podobným interakcím s hostitelem.

Pozorovaná apoptóza buněk infikovaných vakcinačními kmeny Dryvax a Praha může mít vliv na imunitní odpověď organismu imunizovaného těmito viry. Je však otázkou, zda apoptóza buněk infikovaných těmito viry probíhá také *in vivo*. Také není jasné, zda apoptotické infikované buňky budou imunitní odpověď spíše tlumit nebo povzbuzovat.

Některé dosud nepublikované výsledky naší laboratoře naznačují, že apoptóza infikovaných buněk koreluje spíše s nižší imunitní reakcí (J. Knitlová et al., rukopis v přípravě). Ve zmíněné studii byly myši kmenů Nc/Nga, Balb/c a C57Bl/6 imunizovány kožní inokulací VACV kmene wt-WR. Protilátková odpověď (IgG1, IgG2a) byla neslabší u myši Nc/Nga, které slouží jako model atopické dermatitidy (Jin et al., 2009). Na histologických řezech z kožních lézí těchto myši byla patrná nekrotizující folikulitida a chromatinové debris, které je znakem apoptózy (J. Knitlová, rukopis v přípravě). Další plán práce na zmíněném projektu zahrnuje také testování kmenů Dryvax a Praha i na těchto myších.

Je evidentní, že charakterizace typu buněčné smrti buněk infikovaných VACV včetně přítomnosti PAMPs a DAMPs na těchto buňkách a včetně popisu situace *in vivo* může přispět k vývoji efektivních a bezpečných vakcín odvozených z VACV. Díky hrozbě

bioterrorismu se dnes znovu začíná očkovat proti černým neštovicím, ale k dispozici je stále pouze generace původních živých vakcín. V dnešní době je z různých důvodů mnoho osob imunosuprimovaných, takže vývoj bezpečných vakcín nabývá na významu.

#### **6.4 Změny mitochondrií v buňkách infikovaných VACV**

Jako doplnění analýzy buněčné smrti jsem analyzovala také stav mitochondrií u buněk infikovaných VACV. V naší laboratoři bylo již dříve pozorováno, že infekce VACV vede ke snížení mitochondriálního membránového potenciálu oxidativní fosforylace v buněčných liniích HeLa G a BSC-40 (Kalbacova, 2003; Kalbacova et al., 2008; Vrbacký, 2005; Vrbacký et al., 2003). Je také známo, že narušení funkce mitochondrií, především depolarizace mitochondriálního membránového potenciálu, vede k fragmentaci mitochondrií. Bylo však také publikováno, že v T-lymfocytární linii Jurkat nedochází po infekci VACV ke snížení mitochondriálního potenciálu, buňky jsou naopak chráněny proti uvolnění cytochromu c z mitochondrií VACV proteinem F1L (Wasilenko et al., 2005; Wasilenko et al., 2001). Zajímalo nás proto, jaká bude morfologie mitochondrií u námi používaných buněk infikovaných VACV.

V časovém intervalu 6 h.p.i. vykazovaly infikované buňky BSC-40 většinou fragmentované mitochondrie (kap. 5.1.3.1). Tomuto pozorování odpovídalo snížení mitochondriálního potenciálu naměřené ve stejném časovém intervalu infekce i o 6 hodin později. V čase 6 h.p.i. jsou buňky BSC-40 při m.o.i. = 5 infikovány přibližně z 80% (Tab. 4), což odpovídá primární infekci. Čas 6 h.p.i. byl pro studium mitochondrií zvolen proto, že primárně infikované buňky jsou již virem ovlivněny, ale stále ještě si zachovávají strukturu a atributy živých buněk. Pozorované změny jsou tedy pravděpodobně reakcí buňky na přítomnost viru. V pozdějších časech infekce je struktura infikovaných buněk deorganizována tvorbou a přítomností velkého množství virového potomstva. Pozorované strukturální změny takových buněk pak nemusejí být důsledkem interakcí viru a hostitelské buňky, ale prostým následkem vyčerpání energetických zdrojů a neschopnosti obnovit poškozené struktury.

Zdá se tedy, že v infikovaných buňkách BSC-40 dochází ke fragmentaci mitochondrií a snížení mitochondriálního membránového potenciálu. Toto pozorování zřejmě nebude ovlivněno pipetováním buněk, protože pro konfokální mikroskopii byly buňky pouze obarveny v kultivační destičce a nebylo s nimi nijak manipulováno. Naproti tomu pro určení mitochondriálního membránového potenciálu byly buňky odpipetovány,

takže pozorované snížení mitochondriálního potenciálu tím mohlo být ovlivněno. Toto podezření jsme měli i díky publikovaným zjištěním, že v linii Jurkat ke snížení mitochondriálního potenciálu nedochází (Wasilenko et al., 2001). Buněčná linie Jurkat je však suspenzní a při přípravě vzorků pro průtokovou cytometrii není nutné vystavovat tyto buňky stresu spojenému s resuspendováním přisedlých buněk. Díky zjištění, že v infikovaných buňkách BSC-40 dochází k fragmentaci mitochondrií, se však přikláníme k názoru, že snížení mitochondriálního potenciálu infikovaných buněk pozorované v naší laboratoři není artefakt a skutečně k němu dochází.

Význam fragmentace mitochondrií v infikovaných BSC-40 není zcela jasný. V naší laboratoři bylo ukázáno, že u infikovaných buněk HeLa G ani BSC-40 nedochází k uvolnění cytochromu c z mitochondrií (Vrbacký, 2005). Zároveň však dochází ke snížení mitochondriálního membránového potenciálu, což probíhá nejasným mechanismem při současném zadržení cytochromu c v mitochondriích. Buňky BSC-40 jsou závislé na oxidativní fosforylaci jako zdroji ATP (Kalbacova et al., 2003; Vrbacky et al., 2003), ztráta funkce mitochondrií pro ně tedy může mít fatální důsledky.

## **6.5 Význam transglutaminázy v buňkách infikovaných VACV**

Byla publikována práce (Yamaguchi and Wang, 2006), v níž bylo ukázáno, že aktivita tkáňové transglutaminázy v Bax-deficientních buňkách vedla k vyšším formám kaspázy 3. V této práci byly detekovány vyšší formy kaspázy 3 o přibližné molekulové hmotnosti 64 kDa, což odpovídá dvěma spojeným prokaspázám 3 (2 x 32 kDa), dále vyšší formy o přibližné molekulové hmotnosti 40 kDa, což odpovídá dvěma spojeným fragmentům kaspázy 3 (2 x 19 kDa). Autoři této práce navrhují, že transglutamináza zde funguje jako inhibitor kaspázy 3 díky mutaci v genu kódujícím protein Bax. Při inhibici aktivity transglutaminázy jejím inhibitorem MDC totiž došlo k objevení štěpené formy kaspázy 3, ke snížení množství vyšších forem kaspázy 3 a také proběhla apoptóza, která byla bez přidání MDC blokována.

Situace u buněk infikovaných VACV se podobá výše popsané situaci v několika bodech. Průběh apoptózy je zde také blokován, a to expresí několika antiapoptotických proteinů VACV, které blokují i mitochondriální dráhu aktivace apoptózy podobně jako deficeence proteinu Bax. V naší laboratoři jsme také pozorovali výskyt vyšších forem proteinů, dříve proteinu Bax, později také kaspázy 3. Domnívali jsme se proto, že by

v buňkách infikovaných VACV analogicky mohla být aktivována tkáňová transglutamináza a její aktivita by mohla interferovat s aktivitou kaspázy 3.

V infikovaných buňkách HeLa G i BSC-40 byly pomocí western blotu pozorovány vyšší molekulové hmotnosti kaspázy 3 o molekulové hmotnosti 40 kDa, což odpovídá dvěma spojeným štěpeným kaspázám 3 o molekulové hmotnosti 19 kDa (kap. 5.1.4.1). Při hlubší analýze však vyšlo najevo, že ne všechny rekombinanty VACV kmene WR způsobují vznik vyšších forem kaspázy 3. Divoký typ viru wt-WR, který neexprimuje žádný rekombinantní gen, tvorbu vyšších forem kaspázy 3 neindukoval. Stejně tak vyšší formy kaspázy 3 neindukovaly rekombinanty exprimující rekombinantní proteiny pod časně-pozdním VACV promotorem p7.5. Naopak tvorbu vyšší formy kaspázy 3 indukovaly viry exprimující rekombinantní proteiny pod IPTG-inducibilním pozdním promotorem p4b. Výskyt těchto forem však nebyl závislý na přítomnosti IPTG a tedy ani na expresi rekombinantního proteinu. Navíc virus WR-LUC L, který exprimuje luciferázu také pod promotorem p4b, ale bez regulace systémem LacI/LacO, vyšší formy kaspázy 3 také neindukoval.

