

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA JIHOČESKÉ UNIVERZITY  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH



## **Ultrastrukturní změny lidských neuronálních buněk po infekci virem klíšťové encefalitidy**

Magisterská diplomová práce

Bc. Martina Tesařová

Vedoucí práce: Ing. Jana Nebesářová, CSc.  
Školitel-specialista: RNDr. Marie Vancová, Ph.D.  
Školitel-specialista: RNDr. Daniel Růžek, Ph.D.

**2010**

Magisterská diplomová práce

Tesařová M., Bc. 2010: Ultrastrukturní změny lidských neuronálních buněk po infekci virem klíšťové encefalitidy. [Ultrastructural changes in human neural cells after infection with tick-borne encephalitis virus, MSc. Thesis in Czech] - 43 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech republic.

Annotation:

Human cells of neuronal origin represent an excellent tool for the investigation of neuropathogenesis of TBE. The maturation, replication process of tick-borne encephalitis virus (TBEV) and ultrastructural changes induced by infection in the neuroblasts cell line (UKF-NB-4) was studied by electron microscopy. I compared electron microscopical aspects (appearance) of TEM images of neuroblasts cells prepared by (1) conventional chemical fixation, resin-embedding and sectioning; (2) rapid freezing of cell monolayers at high pressure and sectioning of freeze substituted samples. The most interesting fact, however, is that vitrification preserves the cell in close to native state, whereas chemical fixation and dehydration can not take place without extensive intra- and intermolecular cross-linking and aggregation. The appearance of the cytoplasm and nucleoplasm of neuroblasts cells were different in conditions (1) and (2). The excellent ultrastructure of the cytoplasmic and nuclear membranes and organelles of neuroblasts cells processed by (2) confirmed the potential of the method for preservation of cellular fine structures. The infection of neuroblastoma cells was associated with number of major morphological changes, including proliferation of membranes of the rough endoplasmic reticulum and rearrangement of cytoskeletal structures. The viral particles were located mainly in the cisternae of ER but also in the cytoplasm. In the cytoplasm I observed virions in the associations with microtubules and neurosecretory dense core vesicles. The transport of viral particles inside of the transport vesicles was observed from ER to Golgi apparatus. Free nucleocapsids were not confirmed. The observed pattern corresponded to both *trans* and *cis* type of maturation. The TBEV-infected neuroblasts cells exhibited either apoptotic or necrotic morphological changes. I observed the apoptotic signs (condensation, margination and fragmentation of chromatin in nucleus) and other alterations, such as disorganisation of cytoplasm, presence of the vacuoles and high density of cytoplasm. This report also describes scanning electron microscope study of the surface features of neuroblasts cells. We observed virus-mediated cytopathic effect. The cells infected with TBEV were rounded with rough and rugged topography.

Magisterská diplomová práce byla financovaná z grantu GAAV KJB600960906, z výzkumného záměru Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR 6007665801 a z výzkumného centra LC 06009.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím citované literatury.

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

V Českých Budějovicích, 29.4. 2010

.....  
Tesařová Martina

## Poděkování

Děkuji vedoucí mé diplomové práce, Ing. Janě Nebesářové, CSc., dále Prof. RNDr. Liborovi Grubhofferovi, CSc. a školiteli, RNDr. Danielu Růžkovi, PhD. za jejich neustálé podporování, příspěvky a cenné rady, kterými nešetřily a byly pro mě dobrou motivací. Zvláštní poděkování patří mé školitelce, RNDr. Marii Vancové, Ph.D. za odborné vedení práce, její obrovskou trpělivost, rady, předané zkušenosti a čas, který mi věnovala pocelou dobu mého magisterského studia. Poděkování patří i členům laboratoře elektronové mikroskopie, kteří byli vždy nápomocni a vytvářeli skvělé podmínky v průběhu mé diplomové práce. Jmenovitě děkuji Petře Masařové a Bc. Lence Bučínské za pomoc při zpracování materiálu a praktické rady. Mgr. Janu Langhansovi děkuji za pomoc s finální úpravou a tiskem práce.

## Seznam použitých zkratk

BSA	bovinní sérový albumin
CNS	centrální nervový systém
CPD	„critical point drying“ - metoda kritického bodu
CPE	cytopatický efekt
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole
DNA	deoxiribonukleová kyselina
EM	elektronová mikroskopie
ER	endoplazmatické retikulum
ERGIC	oblast mezi endoplazmatickým retikulem a Golgiho aparátem
FCS	fetálního telecí sérum
FITC	fluorescenční značka-fluorescein isothiocyanate
FS	freeze substitution, mrazová substituce
GA	Golgiho aparát
HPF	rychlé mražení za vysokého tlaku, high pressure freezing
IMDM	Incovo upravené Dulbecovo médium
KE	klíšťová encefalitida
LM	světelná mikroskopie
NGS	kozí sérum
NS	nestruturní (non structural)
ORF	“open reading frame “ - otevřený čtecí rámec
PB	fosfátový pufr
PBS	fyzilogický fosfátový pufr s přídávkem 0,15 M NaCl
PCD	programovaná buněčná smrt
PDI	proteinová disulfidová izomeráza
pGm	pre-Golgiho elektron-denzní osmiofilní meziprodukt
PLT	kryometoda-progresive lowering temperature
PS	prasečí ledvina
RER	drsne endoplazmatické retikulum
RNA	ribonukleová kyselina
RTS	rychlá transportní jednotka-součást přístroje LEICA EM PACT2
SEM	skenovací elektronový mikroskop
SMS	jemné membránové struktury
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
trans-GA	trans-Golgiho aparát
TRITC	fluorescenční značka-tetramethyl rhodamine iso-thiocyanate

# Obsah

<b>1. Literární přehled</b> .....	1
1.1. Virus klíšťové encefalitidy (KE) .....	1
1.2. Struktura virionu a virové proteiny .....	1
1.3. Genom viru klíšťové encefalitidy (KE).....	2
1.4. Replikační strategie <i>flavivirů</i> .....	3
1.5. Maturace <i>flavivirů</i> .....	4
1.5.1. Strukturní rozlišení <i>cis</i> a <i>trans</i> maturujících <i>flavivirů</i> .....	4
1.6. Nervové a nádorové buňky CNS .....	5
1.7. Klíšťová encefalitida a klinické projevy .....	6
1.7.1. Příznaky a projevy .....	6
1.8. Morfologické změny buněk CNS infikovaných virem KE .....	6
1.8.1. Cytopatický efekt (CPE).....	7
1.8.2. Apoptóza.....	7
1.9. Vezikulární transport .....	9
1.9.1. Sekreční dráha .....	10
1.9.2. Endocytóza .....	10
1.10. Příprava biologických preparátů pro transmisní elektronovou mikroskopii (TEM) ..	11
.....	11
Příprava preparátů chemickou cestou:.....	11
1.10.1. Fyzikální metoda přípravy preparátů pro TEM.....	11
1.10.1.1. Kryofixace (mrazová fixace).....	11
1.10.1.2. Vlastnosti vody a proces nukleace (tuhnutí) .....	12
1.10.1.3. Rychlé zmražení preparátů za vysokého tlaku „high pressure freezing“ (HPF) .....	13
<b>2. Cíl práce</b> .....	15
<b>3. Materiály a metody</b> .....	16
3.1. Virus KE a neuronální buňky .....	16
3.2. Infekce tkáňových kultur a růst viru KE v neuroblastech .....	16
3.3. Příprava preparátů pro elektronovou mikroskopii (EM).....	16
3.3.1. Skenovací elektronový mikroskop (SEM) .....	16
3.3.2. Transmisní elektronový mikroskop (TEM).....	16
3.3.3. Kryofixační metoda (rychlé mražení neuroblastů) pomocí HPF.....	17
3.3.4. Mrazová substituce (FS).....	18
3.4. Imunolokalizace virového proteinu E, ER a mikrotubulárních vláken pomocí fluorescenční a konfokální mikroskopie .....	19
<b>4. Výsledky</b> .....	21
4.1. Studium ultrastrukturních změn neuroblastů po infekci virem KE pomocí transmisní elektronové mikroskopie .....	21
4.1.1. Metoda dvoustupňové chemické fixace pomocí 2,5% glutaraldehydu a 2% OsO <sub>4</sub> .....	21
4.1.1.1. Ultrastruktura neuroblastů infikovaných virem KE po chemické fixaci....	21
4.1.1.2. Morfologické změny neuroblastů infikovaných virem KE .....	21
4.1.1.3. Intracelulární vývoj viru klíšťové encefalitidy .....	22
4.1.1.4. Ultrastruktura neinfikovaných neuroblastů po chemické fixaci.....	22
4.1.2. Kryofixační metoda „high pressure freezing“ a následná mrazová substituce ledu .....	23
4.1.2.1. Ultrastruktura neuroblastů infikovaných virem KE po kryofixaci.....	23
4.1.2.2. Morfologické změny neuroblastů infikovaných virem KE .....	23

4.1.2.3. Intracelulární vývoj viru klíšťové encefalitidy .....	24
4.1.2.4. Ultrastruktura neinfikovaných neuroblastů po kryofixaci.....	24
4.2. Studium morfologických změn neuroblastů po infekci virem KE pomocí skenovací elektronové mikroskopie .....	25
4.3. Imunolokalizace virového proteinu E v ER a v asociaci s $\alpha$ -tubulinem pomocí fluorescenční a konfokální mikroskopie .....	25
4.3.1. Detekce virového proteinu E v ER pomocí PDI protilátky .....	25
4.3.2. Detekce virového proteinu na mikrotubulárních vláknech.....	26
<b>5. Diskuze</b> .....	<b>27</b>
5.1. Studium ultrastrukturních změn neuroblastů po infekci virem KE pomocí transmisní elektronové mikroskopie .....	27
5.1.1. Extrakce a agregovaný vzhled ultrastruktury .....	27
5.1.3. Intracelulární vývoj viru klíšťové encefalitidy .....	29
5.1.4. Morfologické změny infikovaných neuroblastů virem KE .....	32
5.2. Studium morfologických změn neuroblastů po infekci virem KE pomocí skenovací elektronové mikroskopie .....	33
<b>6. Závěry</b> .....	<b>34</b>
<b>7. Seznam použité literatury</b> .....	<b>37</b>
<b>8. Obrazové přílohy</b> .....	<b>43</b>

