

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Katedra medicínské biologie



**Studium inhibice množení viru klíšťové encefalitidy
v podmínkách *in vitro***

Bakalářská práce

Kristýna Kvardová

Vedoucí práce: Daniel Růžek, RNDr., Ph.D.

České Budějovice, duben 2009

Kvardová K., 2009: Studium inhibice množení viru klíšťové encefalitidy v podmínkách *in vitro* [The study of the inhibition of tick-borne encephalitis virus-replication under *in vitro* conditions, Bc. Thesis, in Czech]

Annotation:

We examined the inhibitory effects of three different inhibitors on the replication of TBEV under *in vitro* conditions in two mammalian cell lines (porcine kidney cells, neuroblastoma cells).

Tato práce byla financována granty:

524/08/1509 Grantová agentura České republiky (GAČR)

Vyzkumné centrum LC06009

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 26. dubna 2009

.....
Kristýna Kvardová

Poděkování:

Zde bych ráda poděkovala svému školiteli Danu Růžkovi, RNDr., Ph.D., za nekonečnou trpělivost při vypracování mé bakalářské práce, přátelské vedení, rady a pomoc. Nemenší poděkování patří ostatním členům Laboratoře Virologie na Parazitologickém ústavu, jež mi vždy mile a dobře poradili. V neposlední řadě děkuji mé rodině a blízkým za poskytnuté zázemí pro mé studium.

OBSAH

1. Úvod.....	5
Objevující se onemocnění	5
1.1. Virus klíšťové encefalitidy	6
Virus klíšťové encefalitidy – charakteristika a výskyt.....	6
Klíště obecné (<i>Ixodes ricinus</i>) a přenos patogenu.....	8
Replikace VKE.....	10
Infekce VKE, její následky a role hostitelské imunity.....	11
1.2. Dendrimery a potenciální inhibitory replikace VKE.....	14
Dendrimery.....	14
Syntéza a struktura dendrimerů, PAMAM dendrimery.....	15
Vlastnosti dendrimerů.....	16
Využití dendrimerů.....	16
Brefeldin A.....	19
Monensin.....	21
2. Cíle práce.....	22
3. Materiál a metody.....	23
3.1. Viry.....	23
3.2. Buněčné linie.....	23
3.3. Inhibitory a dendrimery.....	23
3.4. Testování dendrimerů.....	26
3.5. Testování inhibitorů BFA a MON.....	27
4. Vyhodnocování výsledků.....	28
5. Výsledky.....	29
5.1. Cytotoxicita dendrimerů.....	29
5.2. Vliv dendrimerů na replikaci VKE <i>in vitro</i>	29
5.3. Cytotoxicita DMSO, BFA a MON.....	30

6. Diskuse.....	32
7. Souhrn.....	35
8. Literatura.....	36

1. Úvod

Objevující se onemocnění

Pojem "objevující se" (angl. emerging) nebo "znovu-objevující se" choroby (angl. re-emerging diseases) souhrnně označuje širokou skupinu virových, bakteriálních a parazitárních nákaz různých druhů a čeledí, jež sdílí jednu podstatnou společnou vlastnost. Tou je schopnost propuknout vždy souvisle s většími změnami v lidské populaci. Ať se již jedná o osidlování nových území, bližší kontakt člověka s domestikovanými zvířaty (McMichael, 2004), populační exploze, jiné sociální uspořádání, klimatické, ale i genetické změny v populaci, všechny tyto větší změny byly doprovázeny zřetelnými přeměnami ve vztahu *Homo sapiens sapiens* s okolním světem na biologické úrovni (Turk *et* Thomson, 1999). Z historického hlediska bylo jistě důležitým krokem umožňujícím vznik nových infekcí založení lidských osad a pěstování dobytka. Podle antropologického výzkumu v Africe provedeném v roce 1990, koreluje objev srpkovitých erytrocytů chráněných proti malárii se zavedením železných nástrojů a vypalováním lesů, což zřejmě poskytlo lepší podmínky pro život komárů rodu *Anopheles gambiae*, hlavnímu přenašeči prvoka *Plasmodium falciparum* a *Plasmodium malariae* (Inhorn *et* Brown, 1990). Z dalších historických vlivů je třeba zmínit velké pohyby národů, vojenské výpravy a expanze na do té doby neobjevené kontinenty, možné klimatické vlivy (Gubler, 2002), dále zvýšený kontakt lidí se zvířaty, více lidí s poruchami imunity, a konečně také objevy nových živočišných druhů dosud neznámých (Hansen *et al.*, 2001). Vznikly nové ekologické niky, vztah člověka k mikrobům, a hlavně příležitosti dosud nevídaným infekcím napadnout nového hostitele – člověka. Jedním z takových onemocnění je Omská hemoragická horečka, jež se objevila v Rusku po vysazení ondater do nového prostředí (Casals *et al.*, 1966). Především pronikání lidí do ohnisek nákaz a nedostačující zdravotní prohlídky a opatření mají za následek znovuzplanutí dřívějších chorob či objevení se nových.

Mezi aktuální objevující se nemoci dnešní doby řadíme, mimo jiné, virové choroby přenášené členovci živícími se obratlovčí krví, tzv. arboviry (angl. **arthropod-borne viruses**). Arboviry se řadí do 7 virových čeledí vymezených ekologickými vlastnostmi a nikoliv genetickou či morfológickou příbuzností, patří sem také čeleď *Flaviviridae* (dříve podčeleď čeledi *Togaviridae*) (Rajčáni *et* Čiampor, 2006). Čeleď *Flaviviridae* čítá nejméně 70 rodů. Virové částice této čeledi se vyznačují relativně malým obalem, jejich genom je tvořen jednovláknovou RNA pozitivní polarity kódující všechny virové proteiny uvnitř jednoho čtecího rámce (ORF) (angl. **open reading frame**). Přenašeči jsou členovci (klíště, komár) a hostitelé jsou obratlovci. Podle fylogenetických studií se viry přenášené klíšťaty oddělily od virů přenášených komáry asi před 5000 lety (Kuno *et al.*, 1998). Jedním ze 3 rodů této čeledi je rod *Flavivirus*. Jako příklady zástupců komplexu klíšťové encefalidity (KE) lze jmenovat virus klíšťové encefalidity, virus horečky Kyasanurského lesa, virus Langat, virus vrtivky, virus Omské hemoragické horečky a virus Powassan (Grešíková *et* Kaluzová, 1997). Největší hrozbou pro střední Evropu a tedy i Českou republiku je virus klíšťové encefalidity. Virus klíšťové encefalidity sice není klasickým příkladem nově se objevující choroby, nicméně oblast jeho výskytu se za posledních několik desítek let výrazně rozšířila a současně v některých státech prudce vzrostla incidence tohoto závažného onemocnění.

1.1. Virus klíšťové encefalidity

Virus klíšťové encefalidity – charakteristika a výskyt

Virus klíšťové encefalidity (VKE) (rod *Flavivirus*, čeleď *Flaviviridae*) je příčinnou závažného lidského onemocnění centrální nervové soustavy (CNS) ve střední Evropě a severovýchodní Asii. Způsobuje minimálně 11 000 případů encefalidity v Rusku a asi 3000 v Evropě ročně (Gritsun *et al.*, 2003). VKE je v pořadí druhou nejčastější příčinnou virové encefalidity hned po viru japonské encefalidity (JEV) (Kunz *et Heinz*, 2003). Rozlišujeme 3 subtypy lišící se nukleotidovými sekvencemi, ale i biologickými vlastnostmi, jednotlivé subtypy byly pojmenovány podle geografického výskytu - Evropský, Sibiřský a Dálný východ (Bröker *et Gniel*, 2003). Pobaltské státy a Ukrajina jsou místem setkání dvou nebo všech subtypů (Růžek *et al.*, 2007). Subtypy se liší svými vektory (přenašeči), mortalitou i celkovým průběhem nemoci. Evropský subtyp je přenášen klíšťem *Ixodes ricinus*, Dálný východ a Sibiřský subtyp především klíšťem *Ixodes persulcatus* (vyjíměčně *Haemaphysalis concinna*). Klinické projevy infekcí způsobených kmeny subtypu Dálný východ mají rychlý nástup, komplikovanější průběh a mortalitu 20 – 60%. Kmeny ze Sibiřského subtypu způsobují obvykle chronické onemocnění s úmrtností kolem 7%. Chronický průběh KE je poměrně častá komplikace doprovázející toho onemocnění. Příčinou je přechod z akutní fáze do zdoluhavého, slabého infekčního procesu, jakožto výsledku přežití viru v CNS, nebo následné degenerativní reakce imunitního systému v zánětlivém ložisku bez přítomnosti viru. Mezi 113 kmeny VKE izolovaných v různých oblastech Sibiře byl u 8 kmenů (7,1%) zjištěn chronický průběh nemoci u infikovaných opic *Macaca rhesus*, přičemž se KE manifestuje u tohoto druhu opic velmi podobně jako u lidí. Patogeneze chronické formy KE byla v tomto případě založena na schopnosti viru dlouhodobě setrvávat v určitých strukturách mozku za současně vysokého obsahu protilátek v krvi a mozkomíšním moku opic. Zatímco izolace viru z krevních vzorků opic byla poměrně snadná během akutní fáze, nepodařilo se izolovat virus z krve zvířete prodávající chronickou formu infekce (Iliencko *et al.*, 1974). Klinický průběh Evropského subtypu je obvykle mírný s nízkou mortalitou 1 – 5%. Infekce způsobené evropskými kmeny mají typicky dvoufázový průběh. První fáze virémie, provázená chřipkovými symptomy – horečka, malátnost, bolest hlavy, svalová bolest, trvá přibližně 1 až 2 týdny. Asi 2/3 lidí nakažených VKE prodělá tzv. inaparentní (bezpříznakovou) infekci s virémií nebo bez ní. Mezi 1. a 2. fází obvykle nastává celkové zlepšení stavu pacienta. Pokud se imunitnímu systému nepodaří virus zneškodnit, v 25% případů nastane sekundární fáze infekce. Během ní virus pronikne do mozkové tkáně. Dochází k postižení CNS s příznaky meningitidy, meningoencefalitidy nebo encefalomyelitidy - prudké bolesti hlavy, břicha, pacienti mají vysoké horečky, jsou dezorientovaní, mají porušenou motorickou koordinaci atd. Rekonvalescence je dlouhá, výjimečně dochází k rozvoji trvalých paralýz, trvalým poruchám soustředění či snížení intelektuálního výkonu nebo smrti (Charrel *et al.*, 2004). Obecně lehčí průběh nemoci zaznamenáváme u věkové skupiny do 14-ti let. Naopak u pacientů nad 60 let se častěji vyvíjí těžší případy s paralýzami (Herzig *et al.*, 2002). Pacienti, kteří se zotavili z klíšťové encefalidity, zůstanou imunní po zbytek života, což potvrzuje nález IgG protilátek proti VKE v jejich séru (Charrel *et al.*, 2004).

První zmínka o existenci VKE se datuje zpět do 18. století, kdy byla nemoc podobná KE zmíněna v dokumentech z Finska (citováno dle Kunz *et Heinz*, 2003). Poprvé byla KE diagnostikována v roce 1931 H. Schneiderem. Ruští vědci izolovali virus z nakažených lidí, myši a klíšťat a tím potvrdili přenos VKE z klíšťat.

V Evropě byl VKE prvně detekován v roce 1948 Galliou v Československu. Následně byla nemoc/virus potvrzen/a téměř v celé Evropě a také na severu Číny a Japonska (citováno dle Kunz *et* Heinz, 2003).

Částice VKE (virion) je sférického tvaru a má velikost přibližně 50nm v průměru (Westaway *et al.*, 1985). Na povrchu je lipidická dvouvrstva obklopující kapsidu s virovou nukleovou kyselinou. Lipoproteinový obal v sobě obsahuje dva virové proteiny; E (envelope) a M (membrane). Kapsida je kubického tvaru o 20-ti stěnách a skládá se z proteinu C (capsid). Virová jednořetězová nukleová kyselina RNA o velikosti 11kb je pozitivní polarity. Kóduje jeden velký polyprotein o 3400 aminokyselinách, jež je translatován z jediného ORF. Polyprotein je kotranslačně a post-translačně štěpen virovými a buněčnými proteázami na 3 strukturální a 7 nestrukturních proteinů, jež jsou detailněji popsány v tabulce č.1.1. ORF je ohraničen 5' a 3' nekódujícími oblastmi (NCR) (angl. noncoding regions). Je pravděpodobné, že 5' NCR ovlivňuje translaci virového genomu a také slouží jako místo zahájení syntézy pozitivního řetězce během replikace RNA. 3' oblast genomu je velmi variabilní a nejspíš také hraje důležitou roli v replikaci virové RNA, avšak přesná funkce není dosud známa. Na rozdíl od buněčné mRNA, genom většiny flavivirů není polyadenylován na 3' konci (Wengler *et al.*, 1978), až na několik výjimek s interními polyA sekvencemi ve variabilní části 3' konce, například kmen Neudoerfl či kmen 263 (Mandl *et al.*, 1998; Wallner *et al.*, 1996). Jako u všech RNA virů pozitivní polarity slouží i genom VKE jako mRNA pro translaci virových proteinů. Replikace je zahájena syntézou negativního řetězce RNA, který je použit pro tvorbu dalších pozitivních řetězců RNA. Proto je syntéza asymetrická s výraznou převahou negativních řetězců nad pozitivními, kumulují se během infekce a byly izolovány výhradně ve dvou-řetězcových formách (Lindenbach *et* Rice, 2003).

Tab. 1.1 Proteiny VKE (Lindenbach *et* Rice, 2003)

PROTEINY STRUKTURNÍ	VELIKOST (kDa)	FUNKCE
E	≈ 53	hlavní povrchový protein, antigen, N-glykosylovaný dimer, indukce protilátek, vazba na receptor vnímavé buňky, fúze s membránou, virový fúzní protein II. třídy
M	≈ 26	membránový glykoprotein, vzniká z prekurzoru prM - nutný pro správné složení E proteinu
C	≈ 11	tvoří kapsidu
PROTEINY NESTRUKTURNÍ	VELIKOST (kDa)	FUNKCE
NS1	≈ 46	stabilní homodimer důležitý pro počáteční fáze replikace RNA, antigen spouštějící komplementem zprostředkovanou lýzu napadených buněk, periferní částí je asociován s buněčnou membránou
NS2A	≈ 22	pravděpodobně koordinuje krok mezi replikací RNA a jejím balením, důležitý pro produkci infekčních částic
NS2B	≈ 14	asociovaný s membránou, tvoří komplex s NS3, nezbytný kofaktor serinové proteázy v NS3, nejspíše ovlivňuje permeabilitu membrány během

		infekce
NS3	≈ 70	Multifunkční protein zapojený v replikaci RNA a zpracování polyproteinu, pomocí NS2B je začleněn do membrány, 1/3 jeho N-konce je trypsinu podobná serinová proteáza, jeho C-konec má ve spojení s NS5 funkce podobné helikázám
NS4A	≈ 16	funkce není zcela známa, možná role v RNA replikaci, zpracování polyproteinu
NS4B	≈ 27	transmembránový protein s nejasnou funkcí, soustředěný do míst replikace a u jádra
NS5	≈ 103	multifunkční, dobře konzervovaný protein zahrnutý v RNA replikaci, jeho N-konec vytváří 5' čepičku, C-konec má RNA dependentní RNA polymerázovou aktivitu, tvoří komplex s NS3 a může stimulovat NS3 NTPázovou aktivitu, nachází se u jádra

Porovnáním dat z virulentních a oslabených kmenů encefalitických virů bylo zjištěno, že i 3' NCR hraje důležitou roli v patogenezí (Hurrelbrink *et al.*, 2003). Aminokyselinové záměny ovlivňující biologické vlastnosti viru (oslabení, fúzi a uvolnění, tropismus, stabilitu) byly lokalizovány ve 4 shlucích E proteinu. Na virulenci působí svým způsobem i bodové mutace, ač nemusí měnit sekundární a terciální struktury proteinu (Gritsun *et al.*, 1995). U některých přírodních izolátů VKE bylo zjištěno, že například mutace v nestrukturních proteinech NS2B a NS3 vedly k atenuovanému termosenzitivnímu fenotypu viru (Růžek *et al.*, 2008).

Klíště obecné (*Ixodes ricinus*) a přenos VKE

VKE je v přírodě udržován v cyklu zahrnující klíšťata a obratlovčí hostitele (nejčastěji hlodavce). Klíště slouží jako rezervoár i vektor tohoto patogena (Rizzoli *et al.*, 2004). Klíště je slepé, k potenciálnímu hostiteli je navigováno oxidem uhličitým vylučovaným pokožkou obratlovce, jeho teplotou, zápachem, amoniakem a pohybem (Gritsun *et al.*, 2003). Obratlovec může být nakažen přisáním jakéhokoliv stádia klíštěte, jež jsou larva (0,6-1 mm), nymfa (1-2 mm) a dospělec (samec 2,5 mm, samice 3-4 mm) (Herzig *et al.*, 2002). Každé stádium vývoje klíštěte od larvy přes nymfu po dospělce musí alespoň jednou sát na obratlovci předtím, než se může vyvinout v další stádium. Klíště zůstává přenašečem po celý svůj život i po metamorfózách (trans-stadiální přenos) (Nuttall *et al.*, 2003). Virus se též přenáší na potomky, a to tzv. trans-ovariálním přenosem z infekční fertlní samice do jejích vajíček, kterých bývá cca 500 až 5000. Samice po naklazení vajíček umírá. Virus se též přenáší z infikovaného klíštěte na dosud neinfikované jedince i tzv. „co-feedingem” (sousáním) v případě, kdy více klíšťat saje současně na téže hostiteli. V takovém případě je virus vyloučený spolu se slinami infikovaného klíštěte do místa sání současně nasán klíštětem neinfikovaným. Samci klíšťat se neživí krví, ale pouze malým množstvím tkáňové tekutiny v rámci krátkého krmení, většinou během kopulace s právě sající samičkou (Rizzoli *et al.*, 2001). Nejčastější cestou nákazy klíštěte je sání na viremickém hostiteli. KE se u

klíšťat samotných neprojevuje. VKE je z klíšťat přenesen klíštěcími slinami do hostitele. Naopak, obratlovcí krev nebo tkáň obsahující VKE vstupuje do klíštěcího střeva během sání. K přenosu infekce z klíštěte stačí jen krátký čas (Sauer *et al.*, 1995). Je známo, že klíštěcí sliny obsahují různé bioaktivní látky podobné lékům, například anestetika, prostaglandiny, imuno-modulační faktory, anti-koagulanty, enzymy, inhibitory, protizánětlivé látky aj., jež místo sání znecitlivují, tudíž mnohá infestace zůstávají bez povšimnutí (Parola *et Raoult*, 2001). Nejpravděpodobněji se člověk nakazí VKE kousnutím infekčního klíštěte během venkovních aktivit v lese s hustou vegetací, jež může ukrývat velké množství klíšťat. Lidské případy nakažením VKE se objevují od dubna do listopadu. Klíště začne být aktivní, když půdní teplota dosáhne hodnot 5 až 7°C (Gardiner *et Gettinby*, 1981). Vlhká léta a mírné zimy zvyšují hustotu klíštěcích populací. Během zimních měsíců virus v klíštěti přezimuje, na jaře se znásobí a vstoupí do téměř všech jeho orgánů (Volf *et Horák*, 2007).