Virus WR-LUC L se liší od ostatních rekombinantních VACV exprimujících pod promotorem p4b regulací exprese rekombinantního proteinu. Zatímco viry WR-CAT/I, WR-Bcl2/I a WR-PKR/I byly připraveny homologní rekombinací plasmidu pPR35 s vloženou cDNA do thymidinkinázového genu VACV, virus WR-LUC L byl připraven homologní rekombinací plasmidu pPR15 s vloženou cDNA také do thymidinkinázového genu VACV. Virus WR-LUC L se tedy liší sekvencemi vloženými spolu s cílovým genem. Viry WR-CAT/I, WR-Bcl2/I a WR-PKR/I mají spolu s cílovým genem vložený gen LacI pod časně-pozdním VACV promotorem p7.5, protein kódovaný tímto genem (repressor laktózosvého operonu) je tedy přítomen v infikovaných buňkách. Tento repressor blokuje expresi z promotoru p4b, neboť se váže na sekvenci laktózosvého operátoru přítomnou za tímto promotorem. V přítomnosti IPTG se repressor uvolní z vazby na DNA a probíhá exprese z promotoru p4b (Rodriguez and Smith, 1990). Virus WR-LUC L vloženou sekvenci LacI ani žádného dalšího genu nemá. Je tedy možné, že efekt pozorovaný na změnách molekulových hmotností kaspázy 3 je způsoben expresí proteinu kódovaného genem LacI. Protilátka použitá k detekci kaspázy 3 je polyklonální, takže je také možné předpokládat určitou nespecifickou reaktivitu této protilátky. Velikost proteinu kódovaného genem LacI je udávána jako asi 37,5 kDa (Wilson et al., 2005), takže je možné, že protein o přibližné velikosti 40 kDa detekovaný protilátkou proti kaspáze 3 je protein kódovaný genem LacI.



Stanovovala jsem také vliv inhibitoru transglutaminázy MDC na růst VACV. Při koncentraci 300  $\mu$ M MDC přidaného do média infikovaných buněk (buňky byly s MDC také preinkubovány a bylo přítomno i při adsorpci viru) byl titr viru výrazně snížen u obou testovaných virů. Byl testován virus WR-LUC, který nezpůsobuje výskyt vyšších molekulových hmotností kaspázy 3, i virus WR-CAT/I, který způsobuje objevení se vyšších molekulových hmotností kaspázy 3. Růst viru WR-LUC byl vlivem působení MDC snížen o 0,86 logaritmu, virus WR-CAT/I o 1,4 logaritmu. Zdá se tedy, že inhibice transglutaminázy nebo enzymů s podobnou aktivitou má negativní efekt na množení VACV.

## 6.6 Možnost superinfekce buněk infikovaných VACV

V dříve publikované práci (Christen et al., 1990) bylo ukázáno, že replikace superinfikujícího VACV byla snížena o 90% ve 4-hodinovém intervalu superinfekce. V této práci byl také použit VACV kmen WR a buněčná linie BSC-40. My jsme se rozhodli kinetiku bloku superinfekce prověřit pomocí VACV kmene WR exprimujícího červený a zelený fluorescenční protein pod časně-pozdním promotorem p7.5 (WR-DsRed, WR-EGFP) a také na buňkách BSC-40. Pro první i druhou infekci v superinfekčním experimentu byla použita multiplicita infekce 5. Při této m.o.i. zůstává část buněk neinfikována po primární infekci, což komplikuje vyhodnocení výsledků. Při použití vyšší m.o.i. by však byl výrazný cytopatický efekt buněk, buňky by byly křehké a velká část buněk by plavala v médiu. Infikované buňky by se nedaly snímat mikroskopem *in situ* ani spolehlivě měřit průtokovou cytometrií. Proto byla pro tyto experimenty zvolena tato multiplicita infekce.

Pomocí konfokálního mikroskopu a následné kvantifikace buněk na fotografiích jsem ukázala, že ve 2 hodinách po první infekci je možné superinfikovat 90% infikovaných buněk (kap. 5.2.2.1). Ve 4 hodinách po první infekci je již možno superinfikovat pouze 47% buněk a v 6 hodinách pouze 33% infikovaných buněk. V 6 hodinách ještě výsledek analýzy téměř není zkreslený sekundární infekcí prvního viru (WR-DsRed). Blok superinfekce u VACV tedy probíhá, ale nastupuje spíše mezi 2 a 4 hodinami po infekci.

Výsledek kvantifikace fotografií z konfokálního mikroskopu byl prověřen také srovnáním s průtokovou cytometrií infikovaných buněk. Výsledky těchto dvou přístupů byly velmi podobné. Průtoková cytometrie však v tomto případě byla méně přesným odhadem situace *in situ* než mikroskopie. Pro průtokovou cytometrii byly buňky resuspendovány opatrným pasážováním, při kterém samozřejmě došlo k destrukci části

buněk. Při vyhodnocení dat z průtokové cytometrie pak byly použity pouze částice odpovídající celým nepoškozeným buňkám, a nikoli jejich fragmenty či dublety, kvůli co nejpřesnějšímu odhadu zastoupení superinfikovaných buněk. Dále část buněk, které vykazovaly malou fluorescenci DsRed, byla nejspíše vyhodnocena jako negativní, protože červená fluorescence proteinu DsRed je obecně málo intenzivní. Proto byl také virus WR-DsRed použit pro první infekci a virus WR-EGFP pro druhou infekci. Fluorescence EGFP exprimovaného z promotoru p7.5 je totiž detekovatelná již 1 hodinu po infekci (není ukázáno).

Graf na obr. 36A ukazuje zastoupení buněk superinfikovaných v jednotlivých intervalech superinfekce (RG/R). Zajímavý však je také průběh výskytu čistě červených (R) a čistě zelených (G) buněk v jednotlivých intervalech superinfekce. Čistě zelené buňky jsou ve 2 a 4 hodinách zastoupeny okolo 29%, poté jejich množství prudce klesá k 7% v 6 h.p.i., v 8 h.p.i. jsou jich jen 3%. Jsou to buňky, které nebyly infikovány při první infekci virem WR-DsRed a proto byly infikovány při druhé infekci virem WR-EGFP. Při vyhodnocení proto tyto buňky vykazovaly pouze zelenou fluorescenci. Primární infekce kolem 75% při m.o.i. = 5 byla ukázána i průtokovou cytometrií (kap. 5.1.1.4, tab. 4). Mezi 4 a 6 h.p.i. dochází k produkci potomstva z primárně infikovaných buněk, a tedy k sekundární infekci prvním virem, buňky v 6 a 8 h.p.i. po první infekci tedy již obsahovaly jen malou část neinfikovaných buněk.

Naopak procento čistě červených buněk představuje buňky, které nebyly superinfikované, a je tedy doplňkem k procentu superinfikovaných buněk. Toto procento stoupá od 7% ve 2 hodinách ke 38% ve 4 hodinách a dále přes 62% v 6 hodinách až k 80% v 10 hodinách. Určitá možnost superinfekce tedy zůstává i v 10 h.p.i., zřejmě díky nízké m.o.i. a tedy zastoupení buněk sekundárně infikovaných prvním virem ještě před superinfekcí druhým virem.

Autoři dřívější práce o bloku superinfekce u VACV (Christen et al., 1990) spekulují o možných mechanismech tohoto bloku. Navrhují tři teoreticky možné mechanismy. První spočívá v expresi časných virových proteinů, které navodí specifický blok superinfekce; tedy zabrání adsorpci, vstupu nebo expresi genů superinfikujícího viru. Druhý možný mechanismus spočívá v navození antivirového stavu již jednou infikované buňky reakcí založenou na interferonech, takže další infekce není možná. Třetí možnost předpokládá, že infikující virus změní fyziologii infikované buňky nespecificky takovým způsobem, že další infekce nebude možná. Nejpravděpodobnější se zdá první možnost, neboť již bylo ukázáno několik časně exprimovaných proteinů VACV, které se zřejmě podílejí na bloku superinfekce.

Časné VACV proteiny K2 a A56 se vyskytují na povrchu infikovaných buněk. Již dříve bylo ukázáno, že tyto proteiny brání vzájemné fúzi infikovaných buněk (Wagenaar and Moss, 2009). Nedávno však bylo ukázáno, že tyto proteiny svou přítomností na povrchu buňky rovněž brání fúzi virové částice s buňkou, zřejmě interakcí s "entry-fusion" komplexem na povrchu virionů. Buňky infikované VACV defektní pro tyto dva geny podstupovaly superinfekci ve větší míře než buňky infikované nemutovanými viry (Turner and Moyer, 2008). Bylo rovněž ukázáno, že pouhá exprese těchto dvou proteinů na buňkách zabránila infekci VACV (Wagenaar and Moss, 2009). Proteiny K2 a A56 však fungují v komplexu a musejí být přítomny oba, aby omezovaly superinfekci.

Časné VACV proteiny A33 a A36 jsou také přítomny na povrchu infikovaných buněk. Tyto dva proteiny hrají roli v indukci tvorby aktinových komet, na nichž jsou částice VACV tlačeny směrem k sousedním buňkám. Bylo ukázáno, že nově infikované buňky brzy po infekci exprimují tyto dva proteiny a díky nim jsou částice viru, které by mohly buňku superinfikovat, tlačeny aktinovými kometami k sousedním buňkám, a to tak dlouho, dokud virus nedosáhne neinfikované buňky (Doceul et al., 2010). Díky tomu je virus schopen se šířit zdánlivou rychlostí 75 minut na jednu buňku, jak bylo pozorováno při růstu virových plaků. Tato rychlost je cca 3-4x vyšší, než by odpovídalo kinetice tvorby nových virionů.