# 1. Literární přehled

## 1.1. Virus klíšťové encefalitidy (KE)

Virus klíšťové encefalitidy patří mezi zástupce rodu *Flavivirus*, čeledi *Flaviviridae*. Většina *flavivirů* z epidemiologického hlediska tvoří velkou podskupinu patřící mezi *arboviry* (Rajčáni a Čaimpor, 2006). Označení „*arbovirus*“ se používá pro viry přenášené specifickým způsobem pomocí klíšťat a komárů. Samotné slovo „*arbovirus*“ vzniklo jako zkratka z anglických slov „arthropod-borne-viruses“, což znamená „viry přenášené členovci“. Kromě viru KE je do rodu zařazeno asi 70 virů, z nichž většina je přenášena komáry (viry dengue, žluté zimnice, encefalitidy Murray Valley, encefalitidy St. Louise atd.), klíšťaty (viry KE, Powassan, Langat atd.) a u několika *flavivirů* nebyl vektor dosud identifikován (Calisher a Gould, 2003).

Viry KE můžeme rozdělit podle typu hostitele do dvou skupin:

- infikující savce
- infikující mořské ptáky

Virus KE je klasifikován mezi savčí skupinu a zahrnuje 3 podtypy podle výskytu:

- Evropský
- Sibiřský
- Dálně-Východní (Lindquist a Vapalahti, 2008)

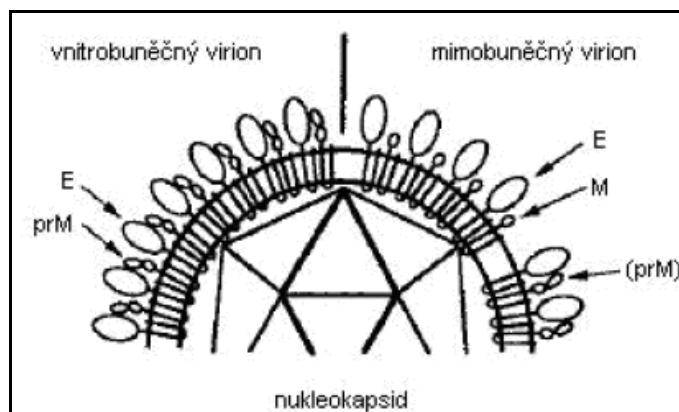
V Evropě byl virus KE poprvé izolován v roce 1948 v bývalém Československu (Daniel a kol., 2008; Kříž a kol., 2009). Později se virus a samotné onemocnění klíšťová encefalitida objevila téměř v celé Evropě a posléze i na Dálném Východě (Čína a Japonsko).

## 1.2. Struktura virionu a virové proteiny

*Flaviviry* jsou RNA viry obalené lipidovým obalem, které obsahují pouze tři různé strukturální proteiny *C*, *M* a *E*. Samotný virion se skládá z dřeně (nukleokapsidy) a membránového obalu. Velikost partikul viru KE (virionu) v buňkách mozku klíšťat se pohybuje mezi 50-60 nm (Grešíková a Nosek, 1981). *Protein C* vytváří sférickou kapsidu, jakousi „krabičku“, ve které je uzavřena virová RNA a společně zaujímají velikost 30 nm (Lindquist a Vapalahti, 2008; Dumpis a kol., 1999). Další proteiny *M* a *E* interagují s obalovou membránou (z angl. "envelope" = obal), do které je celý glykoprotein *E* zabalen. *Protein E* je nejvýznamnějším proteinem virionu, protože je přímo odpovědný za vazbu na buněčný receptor a tím tedy za penetraci viru do hostitelské buňky (Helenius, 1995; Holzmann a kol., 1995). Jelikož se *protein E* váže na buněčné receptory, funguje tedy jako hlavní antigení determinanta virionu a je zodpovědný za tvorbu protilátek a indukci imunitních reakcí v infikovaném organismu. Kromě *proteinu E* je také součástí virového obalu membránový *protein M*. Jedná se o menší protein o velikosti 7 kDa, který se vyskytuje jen na zralých extracelulárních virionech a je spíše pomocným proteinem. *Protein M* vzniká štěpením *prekurzoru prM* o velikosti 26 kDa (Rajčáni a Čaimpor, 2006; Votava a kol. 2003). Nezralá forma *prM* brání konformační změně *proteinu E* indukované nízkým pH, která je nevratná a ke které by došlo ve váčcích trans-Golgiho aparátu (Allison a kol., 1995; Guirakhoo a kol., 1989; Stiasny a kol., 1996). Tato konformační změna vede k odhalení hydrofobních domén *proteinu E* a má za následek fúzi membrán (Rey a kol., 1995). Fúze membrán je důležitá při infekci buňky tím, že umožní virionu (resp. nukleokapsidě) opustit endocytický váček a dostat se tak do cytoplazmy (Nawa, 1998). Ovšem pokud by k této



změně došlo už při uvolňování nově vzniklých virionů z infikované buňky, kdy je virion transportován k povrchu buňky ve váčcích trans-Golgiho aparátu (uvnitř nízké pH), dostal by se tento virion zpět do buňky, ve které byl vytvořen, a neměl by šanci tuto buňku opustit. Právě *protein prM* této změně brání. Krátce před vlastním uvolněním virionu z buňky je *protein prM* endoproteolyticky štěpen za vzniku *proteinu M*, který už tuto ochrannou funkci nemá (Stadler a kol., 1997). Ta by se po uvolnění virionu stala nežádoucí, poněvadž by bránila penetraci virionu do další buňky (Heinz a kol., 1994). Schéma struktury virionu KE a virových proteinů je znázorněno na obr. 1.

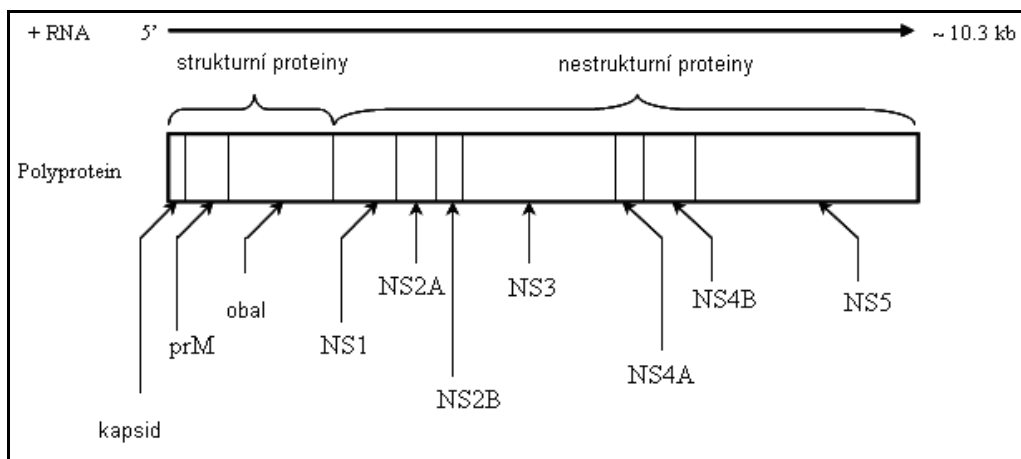


**Obrázek 1: Schéma virionu KE.**

Virový obal tvoří lipidová dvojvrstva, ve které se nachází glykoprotein *E* a membránový *protein M* (respektive jeho *prekurzor prM*). Mimobuněčné částice mají v obalu převážně *protein M* (ale i naštěpený *prM*), vnitrobuněčné částice mají v obalu jen *prekurzor proteinu M*. Uvnitř částice se nachází nukleokapsid. Upraveno podle Rajčáni a Čiampor (2006).

### 1.3. Genom viru klíš'ové encefalitidy (KE)

Virová jednořetězcová RNA kóduje kromě tří strukturálních *proteinů* (*C*, *prM* a *E*) ještě 7 nestrukturních (non structural; NS) *proteinů* (*NS1*, *NS2A*, *NS2B*, *NS3*, *NS4A*, *NS4B* a *NS5*). Tyto nestrukturní proteiny jsou syntetizovány společně se strukturálními proteiny a tvoří velký polyprotein, který obsahuje více jak 1400 aminokyselin (Rajčáni a Čiampor, 2006). To vyplývá z replikační strategie viru KE a virionová +RNA je po uvolnění do cytoplazmy ihned translatována do jediného polyproteinu. Ten je dále štěpen za pomoci virových a hostitelských signaláz a zřejmě i jiných hostitelských proteáz za vzniku všech deseti virových proteinů (Westaway, 1987, Chambers a kol., 1990a, b).