Výskyt patogena je úzce spjat s výskytem klíšťat, prevalencí viru v klíšťatech a frekvencí kontaktu mezi virem-nakaženými klíšťaty a jejich vnímavými hostiteli. Hustota klíštěcích populací je citlivá na klimatické změny – teplejší počasí poskytuje klíšťatům delší období pro aktivní život, resp. sání, stejně tak i lidé mohou provozovat venkovní aktivity déle a častěji, je-li teplejší klima, čímž zvyšují riziko nakažení se (Bröker *et Gniel*, 2003; Lindgren *et al.*, 2000; Gustafson *et Lindgren*, 2001). Studie z posledního desetiletí 20. stol. upozorňují na posun hranice výskytu klíštěte *Ixodes ricinus* do vyšších nadmořských poloh jako například na Šumavě, čímž se zvyšuje riziko infekce při venkovních aktivitách (Daniel *et al.*, 2003).

VKE se vyskytuje prakticky na celém území České republiky. Z dlouhodobého hlediska jsou jižní Čechy jedním z nejzatiženějších regionů v ČR co se počtu případů KE týče. Také v okolí Plzně v západočeském kraji byl zjištěn konstantně vyšší výskyt onemocnění KE. Severní Čechy se v poslední letech staly novým ohniskem této nákazy a ani východní Čechy neunikly nové vlně objevující se encefalidity, obzvláště v okrese Olomouc (Beran, 2004). V letech 1993 až 2006 byl roční průměr 619,6 případů KE. Za rok 2006 to bylo již 1029 případů KE v jediném roce. Nepříznivý vývoj situace ohledně výskytu VKE jde ruku v ruce s neobvyklým vývojem počasí v roce 2006 (Daniel *et al.*, 2008). Počet případů klesl v roce 2007 na 542, což představuje 52,7% z počtu v roce 2006 (Süss, 2008). Česká republika je příkladem, kde nedostatečná proočkovanost vede k vysokému počtu nakažených, jež dosáhl v roce 2006 svého historického maxima.

Kromě nejběžnějšího způsobu přenosu infekce kousnutím nakaženého klíštěte je méně častý případ infekce po požití kontaminovaného syrového kozího mléka nebo nepasterizovaného mléka. Tento případ byl zaznamenán v roce 1951 v Rožňavě na Slovensku (Grešíková *et al.*, 1975). Pacienti s encefalitou získanou z mléka mají vyšší pravděpodobnost úplného zotavení. Virem se lze infikovat i v laboratořích při náhodném poranění jehlou nebo vdechnutím kontaminovaného aerosolu.

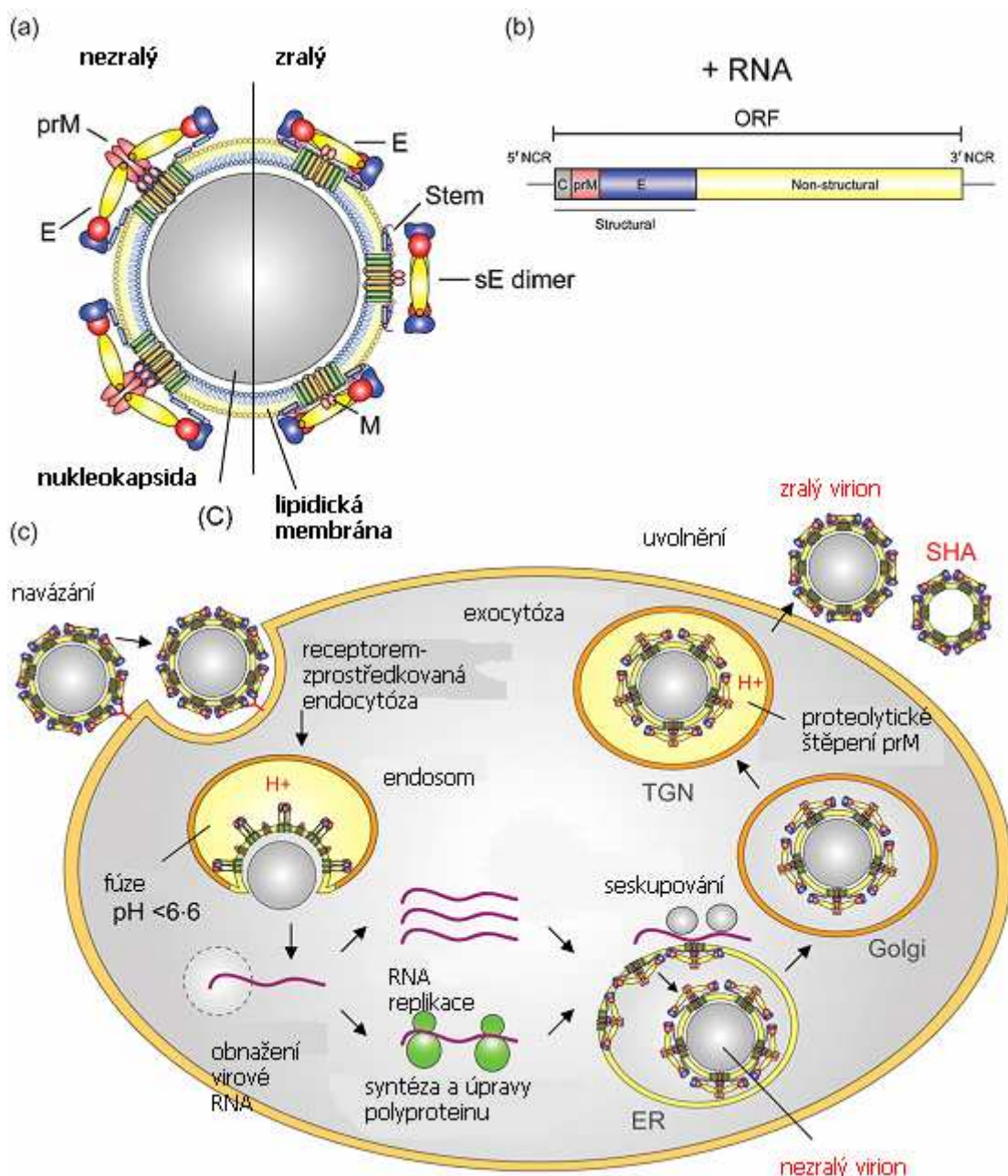
V případě experimentů s virem encefalidity St. Louis (SLEV) bylo prokázáno, že některé neurotropní viry jako VKE se mohou do mozku dostat skrz čichovou cestu. Místo zakončení čichových nervů je obzvláště citlivé k infekci, protože nervová zakončení sahají až do čichové sliznice (Fazakerley, 2002). U laboratorních myší nakažených intranasálně byla pozorována progresse infekce z čichového neuroepitelia přes čichový lalok do mozku, přičemž virový antigen se nacházel též ve smyslových nervových buňkách sítnice, avšak tam se dostal až po infekci mozku a tím se vyloučila možnost centrální neuroinvaze oční cestou. Přítomnost částic SLEV v nosním sekretu po opadnutí virémie by se dala použít pro rychlou diagnostiku lidských případů (Monath *et al.*, 1983). Nákaza VKE člověka člověkem nebyla dosud zaznamenána, ale teoreticky by se tak mohlo stát transfúzí viremické krve zdravému jedinci (Herzig *et al.*, 2002).

Replikace VKE

Aby došlo k úspěšné infekci hostitele VKE, musí být k němu hostitel vnímavý, tzn. jeho buňky musí nést receptory, na něž se virus naváže svým E proteinem. Ačkoliv povaha buněčného receptoru pro VKE není ještě zcela objasněna, byly objeveny látky hrající významnou úlohu v počáteční fázi infekce VKE. Jsou jimi glykosaminoglykany jako například heparan sulfát (HS), vyskytující se na mnoha typech buněk (Mandl *et al.*, 2001; Mandl, 2005). Receptorová variabilita pro VKE je pravděpodobně mechanismem přizpůsobení se na široký tkáňový a buněčný repertoár, čili umožňuje viru replikovat se v buňkách bezobratlých živočichů i obratlovců (Chambers *et Diamond*, 2003).

Schéma replikace VKE je zobrazeno na obrázku 1.2 (Stiasny *et Heinz*, 2006). V prvním kroku se virová částice naváže na receptor povrchu vnímavé buňky svým E proteinem, konkrétně jeho doménou II. Každý monomer E proteinu se skládá ze tří rozdílných domén označovaných I, II a III. Předpokládá se, že soubor aminokyselinových zbytků v doméně II zprostředkovává vazbu na receptor a významně ovlivňuje neurovirulenci a neroinvazivitu. Konkrétněji se jedná o velmi konzervovaný fúzní protein obsahující konzervované aminokyseliny v doméně II jinak velmi variabilního proteinu E, 6 z nich jsou glyciny. Dvanáct cysteinových zbytků tvořících 6 disulfidických můstků je vysoce konzervovaných (Mandl *et al.*, 1989). Přestože je tato oblast E proteinu jednou z nejvíce konzervovaných sekvencí v celém genomu, volná otáčivost glycinových zbytků kolem jejich C-C a C-N vazeb pravděpodobně povoluje konformační změny nezbytné pro fúzi s odlišnými druhy buněk (Seligman, 2008). Následuje receptorem-zprostředkovaná endocytóza. Virové částice jsou včleněny do klatrinem obalených váčků. Nízké pH těchto váčků způsobí změnu konformace E proteinu z dimeru na trimer a tím splynutí virového obalu s membránou endosomu (Stiasny *et al.*, 1996). Konverze z dimeru na trimer je dvoufázový proces, v prvním kroku dochází ke vratné disociaci na monomery následované v druhém kroku nevratnou tvorbou trimerů, pro což je naprosto nezbytná transmembránová část E proteinu s jejími α -šroubovitými strukturálními elementy (Stiasny *et al.*, 1996). Kinetické studie fúze s liposomy ukázaly, že VKE užívá nejrychlejší a nejúčinnější fúzní mechanismus ze všech obalených virů doposud analyzovaných. Fúze je spuštěna na rozdíl od jiných obalených virů již při pH 5.5 a teplotě 37°C bez jakékoliv měřitelného opoždění (tzv. lag fáze) a je z 50% uvolněná během prvních třech vteřin (Heinz *et Allison*, 2001). Splynutí vyústí v uvolnění virové nukleokapsidy do cytoplazmy buňky. Nukleová kyselina viru je po obnažení nejprve použita k translaci proteinů, jež jsou dále použity k replikaci virového genomu. Během replikace je vytvořeno nadměrné množství negativních řetězců RNA, které slouží jako templáty pro syntézu nových pozitivních řetězců RNA. Infekce VKE způsobuje v infikované buňce přeskupení membrán poblíž jádra. Jednou z prvních změn je proliferace endoplasmatického retikula (ER) následovaná objevením se tzv. SMS (angl. smooth membrane structures). Virové povrchové proteiny prM a E jsou přemístěny do lumen ER během syntézy polyproteinu, buněčné signalázy odštěpují jejich amino-konce. Virová RNA je zabalena C proteinem do nukleokapsidy na cytoplasmatické straně membrány ER. Pučením nukleokapsidy do ER vzniká obal virové částice. Na konci tohoto procesu jsou tvořeny nezralé virové částice obsahující v obalu proteiny prM a E v heterodimerickém uspořádání, nejsou infekční (Heinz *et al.*, 1994). Tyto nezralé viriony jsou dále transportovány skrz hostitelskou sekreční dráhu ven z buňky. V kyselých váčcích Golgiho aparátu (GA) je buněčnou proteázou furinem odštěpen protein prM, což umožňuje reorganizaci proteinu E do fúze-kompetentního homodimeru. Virové proteázy NS2B-NS3 odstraňují v jednom z posledních kroků virové replikace vnitrobuněčnou formu virového kapsidového proteinu C během formování zralého virionu (Yamshchikov *et Compans*, 1995). Splynutím

transportních váčků GA obsahující nové virové částice s plasmatickou membránou buňky dojde k jejich uvolnění do okolí, tento proces se nazývá exocytóza.



Obr. 1.2 Flavivirová částice, genom VKE a schéma replikačního cyklu VKE (upraveno dle Stiašny *et* Heinz, 2006)

Infekce VKE, její následky a role hostitelské imunity

Krátce po přenesení viru ze sajčího klíštěte do hostitele se místo sání stává důležitým ohniskem pro pomnožení a rozšíření infekce nejen v rámci hostitele, ale i do již dříve zmíněných případných spolusajících klíšťat (Dumpis *et al.*, 1999). V kůži, jakožto primárním místě pomnožení viru, se nabízí několik typů buněk zodpovědných za další distribuci a transport viru do lymfatických uzlin, jsou jimi epidermální Langerhansovy buňky (LC), keratinocyty, kožní makrofágy a neutrofilů migrující do místa sání. Jsou zapotřebí ke spuštění T-buňkami zprostředkované imunitní odpovědi (Austyn, 1992). Buňky protizánětlivé odpovědi tak samy mohou

zvýšit pravděpodobnost setkání viru s vnímavými buňkami, navíc zde hrají svoji roli imunomodulační látky ze slin klíštěte (Wikel *et al.*, 1994), které napomáhají množení viru například potlačením aktivity NK buněk (angl. **natural killers**) a cytokinů. Epidermální LC, jež se řadí do typu dendritických buněk, jsou zřejmě mezi prvními a nejdůležitějšími buňkami při zahájení infekce VKE (Chambers *et al.*, 2003). Hypotézu potvrzují četné nálezy zvýšené exprese hlavního histokompatibilního komplexu antigenů II. třídy (MHCII) CD54 a CD80 na LC (Johnston *et al.*, 1996) při infekci VKE, jež je prezentují T-lymfocytům v lymfatických uzlinách. Tam se virus pomnoží, pronikne do krve a nemoc vstupuje do první klinicky manifestní fáze (Labuda *et al.*, 1996). Během primární virémie dojde k infekci dalších orgánů (slezina, ledviny, srdce) a následuje sekundární virémie. Dostatečné pomnožení viru v lymfatických uzlinách je nezbytné pro vznik virémie, jejíž hladina a doba trvání určují potenciál a průběh invaze CNS a patogenezí (McMinn *et al.*, 1996). Hostitelské faktory ovlivňující průběh nemoci jsou věk, genetická výbava či protilátky po dříve prodělané infekci. Muži jsou častějšími oběťmi nákazy VKE než ženy (Haglund *et al.*, 2003).

Po 6 až 9-ti dnech vstupuje virus do CNS. K tomu je nezbytná vysoká hladina viru v krvi. Schopnost viru invadovat CNS se označuje jako tzv. neuroinvazivita viru. Neurovirulence je schopnost viru se replikovat a způsobit poškození v CNS jak vlastní replikací, tak indukci imuno-patologických reakcí (Mandl, 2005). Viry s nízkou replikační kapacitou v periferních tkáních nemají obvykle ani vysoký neuroinvasivní potenciál bez ohledu na jejich vlastní úroveň neurovirulence (Chambers *et al.*, 2003). V mozku VKE nejdříve napadá neurony, nejdále přetvárá v mozковém kmeni (Xiao *et al.*, 2001). Konečným stádiem infekce neuronů je tzv. degenerativní nekróza. Průvodní patologické změny, jež mohou být nalezeny v napadených buňkách, jsou například vakuolizace, proliferace intracelulárních membrán, chromatolýza, rozklad Nisslovy substance, morfologické změny buněčného jádra, rozpad jaderné obálky a změny v chromatinu (Růžek *et al.*, 2009a). Leze jsou nalézány v šedé kůře, dřeni prodloužené míchy, mozkovém kmeni, mozečku a míše.

Mechanismus přechodu viru přes hematoencefalitickou bariéru není zcela znám. Nabízí se několik možností: a) pasivní difúze nebo transcytóza přes mozkové kapiláry endotelia, b) replikace viru v buňkách endotelu s následným uvolňováním na parenchymatické straně, c) prostup hematoencefalitické bariéry napadením čichového endotelia z krve a následného vstupu do CNS (McMinn, 1997). Některé oblasti v CNS se slabší nebo žádnou hematoencefalitickou bariérou mohou být náchylnější na infekci během virémie, například *plexus choroideus*. Vstup viru do CNS přes malé mozkové kapiláry doprovází vznik perivaskulárních infiltrátů zánětlivých buněk, což je znak typický pro flavivirové encefalitidy (Johnson *et al.*, 1985). Průniku viru do CNS narušenou hematoencefalitickou bariérou napomáhají i buňky vlastní imunity, stres, inhalační anestetika, kortikosteroidy.