Časné proteiny K2, A56, A33 a A36 tedy přispívají k pozorovanému bloku superinfekce VACV. Podle času výrazného nástupu bloku superinfekce až po 2 h.p.i. po první infekci se však zdá, že roli může hrát i exprese pozdních virových proteinů.

V této práci bylo ukázáno, že blok superinfekce VACV nastupuje teprve mezi 2 a 4 hodinami po první infekci. Byla ovšem testována pouze virová exprese, zbývá ještě otestovat vliv bloku superinfekce na produkci potomstva. Zbývá také charakterizovat, který krok životního cyklu superinfikujícího viru je blokován. Dřívější práce ukazovala, že je blokována již časná exprese superinfikujícího VACV, adsorpce viru však blokována není (Christen et al., 1990). Nejpravděpodobnější je tedy blok vstupu viru do buňky.

Zjištění nástupu bloku superinfekce u VACV teprve po 2 hodinách má také experimentální význam. Je totiž možné superinfikovat buňky již jednou infikované dalším virem a kombinovat tak jejich vliv na buňku.

## 7. ZÁVĚR

V předložené práci bylo dosaženo výsledků, které se dají shrnout takto:

1. Byla popsána apoptóza u buněk HeLa G infikovaných VACV kmene WR na základě znaků morfologických (kondenzace a fragmentace jader) i biochemických (aktivita kaspázy 3, štěpení substrátů exekutorových kaspáz - PARP a cytokeratinu 18).
2. U buněk BSC-40 infikovaných VACV kmenem WR apoptóza přítomná nebyla, buňky však nepodlehly lytické, tedy nekrotické smrti ani v čase 96 h.p.i.
3. Byla detekována aktivace kaspáz 2 a 4 a také kaspázy 3 v buňkách HeLa G i BSC-40 infikovaných VACV kmene WR. Aktivita těchto kaspáz však byla detekována pouze v infikovaných buňkách HeLa G, v infikovaných buňkách BSC-40 aktivita těchto kaspáz detekována nebyla.
4. Infekce VACV kmeny Dryvax a Praha indukovala apoptózu v buňkách HeLa G i BSC-40, což bylo charakterizováno morfologií buněčných jader i analýzou štěpení substrátu exekutorových kaspáz PARP.
5. Byl připraven rekombinantní VACV kmene WR exprimující protein DsRed pod promotorem p7.5 (WR-DsRed).
6. Byl charakterizován průběh superinfekce VACV kmene WR, blok superinfekce výrazně nastával až po 2 hodinách po první infekci VACV.

## 8. REFERENCE

- Alcami, A., Khanna, A., Paul, N.L. and Smith, G.L. (1999) Vaccinia virus strains Lister, USSR and Evans express soluble and cell-surface tumour necrosis factor receptors. *J Gen Virol* 80 ( Pt 4), 949-59.
- Alcami, A. and Smith, G.L. (1992) A soluble receptor for interleukin-1 beta encoded by vaccinia virus: a novel mechanism of virus modulation of the host response to infection. *Cell* 71(1), 153-67.
- Alcami, A. and Smith, G.L. (2002) The vaccinia virus soluble interferon-gamma receptor is a homodimer. *J Gen Virol* 83(Pt 3), 545-9.
- Alenzi, F.Q., Lotfy, M. and Wyse, R. (2010) Swords of cell death: caspase activation and regulation. *Asian Pac J Cancer Prev* 11(2), 271-80.
- Amato, R.J. (2010) 5T4-modified vaccinia Ankara: progress in tumor-associated antigen-based immunotherapy. *Expert Opin Biol Ther* 10(2), 281-7.
- Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Obeid, M., Ortiz, C., Criollo, A., Mignot, G., Maiuri, M.C., Ullrich, E., Saulnier, P., Yang, H., Amigorena, S., Ryffel, B., Barrat, F.J., Saftig, P., Levi, F., Lidereau, R., Nogues, C., Mira, J.P., Chompret, A., Joulin, V., Clavel-Chapelon, F., Bourhis, J., Andre, F., Delaloge, S., Tursz, T., Kroemer, G. and Zitvogel, L. (2007) Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* 13(9), 1050-9.
- Arnoult, D., Grodet, A., Lee, Y.J., Estaquier, J. and Blackstone, C. (2005) Release of OPA1 during apoptosis participates in the rapid and complete release of cytochrome c and subsequent mitochondrial fragmentation. *J Biol Chem* 280(42), 35742-50.
- Artenstein, A.W. (2008) New generation smallpox vaccines: a review of preclinical and clinical data. *Rev Med Virol* 18(4), 217-31.
- Assarsson, E., Greenbaum, J.A., Sundstrom, M., Schaffer, L., Hammond, J.A., Pasquetto, V., Oseroff, C., Hendrickson, R.C., Lefkowitz, E.J., Tschärke, D.C., Sidney, J., Grey, H.M., Head, S.R., Peters, B. and Sette, A. (2008) Kinetic analysis of a complete poxvirus transcriptome reveals an immediate-early class of genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(6), 2140-5.
- Bahar, M.W., Graham, S.C., Chen, R., Cooray, S., Smith, G.L., Stuart, D.I. and Grimes, J.M. (2011) How vaccinia virus has evolved to subvert the host immune response. *J Struct Biol*.
- Bahar, M.W., Kenyon, J.C., Putz, M.M., Abrescia, N.G., Pease, J.E., Wise, E.L., Stuart, D.I., Smith, G.L. and Grimes, J.M. (2008) Structure and function of A41, a vaccinia virus chemokine binding protein. *PLoS Pathog* 4(1), e5.
- Baixeras, E., Cebrian, A., Albar, J.P., Salas, J., Martinez, A.C., Vinuela, E. and Revilla, Y. (1998) Vaccinia virus-induced apoptosis in immature B lymphocytes: role of cellular Bcl-2. *Virus Res* 58(1-2), 107-13.
- Baldick, C.J., Jr. and Moss, B. (1993) Characterization and temporal regulation of mRNAs encoded by vaccinia virus intermediate-stage genes. *J Virol* 67(6), 3515-27.
- Ball, L.A. (1987) High-frequency homologous recombination in vaccinia virus DNA. *J Virol* 61(6), 1788-95.
- Barnard, R.J., Elleder, D. and Young, J.A. (2006) Avian sarcoma and leukosis virus-receptor interactions: from classical genetics to novel insights into virus-cell membrane fusion. *Virology* 344(1), 25-9.
- Bayir, H., Fadeel, B., Palladino, M.J., Witasz, E., Kurnikov, I.V., Tyurina, Y.Y., Tyurin, V.A., Amoscato, A.A., Jiang, J., Kochanek, P.M., DeKosky, S.T., Greenberger,

- J.S., Shvedova, A.A. and Kagan, V.E. (2006) Apoptotic interactions of cytochrome c: redox flirting with anionic phospholipids within and outside of mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1757(5-6), 648-59.
- Bengali, Z., Townsley, A.C. and Moss, B. (2009) Vaccinia virus strain differences in cell attachment and entry. *Virology* 389(1-2), 132-40.
- Bergsbaken, T. and Cookson, B.T. (2007) Macrophage activation redirects yersinia-infected host cell death from apoptosis to caspase-1-dependent pyroptosis. *PLoS Pathog* 3(11), e161.
- Bhatt, K., Feng, L., Pabla, N., Liu, K., Smith, S. and Dong, Z. (2008) Effects of targeted Bcl-2 expression in mitochondria or endoplasmic reticulum on renal tubular cell apoptosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 294(3), F499-507.
- Borutaite, V. (2010) Mitochondria as decision-makers in cell death. *Environ Mol Mutagen* 51(5), 406-16.
- Bournsnel, M.E., Foulds, I.J., Campbell, J.I. and Binns, M.M. (1988) Non-essential genes in the vaccinia virus HindIII K fragment: a gene related to serine protease inhibitors and a gene related to the 37K vaccinia virus major envelope antigen. *J Gen Virol* 69 ( Pt 12), 2995-3003.
- Bowie, A., Kiss-Toth, E., Symons, J.A., Smith, G.L., Dower, S.K. and O'Neill, L.A. (2000) A46R and A52R from vaccinia virus are antagonists of host IL-1 and toll-like receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(18), 10162-7.
- Brady, C.A. and Attardi, L.D. (2011) p53 at a glance. *J Cell Sci* 123(Pt 15), 2527-32.
- Buller, R.M. and Palumbo, G.J. (1991) Poxvirus pathogenesis. *Microbiol Rev* 55(1), 80-122.
- Cande, C., Vahsen, N., Kouranti, I., Schmitt, E., Daugas, E., Spahr, C., Luban, J., Kroemer, R.T., Giordanetto, F., Garrido, C., Penninger, J.M. and Kroemer, G. (2004) AIF and cyclophilin A cooperate in apoptosis-associated chromatinolysis. *Oncogene* 23(8), 1514-21.
- Cao, X., Bennett, R.L. and May, W.S. (2008) c-Myc and caspase-2 are involved in activating Bax during cytotoxic drug-induced apoptosis. *J Biol Chem* 283(21), 14490-6.
- Carrasco, L. and Esteban, M. (1982) Modification of membrane permeability in vaccinia virus-infected cells. *Virology* 117(1), 62-9.
- Carroll, K., Elroy-Stein, O., Moss, B. and Jagus, R. (1993) Recombinant vaccinia virus K3L gene product prevents activation of double-stranded RNA-dependent, initiation factor 2 alpha-specific protein kinase. *J Biol Chem* 268(17), 12837-42.
- Carter, G.C., Law, M., Hollinshead, M. and Smith, G.L. (2005) Entry of the vaccinia virus intracellular mature virion and its interactions with glycosaminoglycans. *J Gen Virol* 86(Pt 5), 1279-90.
- Cassens, U., Lewinski, G., Samraj, A.K., von Bernuth, H., Baust, H., Khazaie, K. and Los, M. (2003) Viral modulation of cell death by inhibition of caspases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 51(1), 19-27.
- Caulin, C., Salvesen, G.S. and Oshima, R.G. (1997) Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *J Cell Biol* 138(6), 1379-94.
- Colamonici, O.R., Domanski, P., Sweitzer, S.M., Larner, A. and Buller, R.M. (1995) Vaccinia virus B18R gene encodes a type I interferon-binding protein that blocks interferon alpha transmembrane signaling. *J Biol Chem* 270(27), 15974-8.
- Cooray, S., Bahar, M.W., Abrescia, N.G., McVey, C.E., Bartlett, N.W., Chen, R.A., Stuart, D.I., Grimes, J.M. and 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.