**Obrázek 2: Genom viru klíšťové encefalidity.**

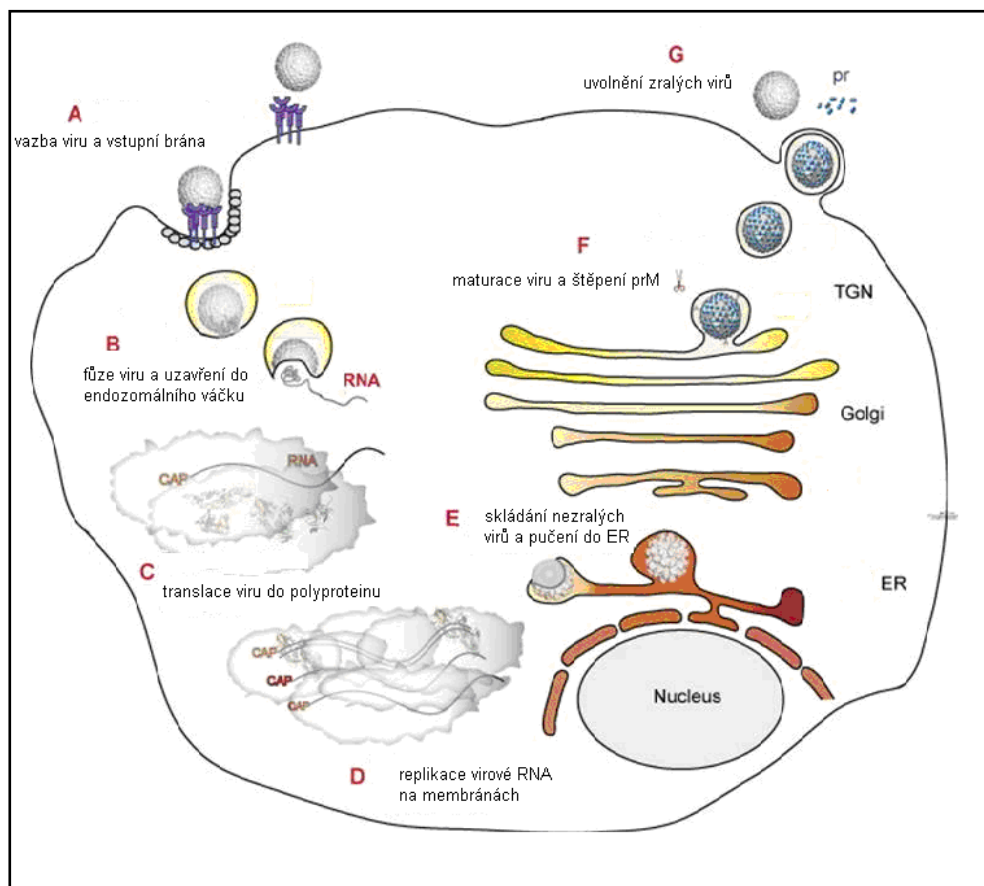
Schéma organizace tří strukturních (*C*, *E*, *prM*) a sedmi nestrukturních (*NS1*, *NS2A*, *NS3*, *NS4A*, *NS4B*, *NS5*) proteinů v genomu *flaviviru* (C. M. Fauquet a kol., 2005. *Virus taxonomy*. 8th ed., Elsevier, pp. 990, upraveno).

## 1.4. Replikační strategie *flavivirů*

U *flavivirů* probíhá proces replikace viru v cytoplasmě. Tento fakt nebyl dosud vrácen, ale bylo zjištěno, že virové proteiny *C* a nestrukturní protein *NS4B* se během pozdní fáze latentní periody dostávají do jádra. Dosud však nebyl objasněn význam této jaderné lokalizace (Westaway a kol., 1997a).

Infekce klíšťové encefalidity (KE) způsobená virovou částicí začíná vazbou na hostitelský receptor (cytoplazmatickou membránu). Virová částice vstupuje do hostitelské buňky procesem zvaným „endocytóza“, kdy dochází k invaginaci cytoplazmatické membrány v místě vazby virionu na receptor a ke vzniku endocytického váčku s uzavřeným virionem. Buněčnými mechanismy je zajištěno, že v endocytickém váčku dojde ke snížení pH, které dále indukuje výše zmíněnou konformační změnu hlavního obalového proteinu *E*, který se vztyčí a odhalí tak své hydrofobní domény (Helenius, 1995; Holzmann a kol., 1995). To má za následek fúzi membrány endocytického váčku (endosómu) s obalovou membránou virionu a uvolnění nukleokapsidy (nahý virion bez obalu) do cytoplazmy. Mechanismus rozložení virové nukleokapsidy a uvolnění RNA není dosud zcela objasněn. V další fázi probíhá replikace a translace virové RNA, kdy vzniká velký polyprotein (Chambers a Rice, 1987).

Ke skládání virových částic dochází na membránách endoplazmatického retikula (ER), se kterými jsou asociované všechny virové proteiny (*protein C* je v komplexu s virovým genomem). Viriony dozrávají na membránách odvozených z ER a odtud jsou uvolňovány pučením do lumen ER, kde jsou ve spojení s *proteiny prM* a *E* a společně vytváří neobalený (nahý) virion (Rajčáni a Čiampor, 2006). Neobalené virové částice jsou pak dále transportovány exocytickou cestou, kdy *protein prM* je rozštěpen hostitelskou furinovou proteázou v trans-Golgiho aparátu. Štěpení *proteinu prM* a rozpuštění *prM* z virové částice způsobuje konformační změnu virového obalového glykoproteinu *E* a maturaci virových částic. Vzniklé virové částice s obalem (zralé viriony) jsou následně uvolněny ven z buňky procesem exocytózy.



**Obrázek 3: Replikační cyklus flavivirů.**

A) Viriony navázané na povrchové receptory hostitelské buňky vstupují do buňky endocytózou. B) Acidifikace (pH) endozomálního vakuolu způsobí konformační změnu proteinů virionu, fúzi virové a buněčné membrány hostitelské buňky a rozbalení virionu. C) Jakmile je virový protein uvolněn do cytoplazmy, +RNA je translatována do jednoho polyproteinu. D) K replikaci viru RNA dochází v ER uvnitř nebo na membráně ER. E) Strukturální proteiny a nově syntetizovaná +RNA pučí do cisterny ER. F) Neinfekční, nezralé virové a subvirové částice jsou dále transportovány trans-Golgiho aparátem (TGN). Nezralé viriony jsou přimknuty hostitelskou proteázou za vzniku zralých virových částic. G) Zralé viriony a subvirové částice jsou postupně uvolňovány ven z buňky exocytózou. (<http://jiang.bio.purdue.edu/research.php>; upraveno).

## 1.5. Maturace flavivirů

*Flaviviry* můžeme rozdělit do dvou skupin podle způsobu jejich maturace v hostitelské buňce: *cis* a *trans* (Šenigl, 2000a, b; Šenigl a kol., 2006). Vlastní maturaci viru předchází penetrace virionu do hostitelské buňky a způsob, jakým virion do nitra buňky vniká se zdá být shodný pro celou čeleď *Flaviviridae*.

### 1.5.1. Strukturální rozlišení *cis* a *trans* maturujících flavivirů

U většiny virů probíhá maturace způsobem *trans* a obalené (zralé) viriony se shromažďují v cisternách ER. Mezi *trans*-maturující viry patří např. viry Japonské encefalitidy, viru západního Nilu, encefalitidy Murray Valley, encefalitidy St. Louis a kmen New Guinea C viru dengue-2 (Zhang a kol., 1993; Hase a kol., 1987b; Ng, 1987; Ng a Hong, 1989). Uvnitř cisteren ER, které jsou hypertofované a dilatované se později začnou společně s charakteristickými váčky (tzv. jemné membránové struktury, z angl. „smooth membrane

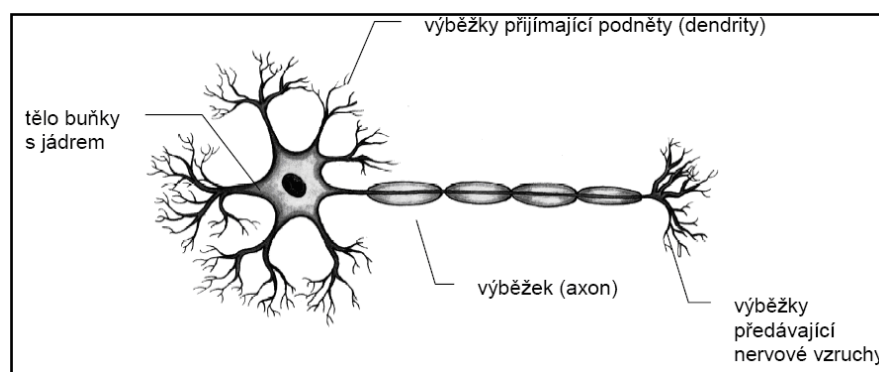
structures“) objevovat viriony. Povrch virionů je již pokryt membránovým obalem a viriony putují do Golgiho aparátu (GA), kde probíhá maturace viru. Z GA jsou transportovány ve váčcích do trans-Golgiho aparátu (trans-GA). Odtud pak směřují k buněčné membráně, se kterou splynou a viriony jsou uvolněny do extracelulárního prostoru. Pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM) bylo zjištěno, že lze vidět už hotové obalené viriony (zralé) uvnitř ER, aniž by byly v cytoplazmě nebo jiných vnitrobuněčných kompartmentech pozorované neobalené „nahé“ nukleokapsidy (nezralé viriony) (Filshie a Řeháček, 1968). Jakým způsobem viriony získávají svůj membránový obal není dosud jasné. Pozorování pučení virionů do cisteren RER se zatím nepodařilo zachytit pomocí TEM.

U *cis*-maturujících virů je situace odlišná. Neobalené nukleokapsidy (nezralé viriony) jsou skládány v cytoplazmě a následně putují k buněčné membráně, přes kterou pučí a tak získávají svůj obal. Viriony pozorované např. u klíštěcích buněk infikovaných virem KE jsou poté uvolněny z buňky ven exocytózou (Šenigl, 2000a). ER není hypertrofováno, ale naopak dochází k jeho fragmentaci a vzniku mnoha váčků. Na membránách ER dále dochází k disociaci ribozómů. Mezi *cis*-maturující viry a jim odpovídající výše popsany způsob maturace patří kmen PR-159 viru dengue-2 (Hase a kol., 1987a).