U lidí způsobuje VKE již dříve zmíněnou akutní, někdy až smrtelnou encefalomyelitidu, destrukci cévních struktur s místním krvácením, zánět cév. Například infekce kortikální oblasti CNS má za následek potlačené vědomí a záchvaty, poškození vnitřních částí spolu se středním mozkem, mozkovým kmenem a basálními ganglii vede k množství pohybových poruch, jež jsou typickým projevem infekce VKE (Murgod *et al.*, 2001). Rozvoj paralýzy není v korelaci se stupněm závažnosti encefalitidy (Haglund *et al.*, 2003).

VKE v napadených buňkách navozuje apoptózu i nekrózu (Prihod'ko *et al.*, 2002; Růžek *et al.*, 2009a). Apoptózu vyvolává přímé působení vlastních virových povrchových proteinů a proteáz (NS3), interferon- α -závislá signální dráha, aktivace fosfolipázy A₂ a p53-regulované geny (Fazakerley, 2001). Typické změny

v jádře buňky při apoptóze jsou méně často pozorované ve virem-infikovaném neuronu a mohou znamenat specifické aspekty regulace nebo uskutečnění virem-indukované apoptózy neuronů (Griffin *et* Hardwick, 1999).

Jedním z průvodních jevů infekce VKE v mozku je poškození neuronů vlastním obranným mechanismem. Během boje imunity s virem může dojít k vedlejšímu poškození okolních tkání a buněk vinou působení CD8⁺ buněk a jimi produkovaných cytokinů (Růžek *et al.*, 2009b). Zánět vyvolaný flavivirovou infekcí nabývá různé intensity a je důležitý jako ochrana proti smrtelné infekci. V první řadě se infekcí aktivují a prolifерují mikroglie a makroglie (astrocyty), jež stimulují T-buňky s následnou produkcí chemokinů a pro-zánětlivých cytokinů dále ovlivňujících Th1 versus Th2 odpovědi a pronikání monocytů (Dong *et* Benveniste, 2001). Předpokládá se zapojení buněk s Fc receptory (mikroglie, rekrutované makrofágy) a IgG podtřídy protilátek, ale také na protilátkách-závislá buněčná cytotoxicita namířená proti virovému proteinu NS1 nebo dokonce komplementem zprostředkovaná lýza. Avšak je-li hladina cytokinů nadměrně zvýšena jako v případě chemokinu IP-10 indukovaným interferonem- γ , stávají se toxickými i vůči buňkám vlastního těla (Potula *et al.*, 2003).

V některých případech dochází k dlouhotrvajícímu přetrvávání viru v několika málo buňkách. Tyto vystavují virový antigen, avšak jen málo z nich produkuje nové virové částice. Infekce není nutně škodlivá pro hostitele. Virus získaný z trvale infikovaných kultur často podstupuje fenotypické změny jako například zmenšení plaků, termosenzitivitu, snížení rozsahu hostitelů, snížení neurovirulence u myší (Igarashi, 1979). Ošetření dlouhodobě infikovaných buněk neutralizačními protilátkami vede ke snížení produkce infekčních částic (Randolph *et* Hardy, 1988). Flaviviry JEV a dengue typ 2 (DEN2) jsou zřejmě schopné manipulovat apoptické dráhy napadené buňky podle stádia infekce. Krátce po vniknutí do buňky spouští virus expresi lipidové kinázy, fosfatidylinositol 3-kináza (PI3K) a následnou fosforylaci Akt (cílový protein PI3K, dále fosforyluje další substráty), jež chrání buňku před kaspázou-řízenou apoptózou v počáteční fázi infekce, a tím ji udržuje ve stavu příznivém pro replikaci. JEV a DEN2 aktivací PI3K/Akt signální dráhy udržují integritu mitochondrií pomocí Bcl-2, což je zásadní mediátor této dráhy. JEV a DEN2 takto inhibují apoptózu v mnoha typech buněk, jako jsou neurální buňky N18, epitelální A549 a fibroblasty BHK-21. Po namnožení virového materiálu a složení nových virových částic řídí tyto virové molekuly další vlnu apoptické signální dráhy vedoucí tentokrát ke smrti buňky. Aktivace PI3K/Akt cesty je přechodná. Pokles Akt proteinu v JEV a DEN2 infikovaných buňkách během pozdější fáze infekce je pravděpodobně řízen virem aktivované kaspázy. Rovnováha mezi apoptickými a anti-apoptickými signály spouštěné vzájemným působením viru a buňky nejspíš reguluje celkový výsledek flavivirové infekce (Lee *et al.*, 2005). Neurologické následky přetrvávající infekce se projevují sníženým tokem krve v mozku (častěji u mužů), abnormální hustotou signálů v určitých oblastech mozku, zeslabení přenosu nervového signálu a gliózou. Snížení průtoku krve v mozku (rCBF) (angl. reduction of cord blood flow) může být způsobeno kortikální atofií, sníženým metabolismem zdravých neuronů nebo poškozenými neurony. Zánět zřejmě není příčinou dlouhodobého rCBF (Günther *et al.*, 1998), rCBF je téměř ve všech případech spojován s aseptickou meningoencefalitidou. Zhoršování rCBF v dlouhodobém pozorování bylo častější u pacientů s přetrvávajícími symptomy KE 6 týdnů po nástupu nemoci (Haglund *et* Günther, 2003). Příčina prodloužené nemoci způsobené VKE byla přisouzena imunosupresi, vyčerpanosti organismu a odolnosti zralých neuronů k apoptóze (Everett *et* McFadden, 1999).

Retrospektivní studie zkoumající dlouhodobě zdravotní stav lidí po KE ve Stockholmu poukázaly na poměrně dobré výsledky rekonvalescence, přestože je k ní třeba i několik měsíců. Nejčastější symptomy jsou

různé kognitivní problémy, akutní paralýza většiny kraniálních nervů, zrakové a/nebo sluchové defekty, podrážděnost, nervozita, přecitlivělost, poruchy spánku, emoční nestabilita, paměťové a koncentrační poruchy, ztráta čichu, závrať, zhoršená koordinace, třes, Parkinsonova choroba, pocity slabosti, bolest hlavy, fotofobie, únava a bolest končetin. Vyšší věk pozitivně koreloval s délkou hospitalizací a rizikem trvalých následků (Haglund *et al.*, 1996). Navíc byl zaznamenán případ 34-leté ženy, u které se bez jakýkoliv rizikových faktorů k srdečním chorobám vyvinul infarkt myokardu, jež mohl být způsoben zánětem cév doprovázející encefalitudu. I nedostatečná humorální imunita může zhoršit průběh onemocnění (Haglund *et Günther*, 2003).

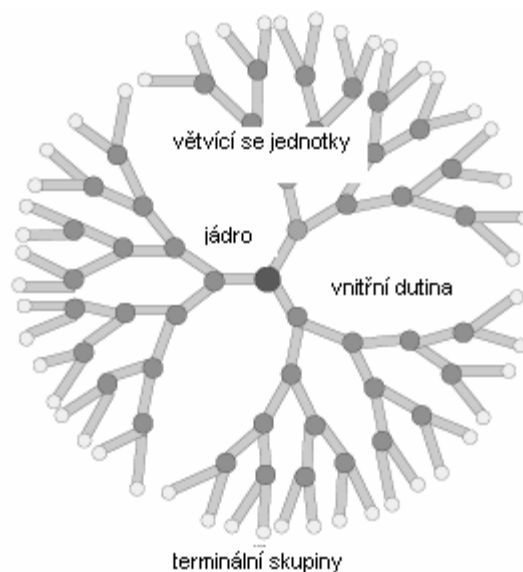
Některé země hlásí vyšší podíl nakažených osob VKE v dětském věku. Nejmladším zaznamenaným pacientem bylo 3-měsíční dítě se sérologicky potvrzenou KE bez následků v dalším sledování (Grubbauer *et al.*, 1992). Několik dětí ve věku do 7 let trpělo vážnějšími následky po podání specifických imunoglobulinů, jež mohly vývoj nemoci negativně ovlivnit (Wahlberg *et al.*, 1989). Smrt 11ti letého chlapce na VKE je jediným publikovaným případem úmrtí na KE u dětí. K fatálnímu výsledku pravděpodobně přispěla operace slepého střeva během první fáze KE.

Izolovat virus z krve se dá pouze v první fázi onemocnění. Později lze detekovat specifické protilátky IgM a IgG metodou ELISA (angl. enzyme-linked immuno-sorbent assay). V krvi též může být detekována virová RNA metodou RT-PCR, ale také pouze v první fázi onemocnění. V mozkomíšním moku bývají protilátky nalezeny pouze v 50% případů, avšak po 10-ti dnech po propuknutí příznaků jsou již téměř trvale měřitelné. U fatálních případů je virus identifikovatelný v CNS například elektronmikroskopicky či RT-PCR. IgM protilátky se v séru vyskytují ještě několik dalších měsíců po infekci, IgG protilátky přetrvávají po celý zbytek života (Holzmann, 2003).

1.2. Dendrimery a potenciální inhibitory replikace VKE

Dendrimery

Dendrimery představují první syntetické makromolekuly s přesně definovanou velikostí a předvídatelnými chemickými vlastnostmi. Poprvé byly vytvořeny počátkem 80.let (Tomalia *et al.*, 1985). Název pochází ze slova *dendron* (řecky: strom) a slova *meros* (řecky: část) (Klajnert *et Bryszewska*, 2001). Z hlediska makromolekulární architektury jsou dendrimery zcela novým typem všestranných polymerů, jejichž složení, velikost a funkce jsou přesně kontrolovány během vzniku. Díky nízké polydisperzitě lze dendrimery přirovnat k vysoce organizovaným biomolekulám typu DNA nebo proteinů. Obecná struktura dendrimeru je znázorněna na obrázku 1.3.



Obr. 1.3 Ukázka dendrimery čtvrté generace (Klajnert *et* Bryszewska, 2001). Generace jsou organizované vrstvy, molekuly jádra reagují s monomery s funkčními skupinami za vzniku první generace dendrimery.

Topologie dendrimery umožňuje použít tyto nanomolekuly pro imitování celé řady funkcí vykazovaných zmíněnými biopolymery. Dendritické struktury je možné najít v přírodě, například na tlapkách gekonů, kde se vyskytují jako dendritická síť chloupků (Boas *et* Heegaard., 2004).

Syntéza a struktura dendrimery, PAMAM dendrimery

Dendrimery mohou být syntetizovány divergentní nebo konvergentní metodou (Emrick *et* Fréchet., 1999). Základní rozdíl mezi těmito způsoby tvorby dendrimery je, že divergentní metodou dendrimery rostou od multifunkčního jádra, na něž jsou kovalentně připojovány větvící se jednotky k periferii, zatímco konvergentní postup zcela naopak sestavuje dendrimer od jeho koncových skupin směrem dovnitř k jádru. Když jsou rostoucí větve dostatečně velké, jsou navázány na jádro. Druhá metoda byla vyvinuta za účelem nahradit slabší divergentní metodu, jež přinášela problémy v podobě postranních nežádoucích reakcí během syntézy a nekompletních reakcí terminálních skupin, což vedlo ke strukturním defektům.

Prvními syntetizovanými dendrimery byly tzv. PAMAMs (angl. **polyamidoamines**) (Witvrouw *et al.*, 2000). Jádrem je molekula amoniaku, v prostředí s metanolem lze střídáním Michaelovy adice metyl-akrylátu na příslušný diamín (generace 1) a následnou aminolýzou takto vzniklých esterů získat dendrimery až do 10. generace. Každá kompletní reakce dává vzniknout nové generaci dendrimery. Množství povrchových reaktivních míst je s každou generací zdvojen, roste geometrickou řadou. Rozeznáváme dendrimery nižších a vyšších generací. Dendrimery nižších generací (0, 1, 2, 3) jsou asymetrického tvaru a vlastní mnoho otevřených struktur na rozdíl od dendrimery vyšších generací. Jak dendrimer roste a větví se, získává kulovitou formu (Cheng *et al.*, 2008). Směrem k periferii je čím dál tím hustější, až se nakonec uzavře úplně. 4. generace je jakousi přechodnou formou mezi asymetrickými nižšími generacemi (G1-3) a kulovitými vyššími generacemi (G5-7). Dosažením kritického větvícího bodu poklesne náhle rychlost dosavadní reakce a dendrimer nemůže dále růst (Bhalgat *et* Roberts., 2000). Je důležité zmínit, že průměr dendrimery roste lineárně, zatímco koncové funkční skupiny přibývají exponenciálně jako funkce generace (Tomalia., 2005). Takto jsou dnes komerčně

připravovány i poly[propyleneimine] (PPI) dendrimery, jež jsou schopné tvořit komplexy s různými bivalentními kationy kovů, jako jsou Cu, Zn a Ni (Emrick *et Fréchet.*, 1999). Mnohostupňová syntéza dendrimerů vyšších generací vyžaduje značné úsilí, proto zavedla Zimmermannova skupina koncept samo-kompletování (Zimmermann *et al.*, 1996). Stačí k tomu pouze vytvořit klínovou molekulu s nestromečkovým ocasem v takovém uspořádání, že se šest takto tvarovaných podjednotek může samo zkompletovat do válcovitého agregátu s velkou dutinou uprostřed. Podjednotky jsou u sebe drženy vodíkovými můstky a jemně stabilizovány van der Waalovými silami (Emrick *et Fréchet.*, 1999).

Určité úsilí bylo vynaloženo v syntetizování dendrimerů od jejich vnitřků selektivní aktivací vnitřních funkcí, což poukazuje na významnou flexibilitu a rozšíření hranic využití dendrimerů. Nově byly syntetizovány sacharidové, peptidové a biomimetické dendrimery a dendrimery s nukleovými kyselinami (Kim *et Zimmermann.*, 1998).

Náležitě očištěné, konvergentně vytvořené dendrimery jsou dnes pravděpodobně nejvíce precizní syntetické makromolekuly (Tomalia., 2005).

Vlastnosti dendrimerů

Na dendrimery můžeme nahlížet jako na unikátní informační systémy v nanoměřítku. Každá komponenta architektury představuje určitou funkci. Jádro může být považováno za molekulární informační centrum, jehož velikost, tvar, směrovost a multiplicita se promítá prostřednictvím kovalentních vazeb do vnějších vrstev. Typ a velikost interiéru dendrimerů jsou určující pro vzájemné interakce s molekulami z vnějšku (enkapsulace přichozících molekul) a jejich využití v supramolekulárních aplikacích (Klajnert *et Bryszewska*, 2001). Exteriér dendrimerů může kromě poskytování výchozího bodu pro výstavbu další generace vykonávat různé funkce, například kontrolovat vstup a/nebo výstup cizorodé molekuly z/do interiéru dendrimeru, rozpustnost a mísitelnost v různých rozpouštědlech či roztocích podle povahy povrchových skupin dendrimeru. Cizí molekula může být navázána buď do dutiny dendrimeru nebo na jeho povrchové skupiny. Na rozdíl od lineárních řetězců, jež se v roztoku formují do smyček, vytvářejí dendrimery pevně sbalená klubka o podstatně nižší viskozitě (Fréchet., 1994). Jádro, interiéru a exteriér zásadně určují fyzikální a chemické vlastnosti, velikost, tvar a flexibilitu dendrimeru.

V rámci zvyšování funkcí dendrimerů se podařilo na jejich povrchu skloubit dvě tak protichůdné funkce, jako je hydrofobicita a hydrofilita. Spojení lipofilního dendronu benzolového typu a hydrofilního dendronu s karboxylovými funkcemi na povrchu vyústilo ke globulárním strukturám vykazujícím amfifilní charakter (Lhoták., 2005).

Naroubování azobenzenových jednotek na povrch dendrimerů vznikly první světlem přepínatelné dendrimery s využitím v získávání energie (Dirksen *et De Cola.*, 2003).

Využití dendrimerů

Jednou z nejatraktivnějších aplikací dendrimerů v biomedicíně je jejich využití jako antivirových prostředků. Upravené dendrimery tvoří stabilní komplexy s viry nebo buněčnými receptory vyúsťující v přerušení procesu infekce. V následujícím přehledu jsou představeny příklady dendrimerů coby nových a nadějných antivirových léčiv.

Existují dendrimery s určitými funkčními skupinami v povrchové vrstvě, které tvoří komplexy s buněčnými nebo virovými receptory, čímž narušují interakce mezi virem a buňkami. Glykodendrimery jsou dendrimery s mnoha kopiemi sacharidů na povrchu (Rojo *et Delgado.*, 2004). Cukry systému udělují vysokou selektivitu pro interakce s lektinovými receptory. Čtvrtá generace PAMAM dendrimery konjugovaná se sialovou kyselinou (tzv. sialodendrimery) reaguje s hemaglutininem, hlavním povrchovým glykoproteinem viru chřipky A, a tím dokáže inhibovat hemaglutinaci krvinek. Připojení podílu α -sialové kyseliny na povrch dendrimery stupňuje terapeutický efekt a umožňuje dendrimery dosáhnout vyšší aktivity v inhibování například infekce virem chřipky. Virus chřipky A nebo HIV (angl. **human immunodeficiency virus**) vykazují vysoký stupeň mutací vedoucích k významným změnám v glykosylaci proteinů virového obalu. Bohužel ani sialodendrimery nebyly schopné inhibovat všechny kmeny viru chřipky dostupných v pokusech (Landers *et al.*, 2002). Komerčně dostupné a relativně levné mnoho-větvené polymery třetí generace pojmenované Boltorn byly opatřeny 32 manóзовými jednotkami spojenými sukcinylem (BH30sucMan). Tyto glykodendritické struktury se přímo váží na DC-SIGN receptory na dendritických buňkách. DC-SIGN (angl. **dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin**) je transmembránový protein se sacharid-rozeznávající doménou na C-konci. DC-SIGN slouží jako transreceptor během infekce HIV. Je vykazován hlavně dendritickými buňkami na sliznicích. V těchto místech hraje klíčovou roli v rozpoznávání a vychytávání patogena a v následující aktivaci imunitního systému. DC-SIGN váže široké spektrum patogenů: viry HIV-1, HIV-2, simian immunodeficiency virus, Ebola virus, virus hepatitidy C, cytomegalovirus a DEN, bakterie *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori* a *Klebsiella pneumoniae*, kvasinky *Candida albicans*, a parazity *Leishmania* a *Schistosoma*. Nejdůležitější moment procesu nastává během na vápníku závislého rozpoznání DC-SIGN specifickými manózami vyskytujícími se právě na těchto patogenech. Potencionální léky musí působit jako anti-adhezní molekuly, musí zablokovat vazby mezi glykoproteiny patogenů a DC-SIGN. BH30sucMan byl schopen zabránit DC-SIGN zprostředkovanému vstupu viru Ebola do buňky v již nanomolárních koncentracích. Tyto předběžné výsledky navrhuji možné využití glykodendrimery jako nových antivirových léků (Rojo *et Delgado.*, 2004).