- Cowling, V. and Downward, J. (2002) Caspase-6 is the direct activator of caspase-8 in the cytochrome c-induced apoptosis pathway: absolute requirement for removal of caspase-6 prodomain. *Cell Death Differ* 9(10), 1046-56.
- Cudmore, S., Cossart, P., Griffiths, G. and Way, M. (1995) Actin-based motility of vaccinia virus. *Nature* 378(6557), 636-8.
- Dasika, G.K. and Letchworth, G.J. (2000) Homologous and heterologous interference requires bovine herpesvirus-1 glycoprotein D at the cell surface during virus entry. *J Gen Virol* 81(Pt 4), 1041-9.
- Davies, D.H., Wyatt, L.S., Newman, F.K., Earl, P.L., Chun, S., Hernandez, J.E., Molina, D.M., Hirst, S., Moss, B., Frey, S.E. and Felgner, P.L. (2008) Antibody profiling by proteome microarray reveals the immunogenicity of the attenuated smallpox vaccine modified vaccinia virus ankara is comparable to that of Dryvax. *J Virol* 82(2), 652-63.
- Di Bartolomeo, S., Nazio, F. and Cecconi, F. (2010) The role of autophagy during development in higher eukaryotes. *Traffic* 11(10), 1280-9.
- DiPerna, G., Stack, J., Bowie, A.G., Boyd, A., Kotwal, G., Zhang, Z., Arvikar, S., Latz, E., Fitzgerald, K.A. and Marshall, W.L. (2004) Poxvirus protein N1L targets the I-kappaB kinase complex, inhibits signaling to NF-kappaB by the tumor necrosis factor superfamily of receptors, and inhibits NF-kappaB and IRF3 signaling by toll-like receptors. *J Biol Chem* 279(35), 36570-8.
- Dobbelstein, M. and Shenk, T. (1996) Protection against apoptosis by the vaccinia virus SPI-2 (B13R) gene product. *J Virol* 70(9), 6479-85.
- Dobo, J., Swanson, R., Salvesen, G.S., Olson, S.T. and Gettins, P.G. (2006) Cytokine response modifier 1 inhibition of initiator caspases results in covalent complex formation and dissociation of the caspase tetramer. *J Biol Chem* 281(50), 38781-90.
- Doceul, V., Hollinshead, M., van der Linden, L. and Smith, G.L. (2010) Repulsion of superinfecting virions: a mechanism for rapid virus spread. *Science* 327(5967), 873-6.
- Duprez, L., Wirawan, E., Vanden Berghe, T. and Vandenabeele, P. (2009) Major cell death pathways at a glance. *Microbes Infect* 11(13), 1050-62.
- Elli, L., Bergamini, C.M., Bardella, M.T. and Schuppan, D. (2009) Transglutaminases in inflammation and fibrosis of the gastrointestinal tract and the liver. *Dig Liver Dis* 41(8), 541-50.
- Elmore, S. (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35(4), 495-516.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. and Nagata, S. (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391(6662), 43-50.
- Engelmayer, J., Larsson, M., Subklewe, M., Chahroudi, A., Cox, W.I., Steinman, R.M. and Bhardwaj, N. (1999) Vaccinia virus inhibits the maturation of human dendritic cells: a novel mechanism of immune evasion. *J Immunol* 163(12), 6762-8.
- Frischknecht, F., Moreau, V., Rottger, S., Gonfloni, S., Reckmann, I., Superti-Furga, G. and Way, M. (1999) Actin-based motility of vaccinia virus mimics receptor tyrosine kinase signalling. *Nature* 401(6756), 926-9.
- Fujikura, Y., Kudlackova, P., Vokurka, M., Krijt, J. and Melkova, Z. (2009) The effect of nitric oxide on vaccinia virus-encoded ribonucleotide reductase. *Nitric Oxide* 20(2), 114-21.
- Galluzzi, L., Kepp, O., Morselli, E., Vitale, I., Senovilla, L., Pinti, M., Zitvogel, L. and Kroemer, G. (2010) Viral strategies for the evasion of immunogenic cell death. *J Intern Med* 267(5), 526-42.

- Galluzzi, L., Maiuri, M.C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L. and Kroemer, G. (2007) Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ* 14(7), 1237-43.
- Gedey, R., Jin, X.L., Hinthong, O. and Shisler, J.L. (2006) Poxviral regulation of the host NF-kappaB response: the vaccinia virus M2L protein inhibits induction of NF-kappaB activation via an ERK2 pathway in virus-infected human embryonic kidney cells. *J Virol* 80(17), 8676-85.
- Geleziunas, R., Bour, S. and Wainberg, M.A. (1994) Cell surface down-modulation of CD4 after infection by HIV-1. *Faseb J* 8(9), 593-600.
- Ghiringhelli, F., Apetoh, L., Tesniere, A., Aymeric, L., Ma, Y., Ortiz, C., Vermaelen, K., Panaretakis, T., Mignot, G., Ullrich, E., Perfettini, J.L., Schlemmer, F., Tasmemir, E., Uhl, M., Genin, P., Civas, A., Ryffel, B., Kanellopoulos, J., Tschopp, J., Andre, F., Lidereau, R., McLaughlin, N.M., Haynes, N.M., Smyth, M.J., Kroemer, G. and Zitvogel, L. (2009) Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med* 15(10), 1170-8.
- Gilbert, S.C., Moorthy, V.S., Andrews, L., Pathan, A.A., McConkey, S.J., Vuola, J.M., Keating, S.M., Berthoud, T., Webster, D., McShane, H. and Hill, A.V. (2006) Synergistic DNA-MVA prime-boost vaccination regimes for malaria and tuberculosis. *Vaccine* 24(21), 4554-61.
- Gomez, C.E., Najera, J.L., Krupa, M. and Esteban, M. (2008) The poxvirus vectors MVA and NYVAC as gene delivery systems for vaccination against infectious diseases and cancer. *Curr Gene Ther* 8(2), 97-120.
- Gong, S.C., Lai, C.F. and Esteban, M. (1990) Vaccinia virus induces cell fusion at acid pH and this activity is mediated by the N-terminus of the 14-kDa virus envelope protein. *Virology* 178(1), 81-91.
- Graham, S.C., Bahar, M.W., Abrescia, N.G., Smith, G.L., Stuart, D.I. and Grimes, J.M. (2007) Structure of CrmE, a virus-encoded tumour necrosis factor receptor. *J Mol Biol* 372(3), 660-71.
- Green, D.R., Ferguson, T., Zitvogel, L. and Kroemer, G. (2009) Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nat Rev Immunol* 9(5), 353-63.
- Gubser, C., Bergamaschi, D., Hollinshead, M., Lu, X., van Kuppeveld, F.J. and Smith, G.L. (2007) A new inhibitor of apoptosis from vaccinia virus and eukaryotes. *PLoS Pathog* 3(2), e17.
- Guicciardi, M.E., Bronk, S.F., Werneburg, N.W., Yin, X.M. and Gores, G.J. (2005) Bid is upstream of lysosome-mediated caspase 2 activation in tumor necrosis factor alpha-induced hepatocyte apoptosis. *Gastroenterology* 129(1), 269-84.
- Hail, N., Jr., Carter, B.Z., Konopleva, M. and Andreeff, M. (2006) Apoptosis effector mechanisms: a requiem performed in different keys. *Apoptosis* 11(6), 889-904.
- Harlow, E. and Lane, D. (1988) Immunoblotting. In: E. Harlow and D. Lane (Eds), *Antibodies: A Laboratory Manual.*, pp. 471-510. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Harte, M.T., Haga, I.R., Maloney, G., Gray, P., Reading, P.C., Bartlett, N.W., Smith, G.L., Bowie, A. and O'Neill, L.A. (2003) The poxvirus protein A52R targets Toll-like receptor signaling complexes to suppress host defense. *J Exp Med* 197(3), 343-51.
- Heath-Engel, H.M., Chang, N.C. and Shore, G.C. (2008) The endoplasmic reticulum in apoptosis and autophagy: role of the BCL-2 protein family. *Oncogene* 27(50), 6419-33.
- Hereg, Z. and Wang, Z.Q. (2001) Functions of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death. *Mutat Res* 477(1-2), 97-110.
- Hitomi, J., Katayama, T., Eguchi, Y., Kudo, T., Taniguchi, M., Koyama, Y., Manabe, T., Yamagishi, S., Bando, Y., Imaizumi, K., Tsujimoto, Y. and Tohyama, M. (2004a)



- Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *J Cell Biol* 165(3), 347-56.
- Hitomi, J., Katayama, T., Taniguchi, M., Honda, A., Imaizumi, K. and Tohyama, M. (2004b) Apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress depends on activation of caspase-3 via caspase-12. *Neurosci Lett* 357(2), 127-30.
- Honner, R. (2007) Rekombinantní virus vakcinie exprimující EGFP a jeho využití pro výzkum interakcí s hostitelskou buňkou, Univerzita Karlova v Praze.
- Hsiao, J.C., Chung, C.S. and Chang, W. (1999) Vaccinia virus envelope D8L protein binds to cell surface chondroitin sulfate and mediates the adsorption of intracellular mature virions to cells. *J Virol* 73(10), 8750-61.
- Huang, I.C., Li, W., Sui, J., Marasco, W., Choe, H. and Farzan, M. (2008) Influenza A virus neuraminidase limits viral superinfection. *J Virol* 82(10), 4834-43.
- Hug, H., Los, M., Hirt, W. and 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.
- Humlova, Z., Vokurka, M., Esteban, M. and Melkova, Z. (2002) Vaccinia virus induces apoptosis of infected macrophages. *J Gen Virol* 83(Pt 11), 2821-32.
- Chen, R.A., Ryzhakov, G., Cooray, S., Randow, F. and Smith, G.L. (2008) Inhibition of I $\kappa$ B kinase by vaccinia virus virulence factor B14. *PLoS Pathog* 4(2), e22.
- Chipuk, J.E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N.M., Newmeyer, D.D., Schuler, M. and Green, D.R. (2004) Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 303(5660), 1010-4.
- Chowdhury, I., Tharakan, B. and Bhat, G.K. (2008) Caspases - an update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 151(1), 10-27.
- Christen, L., Seto, J. and Niles, E.G. (1990) Superinfection exclusion of vaccinia virus in virus-infected cell cultures. *Virology* 174(1), 35-42.
- Jesenberger, V., Procyk, K.J., Yuan, J., Reipert, S. and Baccarini, M. (2000) Salmonella-induced caspase-2 activation in macrophages: a novel mechanism in pathogen-mediated apoptosis. *J Exp Med* 192(7), 1035-46.
- Jiang, C.C., Chen, L.H., Gillespie, S., Wang, Y.F., Kiejda, K.A., Zhang, X.D. and Hersey, P. (2007) Inhibition of MEK sensitizes human melanoma cells to endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Cancer Res* 67(20), 9750-61.
- Jin, H., He, R., Oyoshi, M. and Geha, R.S. (2009) Animal models of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 129(1), 31-40.
- Joklik, W.K. (1962) The purification of four strains of poxvirus. *Virology* 18, 9-18.
- Kalbacova, M. (2003) Effects of Bcl-2 Expression by Vaccinia Virus on Cell Metabolism and Apoptosis, Charles University.
- Kalbacova, M., Spisakova, M., Liskova, J. and Melkova, Z. (2008) Lytic infection with vaccinia virus activates caspases in a Bcl-2-inhibitable manner. *Virus Res* 135(1), 53-63.
- Kalbacova, M., Vrbacky, M., Drahota, Z. and 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.
- Kalbacova, M., Vrbacky, M., Humlova, Z. and Melkova, Z. (2002) Protooncogene Bcl-2 induces apoptosis in several cell lines. *Folia Biol (Praha)* 48(1), 15-27.
- Kalverda, A.P., Thompson, G.S., Vogel, A., Schroder, M., Bowie, A.G., Khan, A.R. and Homans, S.W. (2009) Poxvirus K7 protein adopts a Bcl-2 fold: biochemical mapping of its interactions with human DEAD box RNA helicase DDX3. *J Mol Biol* 385(3), 843-53.
- Keller, N., Mares, J., Zerbe, O. and Grutter, M.G. (2009) Structural and biochemical studies on procaspase-8: new insights on initiator caspase activation. *Structure* 17(3), 438-48.

- Kennedy, R.B., Ovsyannikova, I. and Poland, G.A. (2009) Smallpox vaccines for biodefense. *Vaccine* 27 Suppl 4, D73-9.
- Kepp, O., Senovilla, L., Galluzzi, L., Panaretakis, T., Tesniere, A., Schlemmer, F., Madeo, F., Zitvogel, L. and Kroemer, G. (2009a) Viral subversion of immunogenic cell death. *Cell Cycle* 8(6), 860-9.
- Kepp, O., Tesniere, A., Schlemmer, F., Michaud, M., Senovilla, L., Zitvogel, L. and Kroemer, G. (2009b) Immunogenic cell death modalities and their impact on cancer treatment. *Apoptosis* 14(4), 364-75.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. and Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26(4), 239-57.
- Kettle, S., Alcamí, A., Khanna, A., Ehret, R., Jassoy, C. and Smith, G.L. (1997) Vaccinia virus serpin B13R (SPI-2) inhibits interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme and protects virus-infected cells from TNF- and Fas-mediated apoptosis, but does not prevent IL-1 $\beta$ -induced fever. *J Gen Virol* 78 ( Pt 3), 677-85.
- Kitevska, T., Spencer, D.M. and Hawkins, C.J. (2009) Caspase-2: controversial killer or checkpoint controller? *Apoptosis* 14(7), 829-48.
- Knipe, D.M., Howley, P. M., Griffin, D. E. [et al.]. (2001) *Fields Virology*. 4th ed. Lippincott Williams Wilkins Philadelphia, USA.
- Kono, H. and Rock, K.L. (2008) How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol* 8(4), 279-89.
- Kroemer, G., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Peter, M.E., Vaux, D., Vandenabeele, P., Zhivotovsky, B., Blagosklonny, M.V., Malorni, W., Knight, R.A., Piacentini, M., Nagata, S. and Melino, G. (2005) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2, 1463-7.
- Kroemer, G., Galluzzi, L. and Brenner, C. (2007) Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 87(1), 99-163.
- Krumschnabel, G., Sohm, B., Bock, F., Manzl, C. and Villunger, A. (2009) The enigma of caspase-2: the laymen's view. *Cell Death Differ* 16(2), 195-207.
- Kutinova, L., Ludvikova, V., Krystofova, J., Otavova, M., Simonova, V., Nemeckova, S., Hainz, P. and Vonka, V. (1996) Influence of the parental virus strain on the virulence and immunogenicity of recombinant vaccinia viruses expressing HBV preS2-S protein or VZV glycoprotein I. *Vaccine* 14(11), 1045-52.
- Kutinova, L., Ludvikova, V., Simonova, V., Otavova, M., Krystofova, J., Hainz, P., Press, M., Kunke, D. and Vonka, V. (1995) Search for optimal parent for recombinant vaccinia virus vaccines. Study of three vaccinia virus vaccinal strains and several virus lines derived from them. *Vaccine* 13(5), 487-93.
- Labbe, K., Miu, J., Yeretssian, G., Serghides, L., Tam, M., Finney, C.A., Erdman, L.K., Goulet, M.L., Kain, K.C., Stevenson, M.M. and Saleh, M. (2010) Caspase-12 dampens the immune response to malaria independently of the inflammasome by targeting NF- $\kappa$ B signaling. *J Immunol* 185(9), 5495-502.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259), 680-5.
- Laliberte, J.P. and Moss, B. (2009) Appraising the apoptotic mimicry model and the role of phospholipids for poxvirus entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(41), 17517-21.
- Law, M., Carter, G.C., Roberts, K.L., Hollinshead, M. and Smith, G.L. (2006) Ligand-induced and nonfusogenic dissolution of a viral membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(15), 5989-94.
- Le Boeuf, F., Diallo, J.S., McCart, J.A., Thorne, S., Falls, T., Stanford, M., Kanji, F., Auer, R., Brown, C.W., Lichty, B.D., Parato, K., Atkins, H., Kim, D. and Bell, J.C. Synergistic interaction between oncolytic viruses augments tumor killing. *Mol Ther* 18(5), 888-95.