Různé kmeny viru dengue mohou vykazovat charakteristickou maturaci typu *cis* nebo *trans*. U buněk linie J-111 infikovaných virem kmene Mochizuki nebo Hawaii 32748 viru dengue-1 byly pozorovány znaky obou typů maturace současně. Šenigl a kol. (2006) ve své studii pozoroval u linie buněk PS (prasečí ledvina), které byly infikovány virem KE, maturaci typu *trans*. Naopak linie klíštěcích buněk (IDE2) infikovaných virem KE projevovala znaky maturace typu *cis*. Můžeme tedy říci, že si *flaviviry* vyvinuly různé způsoby maturace, které závisí na komplexní interakci viru a hostitelské buňky (Šenigl, 2000a, b).

## 1.6. Nervové a nádorové buňky CNS

Nervové buňky (neurony) patří mezi základní stavební jednotku nervové soustavy. Nervové výběžky (dendrity) přijímají podněty a pomocí těchto tenkých výběžků se buňky navzájem dotýkají zvláštním zakončením zvaným nervové synapse. Tyto synapse umožňují vzájemné propojení neuronů.



**Obrázek 4:** Stavba nervové buňky (neuronu). (<http://www.zmysl.zlivedu.cz/Biker/Pr8/Nerv.pdf>).

Pro objasnění interakce viru KE s lidskými neuronálními buňkami *in vitro* byla v této magisterské práci zaměřena pozornost pouze na nádorové buňky CNS (neuroblasty). Existují různé nádory a nádorové buňky CNS, které můžeme rozdělovat podle histogenetického původu do různých skupin. Převážná část mozkových nádorů je složena z buněk podobných gliím a neuronům a z buněk podobných jejich histogenetickým formám. Mezi nádory z vývojové řady neuronů patří: **medulloblastom, neuroblastom a gangliogliom**. Neuro-

epitel převážně produkuje neuroblasty, později pouze gliové buňky. Po určité době se neuroblasty již nedělí, pouze vyžívají v diferencovaný neuron s početnými dendrity. *Neuroblast* je tedy nezralá, dělicí se nervová buňka, ze které se vyvine neuron nebo gliová buňka. U člověka jsou neuroblasty produkovány kmenovými buňkami pocházejícími z neurálního hřebenovitého elementu sympatického nervového systému ([https://atlases.muni.cz/atlases/stud/atl\\_cz/main+cnspatol+tumcns.html](https://atlases.muni.cz/atlases/stud/atl_cz/main+cnspatol+tumcns.html)).

## 1.7. Klíšťová encefalitida a klinické projevy

Klíšťová encefalitida, „zánět mozku“, je infekční virové onemocnění napadající mozek a mozkové blány. Onemocnění přenáší klíště *Ixodes ricinus* a průběh KE může být jednofázový nebo dvoufázový. Uvádí se, že u 72-87% pacientů se jedná o dvoufázové onemocnění (Lindquist a Vapalahti, 2008).

### 1.7.1. Příznaky a projevy

Okamžikem vstupu viru do lidského organismu začíná inkubační doba onemocnění. Klíšťová encefalitida je nemocí věku, to znamená, že u velmi malých dětí probíhá onemocnění většinou velmi lehce. U dětí starších a dospělých se za 7 – 14 dní po přisátí klíšete objeví chřipkovité příznaky (teplota, únava, nevolnost, bolesti hlavy, kloubů, svalů) (Banzhoff a kol., 2008). Poté zpravidla následuje období 1 až 2 týdnů bez příznaků. Dopravnými znaky může být i nevolnost či zvracení (Charles a kol., 2004). U některých pacientů může nemoc touto fází skončit a dojít k úplnému uzdravení. Během této fáze se neobjevují příznaky meningoencefalitidy (Dumpis a kol., 1999).

Druhá fáze onemocnění se projevuje nástupem hlavních neurologických syndromů: prudkých bolestí hlavy, které jsou provázeny horečkami, meningitidou atd. Nemocný je světloplachý, přidává se nevolnost a zvracení. Příznakem poškození nervového systému je ztuhnutí svalů na šíji, svalový třes, nervové obrny, závratě, poruchy spánku, poruchy paměti a dezorientace (Grešíková a Nosek, 1981). Tento akutní stav trvá 2 až 3 týdny. Poté obvykle dojde k postupnému zlepšování stavu. Přibližně u jedné třetiny infikovaných pacientů první fáze chybí a onemocnění se již ze začátku projeví závažnými příznaky druhé fáze. Při těžkém průběhu může dojít k úmrtí nebo k dlouhodobějším nebo doživotním následkům v podobě ochrnutí, poruchám soustředění, nálady nebo spánku, chronické bolesti hlavy, deprese nebo snížení intelektuálního výkonu (Banzhoff a kol., 2008). Úmrtnost na KE v Evropě je nižší než 1% (Charrel a kol., 2004).

## 1.8. Morfologické změny buněk CNS infikovaných virem KE

Ve skutečnosti infekce způsobená *flaviviry* způsobuje charakteristické, ale ne pro danou chorobu specifické neuropatologické změny v CNS, přednostně v míše, mozkovém kmeni a mozečku zahrnující meningitidu a polioencefalomyelitidu spojenou se zánětlivou infiltrací buněk. Tyto patologické změny byly popsány u myši (Osetowska a Wróblewska-Mularczyk, 1966), křečka (Simon a kol., 1966), opic (Simon a kol., 1967) a u člověka (Seitelberger a Jellinger, 1966; Beer a kol., 1999; Schellinger a kol., 2000).

Virus KE je patogen způsobující neuroinfekci (KE), která postihuje centrální nervový systém (CNS) člověka (Gritsun a kol., 2003). Existují rozdíly v buněčné patogenezi u buněk savčího hostitele a vektora (klíšete) po infekci *arboviry*. V buňkách hostitele se virus replikuje a způsobuje jejich poškození nebo častěji buněčnou smrt. Výsledným projevem je vznik onemocnění organismu hostitele. Naopak v buňkách vektora se virus také replikuje, ale nemá patologický vliv na buňku a nezpůsobuje její poškození (Šenigl, 2000a, b).

U linie savčích buněk z prasečí ledviny (PS) infikované virem KE byla prokázána replikace viru uvnitř cytoplazmy. Infekce způsobená virem KE měla za následek vážné poškození buněčné ultrastruktury a buňky zpravidla do dvou dnů zahynuly. Naopak v jiném případě např. při infekci virem KE u linie buněk RA-257 pocházejících z klíšťat docházelo k pomnožení viru, ale cytopatický efekt (CPE; působení viru na buňku) nebyl pozorován. Buňky nevykazovaly poškození, ale došlo k nastolení tzv. produktivní perzistentní infekce (virus se replikuje, tvoří infekční virové částice, ale buňku nijak nepoškozuje). Prozatím nezodpovězenou otázkou zůstává co je vlastně příčinou toho, že virus KE u jednoho typu buněk způsobuje buněčnou smrt a pro jiný typ je zcela neškodný (Šenigl, 2000a). Schopnost reakce hostitelské buňky na infekci virem KE zůstává zatím zcela neobjasněná.

U lidských neuronálních buněk (neuroblasty, glioblasty a medulloblasty) infikovaných virem KE byla testována citlivost k viru KE, a virovou replikací způsobený CPE. Bylo zjištěno, že buňky CNS po infekci virem KE jsou schopny produkovat vyšší množství (100-10.000 násobný titr) viru v porovnání s běžnými buněčnými liniemi jiného původu. U těchto buněk bylo pozorováno velké množství morfologických změn, včetně proliferace membrán drsného endoplazmatického retikula (RER) a rozsáhlé změny v buněčné cytoplazmě a cytoskeletu. Buňky prokazovaly známky apoptózy, nekrózy a virem indukovaný CPE (Růžek a kol., 2009).

### 1.8.1. Cytopatický efekt (CPE)

Starší označení „*cytopatogenní*“ efekt je důsledek působení některých virů na buňku. Vir po proniknutí do buňky způsobí zvrácení její fyziologické funkce ve svůj prospěch a zahubí ji. Při rozpadu buňky dochází potom k uvolnění nových virových částic. Tento proces můžeme pozorovat *in vitro* v buněčné kultuře infikované virem. V kultuře buněk vznikají místa, tzv. plaky, kde došlo k CPE a tedy k rozpadu buněk, které můžeme pozorovat pomocí světelného a elektronového mikroskopu. CPE produkovaný virem KE pozorovaný u buněk CNS se projevoval několika charakteristickými rysy: zakulacení buněk (z angl. „rounding up“), agregací buněk a buněčnou smrtí (Růžek a kol., 2009).