Tři PAMAM a dva polylysin dendrimery byly testovány v *in vitro* a *in vivo* pokusech na aktivitu proti virům herpes simplex, typ 1 a 2 (HSV-1, HSV-2). Všechny pět látek účinkovalo proti oběma virům, pokud byly buňky inkubovány s dendrimery před samotnou infekcí. Odlišnosti v účinnosti jednotlivých dendrimery byly zřejmé v okamžiku, kdy byl pokus navržen jinak. Nejúčinnější z pěti dendrimery vykazoval antivirovou aktivitu proti oběma virům i po přidání dendrimery 1 hodinu po infekci. To naznačuje působení dendrimery v počátečních stádiích infekce. Některé z pěti testovaných PAMAM dendrimery podstatně snížily rozsah infekce po intravaginální aplikaci 20 sekund před virem HSV-2 v myším modelu v porovnání s kontrolami, jimž byl podán PBS. Účinnost byla snížena po oddálení aplikace dendrimery na 30 minut po vystavení viru v myších modelech. Nízká účinná koncentrace je v tomto případě velmi důležitá, neboť potencionální místní mikrobicidní léky by byly podávány opakovaně, například před pohlavní stykem jako profylaxe proti sexem přenosným chorobám. Všechny testované dendrimery v tomto směru vykazovaly dobré bezpečnostní vlastnosti v *in vivo* studiích, žádný z dendrimery nebyl toxický pro buňky v koncentracích použitých proti virům (Bourne *et al.*, 2000).

Bylo zjištěno, že polyanionické dendrimery s fenyldikarboxylovou kyselinou (BRI6195) a naftyldisulfonickou kyselinou (BRI2923) inhibují replikaci HIV-1 v lymfocytech již v koncentracích 0,1 až 0,3 $\mu\text{g/ml}$, aniž by byly toxické pro zdravé buňky. Obě látky úspěšně blokovaly rekombinantní virový glykoprotein gp120, jímž se HIV váže na lymfocyty. Replikaci bylo možno zastavit, pouze pokud byly dendrimery přidány

v době infikování. Ze studií vyplynulo, že jediná složka BRI2923 pronikla do buněk. Po ošetření viru těmito látkami byly objeveny rezistentní kmeny s mutacemi v gp120 genu (Witvrouw *et al.*, 2000).

Přes veškeré úspěchy mnohých dendrimerů je třeba mít na paměti, že v některých příkladech se jedná o viry využívající oproti VKE zcela jiný proces vstupu do buňky.

Nyní již existuje více než padesát rodin dendrimerů, každá s jedinečnými vlastnostmi a potenciálem pro užití. V Data International Inc. (U.S.A.) zavedli novou metodu kardiální diagnostiky *in vitro* pomocí dendrimerů. Proteiny z krevního vzorku se vážou na imunoglobuliny, které jsou upevněné dendrimery na skleněné ploše. Výsledek ukazuje, zda je srdeční sval poškozen či nikoliv. Tato metoda podstatně urychlila výsledky krevních testů ze 40-ti na pouhých 8 minut. Komplexy dendrimerů a protilátek také výrazně zlepšily přesnost a citlivost testu.

Předběžné testy potvrdily výhody dendrimerů jako kontrastních látek pro magnetickou rezonanci (MRI) (Bryant *et al.*, 1999). Kontrastní látky zlepšují citlivost a přesnost MRI, běžně je používána sůl gadolinia, ale kvůli své nízké molekulární hmotnosti proniká do externích oblastí mimo pozorované tkáně a orgány. Dendrimery s gadoliniovými ionty na povrchu jsou silnými kontrastními činidly zlepšujícími vizualizaci orgánů během MRI. Navíc vysoko-generační dendrimery vydrží v krevním řečišti déle a méně pronikají do okolních tkání, což dále zvyšuje efektivnost kontrastních látek (Kim *et Zimmermann*, 1998).

Ve farmaceutickém průmyslu je snaha o využití dendrimerů pro cílené doručování původně toxických či ve vodě špatně rozpustných léků v organismu (Twyman *et al.*, 1999), jako například proti-nádorový lék 5-fluorouracil (Zhuo *et al.*, 1999) a neutronová záchytová terapie (Backer *et al.*, 2005).

Hřebenovité dendrimery indukují tvorbu NK buněk a specifických protilátek nezbytných k eliminaci nádorových buněk. Bylo identifikováno množství s nádorem asociovaných povrchových sacharidových antigenů, například Tn-antigen, jež jsou nadměrně vystavovány na maligních buňkách. Glykodendrimery nesoucí shluky Tn-antigenů byly testovány jako inhibitory rakoviny s pomocí rostlinných a živočišných lektinů. Endogenní savčí lektiny jsou důležité proteiny pro potencionální *in vivo* aplikace hřebenovitých dendrimerů. Tyto receptory by mohly být zodpovědné za léčebné účinky glykodendrimerů díky jejich schopnosti aktivovat buňky imunitního systému. Jinými slovy, navážeme-li na dendritické nosiče lektiny, jež aktivují imunitní systém, a Tn antigen, získáme teoreticky vakcínu proti určitým typům rakoviny (Vepřek *et al.*, 2005).

Dendrimery coby vektory mohou sloužit účelům genové terapie. Testovány byly zatím PAMAM dendrimery jako přenašeči genetického materiálu. Dendrimery jsou schopné reagovat na základě elektrostatického náboje s nukleovými kyselinami, protože jejich povrch je pokryt primárními amino skupinami, jež působí na fosfátové skupiny nukleových kyselin. Dendrimery mohou být využívány pro doručování antisense oligonukleotidů a plasmidových vektorů kódujících antisense mRNA (Bielinska *et al.*, 1996). Reagencie s aktivovanými dendrimery jsou již dostupné na trhu pod názvem SuperFectTM. Výhodou používání dendrimerů coby vektorů je, že oproti doposud užívaným virovým a liposomovým vektorům mohou nést větší množství genetického materiálu. Jsou vysoce stabilní a spolehlivěji doručují DNA do jádra než liposomy. Předpokládá se, že dendrimery vděčí za tyto vynikající doručovatelské vlastnosti kromě pevně daného tvaru především nízkému pK aminů (3,9 a 6,9), které jim umožňuje vyrovnávat pH změny v kompartmentech endosomu (Haensler *et Szoka.*, 1993).

Vedle biomedicínských aplikací mohou dendrimery zlepšit mnoho průmyslových procesů. Kombinace velkého povrchu a dobré rozpustnosti dělá z dendrimerů výborné katalyzátory (Knapen *et al.*, 2002).

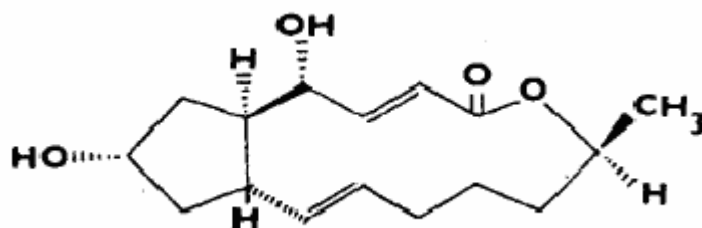
Alternativní využití možná čeká dendrimery v oblasti industriálních vlivů na životní prostředí. Dendrimery mohou uzavřít nerozpustné látky jako jsou kovy a transportovat je v sobě do prostředí, kde již bude možné je rozpustit.

POPAM (**polypropylenamin**) dendrimery s *meta*-azobenzenovými jednotkami byly úspěšně použité v holografických materiálech.

V neposlední řadě je možné na povrch dendrimerů navázat tzv. Hamiltonův receptor. Tento receptor je schopen silně vázat barbituráty a jejich deriváty pomocí vodíkových můstků. Z toho vyplývá další využití dendrimerů jako supramolekulárních senzorů pro barbituráty (Dirksen *et De Cola.*, 2003).

Brefeldin A

Brefeldin A (BFA) je makro-cyklický lakton syntetizovaný z palmitu mnoha houbovitými organismy. Jeho struktura je vyobrazena na obrázku 1.4 (Betina., 1992). Je možné ho najít pod názvy: decumbin, cyanein, ascotoxin a synergisidin.



Obr. 1.4 Struktura BFA (Betina., 1992).

Původně byl izolován a charakterizován jako antibiotikum, antivirotikum a jako fungicid, záhy však byly objeveny jeho inhibiční účinky na sekreci proteinů. BFA zabráňuje exportu intracelulárních proteinů především působením na GA v živočišných buňkách a způsobuje přerozdělení proteinů z GA do ER. U rostlin například potlačuje klíčení pšenice a růst kořínků cibule. Studium vlivu BFA na růst kořenů bobu obecného (*Vicia faba*) ho charakterizovalo jako inhibitor profáze, jehož účinky jsou u rostlin reversibilní. Pokusy s HeLa buňkami ukázaly kompletní inhibici proteinové syntézy v přítomnosti BFA během prvních 24h. Antibiotikum vykazuje toxicitu na několika typech lidských nádorových buněk. U myši byl BFA schopen potlačit růst Krebsova ascitického karcinomu. Tyto výsledky podnítily testování BFA coby proti-rakovinového antibiotika. Antivirové účinky BFA byly pozorovány u HSV, viru newcastleské choroby drůbeže, viru vesikulární stomatitidy (VSV) a infekce virem Sindbis (Betina., 1992). Konkrétněji, při infekci VSV zastavil BFA transport virového obalového glykoproteinu G k plazmatické membráně. Vzrůstající počet zvířecích virů vykazuje stejnou citlivost k BFA jako VSV. I přes dvouhodinovou prodlevu mezi vstupem viru a podáním BFA je možné zaznamenat podstatnou redukci syntézy virových proteinů (Irurzun *et al.*, 1993). Proti HIV, ovšem, neprokázal BFA žádnou aktivitu. BFA v různých směrech ovlivňuje biosyntézu DNA, RNA a proteinů v rozličných typech buněk. Jeho nejvýznamnější funkce tlumiče vnitrobuněčné sekrece proteinů v ER, jež přímo zasahuje do skladby GA, nijak nepostihuje proteinovou syntézu mimo ER (Betina., 1992). Příčinou přerušení toku váčků do GA a rozpadu GA po podání BFA je jeho vliv na ADP-ribosylační faktory (Mackenzie *et Westaway.*, 2001).

Rozsah BFA inhibice se liší mezi různými buněčnými liniemi. Například, BFA o koncentraci 1µg/ml zcela zablokoval vylučování proteinů v krysích jaterních buňkách, aniž by jakkoliv ovlivnil syntézu proteinů. Stejná koncentrace BFA mírně podporuje proteinovou syntézu v myších erytro-leukemických buňkách. Zvýšíme-li koncentraci BFA na 10µg/ml, zaznamenáme u krysích hepatocytů 26% inhibici proteinové syntézy. Různé buňky mohou být různě citlivé na BFA. Předpokládá se, že BFA posunuje rovnováhu mezi časnými (anterográdní) a pozdějšími stupni (retrográdní) transportní dráhy mezi ER a GA potlačováním časného stupně a zvyšováním pozdějšího stupně. Akumulace proteinů z GA v ER ovlivňuje syntézu proteinů vlastních ER (Fishman *et Curran.*, 1992). Výzkum viru dětské obrny signalizuje, že pro zformování funkčních RNA replikačních komplexů je nezbytný neporušený vesikulární systém. To platí pro viry s pozitivní i negativní RNA. V souvislosti s těmito výsledky bylo zjištěno, že BFA zasahuje do glykosylace proteinů. Buněčné i virové glykoproteiny musí putovat skrz vesikulární systém, aby byly správně glykosylovány, což je proces blokován BFA (Irurzun *et al.*, 1993).

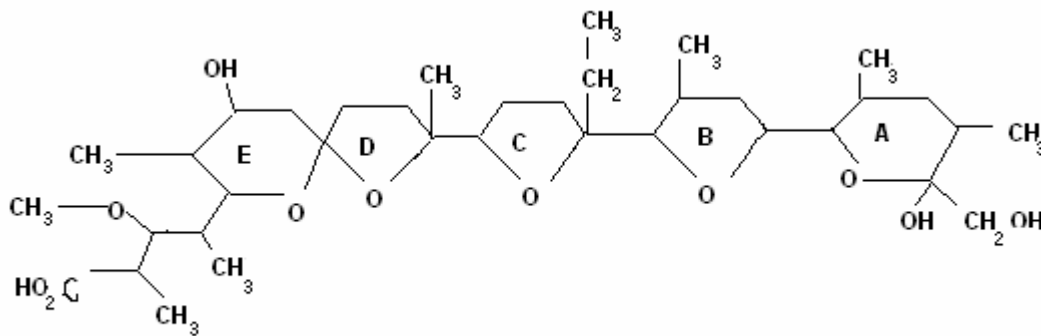
Typické změny v buňkách ošetřených BFA jsou morfologicky pozměněné mitochondrie, váčky glykogenu a kompletní rozklad GA. Právě nepřítomnost nepoškozeného GA v BFA léčených buňkách je pravděpodobně příčinou nesprávného nebo žádného skládání virových glykoproteinů. Úplného zhroucení GA a podstatné redukce virového titru viru horečky západního Nilu (WNV) až o 4 řády bylo dosaženo pouhým 1µg/ml BFA netoxickým v buňkách opičích ledvin (Vero buňky). Avšak ani 10µg/ml BFA nijak zvlášť neovlivnilo utváření virových glykoproteinů WNV ani produkci infekčních částic v buňkách komárů (C6/36 buňky). To může být způsobeno buď odlišnou virovou replikací v savčích a komářích buňkách nebo jiným potenciálem BFA v těchto rozdílných buněčných liniích. Na rozdíl od Vero buněk, komářích buňky si i po ošetření BFA ponechaly nepoškozený GA a virové glykoproteiny normálně dozrály. Ostatní flavivirové proteiny NS3 a NS5, jež nejsou glykosylovány, byly syntetizovány, z čehož vyplývá, že BFA neovlivňuje počáteční transkripci ani translaci, ale kompletování a uvolňování infekčních virových částic zabráněním inkorporace manózy do virových glykoproteinů E a prM (Sreenivasan *et al.*, 1993).

BFA byl schopen potlačit infekci JEV v buňkách prasečích ledvin (PS buňky) (angl. porcine kidney stable). Pozoruhodné je, že BFA nikterak neovlivnil presentaci virového antigenu, zaznamenaný byl pouze pokles v hemaglutinační aktivitě (Lad *et Gupta.*, 2002).

V rámci hledání shromažďovacího místa pro flavivirové proteiny v buňce byl objeven inhibiční vliv BFA na vylučování infekčních částic Kunjin viru (KUN) v pozdější fázi infekce. Místo skládání virových proteinů do zralých částic se pravděpodobně nachází v lumen drsného ER. Pokus dále odhalil, že k tomu, aby virové částice úspěšně dozrály, musí každý virion z ER projít v individuálním váčku do GA, a touto cestou dozrává. Podle výsledků z imunoflorescenční mikroskopie nemá BFA významný vliv na rozdělení virového E proteinu v buňce, ale barvení GA ukázalo na značné rozptýlení této organely v přítomnosti BFA. Inkubací infikovaných buněk s BFA bylo zredukováno množství všech vylučovaných strukturálních proteinů pod hranici detekčního limitu (Mackenzie *et Westaway*, 2001).

Monensin

Monensin (MON), jehož struktura je zobrazena na obrázku č.1.5 (Pinkerton *et* Steinrauf., 1970) je jednomocné, karboxylové, ionoforní, polyéterové antibiotikum produkované *Streptomyces cinnamomnensis* komerčně dostupné jako sodná sůl. Navenek je molekula MON neutrální. Jediné síly držící více molekul MON pohromadě, jsou vodíkové můstky a van der Waalsovy interakce. Exteriér MON je silně hydrofobní, dobře se rozpustí v organických rozpouštědlech (aceton, alkohol). Jedna z nejpozoruhodnějších vlastností MON je jeho schopnost tvořit s určitými jednomocnými ionty kovů komplexy rozpustné v organických rozpouštědlech a schopnost těchto komplexů přecházet lipidovou membránou buněk (Pinkerton *et* Steinrauf., 1970). Hojně se používá ve veterinární medicíně proti kokcidiím u drůbeže a jako stimulant růstu u dobytka.



Obr. 1.5 Struktura MON (Pinkerton *et* Steinrauf., 1970).