- LeBlanc, P.M., Yeretssian, G., Rutherford, N., Doiron, K., Nadiri, A., Zhu, L., Green, D.R., Gruenheid, S. and Saleh, M. (2008) Caspase-12 modulates NOD signaling and regulates antimicrobial peptide production and mucosal immunity. *Cell Host Microbe* 3(3), 146-57.
- Lee, S.B. and Esteban, M. (1994) The interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase induces apoptosis. *Virology* 199(2), 491-6.
- Lee, S.B., Melkova, Z., Yan, W., Williams, B.R., Hovanessian, A.G. and 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.
- Lee, S.B., Rodriguez, D., Rodriguez, J.R. and 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.
- Lee, Y.J., Jeong, S.Y., Karbowski, M., Smith, C.L. and Youle, R.J. (2004) Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Mol Biol Cell* 15(11), 5001-11.
- Leu, J.I., Dumont, P., Hafey, M., Murphy, M.E. and George, D.L. (2004) Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat Cell Biol* 6(5), 443-50.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.J. and Yuan, J. (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94(4), 491-501.
- Lin, C.L., Chung, C.S., Heine, H.G. and Chang, W. (2000) Vaccinia virus envelope H3L protein binds to cell surface heparan sulfate and is important for intracellular mature virion morphogenesis and virus infection in vitro and in vivo. *J Virol* 74(7), 3353-65.
- Liskova, J., Knitlova, J., Honner, R. and Melkova, Z. (2011) Apoptosis and necrosis in vaccinia virus-infected HeLa G and BSC-40 cells. *Virus Res.*(doi:10.1016/j.virusres.2011.05.005).
- Lopez-Anton, N., Rudy, A., Barth, N., Schmitz, M.L., Pettit, G.R., Schulze-Osthoff, K., Dirsch, V.M. and Vollmar, A.M. (2006) The marine product cephalostatin 1 activates an endoplasmic reticulum stress-specific and apoptosome-independent apoptotic signaling pathway. *J Biol Chem* 281(44), 33078-86.
- Macen, J., Takahashi, A., Moon, K.B., Nathaniel, R., Turner, P.C. and Moyer, R.W. (1998) Activation of caspases in pig kidney cells infected with wild-type and CrmA/SPI-2 mutants of cowpox and rabbitpox viruses. *J Virol* 72(5), 3524-33.
- Majai, G., Petrovski, G. and Fesus, L. (2006) Inflammation and the apopto-phagocytic system. *Immunol Lett* 104(1-2), 94-101.
- Mann, B.A., Huang, J.H., Li, P., Chang, H.C., Slee, R.B., O'Sullivan, A., Anita, M., Yeh, N., Klemsz, M.J., Brutkiewicz, R.R., Blum, J.S. and Kaplan, M.H. (2008) Vaccinia virus blocks Stat1-dependent and Stat1-independent gene expression induced by type I and type II interferons. *J Interferon Cytokine Res* 28(6), 367-80.
- Marques, J.T., Rebouillat, D., Ramana, C.V., Murakami, J., Hill, J.E., Gudkov, A., Silverman, R.H., Stark, G.R. and Williams, B.R. (2005) Down-regulation of p53 by double-stranded RNA modulates the antiviral response. *J Virol* 79(17), 11105-14.
- Martinez, J.A., Zhang, Z., Svetlov, S.I., Hayes, R.L., Wang, K.K. and Larner, S.F. (2010) Calpain and caspase processing of caspase-12 contribute to the ER stress-induced cell death pathway in differentiated PC12 cells. *Apoptosis* 15(12), 1480-93.
- Martinon, F. and Tschopp, J. (2007) Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death Differ* 14(1), 10-22.
- McKenzie, R., Kotwal, G.J., Moss, B., Hammer, C.H. and Frank, M.M. (1992) Regulation of complement activity by vaccinia virus complement-control protein. *J Infect Dis* 166(6), 1245-50.

- McStay, G.P., Salvesen, G.S. and Green, D.R. (2008) Overlapping cleavage motif selectivity of caspases: implications for analysis of apoptotic pathways. *Cell Death Differ* 15(2), 322-31.
- Meiser, A., Sancho, C. and Krijnse Locker, J. (2003) Plasma membrane budding as an alternative release mechanism of the extracellular enveloped form of vaccinia virus from HeLa cells. *J Virol* 77(18), 9931-42.
- Melkova, Z. and Esteban, M. (1995) Inhibition of vaccinia virus DNA replication by inducible expression of nitric oxide synthase. *J Immunol* 155(12), 5711-8.
- Mercer, J. and Helenius, A. (2008) Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science* 320(5875), 531-5.
- Mercer, J. and Helenius, A. (2010) Apoptotic mimicry: phosphatidylserine-mediated macropinocytosis of vaccinia virus. *Ann N Y Acad Sci* 1209, 49-55.
- Milakovic, T., Tucholski, J., McCoy, E. and Johnson, G.V. (2004) Intracellular localization and activity state of tissue transglutaminase differentially impacts cell death. *J Biol Chem* 279(10), 8715-22.
- Morishima, N., Nakanishi, K., Takenouchi, H., Shibata, T. and Yasuhiko, Y. (2002) An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem* 277(37), 34287-94.
- Najera, J.L., Gomez, C.E., Domingo-Gil, E., Gherardi, M.M. and Esteban, M. (2006) Cellular and biochemical differences between two attenuated poxvirus vaccine candidates (MVA and NYVAC) and role of the C7L gene. *J Virol* 80(12), 6033-47.
- Nakagawa, T. and Yuan, J. (2000) Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol* 150(4), 887-94.
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B.A. and Yuan, J. (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403(6765), 98-103.
- Nawrocki, S.T., Carew, J.S., Dunner, K., Jr., Boise, L.H., Chiao, P.J., Huang, P., Abbruzzese, J.L. and McConkey, D.J. (2005) Bortezomib inhibits PKR-like endoplasmic reticulum (ER) kinase and induces apoptosis via ER stress in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 65(24), 11510-9.
- Nicholas, B., Smethurst, P., Verderio, E., Jones, R. and Griffin, M. (2003) Cross-linking of cellular proteins by tissue transglutaminase during necrotic cell death: a mechanism for maintaining tissue integrity. *Biochem J* 371(Pt 2), 413-22.
- Obeid, M., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Fimia, G.M., Apetoh, L., Perfettini, J.L., Castedo, M., Mignot, G., Panaretakis, T., Casares, N., Metivier, D., Larochette, N., van Endert, P., Ciccosanti, F., Piacentini, M., Zitvogel, L. and Kroemer, G. (2007) Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 13(1), 54-61.
- Obeng, E.A. and Boise, L.H. (2005) Caspase-12 and caspase-4 are not required for caspase-dependent endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Biol Chem* 280(33), 29578-87.
- Osborne, J.D., Da Silva, M., Frace, A.M., Sammons, S.A., Olsen-Rasmussen, M., Upton, C., Buller, R.M., Chen, N., Feng, Z., Roper, R.L., Liu, J., Pougatcheva, S., Chen, W., Wohlhueter, R.M. and Esposito, J.J. (2007) Genomic differences of Vaccinia virus clones from Dryvax smallpox vaccine: the Dryvax-like ACAM2000 and the mouse neurovirulent Clone-3. *Vaccine* 25(52), 8807-32.
- Panaretakis, T., Joza, N., Modjtahedi, N., Tesniere, A., Vitale, I., Durchschlag, M., Fimia, G.M., Kepp, O., Piacentini, M., Froehlich, K.U., van Endert, P., Zitvogel, L., Madeo, F. and Kroemer, G. (2008) The co-translocation of ERp57 and calreticulin determines the immunogenicity of cell death. *Cell Death Differ* 15(9), 1499-509.