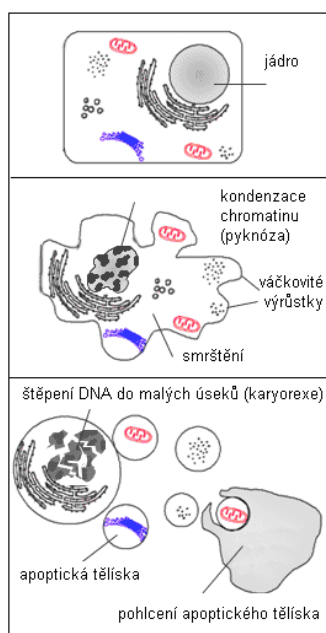
### 1.8.2. Apoptóza

Apoptózu řadíme k jednomu z hlavních typů programované buněčné smrti (PCD) probíhající u živočichů i rostlin (Hay a Kannourakis, 2002). Apoptóza je indukována signálem zvenčí i ze samotné buňky naprosto cíleně. Výsledkem je usmrcení a odstranění buňky takovým způsobem, že nedojde k poškození okolních buněk. Jedná se tedy o organizovaný a přísně regulovaný děj (sled biochemických procesů) vedoucí k morfologickým změnám buňky (Zhu a kol., 1995; Despres a kol., 1996, 1998; Chu a Ng, 2003). Vzhled buňky vykazuje charakteristické rysy apoptózy jako např.:

- smrštění buňky
- degradace cytoskeletu
- váčkovité výrůstky z membrány (z angl. „blebbing“; způsobené rozkladem cytoskeletu)
- změny ve struktuře membrány, např. vysunutí fosfatidylserinu na její vnější povrch („eat-me“ signál)
- poruchy propustnosti mitochondriální membrány a uvolňování cytochromu c
- fragmentace jádra i chromozomů uvnitř

- pyknóza chromatinu (kondenzace do kompaktních shluků), karyorexe (internukleozomální štěpení DNA do malých úseků) a následná karyolýza (rozpad jádra)
- rozpad buňky na apoptická tělíska (membránou ohraničené buněčné fragmenty)

Při vlastním průběhu apoptózy dochází k využití enzymatické regulační kaskády buňky (uplatňují se zde tzv. kaspázy vyskytující se u neaktivní buňky). Proapoptotický signál aktivuje kaspázy, které připravují buňku na její smrt. Na rozdíl od nekrózy dochází k nenáhodné fragmentaci jaderné DNA (Shinomiya a kol., 1994; Adle-Biassette a kol., 1995). Buňka mění tvar (smrštění) i charakter různých organel (např. mitochondrie), které hrají významnou roli v apoptóze buňky. Celý proces je ukončen rozpadem buňky do apoptických tělísek a odstranění buněčných zbytků bez vzniku zánětu (Fairbairn a kol., 1994; Edstrom a kol., 1996). Mezi nekrózou a apoptózou neexistuje ostrá hranice a oba jevy se často kombinují. Například u myších neuroblastů infikovaných virem dengue, který se řadí mezi *flaviviry* byla pozorována indukovaná apoptóza *in vitro* (Despres a kol., 1996). Pomocí metody TUNEL assay, kdy se měří přítomnost štěpené chromozomální DNA můžeme sledovat, zda infekce viru KE způsobuje apoptózu u buněk CNS (Růžek a kol., 2009).



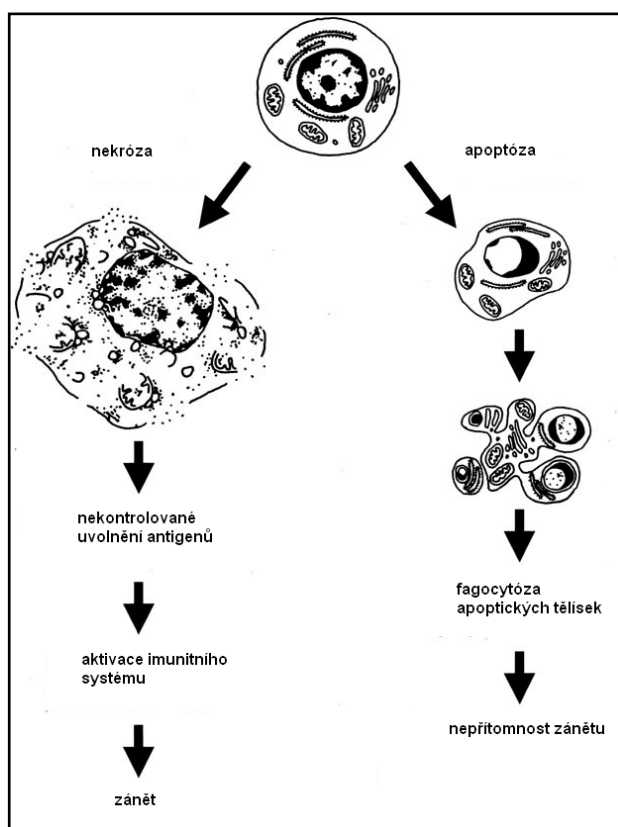
**Obrázek 5: Morfologické změny buňky při apoptóze.**  
(cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Apoptosis.png, upraveno).

### 1.8.3. Nekróza

Dalším typem buněčné smrti je nekróza. Jedná se o patologický proces, který může být vyvolán různými vlivy (mechanickými, chemickými nebo tepelnými). Nekrózu může také vyvolat virová infekce buňky, různé toxiny nebo vyčerpání energetických zásob buňky. Při nekróze dochází k narušení cytoplazmatické a jaderné membrány a k ultrastrukturním změnám buněčných organel, např. mitochondrií (Wyllie a kol., 1980). Výsledkem nekrotického procesu je narušení rovnováhy vnitřního prostředí buňky, které má charakteristické rysy:

- objemové změny celé buňky (buněčný edém), tak i jiných buněčných organel (mitochondrie a ER)
- přítomnost velkého množství vakuol v cytoplazmě
- poškození buňky enzymy (náhodné štěpení jaderné DNA) a její rozpad
- karyolýza , pyknóza a karyorexe
- vznik zánětu

Celý obsah buňky se uvolní do okolí. Uvolněné enzymy indukují nekrózu okolních buněk a způsobují „řetězovou reakci“, která může mít za následek rozsáhlé poškození tkáně a následný zánět.



**Obrázek 6: Dva typy buněčné smrti: nekróza a apoptóza.** Při nekróze dochází k porušení cytoplazmatické membrány, což vede k narušení rovnováhy vnitřního prostředí buňky a to má za následek rozpad celé buňky a vznik zánětu v okolí poškozené tkáně. Při apoptóze dochází ke změnám cytoplazmatické membrány, fragmentaci jaderné DNA a celý proces končí rozpadem buňky do apoptických tělísek. Apoptická tělíška jsou fagocytována okolními buňkami ([www.nature.com/.../v83/n4/fig\\_ta/3780641f1.html](http://www.nature.com/.../v83/n4/fig_ta/3780641f1.html), upraveno).

## 1.9. Vezikulární transport

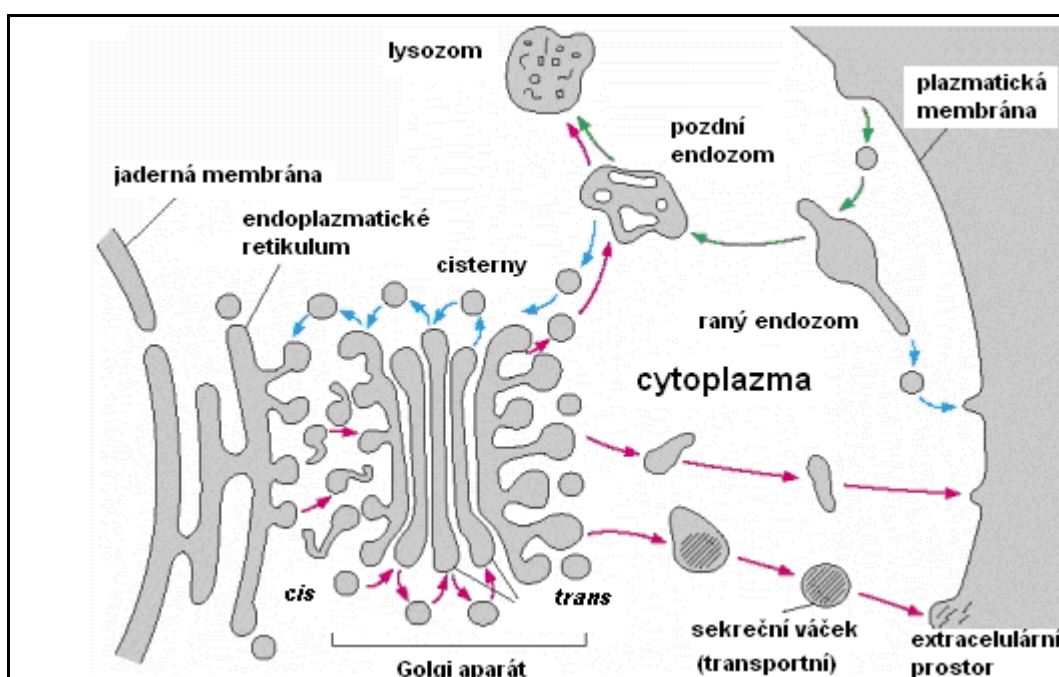
Hlavní způsob transportu molekul/proteinů v buňkách (intracelulární transport) využívá transportní váčky. Buněčné procesy, kde se využívají transportní váčky jsou: sekrece, exocytóza, endocytóza a transcytóza. Tyto procesy zajišťují komunikaci intracelulárních kompartmentů s cytoplazmatickou membránou a extracelulárním prostorem. Vezikulární transport je jednou ze základních charakteristik živé eukaryotické buňky (obr. 7). Mezi hlavní principy vezikulárního transportu patří: pučení (z angl. „budding“) - vytváření transportních váček, oddělení váčku od zdrojového kompartmentu, cílený transport cytosolem v asociaci s cytoskeletem (převážně s mikrotubuly), specifické usazení („svázání“) a propojení membrán a závěrečná fúze váčku s cílovým kompartmentem. Zakončení celého procesu je uvolnění vnitřního obsahu váčku do cílového kompartmentu, extracelulárního



prostoru nebo inkorporací membránových proteinů do biologické membrány akceptorového kompartmentu (Alberts a kol., 1998).