Mimo tyto účinky MON zasahuje do iontového transportního systému prokaryotních i eukaryotních buněk. Vzhledem ke snadnému vstřebání je MON poměrně toxický nejen pro cílené mikroby, ale i pro savčí a ptačí buňky. MON může způsobovat vážná poškození nervových buněk kuřat. Mechanismus poškození spočívá ve snižování membránového potenciálu, tvorbě kyslíkových radikálů a aktivaci řetězových reakcí lipidové peroxidace. V konečném výsledku indukuje MON nekrózu nervových buněk. Součástí klinických pokusů je antioxydant (IRFI-042), jež by mohl hrát významnou úlohu ve snižování neurotoxicity MON (Calò *et al.*, 2008).

MON vyloučený zvířaty do prostředí je docela stálý v podmínkách napodobující přírodní podmínky. Ve vodě je jeho poločas rozpadu přibližně 20 až 25 dní. V povrchových vodách je koncentrace MON nejvyšší (asi 1,17 µg/l), ale není škodlivá (McGregor *et al.*, 2007).

MON byl testován jako inhibitor replikace KUN. Zjistilo se, že MON podstatně snižuje produkci viru infikovanými buňkami. Přidání MON v pozdější fázi infekce sice nezabránilo vylučování virových částic z buněk, ty avšak stále obsahovaly prM protein, jež by měl být správně štěpen na M protein. MON zvyšuje pH uvnitř endosomu. Nicméně furin pro svoji činnost potřebuje pH nižší. Předpokládá se, že MON účinkuje na úrovni GA a nepouští nedozrálé virové částice do trans-GA. Působením MON se GA zahušťuje a soustřeďuje se blíže k jádru, také rozložení E proteinu se koncentruje do této oblasti. V lyzátech buněk ošetřených MON byl nalezen nezralý Ci prekursor C proteinu a prM, z čehož vyplývá, že MON zásadně ovlivňuje zpracování prM a Ci. Nedostatečné štípání prekursorů je nejspíš příčinou redukce virového titru zablokováním konformačních změn nezbytných k odhalení virové nukleové kyseliny a fúze s endosomem po infekci (Mackenzie *et* Westaway., 2001).

2. Cíle práce

- Vypracovat kritickou literární rešerši zaměřenou na možnosti využití virostatických látek vůči flavivirům.
- Testovat inhibiční efekt vybraných glykodendrimerů na replikaci viru klíšťové encefalitidy v podmínkách *in vitro*.
- Testovat inhibiční efekt vybraných inhibitorů na replikaci viru klíšťové encefalitidy v podmínkách *in vitro*.

V mé bakalářské práci se soustředím na testování potenciálních léčiv, jež by pomohla pacientům postiženým virem klíšťové encefalitidy se rychleji zotavit či předejít trvalým následkům provázející tuto nemoc. V současnosti není známá protivirová léčba, pouze očkování.

3. Materiál a metody

3.1. Viry

Kmen Vasilchenko je zástupcem sibiřského sudtypu VKE. Byl izolován z pacienta prodávajícího inaparentní encefalitidu, z níž se pacient posléze kompletně zotavil. Kmen Vasilchenko se vyznačuje nižší virulencí u primátů a křečků (Gritsun *et al.*, 1993).

Kmen Hypr je vysoce neuroinvasivní kmen VKE s dlouhou historií laboratorních pasáží v mozcích sajících myšek. Byl izolován z krve 10-ti letého dítěte nakaženého VKE na Moravě v tehdejší Československu roku 1953. Hypr vykazuje podstatně virulentnější fenotyp v myších modelech oproti typovému kmeni VKE evropského subtypu Neudoerfl. Jeho genomová sekvence je uložena v GenBank databázi pod přístupovým číslem U39292 (Wallner *et al.*, 1996).

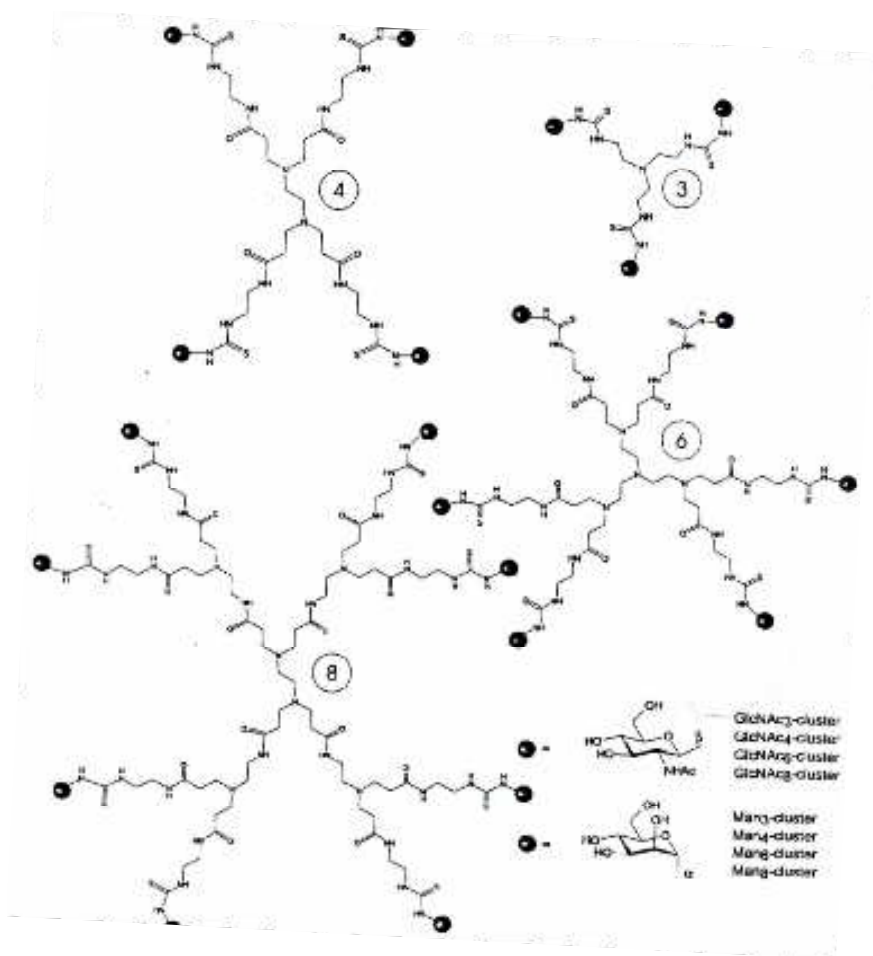
3.2. Buněčné linie

Buněčné linie PS (Kožuch *et Mayer.*, 1975) byly kultivovány v médiu L15 (Leibowitz) (Sigma) s přidavkem 3 % prekolostrálního telecího séra (PTS), 1 % antibiotik a antimykotik (ATB) (Sigma; penicilin, streptomycin, amphotericin B) a 1 % glutaminu při 37 °C.

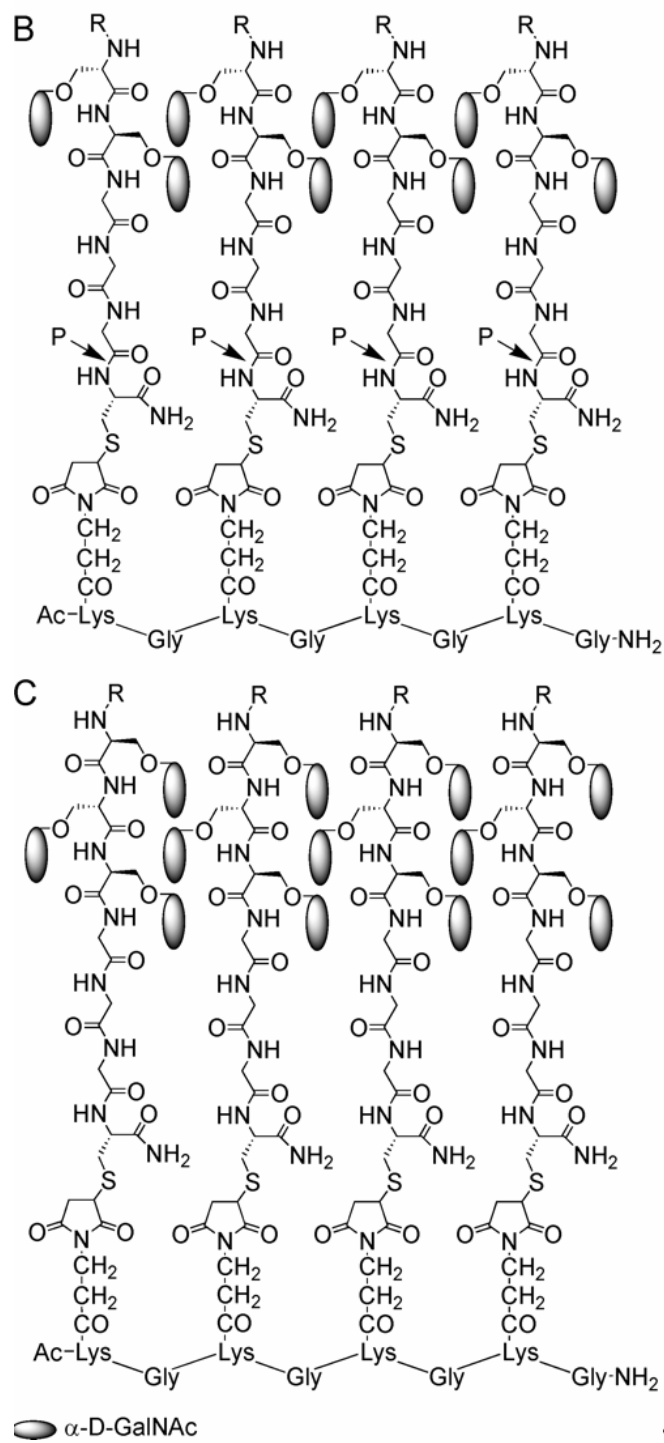
Buněčné linie neuroblastů jsou transformované, z nervového hřebenu odvozené buňky schopné neomezené proliferace *in vitro*. Získávají se z neuroblastomů, druhými nejčastějšími nádory u dětí. Tyto buňky si ponechaly schopnost diferenciaci na typy nervových buněk podle ošetřujícího činidla (Shastri *et al.*, 2001). Linie neuroblastů UFK-NB4 byly kultivovány v médiu IMDM s přidavkem 10 % fetálního bovinního séra (BOFES), antibiotiky (ATB) a glutaminu při 37 °C.

3.3. Inhibitory a dendrimery

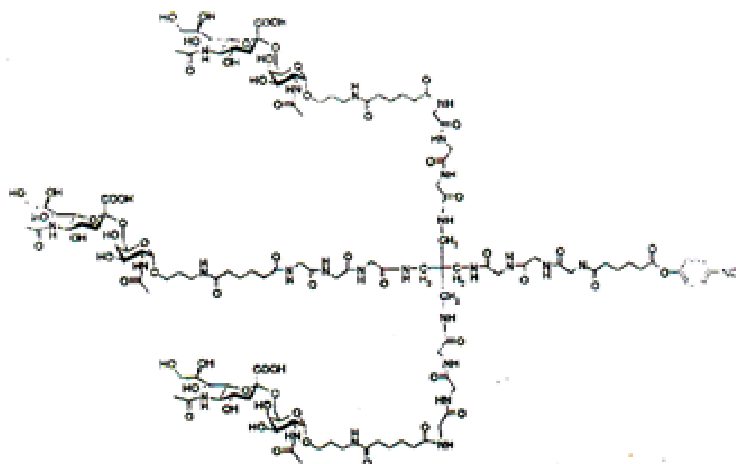
PAMAM dendrimery byly laskavě poskytnuty prof. Bezouškou z Přírodovědecké fakulty UK v Praze v zásobní koncentraci 0,1 mmol/l. Jejich struktury jsou znázorněny na obrázcích 3.1 – 3.4. Pro pokusy byly dendrimery ředěny v příslušném médiu na koncentraci 0,001 mmol/l, výjimečně jen na 0,01 mmol/l. BFA a MON byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich v zásobní koncentraci BFA 10 mg/ml a MON 0,1 M již rozpuštěný v DMSO. Pro pokusy byly použity koncentrace BFA 0,5; 0,05; 0,005 a 0,0005 µg/ml a MON: 1; 0,1; 0,01 a 0,001 µM.



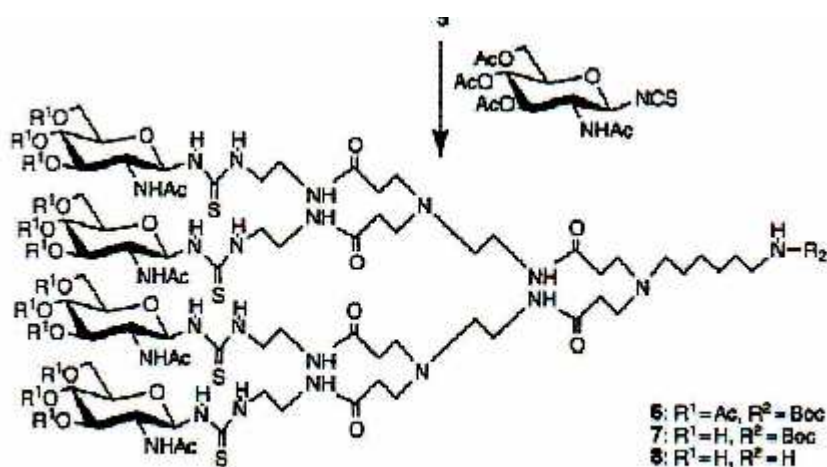
Obr. 3.1 Struktura hřebenových GalNAc dendrimerů.



Obr. 3.2 Struktura α -GalNAc hřebenových dendrimerů.



Obr. 3.3 Struktura SiaTn trojnásobného dendrimery LECTINITY



Obr 3.4 Struktura manosového oktadendrimery PAMAM.

Obrázky laskavě poskytl Prof. Bezouška, PšF UK v Praze.

3.4. Testování dendrimery

V rámci testování dendrimery byly provedeny orientační testy jejich cytotoxicity na PS buňky. Dendrimery byly naředěny ve 2x koncentrovaném médiu. K PS buňkám ve stavu plné konfluency v 24-jamkovém panelu bylo po odstranění původního média přidáno množství roztoku vždy 0,5 ml/jamku skládajícího se z 2x koncentrovaného kultivačního média, 1,5 % karboxymethylcelulózy (CMC) a příslušných dendrimery v koncentraci 0,01 mmol/l. Do kontrolních jamek byl přidán pouze roztok 2x koncentrovaného kultivačního média a CMC bez dendrimery. Po 3 dnech byla stanovena cytotoxicita dendrimery na PS buňky zkoumáním morfologických změn na buňkách pod mikroskopem a vitalita buněk byla orientačně zjišťována po obarvení naftalenovou černí.

Vybrané typy dendrimery byly testovány na jejich potenciální inhibici replikace VKE/vazby VKE k buněčnému receptoru ve 24-jamkových panelech s PS buňkami po dosažení konfluency (cca $2,5 \times 10^5$ buněk/jamku). Kultivační médium bylo odebráno a do každé jamky kromě kontrolních bylo přidáno po 1 ml roztoku téhož média s určitými dendrimery. V této fázi tzv. preinkubace se panely ponechaly 1 h při pokojové

teplotě. Následně byl obsah jamek opět odebrán, tentokrát i z jamek určených pro kontrolu (virus). Do jamek pro dendrimery byl přidán roztok média, příslušných dendrimerů o koncentraci 10^{-3} mmol/l a viru Vasilchenko o určitém titru $10^3;10^2$ nebo 10^1 pfu/ml. Kmen Vasilchenko byl pro tento pokus vybrán z důvodu jeho nižší virulence a tudíž i potenciálně vyšší citlivosti k účinku inhibitorů. Roztok pro kontrolu sestával jen z média a viru o titrech $10^3;10^2$ nebo 10^1 pfu/ml, vše v množství 1 ml/jamku. Buňky byly inkubovány při $37\text{ }^\circ\text{C}$ v atmosféře 0,5 % CO_2 po dobu 1 h. Po 1 h inkubace byl obsah jamek odebrán, buňky byly promyty sterilním PBS (0,5 ml/jamku) a převrstveny roztokem pro pokrývku, jež se skládala se z 2x koncentrovaného kultivačního média a CMC v poměru 1:1 a z příslušných dendrimerů. Následně byly panely uloženy do $37\text{ }^\circ\text{C}$ teploty a atmosféry s 0,5 % CO_2 na 3 až 4 dny. Po obarvení naftalenovou černí (1 g naftalenové černě, 60 ml ledové kyseliny octové, 13,6 g octanu sodného, doplněno do 1 l vody) bylo možné spočítat vytvořené plaky a jejich počet byl porovnán s kontrolním vzorkem (pouze virus).

3.5. Testování inhibitorů BFA a MON

Jelikož oba inhibitory způsobují uvnitř buněk narušení jejich integrity, bylo nezbytné orientačně určit necytotoxickou koncentraci. Pokusy byly prováděny v triplicaci, navíc se testovaly toxické účinky rozpouštědla dimethylsulfoxidu (DMSO) pro MON. DMSO je pro buňky toxické v koncentraci vyšší než 1 %. V našem případě koncentrace DMSO v experimentech činila pouze 0,001 %. Pro test na cytotoxicitu byly opět použity 24-jamkové panely s narostlými PS buňkami ve stavu plné konfluence. Jamky byly propláchnuty 0,5 ml/jamku sterilního PBS. Poté bylo do všech jamek (kromě 3 kontrolních s PS buňkami) přidáno po 250 μl 2x koncentrovaného kultivačního média. Inhibitory a DMSO byly v jamkách opatrně ředěny desítkovou ředící řadou. Na závěr byly buňky převrstveny 250 μl CMC a uloženy do termostatu o teplotě $37\text{ }^\circ\text{C}$, 0,5 % CO_2 . Kontrolní jamky obsahovaly 2x koncentrované médium a CMC v poměru 1:1 a v množství 0,5 ml/jamku. Panely byly obarveny 2. nebo 3. den po inkubaci.