- Park, D., Choi, S.S. and Ha, K.S. (2010) Transglutaminase 2: a multi-functional protein in multiple subcellular compartments. *Amino Acids* 39(3), 619-31.
- Parrino, J. and Graham, B.S. (2006) Smallpox vaccines: Past, present, and future. *J Allergy Clin Immunol* 118(6), 1320-6.
- Perdiguero, B. and Esteban, M. (2009) The interferon system and vaccinia virus evasion mechanisms. *J Interferon Cytokine Res* 29(9), 581-98.
- Petrosillo, G., Ruggiero, F.M., Pistolesse, M. and Paradies, G. (2004) Ca<sup>2+</sup>-induced reactive oxygen species production promotes cytochrome c release from rat liver mitochondria via mitochondrial permeability transition (MPT)-dependent and MPT-independent mechanisms: role of cardiolipin. *J Biol Chem* 279(51), 53103-8.
- Philipp, S., Puchert, M., Adam-Klages, S., Tchikov, V., Winoto-Morbach, S., Mathieu, S., Deerberg, A., Kolker, L., Marchesini, N., Kabelitz, D., Hannun, Y.A., Schutze, S. and Adam, D. (2010) The Polycomb group protein EED couples TNF receptor 1 to neutral sphingomyelinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(3), 1112-7.
- Pozarowski, P., Huang, X., Halicka, D.H., Lee, B., Johnson, G. and Darzynkiewicz, Z. (2003) Interactions of fluorochrome-labeled caspase inhibitors with apoptotic cells: a caution in data interpretation. *Cytometry A* 55(1), 50-60.
- Pradelli, L.A., Beneteau, M. and Ricci, J.E. (2010) Mitochondrial control of caspase-dependent and -independent cell death. *Cell Mol Life Sci* 67(10), 1589-97.
- Puthalakath, H., O'Reilly, L.A., Gunn, P., Lee, L., Kelly, P.N., Huntington, N.D., Hughes, P.D., Michalak, E.M., McKimm-Breschkin, J., Motoyama, N., Gotoh, T., Akira, S., Bouillet, P. and Strasser, A. (2007) ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* 129(7), 1337-49.
- Ramsey-Ewing, A. and Moss, B. (1998) Apoptosis induced by a postbinding step of vaccinia virus entry into Chinese hamster ovary cells. *Virology* 242(1), 138-49.
- Rasper, D.M., Vaillancourt, J.P., Hadano, S., Houtzager, V.M., Seiden, I., Keen, S.L., Tawa, P., Xanthoudakis, S., Nasir, J., Martindale, D., Koop, B.F., Peterson, E.P., Thornberry, N.A., Huang, J., MacPherson, D.P., Black, S.C., Hornung, F., Lenardo, M.J., Hayden, M.R., Roy, S. and Nicholson, D.W. (1998) Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex. *Cell Death Differ* 5(4), 271-88.
- Renatus, M., Stennicke, H.R., Scott, F.L., Liddington, R.C. and Salvesen, G.S. (2001) Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(25), 14250-5.
- Repnik, U. and Turk, B. Lysosomal-mitochondrial cross-talk during cell death. *Mitochondrion* 10(6), 662-9.
- Rice, A.P. and Roberts, B.E. (1983) Vaccinia virus induces cellular mRNA degradation. *J Virol* 47(3), 529-39.
- Riedl, S.J., Renatus, M., Schwarzenbacher, R., Zhou, Q., Sun, C., Fesik, S.W., Liddington, R.C. and Salvesen, G.S. (2001) Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell* 104(5), 791-800.
- Riedl, S.J. and Salvesen, G.S. (2007) The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(5), 405-13.
- Roberts, K.L. and Smith, G.L. (2008) Vaccinia virus morphogenesis and dissemination. *Trends Microbiol* 16(10), 472-9.
- Rodriguez, J.F., Rodriguez, D., Rodriguez, J.R., McGowan, E.B. and 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.
- Rodriguez, J.F. and Smith, G.L. (1990) Inducible gene expression from vaccinia virus vectors. *Virology* 177(1), 239-50.

- Rodriguez, J.R., Risco, C., Carrascosa, J.L., Esteban, M. and Rodriguez, D. (1998) Vaccinia virus 15-kilodalton (A14L) protein is essential for assembly and attachment of viral crescents to virosomes. *J Virol* 72(2), 1287-96.
- Romano, P.R., Zhang, F., Tan, S.L., Garcia-Barrio, M.T., Katze, M.G., Dever, T.E. and Hinnebusch, A.G. (1998) Inhibition of double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR by vaccinia virus E3: role of complex formation and the E3 N-terminal domain. *Mol Cell Biol* 18(12), 7304-16.
- Roy, S., Sharom, J.R., Houde, C., Loisel, T.P., Vaillancourt, J.P., Shao, W., Saleh, M. and Nicholson, D.W. (2008) Confinement of caspase-12 proteolytic activity to autoprocessing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(11), 4133-8.
- Sahu, A., Isaacs, S.N., Soulika, A.M. and Lambris, J.D. (1998) Interaction of vaccinia virus complement control protein with human complement proteins: factor I-mediated degradation of C3b to iC3b1 inactivates the alternative complement pathway. *J Immunol* 160(11), 5596-604.
- Saleh, M., Mathison, J.C., Wolinski, M.K., Bensinger, S.J., Fitzgerald, P., Droin, N., Ulevitch, R.J., Green, D.R. and Nicholson, D.W. (2006) Enhanced bacterial clearance and sepsis resistance in caspase-12-deficient mice. *Nature* 440(7087), 1064-8.
- Saleh, M., Vaillancourt, J.P., Graham, R.K., Huyck, M., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Steinberg, M.H., Nolan, V., Baldwin, C.T., Hotchkiss, R.S., Buchman, T.G., Zehnbaauer, B.A., Hayden, M.R., Farrer, L.A., Roy, S. and Nicholson, D.W. (2004) Differential modulation of endotoxin responsiveness by human caspase-12 polymorphisms. *Nature* 429(6987), 75-9.
- Sanges, D. and Marigo, V. (2006) Cross-talk between two apoptotic pathways activated by endoplasmic reticulum stress: differential contribution of caspase-12 and AIF. *Apoptosis* 11(9), 1629-41.
- Santos, C.R., Vega, F.M., Blanco, S., Barcia, R. and Lazo, P.A. (2004) The vaccinia virus B1R kinase induces p53 downregulation by an Mdm2-dependent mechanism. *Virology* 328(2), 254-65.
- Scarlatti, F., Granata, R., Meijer, A.J. and Codogno, P. (2009) Does autophagy have a license to kill mammalian cells? *Cell Death Differ* 16(1), 12-20.
- Senkevich, T.G., Ojeda, S., Townsley, A., Nelson, G.E. and Moss, B. (2005) Poxvirus multiprotein entry-fusion complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(51), 18572-7.
- Sharp, T.V., Moonan, F., Romashko, A., Joshi, B., Barber, G.N. and 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.
- Sheridan, C., Delivani, P., Cullen, S.P. and Martin, S.J. (2008) Bax- or Bak-induced mitochondrial fission can be uncoupled from cytochrome C release. *Mol Cell* 31(4), 570-85.
- Sheridan, C. and Martin, S.J. (2010) Mitochondrial fission/fusion dynamics and apoptosis. *Mitochondrion* 10(6), 640-8.
- Shisler, J.L. and Jin, X.L. (2004) The vaccinia virus K1L gene product inhibits host NF-kappaB activation by preventing I-kappaBalpha degradation. *J Virol* 78(7), 3553-60.
- Schelhaas, M. (2010) Come in and take your coat off - how host cells provide endocytosis for virus entry. *Cell Microbiol* 12(10), 1378-88.
- Schumperli, D., Peterhans, E. and Wyler, R. (1978) Permeability changes of plasma and lysosomal membranes in HeLa cells infected with rabbit poxvirus. *Arch Virol* 58(3), 203-12.
- Silverman, G.A. and Lomas, D.A. (2007) *Molecular and Cellular Aspects of the Serpinopathies and Disorders in Serpin Activity*. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore.

- Siskind, L.J. (2005) Mitochondrial ceramide and the induction of apoptosis. *J Bioenerg Biomembr* 37(3), 143-53.
- Smith, C.A., Smith, T.D., Smolak, P.J., Friend, D., Hagen, H., Gerhart, M., Park, L., Pickup, D.J., Torrance, D., Mohler, K., Schooley, K. and Goodwin, R.G. (1997) Poxvirus genomes encode a secreted, soluble protein that preferentially inhibits beta chemokine activity yet lacks sequence homology to known chemokine receptors. *Virology* 236(2), 316-27.
- Stewart, T.L., Wasilenko, S.T. and 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.
- Sun, C., Cai, M., Meadows, R.P., Xu, N., Gunasekera, A.H., Herrmann, J., Wu, J.C. and Fesik, S.W. (2000) NMR structure and mutagenesis of the third Bir domain of the inhibitor of apoptosis protein XIAP. *J Biol Chem* 275(43), 33777-81.
- Symons, J.A., Adams, E., Tschärke, D.C., Reading, P.C., Waldmann, H. and Smith, G.L. (2002) The vaccinia virus C12L protein inhibits mouse IL-18 and promotes virus virulence in the murine intranasal model. *J Gen Virol* 83(Pt 11), 2833-44.
- Szegezdi, E., Logue, S.E., Gorman, A.M. and Samali, A. (2006) Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* 7(9), 880-5.
- Szondy, Z., Sarang, Z., Molnar, P., Nemeth, T., Piacentini, M., Mastroberardino, P.G., Falasca, L., Aeschlimann, D., Kovacs, J., Kiss, I., Szegezdi, E., Lakos, G., Rajnavolgyi, E., Birckbichler, P.J., Melino, G. and Fesus, L. (2003) Transglutaminase 2<sup>-/-</sup> mice reveal a phagocytosis-associated crosstalk between macrophages and apoptotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(13), 7812-7.
- Tan, Y., Dourdin, N., Wu, C., De Veyra, T., Elce, J.S. and Greer, P.A. (2006) Ubiquitous calpains promote caspase-12 and JNK activation during endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Biol Chem* 281(23), 16016-24.
- Tang, J., Xie, W. and Yang, X. (2005) Association of caspase-2 with the promyelocytic leukemia protein nuclear bodies. *Cancer Biol Ther* 4(6), 645-9.
- Taylor, J.M. and Barry, M. (2006) Near death experiences: poxvirus regulation of apoptotic death. *Virology* 344(1), 139-50.
- Taylor, J.M., Quilty, D., Banadyga, L. and 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.
- Tinel, A. and Tschopp, J. (2004) The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science* 304(5672), 843-6.
- Townsley, A.C., Weisberg, A.S., Wagenaar, T.R. and Moss, B. (2006) Vaccinia virus entry into cells via a low-pH-dependent endosomal pathway. *J Virol* 80(18), 8899-908.
- Turner, P.C. and Moyer, R.W. (2008) The vaccinia virus fusion inhibitor proteins SPI-3 (K2) and HA (A56) expressed by infected cells reduce the entry of superinfecting virus. *Virology* 380(2), 226-33.
- Turner, S.J., Silke, J., Kenshole, B. and Ruby, J. (2000) Characterization of the ectromelia virus serpin, SPI-2. *J Gen Virol* 81(Pt 10), 2425-30.
- Upton, J.P., Austgen, K., Nishino, M., Coakley, K.M., Hagen, A., Han, D., Papa, F.R. and Oakes, S.A. (2008) Caspase-2 cleavage of BID is a critical apoptotic signal downstream of endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* 28(12), 3943-51.
- Vakifahmetoglu-Norberg, H. and Zhivotovsky, B. (2010) The unpredictable caspase-2: what can it do? *Trends Cell Biol* 20(3), 150-9.
- Vakifahmetoglu, H., Olsson, M., Orrenius, S. and Zhivotovsky, B. (2006) Functional connection between p53 and caspase-2 is essential for apoptosis induced by DNA damage. *Oncogene* 25(41), 5683-92.
- Vanderplassen, A., Mathew, E., Hollinshead, M., Sim, R.B. and Smith, G.L. (1998) Extracellular enveloped vaccinia virus is resistant to complement because of