### 1.9.1. Sekreční dráha

Prvním kompartmentem sekreční dráhy proteinů určených do extracelulárního prostoru, k začlenění do cytoplazmatické membrány nebo určené k funkci v lysozomálně/endozomálním kompartmentu jsou cisterny ER. Funkční propojení mezi ER a GA tvoří membránový systém nazývaný ERGIC, který zahrnuje pre-Golgi intermediáty (pGm) nebo tzv. tubulo-vezikulární membránové shluky (klastry). Transport proteinu mezi ER a GA je obousměrný a využívá transportních váčků (zajišťuje retenci a recyklaci proteinů v ER). Směr pohybu transportních váčků mezi ER a Golgiho aparátem je, mimo jiné, asociovan s různými typy proteinů vytvářejícími obal transportních váčků (ER>Golgi - COPII, Golgi>ER – COPI). Golgiho aparát je následujícím kompartmentem. Golgiho aparát je dynamický membránový systém postupně zrajících váčků (tzv. cisteren), který zajišťuje glykosylační modifikace proteinů syntetizovaných a sbalovaných v ER. Golgiho aparát obsahuje velké množství na sobě naskládaných cisteren a má dva různé povrchy: vstupní (*cis*) a výstupní (*trans*). *Cis* povrch sousedí s ER, kdežto *trans* povrch směřuje k plazmatické membráně.



**Obrázek 7: Intracelulární kompartmenty uvnitř cytoplazmy buňky a jejich účast při sekreci a endocytóze.** Transportní sekreční váčky umožňují transport látek mezi mimobuněčným prostorem (modře vystínovaná část) a jednotlivými buněčnými kompartmenty. V sekreční dráze (červené šipky) jsou molekuly proteinu transportovány z ER přes Golgiho aparát směrem k plazmatické membráně, nebo přes pozdní endozom do lysozomů. V endocytické dráze (zelené šipky) jsou molekuly proteinu pohlceny do váčku (endozomu) odvozených od plazmatické membrány a směřují do nitra buňky, kde dochází k přenosu do raného endozomu a posléze (cestou pozdních endozomů) do lysozomů. Mnoho proteinů z raného endozomu se vrací na povrch buňky pro opětovné použití; stejně tak některé proteiny z pozdního endozomu jsou zpětně vráceny do GA a odtud do ER (modré šipky). ([www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=m](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=m), upraveno).

### 1.9.2. Endocytóza

Endocytóza je proces, pomocí kterého eukaryotické buňky přijímají extracelulární molekuly do buňky. Proces je zahájen invaginací cytoplazmatické membrány. Pohlcení

materiál, který je obklopen plazmatickou membránou, nejdříve vypučí dovnitř buňky, potom se odškrtní a nakonec vytvoří endocytický váček (obr. 7). Podle velikosti vytvořených váčků (endozomů) se endocytóza dále dělí na dva typy: pinocytózu (buněčné pití) a fagocytózu (buněčné požívání) (Alberts a kol., 1998).

## 1.10. Příprava biologických preparátů pro transmisní elektronovou mikroskopii (TEM)

Ke studiu ultrastruktury biologických vzorků lze využít TEM, který pracuje při urychlovacím napětí 80-100 kV a pod vysokým vakuem. K přípravě biologických preparátů se používají chemické, fyzikální metody a metody, které kombinují oba způsoby. Při fyzikální metodě je materiál kryofixován a po kryofixaci krájen při velmi nízkých teplotách (-120 °C). Kryorezy obsahují vodu a jsou prohlíženy ve vychlazeném TEM přímo. Během této přípravy nejsou použity žádné chemické látky. Cílem TEM je sledování vnitřní ultrastruktury biologických preparátů co nejbližší jejich nativnímu stavu, čehož lze dosáhnout pouze dobře zvolenou metodou přípravy.

Příprava preparátů chemickou cestou:

- 1) *fixace preparátu* - při chemické metodě je prvním krokem přípravy chemická fixace. Biologický preparát je vystaven reakci chemického činidla (např. glutaraldehyd, formaldehyd, oxid osmičelý atd.), která vede k jeho stabilizaci a imobilizaci bez větších ultrastrukturních změn.
- 2) *odvodnění „dehydratace“ preparátu* - nahrazení volné vody nebo ledu v biologickém preparátu organickým rozpoštědlem např. aceton etanol, metanol. Tento krok může být prováděn za pokojové teploty nebo při teplotách pod 0 °C např. PLT (z angl. „progresive lowering temperature“) nebo FS (z angl. „freeze substitution“).
- 3) *prosycení a zalévání do zalévacího média (pryskyřice)* - je prováděno v závislosti na typu použité pryskyřice např. akrylátové nebo epoxidové při různých teplotách. Polymerizace se provádí teplem při 60 °C nebo UV světlem při nízkých teplotách.
- 4) *příprava ultratenkých řezů* (preparát je nejdříve upraven do tvaru pyramidy (trimování) a pomocí ultramikrotomu nakrájen na ultratenké řezy o tloušťce 70-100 nm.
- 5) *kontrastování ultratenkých řezů pomocí kontrastujících látek* (biologický materiál má skoro stejnou hustotu jako zalévací medium a řezy v TEM mají minimální kontrast; cílem tohoto kroku přípravy je zvýšení kontrastu např. buněčných membrán a organel pomocí roztoku těžkých kovů např. octan uranylu a citrát olova.

### 1.10.1. Fyzikální metoda přípravy preparátů pro TEM

#### 1.10.1.1. Kryofixace (mrazová fixace)

Další používanou metodou přípravy biologických preparátů je metoda fyzikální, při které se uplatňují mrazové metody. Biologický preparát je nejdříve rychle zmrazen např. tekutým dusíkem. Kryofixaci lze provádět na předem chemicky fixovaných preparátech. Před kryofixací mohou být preparáty ošetřené kryoprotektantem. Chceme-li biologický vzorek dobře mrazově fixovat, musíme vycházet především z vlastností vody, která tvoří podstatnou složku buňky. Při nedokonalé kryofixaci preparátů může docházet ke tvorbě krystalů (Vanhecke a kol., 2008). Cílem kryofixace je dosažení vitrifikovaného stavu „zesklenění“ preparátu (preparát je ochlazen pod rekrystalizační teplotu bez vzniku krystalů).

Základní podmínkou minimalizace škod vzniklých při zmražení preparátu je dosažení vysoké chladicí rychlosti a dostatečně vysoké rychlosti odvodu tepla z preparátu (Studer a kol., 1995; Dubochet a kol., 1988).

Výhody kryofixace spočívají v tom, že:

- biologické preparáty zůstávají v přirozeném (nativním) prostředí
- nedochází k denaturaci antigenů a enzymů
- imobilizace nastává ve zlomku sekundy (možnost sledování dynamických dějů)

#### **1.10.1.2. Vlastnosti vody a proces nukleace (tuhnutí)**

Během kryofixace musíme počítat s anomálními vlastnostmi této kapaliny, které mohou mít za následek poškození ultrastruktury preparátů (např. potrhání buněk důsledkem zvětšujícího se objemu a vznikem krystalů).

Voda se vyznačuje několika vlastnostmi:

- hustota vody je nejvyšší při teplotě 277 K (4 °C) tzv. v kapalném stavu, nikoliv v bodě tuhnutí
- voda má vysoký bod tání (273 K), bod varu (373 K)
- objem vody v pevném skupenství je cca o 10% větší než v kapalném stavu
- vysoké vypařovací teplo
- vysoká dielektrická konstanta (s čímž souvisí dobré rozpouštěcí schopnosti)
- několik krystalických forem ledu (Robards a kol., 1985)

Proces tuhnutí vody probíhá tzv. nukleací (Kanno a kol., 1975). Rozlišujeme dva druhy nukleace (tvorby krystalizačních zárodků ledu):

- Homogenní nukleace – v čisté vodě při určité teplotě se začnou náhodně tvořit krystalizační zárodky.
- Heterogenní nukleace – u vody, ve které jsou rozpuštěné další látky, působí nerozpustné částice jako zdroj krystalizačních zárodků (Robards a kol., 1985).

S procesem krystalizace je spojeno uvolňování tepla, které ohřívá celý systém a udržuje jej v oblasti růstu krystalů. Růst krystalů pokračuje až do dosažení rekrytalizační teploty (zhruba při 138 K). Pokud teplo uvolňované krystalizací není dostatečně rychle odváděno, dojde k vytvoření relativně velkých krystalů.

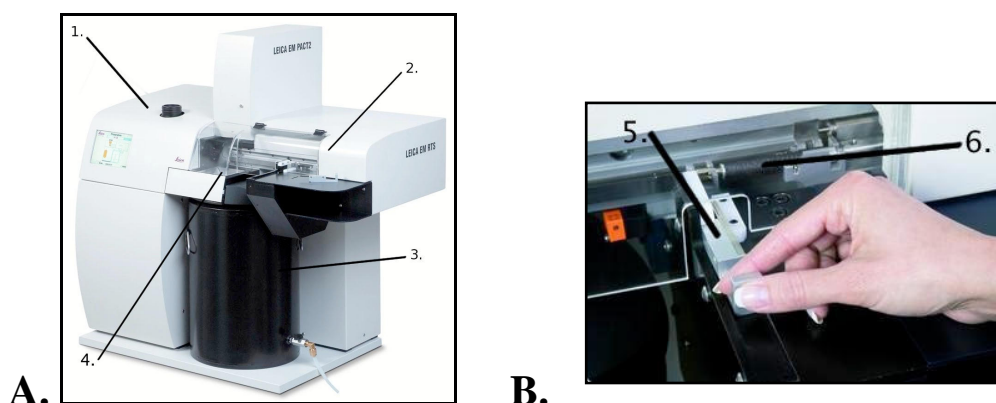
U biologických vzorků je situace jiná. Buňky jsou složeny z mnoha kompartmentů, které jsou odděleny semipermeabilními membránami. Kromě cca 70% vody buňka obsahuje řadu organických a anorganických látek. Voda zamrzá při teplotě 233 K a její rekrytalizační teplota je cca 188 K. Důsledek toho je výrazné zkrácení teplotního intervalu, při němž mohou růst krystaly. Proces krystalizace (růst krystalů) je spojen s fázovou separací, při níž rostoucí krystalky ledu kumulují vodu z nedostatečně zmražených oblastí. Tím pádem roste koncentrace iontů zbylých roztoků, mění se osmotický gradient a pH, což vede k redistribuci intra resp. extracelulárních roztoků a k poškození buněčných struktur. Proces skončí v okamžiku dosažení eutektické teploty („eutektikum“ je tuhá směs dvou látek, jejichž krystaly se vytvářely při tuhnutí společně, teplota = eutektický bod je nižší než teplota tání obou samostatných složek) a ztuhnutím. Teplotní interval růstu krystalů lze zkrátit

při použití **kryoprotektantu** (Gilkey a Staehelin, 1986; McDonald a Auer, 2006). Kryoprotektant je látka, která snižuje teplotu homogenní nukleace, zvyšuje rekrystalizační teplotu a snižuje množství volné vody v systému.