Pro testování inhibičních účinků BFA a MON na replikaci VKE byly použity 96-jamkové panely. Neuroblasty byly infikovány kmenem Hypr v dávce 1 moi (multiplicita infekce). Množství buněk na jamku činilo cca 10^6 buněk. Za 24 h byl do všech jamek kromě 3 kontrolních s buňkami přidán virus a panel byl 1,5 h inkubován při teplotě $37\text{ }^\circ\text{C}$ a atmosférou s 0,5 % CO_2 . Následovalo odstranění inokula a promytí všech jamek 200 μl PBS/jamku. Do jamek pro kontrolu s virem i se samotnými buňkami bylo přidáno po 200 μl jamku kultivačního média IMDM. Zbylé jamky byly naplněny roztoky s různými koncentracemi inhibitorů. Vzorky byly odebírány vždy v triplicaci po 24 h, další po 48 h. Vzorky byly uchovány při teplotě $-70\text{ }^\circ\text{C}$. Pro vyhodnocení účinků inhibitorů na replikaci VKE byla provedena metoda plakové titrace (de Madrid *et* Porterfield., 1969). Vzorky byly desítkově naředěny ve 24-jamkových panelech v médiu L15. Do každé jamky bylo přidáno 300 μl buněčné suspenze o koncentraci $1,2 \times 10^5$ buněk/jamku a obsah byl řádně promíchán. Poté byly panely 4 h inkubovány $37\text{ }^\circ\text{C}$ a prostředím o 0,5 % CO_2 . Nakonec byl obsah jamek převrstven roztokem 2x koncentrovaného média a CMC v poměru 1:1 a v množství 400 μl jamku. Po 4 až 6 dnech byly panely obarveny naftalenovou černí (viz výše) a byl zjištěn titr viru. Rozdíly mezi titry v kontrolních jamkách s virem a v jamkách s inhibitory byly zaneseny do grafů (viz výsledky).

4. Vyhodnocování výsledků

Výsledky byly statisticky hodnoceny v programu Statistica (verze 8) nezávislou analýzou dat podle skupin, což je jednostranný nepárový Studentův T-test. Výsledky s nižší hladinou významnosti než 5 % ($p < 0,05$) jsou považovány za signifikantní a jsou v grafech označeny hvězdičkou. V případě vzorků s menším množstvím opakování byly tyto výsledky vyhodnoceny neparametrickým Mann-Whitney U-testem.

5. Výsledky

5.1. Cytotoxicita dendrimerů

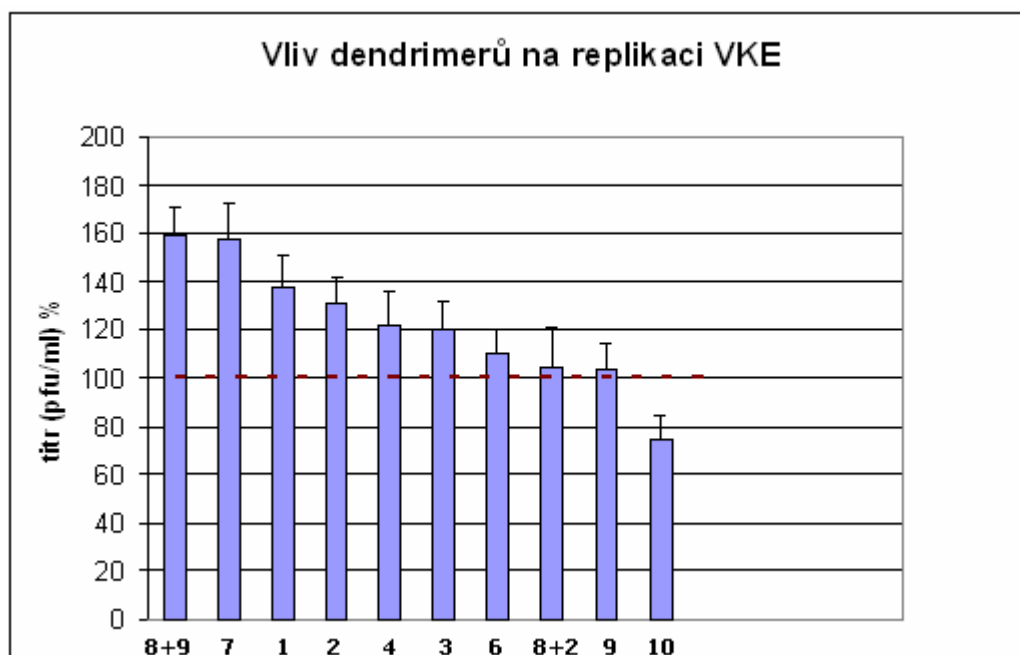
Na základě našeho hrubého, orientačního testu bylo zjištěno, že žádný z testovaných dendrimerů ani jejich směsí se nezdá být v daných koncentracích cytotoxický pro PS buňky. Po 3 dnech inkubace PS buněk s dendrimery o koncentraci 0,01 mmol/l nebyly ve světelném mikroskopu pozorovány žádné změny ve struktuře buněk, po obarvení naftalenovou černí nebyly pozorovány žádné rozdíly v porovnání s kontrolními jamkami.

Souhr všech dendrimerů a jejich směsí, že byly testovány, jsou uvedeny pod obrázkem 4.1.

5.2. Vliv dendrimerů na replikaci VKE *in vitro*

Pro testování potenciačního účinku dendrimerů na replikaci VKE byly dendrimery ředěny z původní koncentrace 0,1 na 0,001 mmol/l. V jednom z pokusů byla použita koncentrace dendrimerů 0,01 mmol/l. Virus Vasilchenko byl v pokusech použit o titru 10^3 ; 10^2 a 10^1 pfu/ml.

Žádný z testovaných dendrimerů ani jejich směsí nebyl v inhibici replikace VKE v kultuře PS buněk signifikatně úspěšný.



Obr. 5.1 Vliv dendrimerů na replikaci VKE (----- 100% kontrola)

Pozn.: 8+9 = Hřebenový alfa-GalNAc dendrimer 10 + Hřebenový alfa-GalNAc dendrimer 11

7 = Hřebenový alfa-GalNAc dendrimer 9

1 = Manosový oktadendrimer PAMAM

2 = GlcNAc tetradendrimer PAMAM

4 = GlcNAc oktadendrimer PAMAM

3 = GlcNAc hexadendrimer PAMAM

6 = GlcNAc oktadendrimer, "koště"

8+2 = Hřebenový alfa-GalNAc dendrimer 10 + GlcNAc tetradendrimer PAMAM

9 = Hřebenový alfa-GalNAc dendrimer 11

5.3. Cytotoxicita DMSO, BFA a MON

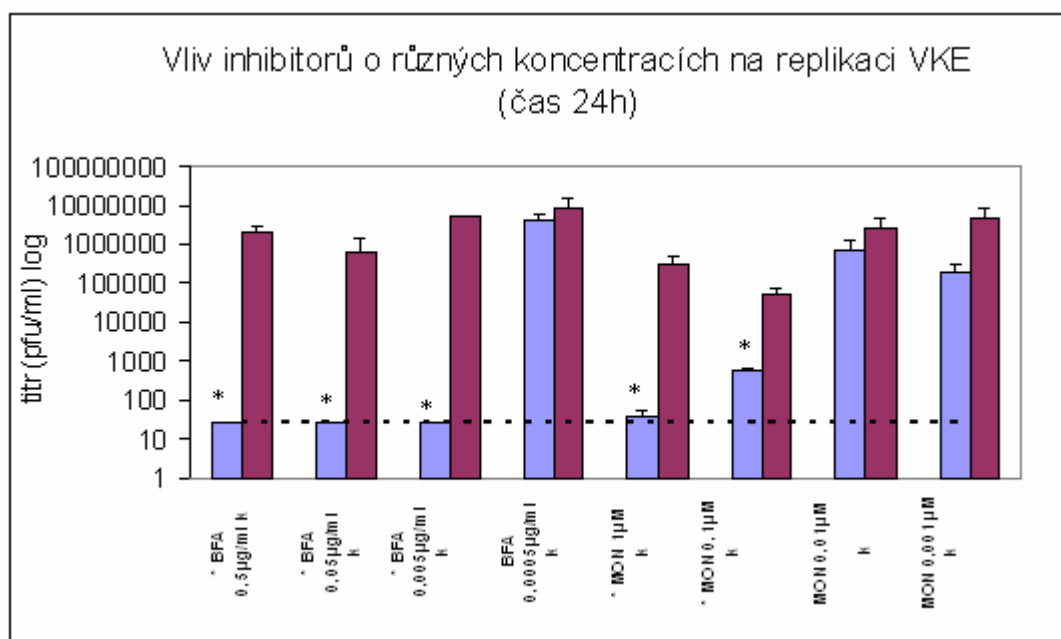
Cílem testů bylo určit, jaká koncentrace inhibitorů je ještě účinná v inhibování VKE a přitom již není cytotoxická na PS buňky. V případě DMSO nebyla pozorována žádná cytotoxicita v nejvyšší použité koncentraci 0,001 %.

U inhibitorů BFA a MON byla situace jiná. BFA vykazoval toxicitu vůči PS buňkám v koncentracích 5; 0,5 a 0,05 $\mu\text{g/ml}$. Až při ředění na koncentrace 0,005 $\mu\text{g/ml}$ a nižší nebyla již cytotoxicita pozorována. MON se od začátku jevil méně cytotoxický a testy to potvrdily. Pouze v nejvyšší koncentraci byla pozorována jemná odchylka od kontrolních buněk a to v koncentraci 1 μM . 0,1 μM ; 0,01 a 0,001 μM MON byl pro buňky netoxický.

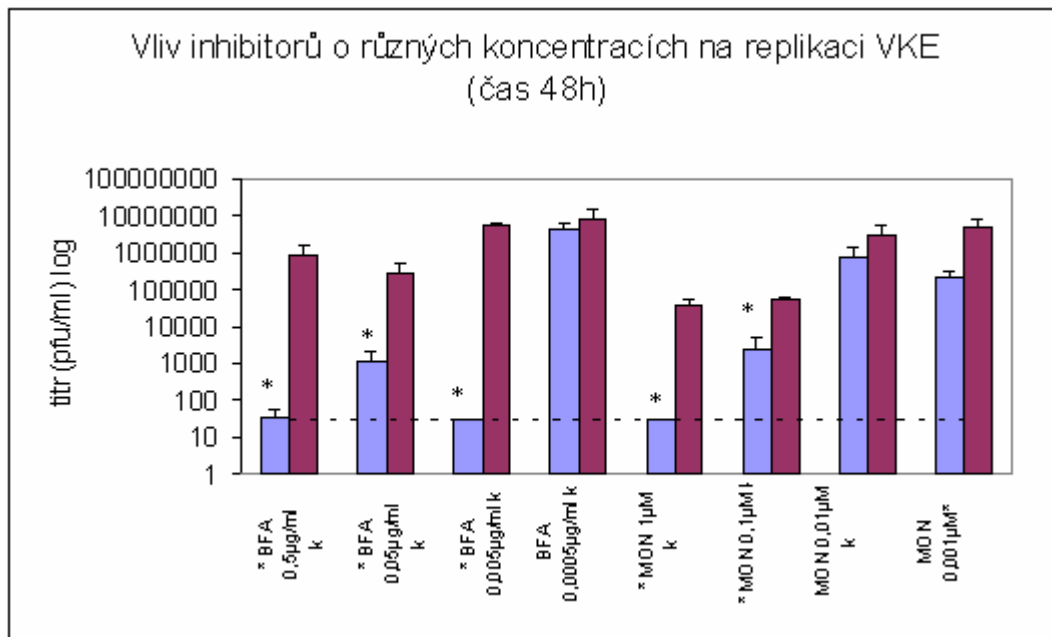
5.4. Vliv BFA a MON na replikaci VKE *in vitro*

BFA i MON prokázaly v několika pokusech podstatnou inhibici replikace VKE. Grafy znázorňují tyto výsledky a statisticky průkazná inhibice je označena hvězdičkou.

Koncentrace inhibitorů: BFA: 0,5; 0,05; 0,005 a 0,0005 $\mu\text{g/ml}$. MON: 1; 0,1; 0,01 a 0,001 μM .



Obr. 5.2 Vliv inhibitorů BFA a MON na replikaci VKE po 24 h inkubace v neuroblastech. (* $p < 0,05$) (----- spodní detekční limit).



Obr. 5.3 Vliv inhibitorů BFA a MON na replikaci VKE po 48 h inkubace v neuroblastech. (* $p < 0,05$)
(----- spodní detekční limit).

6. Diskuse

Existující antivirotika účinkují na různých úrovních replikačního procesu virů. Například je možné virové infekci zabránit ještě před proniknutím do buňky zablokováním specifických buněčných receptorů. Toho lze dosáhnout působením specifických vazebných inhibitorů, včetně monoklonálních protilátek, které interagují s ligandy na povrchu virové částice a brání tak jejich vazbě k buněčnému receptoru. Tímto způsobem bylo možno zablokovat infekci buněk respiračním syncyciálním virem (RSV), kdy vazbě viru k receptoru bylo zabráněno působením specifických IgG1 monoklonálních protilátek (Anderson *et al.*, 1988; Calvez *et al.*, 2004; Marlin *et al.*, 1990). V naší studii jsme se zaměřili na studium potenciální inhibice vazby VKE na receptory PS buněk a následné infekce působením glykodendrimerů. Vycházeli jsme z pozorování, že virový obalový protein E je glykosylovaný (Mandl *et al.*, 2001; Mandl, 2005). V experimentech Rojo *et Delgado.*, 2004 byl vstup viru Ebola do buněk zablokován specifickými glykodendrimery v počáteční fázi infekce. Obalové proteiny tohoto viru jsou také glykosylovány. Avšak role glykosylace v biologických vlastnostech viru zůstává stále neobjasněna a nebyla potvrzena ani v našich experimentech. Porovnáním výše uvedených experimentů lze usuzovat, že buď není glykosylace E proteinu VKE jediným či nejdůležitějším mechanismem vstupu viru do buňky, nebo nebyly použité glykodendrimery dostatečně specifické pro příslušné buněčné receptory. Přestože dendrimery typu PAMAM o srovnatelné koncentraci, jakou jsme použili v našich pokusech, úspěšně snížily infekci HSV-1; 2 v lidských fibroblastech (Bourne *et al.*, 2000), neprokázaly tyto typy dendrimerů statisticky signifikantní inhibiční účinek na replikaci VKE v podmínkách *in vitro*. Důvodem pro odlišné výsledky naší studie a výzkumu provedeném na HSV může být zcela odlišný charakter infekce buněk těmito viry. Otázkou také zůstává, zda dendrimery vykazují inhibiční účinek pouze v případě interakce viru s receptory hostitelské buňky, či zda mohou též pronikat dovnitř buněk a ovlivňovat její metabolické pochody či zasáhnout do replikačního procesu viru, jak navrhuji někteří autoři. Podstatné snížení inhibičních účinků dendrimerů při oddálení jejich aplikace naznačuje působení dendrimerů v počátečních stádiích infekce (Bourne *et al.*, 2000; Gong *et al.*, 2002; Gong *et al.*, 2005). Z celkových experimentů s dendrimery se jako pozitivní výsledek dá považovat pouze to, že žádný z nich v hrubém testu nevykazoval cytotoxicitu na PS buňky a to ani v nejvyšší možné koncentraci 10^{-2} mmol/l. Tento fakt se dá použít v případných dalších pokusech s těmito dendrimery proti jiným virům na dané buněčné kultuře. Je však třeba brát ohled na typ použitých buněčných kultur, neboť podle výzkumu jsou PAMAM dendrimery vyšších generací zakončené amino skupinami obecně cytotoxické (Boas *et Heegaard.*, 2004).

Procesy replikace viru uvnitř buněk mohou být přerušeny buď chemickými sloučeninami nebo zásahy do transkripce/translace virových proteinů a replikace virové nukleové kyseliny. Z chemických sloučenin lze uvést například derivát thiosemicarbazonu (β -aminoketon), který inhibuje replikaci JEV a WNV (Leyssen *et al.*, 2003; Sebastian *et al.*, 2008). Mnoho prací bylo publikováno na téma inhibice replikace rozličných virů na genetické úrovni, za zmínku stojí tzv. ribozymy, což jsou katalyticky aktivní oligonukleotidy se schopností vázat se na cílovou RNA a odstraňovat ji. Testy na buněčných kulturách i na zvířatech prokázaly jejich antivirový účinek proti HIV, hepatitidě B a C, viru chřipky atd. (Yu *et al.*, 1993). Metoda RNA interference (RNAi), má schopnost inhibovat expresi genů pomocí dvou-vláknové RNA (dsRNA) (McManus *et Sharp*, 2002). RNAi je dnes využíváno na poli experimentálního boje např. proti RSV, viru chřipky, polioviru a HIV.

Za účelem experimentální inhibice replikace VKE uvnitř buněk jsme vybrali inhibitory BFA a MON. BFA ovlivňuje transport strukturních proteinů na membránách v cytosolu buněk tím, že inhibuje na GTP-závislou interakci membrány GA s příslušnými proteiny (Donaldson *et al.*, 1992). MON přeskupuje GA blíže

k jádru a tím ovlivňuje složení a rozmístění proteinů jím procházejících. S využitím modelového KUN (rod *Flavivirus*) na Vero buňkách byla částečně zmapována místa shromažďování flavivirových proteinů (Mackenzie *et Westaway.*, 2001). Proteiny KUN se soustřeďují do oblastí kolem drsného ER, kde dochází ke kompletování nových virových částic (Mackenzie *et al.*, 1999). Replikace viru se odehrává ve virem indukovaných SMS a váčcích v cytoplasmě buněk. Tyto struktury se vyznačují např. svinutými membránami. BFA je při včasném podání schopen předejít tvorbě těchto struktur a tím významně narušit replikaci viru, avšak je-li podán pozdě, stávají se SMS rezistentní na jeho rozrušující účinek (Mackenzie *et al.*, 1999). V GA se virové nezralé proteiny buď nevyskytují vůbec, nebo jím jen velmi rychle procházejí. Zjednodušeně řečeno, transportní váčky a SMS jsou potřebné pro přepravu a správné složení buněčných i virových proteinů. Tudíž přerušením toku strukturálních proteinů mezi GA a SMS (účinek BFA, MON) se docílí přerušení skládání virových částic. BFA ani MON nebrání proniknutí viru do buněk, čímž se jejich oblast účinku vymezuje na intracelulární (Mackenzie *et Westaway.*, 2001). Při znalosti místa působení MON a jemu podobných látek lze logicky vyvodit, že ke štípání prM proteinu dochází v kyselých váčcích za GA. Ten je ale v přítomnosti MON narušen a ke štěpení prM proteinu tudíž nedochází. Má-li BFA a MON podobný efekt i v případě replikace VKE zůstává neznámo.