- incorporation of host complement control proteins into its envelope. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(13), 7544-9.
- Vaux, D.L. and Silke, J. (2005) IAPs, RINGs and ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(4), 287-97.
- Verhagen, A.M., Kratina, T.K., Hawkins, C.J., Silke, J., Ekert, P.G. and Vaux, D.L. (2007) Identification of mammalian mitochondrial proteins that interact with IAPs via N-terminal IAP binding motifs. *Cell Death Differ* 14(2), 348-57.
- Verhagen, A.M. and Vaux, D.L. (2002) Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac. *Apoptosis* 7(2), 163-6.
- Vrbacký, M. (2005) Bcl-2 oncoprotein and its effects on mitochondrial metabolism and cell death, Charles University in Prague.
- Vrbacky, M., Krijt, J., Drahotka, Z. and Melkova, Z. (2003) Inhibitory effects of Bcl-2 on mitochondrial respiration. *Physiol Res* 52(5), 545-54.
- Wagenaar, T.R. and Moss, B. (2009) Expression of the A56 and K2 proteins is sufficient to inhibit vaccinia virus entry and cell fusion. *J Virol* 83(4), 1546-54.
- Wali, A. and Strayer, D.S. (1999) Infection with vaccinia virus alters regulation of cell cycle progression. *DNA Cell Biol* 18(11), 837-43.
- Walzer, T., Galibert, L., Comeau, M.R. and De Smedt, T. (2005) Plexin C1 engagement on mouse dendritic cells by viral semaphorin A39R induces actin cytoskeleton rearrangement and inhibits integrin-mediated adhesion and chemokine-induced migration. *J Immunol* 174(1), 51-9.
- Wang, P., Arjona, A., Zhang, Y., Sultana, H., Dai, J., Yang, L., LeBlanc, P.M., Doiron, K., Saleh, M. and Fikrig, E. (2010) Caspase-12 controls West Nile virus infection via the viral RNA receptor RIG-I. *Nat Immunol* 11(10), 912-9.
- Wasilenko, S.T., Banadyga, L., Bond, D. and Barry, M. (2005) The vaccinia virus F1L protein interacts with the proapoptotic protein Bak and inhibits Bak activation. *J Virol* 79(22), 14031-43.
- Wasilenko, S.T., Meyers, A.F., Vander Helm, K. and Barry, M. (2001) Vaccinia virus infection disarms the mitochondrion-mediated pathway of the apoptotic cascade by modulating the permeability transition pore. *J Virol* 75(23), 11437-48.
- White, E. (2008) Autophagic cell death unraveled: Pharmacological inhibition of apoptosis and autophagy enables necrosis. *Autophagy* 4(4), 399-401.
- WHO. (1980) The global eradication of smallpox. Final Report of the Global Commission for the Certification of Smallpox Eradication. *Wkly. Epidem. Rep.-Releve Epidem. Hebd.* 55, 145-152.
- Williamson, J.D., Reith, R.W., Jeffrey, L.J., Arrand, J.R. and Mackett, M. (1990) Biological characterization of recombinant vaccinia viruses in mice infected by the respiratory route. *J Gen Virol* 71 ( Pt 11), 2761-7.
- Wilson, C.J., Das, P., Clementi, C., Matthews, K.S. and Wittung-Stafshede, P. (2005) The experimental folding landscape of monomeric lactose repressor, a large two-domain protein, involves two kinetic intermediates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(41), 14563-8.
- Wolff, S., Erster, S., Palacios, G. and Moll, U.M. (2008) p53's mitochondrial translocation and MOMP action is independent of Puma and Bax and severely disrupts mitochondrial membrane integrity. *Cell Res* 18(7), 733-44.
- Xue, Y., Daly, A., Yngvadottir, B., Liu, M., Coop, G., Kim, Y., Sabeti, P., Chen, Y., Stalker, J., Huckle, E., Burton, J., Leonard, S., Rogers, J. and Tyler-Smith, C. (2006) Spread of an inactive form of caspase-12 in humans is due to recent positive selection. *Am J Hum Genet* 78(4), 659-70.
- Yamaguchi, H. and Wang, H.G. (2006) Tissue transglutaminase serves as an inhibitor of apoptosis by cross-linking caspase 3 in thapsigargin-treated cells. *Mol Cell Biol* 26(2), 569-79.



- Yamaguchi, R., Lartigue, L., Perkins, G., Scott, R.T., Dixit, A., Kushnareva, Y., Kuwana, T., Ellisman, M.H. and Newmeyer, D.D. (2008) Opa1-mediated cristae opening is Bax/Bak and BH3 dependent, required for apoptosis, and independent of Bak oligomerization. *Mol Cell* 31(4), 557-69.
- Yazdi, A.S., Guarda, G., D'Ombra, M.C. and Drexler, S.K. (2010) Inflammatory caspases in innate immunity and inflammation. *J Innate Immun* 2(3), 228-37.
- Yilma, T., Verardi, P. and Jones, L. (2010) Development of safe and efficacious viral vaccines for animals. *Crit Rev Immunol* 30(3), 223-37.
- Yoo, N.K., Pyo, C.W., Kim, Y., Ahn, B.Y. and Choi, S.Y. (2008) Vaccinia virus-mediated cell cycle alteration involves inactivation of tumour suppressors associated with Brl1 and TBP. *Cell Microbiol* 10(3), 583-92.
- Zhai, D., Yu, E., Jin, C., Welsh, K., Shiao, C.W., Chen, L., Salvesen, G.S., Liddington, R. and Reed, J.C. (2010) Vaccinia virus protein F1L is a caspase-9 inhibitor. *J Biol Chem* 285(8), 5569-80.
- Zhang, Y., Padalecki, S.S., Chaudhuri, A.R., De Waal, E., Goins, B.A., Grubbs, B., Ikeno, Y., Richardson, A., Mundy, G.R. and Herman, B. (2007) Caspase-2 deficiency enhances aging-related traits in mice. *Mech Ageing Dev* 128(2), 213-21.
- Zitvogel, L., Casares, N., Pequignot, M.O., Chaput, N., Albert, M.L. and Kroemer, G. (2004) Immune response against dying tumor cells. *Adv Immunol* 84, 131-79.
- Zong, W.X., Li, C., Hatzivassiliou, G., Lindsten, T., Yu, Q.C., Yuan, J. and Thompson, C.B. (2003) Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J Cell Biol* 162(1), 59-69.

## **PŘÍLOHY - PUBLIKACE**

1. Liskova, J., Knitlova, J., Honner, R. and Melkova, Z. (2011) Apoptosis and necrosis in vaccinia virus-infected HeLa G and BSC-40 cells. *Virus Res.*(doi:10.1016/j.virusres.2011.05.005). IF 2,563
2. Kalbacova, M., Spisakova, M., Liskova, J. and Melkova, Z. (2008) Lytic infection with vaccinia virus activates caspases in a Bcl-2-inhibitable manner. *Virus Res* 135(1), 53-63. IF 2,563
3. CD s elektronickou verzí disertační práce