### 1.10.1.3. Rychlé zmrazení preparátů za vysokého tlaku „high pressure freezing“ (HPF)

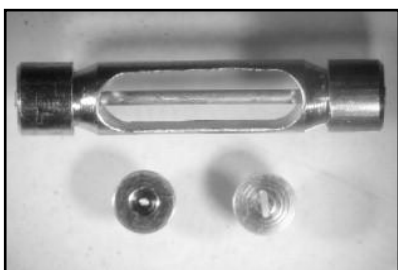
Jednou z novějších fyzikálních metod přípravy biologických preparátů, která uchovává membrány a buněčné organely bez poškození krystaly ledu a co nejlíže jejich nativnímu stavu, je rychlé mražení za vysokého tlaku (HPF) (Sawaguchi a kol., 2002; Studer a kol., 1992, 1995; McDonald, 2007; Moor, 1987). Preparáty zmražené pomocí HPF jsou následně zpracovány metodou mrazové substituce ledu (FS) a zalévány do pryskyřice např. Epon. Fyzikální metoda přípravy biologických preparátů pomocí HPF představená v roce 1970 je hlavně omezená velikostí preparátu. Doporučovaná velikost preparátu by měla být zhruba o průměru 1-2 mm s maximální šířkou 200  $\mu\text{m}$  (Moor, 1987; Moor a kol., 1980; Moor a Hoehli, 1970; Riedle a Hoehli, 1973). Při HPF je materiál fixován pomocí tekutého dusíku za vysokého tlaku. Rychlost fixace je kratší než 50 ms (Vanhecke a kol., 2008). Při tlaku 2000 Bar dochází ke snížení bodu tuhnutí vody z  $0^{\circ}\text{C}$  na  $-21^{\circ}\text{C}$  (platí pro heterogenní nukleaci) a ke zvýšení viskozity vody. Při extrémní viskozitě zůstanou všechny buněčné složky včetně vody zcela imobilizované (Roberts a kol., 1985).

K rychlému mražení živých, chemicky nefixovaných infekčních a neinfekčních neuroblastů byl použit speciální přístroj Leica EM PACT2. Jedná se o vysokotlaké mrazicí zařízení, které je vybaveno rychlou transportní jednotkou (RTS) (obr. 8A a B). Díky vysokému tlaku dochází ke zbrzdění procesu nukleace, růstu krystalů a tím i k efektivnímu snížení bodu tuhnutí vody.



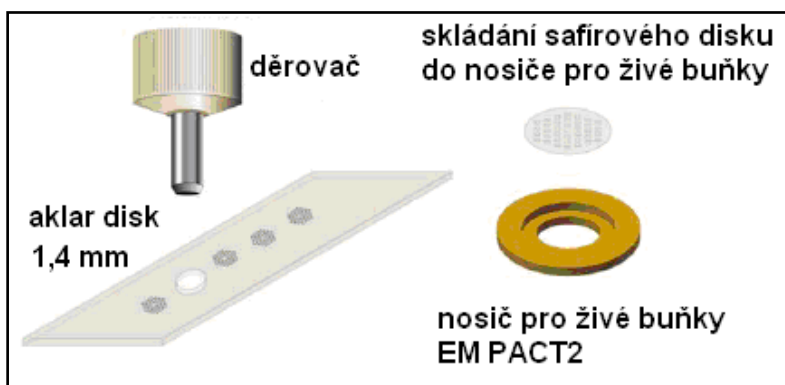
**Obrázek 8: Leica EM PACT2 s rychlou transportní jednotkou. A:** 1. V horní části je zobrazen vysokotlaký mrazicí přístroj, kde dochází k rychlému zmražení vzorků. 2. V pravé horní části je zobrazena rychlá transportní jednotka (RTS), kam se vkládají vzorky k rychlému mražení. 3. Dewarova nádoba na kapalný dusík je zobrazena v pravé dolní části a 4. dusíková lázeň, kam jsou vzorky dopraveny po kryofixaci. **B:** 5. V levé části je zobrazen podávací nástavec s nosičem vzorku v RTS jednotce. 6 V pravé části se nachází přednastavený transportní bajonet k mražení vzorku. ([http://www.leicamicrosystems.com/typo3temp/pics/EM\\_PACT2\\_1\\_05\\_daf262fc4e\\_rounded.jpg](http://www.leicamicrosystems.com/typo3temp/pics/EM_PACT2_1_05_daf262fc4e_rounded.jpg), upraveno). ([http://www.leica-microsystems.com/typo3temp/pics/EM\\_PACT2\\_3\\_05\\_375cfac662\\_rounded.jpg](http://www.leica-microsystems.com/typo3temp/pics/EM_PACT2_3_05_375cfac662_rounded.jpg), upraveno).

K rychlému mražení v přístroji Leica EM PACT2 se používají různé typy nosičů např. trubička pro suspenze, kovový kroužek pro buňky narostlé na safírovém sklíčku, kovový terčík s jamkou nebo kroužek pro biopsie zvolené podle typu vzorku (buňky, tkáně nebo celé organismy) a způsobu zmražení (obr. 9 a 10).



**Obrázek 9:** Tři typy nosičů používané k rychlému zmrazení biologických preparátů v přístroji Leica EM PACT2. V horní části je zobrazen bajonet s trubičkou uvnitř, která je vhodná pro suspenze. Vlevo dole je plochý kruhový terčík s jamkou uvnitř, vhodný pro celé organismy nebo buněčné preparáty o velikosti (200 µm hloubka, průměr 1,5 mm) a vpravo dole se nachází nosič pro biopsie (200 µm hloubka, vnitřní průměr 1,5 mm a tloušťka 0,25 mm) (Vanhecke a kol., 2008; upraveno).

Pro buněčné kultury lze použít aklarové fólie nebo safírové disky, na které buňky dobře adherují. Ilustrovaná příprava aklarového disku před zpracováním pro HPF a montáž safírové disku do speciálního nosiče pro živé buňky je znázorněna na obr. 10.

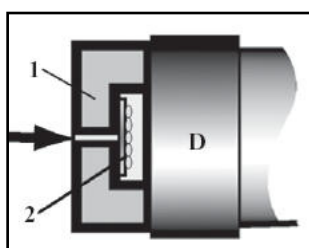


**Obrázek 10:** Příprava nosičů pro buněčné kultury určené k rychlému mražení pomocí HPF. Vlevo dole aklarová fólie a nahoře speciální děrovač, pomocí něhož lze získat kolečka o průměru 1,4 mm. Vpravo dole pozlacený nosič pro živé buňky používaný v mrazicím přístroji EM PACT2, nahoře safírový disk, který se vkládá do nosiče (Spiegelhalter a kol., 2010; upraveno).

K rychlému mražení v Leica EM PACT2 se používají různá příslušenství (nosiče, podávací nástavce, transportní bajonety atd.) (obr. 11 a 12). Během přípravy rychlého mražení preparátů jsou nosiče s preparáty po ošetření kryoprotektantem zasazeny do podávacího nástavce (obr. 11B). K transportu preparátu z RTS jednotky do mrazící jednotky (HPF) přístroje EM PACT2 se využívá transportního bajonetu (obr. 11), který je před procesem mražení připraven v RTS jednotce (obr. 8B). Proces rychlého mražení je ukončen transportem preparátu z RTS jednotky v transportním držáku ( obr. 11C) do mrazící jednotky přístroje EM PACT2, kde preparáty končí ponořené v dusíkové lázni.



**Obrázek 11:** Podávací a transportní příslušenství používané v RTS jednotce přístroje Leica EM PACT2. A. Horní část transportního bajonetu pro rychlé mražení v RTS s malým nastaveným otvorem. B. Rychlý podávací nástavec pro nosiče preparátů s membránovým nosičem zabudovaným uvnitř nástavce (šipka). C. Uzavřená horní část transportního bajonetu s nosičem preparátu uvnitř po kryofixaci (Müller-Reichert a kol., 2006; upraveno).



**Obrázek 12:** Průřez speciálním transportním držákem (bajonetem). 1. Držák na vzorky používaný pro rychlé zmrazení v Leica EM PACT2 s RTS jednotkou. V levé dolní části držáku je otvor. Šipka naznačuje přívod vysokého tlaku. 2. Safírové sklíčko s buňkami směřuje proti otvoru držáku, který je zakrytý diamantem (D). Volný prostor kolem buněk je vyplněn kryoprotektantem například 20% BSA (Reipert a kol., 2008; upraveno).