Naše výsledky byly v porovnání s údaji týkajícími se KUN velmi překvapivé. V případě infekce Vero buněk KUN a přidání inhibitorů MON či BFA 1,5 h p.i. byla pozorována kompletní inhibice replikace viru ve skupině, kam byl přidán BFA, kdežto MON měl účinek méně výrazný (snížení titru viru v supernatantu v řádu cca 3 log oproti kontrole, 24 h p.i.) (Mackenzie *et Westaway.*, 2001). V našem případě však oba inhibitory měly na replikaci VKE dramatický dopad. Byla-li použita shodná koncentrace inhibitorů jako v případě pokusů s KUN, replikace VKE byla zcela zablokována oběma inhibitory v obou časových intervalech (24 a 48 h p.i.). To poukazuje na výraznější efekt MON vůči VKE oproti KUN. Méně výrazný účinek MON byl pozorován až v případě, kdy byla použita jeho desetkrát nižší koncentrace. Ještě pozoruhodnější rozdíl je možno pozorovat v případě, kdy byly působení inhibitorů vystaveny klíštěcí buňky infikované VKE. V takovém případě MON zcela zabránil replikaci VKE, zatímco naopak BFA měl účinek slabší (Růžek, osobní sdělení). Další experimenty s využitím fluorescenční a elektronové mikroskopie by mohly objasnit, v jakém bodě replikačního cyklu dané inhibitory účinkují u savčích a klíštěcích buněk a jaký vliv má působení samotných inhibitorů na vnitřní uspořádání buňky.

BFA a MON jsou ve vyšších koncentracích cytotoxické. Totéž bylo pozorováno i v našem hrubém orientačním testu. Je možné, že poškozením důležitých organel buněk dochází k přerušení či rozvrácení jedné nebo více životně důležitých drah a buňky hynou.

BFA a MON prokázaly významné schopnosti v inhibici replikace VKE v podmínkách *in vitro*. Výsledkem je, že oba inhibitory účinkovaly v obdobné míře v obou sledovaných časových intervalech p.i., čím vyšší byla jejich koncentrace, tím výraznější inhibice replikace VKE *in vitro* byla pozorována. Studie s jinými RNA viry potvrzují inhibiční účinky BFA na replikaci například polioviru snížením titru o 5 až 6 řádů (Maynell *et al.*, 1992) a MON i BFA na virus zarděnek (Qiu *et al.*, 1995). BFA a MON snížily titr KUN 6 až 10 krát, přičemž platí, že čím dříve byly inhibitory přidány k infikovaným buňkám, tím více bránily replikaci viru (Mackenzie *et Westaway.*, 2001). To z našeho pokusu nelze vyvodit, jelikož byly oba inhibitory přidány vždy po stejné době po infekci. Sreenivasan *et al.*, 1993 testoval BFA na inhibici replikace WNV s pozitivními výsledky. Pouhý 1 µg/ml BFA znamenal kompletní zhroucení GA v infikovaných Vero buňkách, což vedlo k modifikacím

virových glykoproteinů neslučitelných s formováním infekčních částic. Výsledky ukazují, jak je transport glykoproteinů WNV do GA důležitý pro infekčnost tohoto viru.

Vzhledem ke znalosti silného inhibičního efektu obou použitých inhibitorů v podmínkách *in vitro* by bylo jistě zajímavé provést experiment s laboratorními myšmi na účinnost BFA a MON v inhibici replikace VKE v podmínkách *in vivo*. Netoxické koncentrace MON i BFA pro laboratorní myši jsou známy, bylo by tedy vhodné zjistit, zda by v takovém případě tyto látky byly schopny zabránit či alespoň zmírnit průběh KE u těchto experimentálních hostitelů. Současně by jistě bylo zajímavé pozorovat, zda lze VKE pasážemi v přítomnosti nízkých koncentrací inhibitoru *in vitro* na jeho působení adaptovat a jaké by to případně s sebou neslo změny v genomové sekvenci viru.

V současné době není proti KE znám žádný lék. Námi objevená inhibice replikace VKE odhalila první látky, jež by, či jejich analogy, mohly být dále testovány coby potenciální antivirotika proti tomuto onemocnění. Doposud je jedinou známou účinnou obranou proti KE preventivní očkování. Například v Rakousku masová vakcinační kampaň předešla cca 2800 případům KE v letech 2000 – 2006 (Heinz *et al.*, 2007; Heinz *et al.*, 1980). Alternativou běžného očkování mrtvou vakcínou je vakcinace tzv. živou-oslabenou vakcínou. Různé kandidátní živé-oslabené vakcíny jsou v současné době ve vývoji (Bray *et al.*, 1991; Monath *et al.*, 2003). Hlavní výhodou živé vakcíny je to, že stačí jediná imunizace živou vakcínou pro dlouhodobou ochranu očkováných osob, zatímco inaktivovaná vakcína vyžaduje několikanásobné očkování k dosažení též imunitní odpovědi (Stephenson *et al.*, 1995). Mimo to i náklady na produkci živé-oslabené vakcíny jsou nižší, což je neopominutelný faktor zejména pro rozvojové země, případně Rusko.

Z dalších potenciálních antivirotik, na které by se výzkum KE mohl v budoucnu též zaměřit, možno jmenovat například inhibitory glykosidáz. Ty způsobují nesprávné složení virových strukturních glykoproteinů, jež jsou při neporušeném skládání glykosylovány během pučení z ER. Tuto antivirovou aktivitu vykazuje například inhibitor α -glukosidázy viru hepatitidy B (Mehta *et al.*, 1998). Předmětem diskusí je možné budoucí užití DNA vakcíny obsahující příslušné flavivirové geny aplikované pomocí genové pistole (Kinney *et al.*, 2001).

Za hlavní přínos mé práce považuji zjištění, v jaké koncentraci jsou inhibitory ještě účinné ale již netoxické. Díky tomuto faktu bude možné navázat na tuto práci, pokračovat ve výzkumu v podmínkách *in vivo* a snad dojít i k závěrům, jež by měly terapeutický přínos. Vybrané dendrimery se neukázaly býti účinné, což je pro nás také informace, kudy se ve výzkumu nevydávat nebo co by se mělo případně změnit v pokusech.

7. Souhrn

- Žádný z testovaných glykodendrimerů není cytotoxický pro PS buňky.
- Žádný z testovaných glykodendrimerů nemá statisticky významný inhibiční účinek na replikaci viru klíšťové encefalitidy v podmínkách *in vitro*.
- BFA a MON působí cytotoxicky na PS buňky jen ve vyšších koncentracích, přičemž MON je o něco méně cytotoxický.
- Oba inhibitory prokázaly výrazný inhibiční efekt na replikaci VKE v podmínkách *in vitro*.

Literatura

- Anderson L.J., Bingham P., Hierholzer J.C., 1988.** Neutralization of respiratory syncytial virus by individual and mixtures of F and G protein monoclonal antibodies. *Journal of Virology* 62: 4232 – 4238.
- Austyn J.M., 1992.** Antigen uptake and presentation by dendritic leukocytes. *Seminars in Immunology* 4: 227 – 236.
- Backer M.V., Gaynutdinov T.I., Patel V., Bandyopadhyaya A.K., Thirumamagal B.T.S., Tjarks W., Barth R.F., Claffey K., Backer J.M., 2005.** Vascular endothelial growth factor selectively targets boronated dendrimers to tumor vasculature. *Molecular Cancer Therapeutics* 4: 1423 – 1429.
- Beran J., 2004.** Tick-borne encephalitis in the Czech Republic. *Eurosurveillance* 8: 2493.
- Betina V., 1992.** Biological effects of the antibiotic brefeldin A (decumbin, cyanein, ascotoxin, synergisidin): a retrospective. *Folia Microbiologica* 37: 3 – 11.
- Bhalgat M.K., Roberts J.C., 2000.** Molecular modeling of polyamidoamine (PAMAM) starburst™ dendrimers. *European Polymer Journal* 36: 647 – 651.
- Bielinska A., Kukowska-Latallo J.F., Johnson J., Tomalia D.A., Baker J.R., Jr., 1996.** Regulation of *in vitro* gene expression using antisense oligonucleotides or antisense expression plasmids transfected using starbursts PAMAM dendrimers. *Nucleic Acids Research* 24: 2176 – 2182.
- Boas U., Heegaard P.M.H., 2004.** Dendrimers in drug research. *Chemical Society Reviews* 33: 43 – 63.
- Bourne N., Stanberry L.R., Kern E.R., Holan G., Matthews B., Bernstein D.I., 2000.** Dendrimers, a new class of candidate topical microbicides with activity against hepes simplex virus infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44: 2471 – 2474.
- Bray M., Lai C.-J., 1991.** Construction of intertypic chimeric dengue viruses by substitution of structural protein genes. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*. 88: 10342-10346.
- Bröker M., Gniel D., 2003.** New foci of tick-borne encephalitis virus in Europe: consequences for travellers from abroad. *Travel Medicine and Infectious Disease* 1: 181 – 184.
- Bryant L.H. Jr., Brechbiel M.W., Wu C., Bulte J.W.M., Herynek V., Frank J.A., 1999.** Synthesis and relaxometry of high-generation (g = 5, 7, 9, and 10) PAMAM dendrimer-dota-gadolinium chelates. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 9: 348 – 352.
- Calò M., Marini H., Bitto A., Altavilla D., Polito F., Minutoli L., Cascio P.L., Antoci S., Squadrito F., 2008.** Protective effects of IRFI-042 in monensin induced neurotoxicity in chicks. *Food and Chemical Toxicology* 46: 3528 – 3533.
- Calvez H.L., Yu M., Fang F., 2004.** Biochemical prevention and treatment of viral infections – a new paradigm in medicine for infectious diseases. *Virology Journal* 1: 12.
- Casals J., Hoogstraal H., Johnson K.M., Shelokov A., Wiebenga N.H., Work T.H., 1966.** A current appraisal of hemorrhagic fevers in the U.S.S.R. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 15: 751 – 764.

- Daniel M., Danielová V., Kříž B., Jirsa A., Nožička J., 2003.** Shift of the tick *Ixodes ricinus* and tick-borne encephalitis to higher altitudes in central Europe. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 22: 328 – 328.
- Daniel M., Kříž B., Danielová V., Beneš Č., 2008.** Sudden increase in tick-borne encephalitis cases in the Czech Republic, 2006. *International Journal of Medical Microbiology* 298: 81 – 87.
- de Madrid A.T., Porterfield J.S., 1969.** A simple micro-culture method for the study of group B arboviruses. *Bulletin of the World Health Organisation* 40: 113 – 121.
- Dirksen A., De Cola L., 2003.** Photo-induced processes in dendrimers. *Comptes Rendus Chimie* 6: 873 – 882.
- Donaldson J.G., Finazzi D., Klausner R.D., 1992.** Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalysed exchange of guanine nucleotide onto Arf protein. *Nature* 360: 350 – 352.
- Dong Y., Benveniste E.N., 2001.** Immune function of astrocytes. *Glia* 36: 180 – 90.
- Dumpis U., Crook D., Oksi J., 1999.** Tick-borne encephalitis. *Clinical Infectious Diseases* 28: 882 – 890.
- Emrick T., Fréchet J.M.J., 1999.** Self-assembly of dendritic structures. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 4: 15 – 23.
- Everett H., McFadden G., 1999.** Apoptosis: an innate immune response to virus infection. *Trends in Microbiology* 7: 160 – 165.
- Fazakerley J.K., 2001.** Neurovirology and developmental neurobiology. *Advances in Virus Research* 56: 73 – 124.
- Fazakerley J.K., 2002.** Pathogenesis of Semliki Forest virus encephalitis. *Journal of Neurovirology* 2: 66 – 74.
- Fishman P.H., Curran P.K., 1992.** Brefeldin A inhibits protein synthesis in cultured cells. *Federation of European Biochemical Societies* 314: 371 – 374.
- Fréchet J.M., 1994.** Functional polymers and dendrimers: reactivity, molecular architecture, and interfacial energy. *Science* 263: 1710 – 1715.
- Gardiner W.P., Gettinby G., 1981.** Models based on weather for the development phases of the sheep tick, *Ixodes ricinus* L. *Veterinary Parasitology* 9: 75 – 86.
- Gong E., Matthews B., McCarthy T., Chu J., Holan G., Raff J., Sacks S., 2005.** Evaluation of dendrimer SPL7013, a lead microbicide candidate against herpes simplex viruses. *Antiviral Research* 68: 139 – 146.
- Gong Y., Matthews B., Cheung D., Tam T., Gadawski I., Leung D., Holan G., Raff J., Sacks S., 2002.** Evidence of dual sites of action of dendrimers: SPL-2999 inhibits both virus entry and late stages of herpes simplex virus replication. *Antiviral Research* 55: 319 – 329.
- Grešíková M., Sekeyová M., Stúpalová S., Necas S., 1975.** Sheep milk-borne epidemic of tick-borne encephalitis in Slovakia. *Intervirology* 5: 57 – 61.
- Grešíková M., Kaluzová M., 1997.** Biology of tick-borne encephalitis virus. *Acta Virologica* 41: 115 – 124.
- Griffin D.E., Hardwick J.M., 1999.** Perspective: virus infections and the death of neurons. *Trends in Microbiology* 7: 155 – 60.
- Gritsun T.S., Frolova T.V., Pogodina V.V., Lashkevich V.A., Venuqopal K., Gould E.A., 1993.** Nucleotide and deduced amino acid sequence of the envelope gene of the Vasilchenko strain of TBEV virus; comparison with other viruses. *Virus Research* 27: 201 – 209.

- Gritsun T.S., Holmes E.C., Gould E.A., 1995.** Analysis of *Flavivirus* envelope proteins reveals variable domains that reflect their pathogenicity and may determine their pathogenesis. *Virus Research* 35: 307 – 321.
- Gritsun T.S., Lashkevich V.A., Gould E.A. 2003.** Tick-borne encephalitis. *Antiviral Research* 57: 129 – 146.
- Grubbauer H.M., Dornbusch H.J., Spork D., Zobel G., Trop M., Zenz W., 1992.** Tick-borne encephalitis in a 3-month old child. *European Journal of Pediatrics* 151: 743 – 744.
- Gubler D.J., 2002.** The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Archives of Medical Research* 33: 330-342.
- Gustafson R., Lindgren E., 2001.** Tick-borne encephalitis in Sweden and climate change. *Lancet*. 358: 16 – 18.
- Günther G., Haglund M., Mesko L., Bremmer S., Lindquist L., Forsgren M., Sköldenberg B., Rudberg U., 1998.** Regional cerebral blood flow scintigraphy in tick-borne encephalitis and other aseptic meningoencephalitis. *Journal of Nuclear Medicine* 39: 2055 – 2061.
- Haensler J., Szoka F.C. Jr., 1993.** Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells culture. *Bioconjugate Chemistry* 4: 372 – 379.
- Haglund M., Forsgren M., Lindh G., Lindhquist L., 1996.** A 10-year follow-up study of tick-borne encephalitis in the Stockholm area and a review of the literature: need for a vaccination strategy. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 28: 217 – 224.
- Haglund M., Günther G., 2003.** Tick-borne encephalitis – pathogenesis, clinical course and long-term follow-up. *Vaccine* 21: 11 – 18.
- Hansen G.R., Woodall J., Brown C., Jazz N., McNamara T., Ruiz A. 2001.** Emerging zoonotic diseases. *Emerging Infectious Diseases* 7: 537.
- Heinz F.X., Kunc C., Fauma H., 1980.** Preparation of a highly purified vaccine against tick-borne encephalitis by continuous flow zonal ultracentrifugation. *Journal of Medical Virology* 6: 213 – 221.
- Heinz F.X., Auer G., Stiasny K., Holzmann H., Mandl C., Guirakhoo F., Kunz C., 1994.** The interactions of the *Flavivirus* envelope proteins: implications for virus entry and release. *Archive of Virology*. Supplementum. 9: 339 – 348.
- Heinz F.X., Allison S.L., 2001.** The machinery for flavivirus fusion with host cell membranes. *Current Opinion in Microbiology* 4: 450 – 455.
- Heinz F.X., Holzmann H., Essl A., Kundi M., 2007.** Field effectiveness of vaccination against tick-borne encephalitis. *Vaccine* 25: 7559 – 7567.
- Herzig R., Patt C.M., Prokes T., 2002.** An uncommon severe clinical course of european tick-borne encephalitis. *Biomedical Papers* 146: 63 – 67.
- Holzmann H., 2003.** Diagnosis of tick-borne encephalitis. *Vaccine* 21: 36 – 40.
- Hurrelbrink RJ, McMinn PC., 2003.** Molecular determinants of virulence: the structural and functional basis for flavivirus attenuation. *Advances in Virus Research* 60: 1 – 42.
- Chambers T.J., Diamond M.S., 2003.** Pathogenesis of flavivirus encephalitis. *Advances in Virus Research* 60: 273 – 342.
- Charrel1 R.N., Attouil H., Butenko A.M., Clegg J.C., Deubel V., Dropova T.V., Gould E.A., Gritsun T.S., Heinz F.X., Labuda M., Lashkevich V.A., Loktev V., Lundkvist A., Lvov D.V., Mandl C.W., Niedrig M., Papa A., Petrov V.S., Plyusnin A., Randolph S., Süß J., Zlobin V.I., X. de**

- Lamballerie I., 2004.** Tick-borne virus diseases of human interest in Europe. *Clinical Microbiology and Infection* 10: 1040 - 1055.
- Cheng Y., Li Y., Wu Q., Xu T., 2008.** New insights into the interactions between dendrimers and surfactants by two dimensional noe nmr spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry B* 112: 12674 – 12680.
- Igarashi A., 1979.** Production of temperature-sensitive and pathogenic virus from *Aedes albopictus* cells (singh) persistently infected with chikungunya virus. *Archives of Virology* 62: 303 – 12.
- Iliencko V.I., Komandenko N.I., Platonov V.G., Prozorova I.N., Panov A.G., 1974.** Pathogenetic study on chronic forms of tick-borne encephalitis. *Acta Virologica* 18: 341 – 346.
- Inhorn M.C., Brown P.J., 1990.** The anthropology of infectious disease. *Annual Review of Anthropology* 19: 89-117.
- Irurzun A., Pérez L., Carrasco L., 1993.** Brefeldin A blocks protein glycosilation and RNA replication of vesicular stomatitis virus. *Federation of European Biochemical Societies* 336: 496 – 500.
- Johnston L.J., Halliday G.M., King N.J., 1996.** Phenotypic changes in langerhans' cells after infection with arboviruses: a role in the immune response to epidermally acquired viral infection? *Journal of Virology* 70: 4761 – 4766.
- Johnson R.T., Burke D.S., Elwell M., Leake C.J., Nisalak A., Hoke C.H., Lorsomrudee W., 1985.** Japanese encephalitis: immunocytochemical studies of viral antigen and inflammatory cells in fatal cases. *Annals of Neurology* 18: 567 – 573.
- Kim Y., Zimmermann S.C., 1998.** Application of dendrimers in bio-organic chemistry. *Current Opinion in Chemical Biology* 2: 733 – 742.
- Kinney R.M., Huang C.Y-H., 2001.** Development of new vaccines against dengue fever and japanese encephalitis. *Intervirology*. 44: 176 – 197.
- Klajnert B., Bryszewska M., 2001.** Dendrimers: properties and applications. *Acta Biochemica Polonica* 48: 199 – 208.
- Knapen J.W.J., van der Made A.W., de Wilde J.C., van Leeuwen P.W.N.M., Wijkens P., Grove D.M., van Koten G. 2002.** Homogeneous catalysts based on silane dendrimers functionalized with aryknickel (II) complexes. *Nature* 372: 659 – 663.
- Kožuch O., Mayer V., 1975.** Pig kidney epithelial (ps) cells: a perfect tool for the study of *Flavivirus* and some other arboviruses. *Acta Virologica* 19: 498.
- Kuno G., Chang G-J. J, Tsuchiya K.R., Karabatsos N., Cropp C.B., 1998.** Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *Journal of Virology* 72: 73 – 83.
- Kunz C., Heinz F.X., 2003.** Tick-borne encephalitis. *Vaccine* 21: 1 - 2.
- Labuda M., Austyn J.M., Zuffova E., Kozuch O., Fuchsberger N., Lysy J., Nuttall P.A., 1996.** Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission. *Virology* 219: 357 – 366.
- Lad V.J., Gupta A.K., 2002.** Inhibition of japanese encephalitis virus maturation and transport in PS cells to cell surface by brefeldin A. *Acta Virologica* 46: 187 – 190.
- Landers J.J., Cao Z., Lee I., Piehler L.T., Myc P.P., Myc A., Hamouda T., Galecki A.T., Baker J.R.Jr., 2002.** Prevention of influenza pneumotitis by sialic acid-conjugated dendritic polymers. *The Journal of Infectious Diseases* 186: 1222 – 1230.

- Lee C.-J., Liao C.-L., Lin Y.-L., 2005.** Flavivirus activates phosphatidylinositol 3-kinase signaling to block caspase-dependent apoptotic cell death at the early stage of virus infection. *Journal of Virology* 79: 8388 – 8389.
- Leysen P., Charlier N., Paeshuyse J., de Clercq E., Neyts J., 2003.** Prospects for antiviral therapy. *Advances in Virus Research* 61: 511 – 541.
- Lhoták P., 2005.** Dendrimery. Učební text dostupný na adrese:
http://www.uochb.cas.cz/Zpravy/PostGrad2005/2_Lhotak.pdf (datum přístupu 22.4.2009).
- Lindenbach B.D., Rice Ch.M., 2003.** Molecular biology of flaviviruses. *Advances in Virus Research* 59: 23 – 61.
- Lindgren E., Tälleklint L., Polfeldt T., 2000.** Impact of climatic change on the northern latitude limit and population density of the disease-transmitting European tick *Ixodes ricinus*. *Environmental Health Perspectives* 108: 119 – 123.
- Mackenzie J.M., Jones M.K., Westaway E.G., 1999.** Markers for *trans*-golgi membranes and the intermediate compartment localize to induced membranes with distinct replication functions in flavivirus-infected cells. *Journal of Virology* 73: 9555 – 9567.
- Mackenzie J.M., Westaway E.G., 2001.** Assembly and maturation of the flavivirus kunjin virus appear to occur in the rough endoplasmic reticulum and along the secretory pathway, respectively. *Journal of Virology* 75: 10787 – 10799.
- Mandl C.W., Guirakhoo F., Holzmann H., Heinz F.X., Kunz C., 1989.** Antigenic structure of the *Flavivirus* envelope protein E at the molecular level, using tick-borne encephalitis virus as a model. *Journal of Virology* 63: 564 – 571.
- Mandl C.W., Holzmann H., Meixner T., Rauscher S., Stadler P.F., Allison S.L., Heinz F.X., 1998.** Spontaneous and engineered deletions in the 3' noncoding region of tick-borne encephalitis virus: construction of highly attenuated mutants of a *Flavivirus*. *Journal of Virology* 72: 2132 – 2140.
- Mandl C.W., Kroschewski H., Allison S.L., Kofler R., Holzmann H., Meixner T., Heinz F.X., 2001.** Adaptation of tick-borne encephalitis virus to BHK-21 cells results in the formation of multiple heparan sulfate binding sites in the envelope protein and attenuation in vivo. *Journal of Virology* 75: 5627 – 5637.
- Mandl C.W., 2005.** Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that affect neuropathogenesis. *Virus Research* 111: 161 – 174.
- Marlin S.D., Ltaunton D.E., Springer T.A., 1990.** A soluble form of intercellular adhesion molecule-1 inhibits rhinovirus infection. *Nature* 344: 70 – 72.
- Maynell L.A., Kirkegaard K., Klymkowsky M.W., 1992.** Inhibition of poliovirus RNA synthesis by brefeldin A. *Journal of Virology* 66: 1985 – 1994.
- McGregor E.B., Solomon K.R., Hanson M.L., 2007.** Monensin is not toxic to aquatic macrophytes at environmentally relevant concentrations. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 53: 541 – 551.
- McManus M.T., Sharp P.A., 2002.** Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nature Reviews. Genetics* 3: 737 – 747.

- McMichael A.J., 2004.** Environmental and social influences on emerging infectious diseases: past, present and future. *The Royal Society* 359: 1049-1058.
- McMinn P.C., Dalgarno L., Weir R.C., 1996.** A comparison of the spread of murray valley encephalitis viruses of high or low neuroinvasiveness in the tissue of swiss mice after peripheral inoculation. *Virology* 220: 414 – 423.
- McMinn P.C., 1997.** The molecular basis of virulence of the encephalitogenic flaviviruses. *The Journal of General Virology* 78: 2711 – 22.
- Mehta A., Zitzmann N., Rudd P.M., Block T.M., Dwek R.A., 1998.** α -glucosidase inhibitors as potential broad based anti-viral agents. *FEBS Letters* 430: 17 – 22.
- Monath T.P., M.D., Cropp C.B., M.S., Harrison A.K., B.S., 1983.** Mode of entry of a neurotropic arbovirus into the central nervous system. *Laboratory Investigation* 48: 399.
- Monath T.P., Lai C.J., 2003.** Chimeric *Flaviviruses*: novel vaccines against dengue fever, tick-borne encephalitis, and japanese encephalitis. *Advances in Virus Research* 61: 469 - 509.
- Murgod UA, Muthane UB, Ravi V, Radhesh S, Desai A., 2001.** Persistent movement disorders following japanese encephalitis. *Neurology*. 57: 2313 - 2315.
- Nuttall P.A., Labuda M., 2003.** Dynamics of infection in tick vectors and at the tick-host interface. *Advances in Virus Research* 60: 233 – 72.
- Parola P., Raoult D., 2001.** Ticks and tick-borne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clinical Infectious Diseases* 32: 897 – 928.
- Pinkerton M., Steinrauf L.K., 1970.** Molecular structure of monovalent metal cation complexes of monensin. *Journal of Molecular Biology* 14: 533 – 546.
- Potula R., Pinson D., Adany I, Li Z., Day J., Buch E., Segebrecht J., Villinger F., Liu Z., Huanq M., Sui Y., Narayan O., Buch S., 2003.** Microarray analysis of cytokine and chemokine genes in the brains of macaques with SHIV-encephalitis. *Journal of Medical Primatology* 32: 229 - 39.
- Prikhod'ko G.G., Prikhod'ko E.A., G. Pletnev A.G., Cohen J.I., 2002.** Langat flavivirus protease NS3 binds caspase-8 and induces apoptosis. *Journal of Virology* 76: 5701 – 5710.
- Qiu Z., Tufaro F., Gillam S., 1995.** Brefeldin A and monensin arrest cell surface expression of membrane glycoproteins and release of rubella virus. *Journal of General Virology* 76: 855 – 863.
- Rajčáni J., Čiampor F., 2006.** Čelad' *Flaviviridae*. In: Rajčáni J., Všeobecná charakteristika, Lekárska Virologia. VEDA, Bratislava: 436 – 444.
- Randolph V.B., Hardy J.L., 1988.** Establishment and characterization of st louis encephalitis virus persistent infections in *Aedes* and *Culex* mosquito cell lines. *The Journal of General Virology* 69: 2189 – 2198.
- Rizzoli A., Hudson P.J., Rosaá R., Chemini C., Jones L.D., Gould E.A., 2001.** Tick-borne encephalitis virus in northern Italy: molecular analysis, relationships with density and seasonal dynamics of *Ixodes ricinus*. *Medical and Veterinary Entomology* 15: 304 – 313.
- Rizzoli A., Rosà R., Mantelli B., Pecchioli E., Hauffe H., Tagliapietra V., Beninati T., Neteler M., Genchi C., 2004.** *Ixodes ricinus*, transmitted diseases and resevoirs. *Parassitologia* 46: 119 – 122.
- Rojo J., Delgado R., 2004.** Glycodendritic structures: promising new antiviral drug. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54: 579 – 581.

- Růžek D., Šťatsná H., Kopecký J., Golovljova I., Grubhoffer L., 2007.** Rapid subtyping of tick-borne encephalitis virus isolates using multiplex RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 144: 133 – 137.
- Růžek D., Gritsun T.S., Forrester N.L., Gould E.A., Kopecký J., Golovchenko M., Rudenko N., Grubhoffer L., 2008.** Mutations in the NS2B and NS3 genes affect mouse neuroinvasiveness of a western European field strain of tick-borne encephalitis virus. *Virology* 374: 249 – 255.
- Růžek D., Salát J., Palus M., Gritsun T.S., Gould E.A., Dyková I., Skallová A., Jelínek J., Kopecký J., Grubhoffer L., 2009b.** CD8+ T- cells mediate immunopathology in tick-borne encephalitis. *Virology* 384: 1 – 6.
- Růžek D., Vancová M., Tesařová M., Ahantarig A., Kopecký J., Grubhoffer L., 2009a.** Morphological changes in human neural cells following tick-borne encephalitis virus infection. *The Journal of General Virology*, v tisku.
- Sauer J.R., McSwain J.L., Bowman A.S., Essenberg R.C., 1995.** Tick salivatory gland physiology. *Annual Reviews of Entomology* 40: 245 – 267.
- Sebastian L., Desai A., Shampur M.N., Perumal Y., D.S., Vasanthapuram R., 2008.** N-methylisatin-beta-thiosemicarbazone derivate (SCH 16) is an inhibitor of japanese encephalitis virus infection in vitro and in vivo. *Virology Journal* 5: 64.
- Seligman S.J., 2008.** Constancy and diversity in the flavivirus fusion peptide. *Virology Journal* 5: 27.
- Shastry P., Basu A., Rajadhyaksha M.S., 2001.** Neuroblastoma cell lines – a versatile in vitro model in neurobiology. *The International Journal of Neuroscience* 108: 109 – 126.
- Sreenivasan V., Ng K.L., Ng M.L., 1993.** Brefeldin A affects west nile virus replication in vero cells but not C6/36 cells. *Journal of Virological Methods* 45: 1 – 17.
- Stephenson J.R., Lee J.M., Easterbrook L.M., Timofeev A.V., Elbert L.B., 1995.** Rapid vaccination protocols for commercial vaccines against tick-borne encephalitis. *Vaccine* 13: 743 – 746.
- Stiasny K., Allison S.L., Marchler-Bauer A., Kunz C., Heinz F.X., 1996.** Structural requirements for low-ph-induced rearrangements in the envelope glycoprotein of tick-borne encephalitis virus. *Journal of Virology* 70: 8142 – 8147.
- Stiasny K., Heinz F.X., 2006.** Flavivirus membrane fusion. *The Journal of General Virology* 87: 2755 – 2766.
- Süss J., 2008.** Tick-borne encephalitis in Europe and beyond – the epidemiological situation as of 2007. *Eurosurveillance* 13: 4 – 6.
- Tomalia D.A., Baker H., Dewald J., Hall M., Kallos G., Martin S., Roeck J., Ryder J., Smith P., 1985.** A new class of polymers: starburst-dendritic macromolecules. *Polymer Journal* 17: 117 – 132.
- Tomalia D.A., 2005.** Birth of a new macromolecular architecture: dendrimers as quantized building blocks for nanoscale synthetic polymer chemistry. *Progress in Polymer Science* 30: 294 – 324.
- Turk J., Thomson G.R., 1999.** Earth science and the environment. Saunders College Publishing. Philadelphia: 589 p.
- Twyman L.J., Beezer A.E., Esfand R., Hardy M.J., Mitchell J.C., 1999.** The synthesis of water soluble dendrimers, and their application as possible drug delivery systems. *Tetrahedron Letters* 40: 1743 – 1746.

- Vepřek P., Hajdúch M., Džubák P., Kuklík R., Poláková J., Bezouška K., 2005.** Comblike dendrimers containing tn antigen modulate natural killing and induce the production of tn specific antibodies. *Journal of Medicinal Chemistry* 49: 6400 – 6407.
- Volf P., Horák P., 2007.** Parazitiční členovci. In: Volf P., Votýpka J., Lékařská entomologie. Význam členovců jako přenašečů nález. Paraziti a jejich biologie. Praha: Triton. 234 - 248.
- Wahlberg P., Saikku P., Brummer-Konverkontio M., 1989.** Tick-borne viral encephalitis in Finland. The clinical features of kumlinge disease during 1959 – 1987. *Journal of Internal Medicine* 225: 173 – 177.
- Wallner G., Mandl C.W., Ecker M., Holzmann H., Stiasny K., Kunz C., Heinz F.X., 1996.** Characterization and complete genome sequences of high- and low- virulence variants of tick-borne encephalitis virus. *Journal of Virology* 77: 1035 – 1042.
- Wengler G., Wengler G., Gross H.J., 1978.** Studies on virus-specific nucleic acids synthesized in vertebrate and mosquito cells infected with flaviviruses. *Virology* 89: 423 – 437.
- Westaway E.G., Brinton M.A., Gaidamovich S.Ya., Horzinek M.C., Igarashi A., Kääriäinen L., Lvov D.K., Porterfield J.S., Russell P.K., Trent D.W., 1985.** Flaviviridae. *Intervirology* 24: 183 – 192.
- Wikel S.K., Ramachandra R.N., Bergman D.K., 1994.** Tick-induced modulation of the host immune response. *International Journal for Parasitology* 24: 59 – 66.
- Witvrouw M., Fikkert V., Pluymers W., Matthews B., Mardel K., Schols D., Raff J., Debysse Z., de Clercq E., Holan G., Pannecouque C., 2000.** Polyanionic (i.e. polysulfonate) dendrimers can inhibit the replication of human immunodeficiency virus by interfering with both virus adsorption and later steps (reverse transcriptase/integrase) in the virus replicative cycle. *Molecular Pharmacology* 58: 1100 – 1108.
- Xiao S.Y., Guzman H., Zhang H., Travassos da Rosa A.P., Tesh R.B., 2001.** West nile virus infection in the golden hamster (*mesocricetus auratus*): a model for west nile encephalitis. *Emerging Infectious Diseases* 7: 714 – 721.
- Yamshchikov V.F., Compans R.W., 1995.** Formation of the flavivirus envelope: role of the viral NS2-NS3 protease. *Journal of Virology* 69: 1995 – 2003.
- Yu M., Ojwang J., Yamada O., Hampel A., Rapaport J., Looney D., Wong-Staal F., 1993.** A hairpin ribozyme inhibits expression of diverse strains of human immunodeficiency virus type 1. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America* 90: 6340 – 6344.
- Zhuo R.X., Du B., Lu Z.R., 1999.** In vitro release of 5-fluorouracil with cyclic core dendritic polymer. *Journal of Controlled Release* 57: 249 – 257.