## 2. Cíl práce

Cíl této diplomové práce lze shrnout do následujících dílčích úkolů:

- 1) Sledování morfologických změn na povrchu neuroblastů infikovaných virem klíšťové encefalitidy pomocí skenovací (rastrovací) elektronové mikroskopie.
- 2) Studium vývoje, replikace a maturace viru klíšťové encefalitidy v lidských neuroblastech pomocí transmisní elektronové mikroskopie.
- 3) Imunolokalizace virového proteinu E v endoplazmatickém retikulu a potvrzení vazby virového proteinu E na mikrotubulární vlákna ( $\alpha$ -tubulin) v cytoskeletu neuroblastů infikovaných virem klíšťové encefalitidy pomocí fluorescentní a konfokální mikroskopie.
- 4) Porovnání ultrastruktury neuroblastů infikovaných virem klíšťové encefalitidy připravených dvěma různými metodami přípravy preparátů pro transmisní elektronovou mikroskopii.
- 5) Interpretace získaných dat vzhledem k funkčním a morfologickým změnám odehrávajícím se v CNS hostitele při infekci virem KE.

## **3. Materiály a metody**

### **3.1. Virus KE a neuronální buňky**

Pro infekci tkáňových kultur byl použit virus klíšťové encefalitidy (KE) kmene Hypr původně izolován z krve 10-letého dítěte, u kterého byla v roce 1953 v České republice diagnostikována TBE (Pospíšil a kol., 1954).

Buněčnou linii lidských neuroblastů (UKF-NB-4) poskytl prof. Tomáš Eckschlager, Karlova univerzita, Praha. Buňky byly kultivovány při 37 °C v Incovu upraveném Dulbecovu médiu (IMDM) s přídatkem 10% fetálního telecího séra (FCS) a 1% směsi penicilinu a streptomycinu (Sigma). Buněčná linie neuroblastů UKF-NB-4 byla získána z metastáze buněk kostní dřeně nashromážděných z relapse pacienta v Evansově stadiu IV neuroblastomu (Cintal a kol., 1990).

### **3.2. Infekce tkáňových kultur a růst viru KE v neuroblastech**

Jednovrstvá kultura buněk byla kultivována v 96 jamkovém sterilním panelu (Costar). Buňky byly infikovány suspenzí obsahující virus KE, která byla rozředěná v malém množství kultivačního média (1 hodinu při 37 °C; virus se v dostatečném množství adsorbuje na povrch buněk). Po hodinové infekci se přítomný virus odsál a buňky byly dvakrát opláchnuty fosfátovým pufovaným roztokem (PB) a bylo přidáno 0,2 ml příslušného kultivačního média.

### **3.3. Příprava preparátů pro elektronovou mikroskopii (EM)**

#### **3.3.1. Skenovací elektronový mikroskop (SEM)**

Virem KE infikované a neinfikované neuronální buňky (neuroblasty) narostlé na krycích sklíčkách (12mm, Hirschmann laborgerate) byly nejdříve fixovány 2,5% glutaraldehydem v 0,1 M fosfátovém pufru (PB) přes noc při 4 °C. Po 24 hodinách byl fixační roztok odsán a sklíčka byla promyta v PB s 4% glukózou (vypírací roztok). Po důkladném promytí byl přidán 4% roztok oxidu osmičelého a PB v poměru 1:1 (výsledná koncentrace OsO<sub>4</sub> byla 2%) a 1 hodinu probíhala postfixace při pokojové teplotě. Poté byla sklíčka promyta ve vypíracím roztoku. Sklíčka byla odvodněna vzestupnou acetonovou řadou (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%), vložena do kapsiček z cigaretového papíru a vysušena metodou kritického bodu (CPD; z angl. „critical point drying“) pomocí speciálního přístroje PELCO CPD2. Vysušená sklíčka byla přichycena pomocí oboustranné uhlíkové lepenky na hliníkové terčíky. Hrany sklíčka byly lehce potřeny koloidním stříbrem pro vytvoření vodivých můstků a dobrý odvod negativního náboje. Sklíčka byla pokovena tenkou vrstvou (10-20 nm) Ag v přístroji Polaron equipment LTD. Sklíčka byla prohlížena ve skenovacím elektronovém mikroskopu JEOL 7401-F při urychlovacím napětí 3 kV.

#### **3.3.2. Transmisní elektronový mikroskop (TEM)**

Virem KE infikované a neinfikované neuronální buňky (neuroblasty) narostlé na krycích sklíčkách byly fixovány různými způsoby:

- Buňky byly fixovány přidáním 50% glutaraldehydu přímo do kultury. Výsledná koncentrace glutaraldehydu byla 2,5%. Neuroblasty byly fixovány při 4 °C, a při pokojové teplotě po dobu 24 hodin. K peletu buněk (centrifugace při 4 °C, 1000 g, 15 min) byl přidán roztok 2,5% glutaraldehydu v PB. Buňky byly fixovány přes noc při 4 °C, a při pokojové teplotě 24 hodin.

Po 24 hodinách byly buňky promyty 3x15 minut ve vypíracím roztoku. Buňky byly ze sklíček pomocí laboratorní stěrky seškrabány do malého množství vypíracím roztoku a stočeny 5 minut při 810 g. K sedimentu bylo přidáno malé množství (1ml) 2% agarů zahřátého na 62 °C. Sediment s agarem se promíchal opakovaným nasáváním do pasterové pipety a byl centrifugován 5 minut při 810 g. Pelet buněk zalitý v agaru se ponechal 1-5 minut při 4 °C a poté byl krájen na malé kousky a vložil zpět do mikrozkuřavky, do které se přidal 4% roztok oxidu osmičelého a vypíracího roztoku v poměru 1:1. Postfixace probíhala 1 hodinu při pokojové teplotě. Po hodině byl vzorek promyt vypíracím roztoku 3x15 minut. Po důkladném promytí byly buňky odvodněny vzestupnou koncentrační řadou acetonu (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%) a vzorek byl ponechán v jednotlivých roztocích 15 minut. Po odvodnění byly buňky postupně prosycovány pryskyřicí Epon (Polysciences) vzestupnou koncentrační řadou pryskyřice a 100% acetonu (1:2, 1:1, 2:1). Buňky byly ponechány v jednotlivých krocích infiltrace 1 hodinu.

Buňky v čisté pryskyřici Epon byly umístěny do exsikátoru (vodní vývěvy), za účelem odvodu pryskyřice a zde byly ponechány přes noc. Druhý den byly buňky umístěny do formiček (SPI), zality do pryskyřice Epon a umístěny do termostatu (60 °C) na 48 hodin k polymerizaci. Hotové bločky byly v místě vzorku upraveny pomocí žiletky/trimovacího zařízení do tvaru pyramidy. Ultratenké řezy o tloušťce 70 nm byly krájeny diamantovým nožem na ultramikrotomu Leica Ultracut UCT při rychlosti krájení 1-2 mm/s. Ultratenké řezy byly sebrány na měděné síťky 300 Mesh s ultratenkou loukotí a kontrastovány. Jako první kontrastovací činidlo byl použit nasycený alkoholový roztok uranyl acetátu (30 minut v tmavé komůrce). Síťky byly vypláchnuty ve třech lázních 30% ethanolu. Druhým kontrastovacím činidlem byl vodný roztok citrátu olova (20 minut) v tmavé komůrce se sníženým obsahem CO<sub>2</sub> (dosaženo umístěním koncentrovaného roztoku NaOH s následným přidáním vody do komůrky). Síťky byly promyty ve třech lázních destilované vody. Po uschnutí byly síťky pozorovány v transmisním elektronovém mikroskopu JEOL 1010 při urychlovacím napětí 80 kV.

### **3.3.3. Kryofixační metoda (rychlé mražení neuroblastů) pomocí HPF**

K rychlému mražení byly použity živé buňky v kultivačním médiu (infikované a neinfikované neuroblasty) kultivované na různých nosičích:

- safírový disk o průměru 1,4 mm (Leica)
- aklarová fólie o průměru 1,4 mm (Polysciences)
- plochý kruhový terčík s jamkou o vnitřním průměru 1,2 mm, hloubkou 200 μm a tloušťkou 0,5 mm (Leica). Do terčíku byla umístěna kapka suspenze buněk kultivovaných na dně 96 jamkového sterilního panelu.

Část safírových disků (Leica) s buňkami byla zasazena do speciálních plochých kruhových nosičů s drážkou pro živé buňky (Leica) o průměru 1,5 x 0,14 mm a do plochých kruhových terčíků s jamkou uvnitř (Leica). Aklarové fólie s narostlými buňkami byly zasazeny do plochých terčíků (tloušťka 0,5 mm s vnitřním průměrem 1,2 mm a hloubkou 200 μm). Buňky (adherované na safírovém disku nebo aklarové fólii) uvnitř terčíku byly ošetřeny kryoprotektantem 20% BSA, který byl naředěn v kultivačním médiu. Buňky narostlé na dně jamkového panelu byly opatrně seškrabány, odsáty s kultivačním médiem do mikrozkuřavky a 5 minut centrifugovány (1000 g). Supernatant byl odstraněn, k buněčnému peletu bylo přidáno malé množství 20% BSA a znovu proběhla centrifugace (1000 g). Kapka buněčného peletu (1 μl) byla nanášena do speciálního terčíku s jamkou. Takto připravené ploché kruhové nosiče a terčíky s buňkami se poté upevnily do speciálního podá-



vacího nástavce používaného v RTS jednotce přístroje Leica EM PACT2. Do RTS jednotky se zasunul speciální transportní bajonet, který se automaticky přednastavil do mrazící pozice. Do RTS jednotky se vložil podávací nástavec s nosičem buněk, který se zasunul do horní části transportního bajonetu připraveného k transportu vzorku do mrazící jednotky (HPF) Leica EM PACT2, kde došlo k rychlé kryofixaci buněk. Terčíky s buňkami skončily ponořené v dusíkové lázni, která se nachází v RTS jednotce přístroje Leica EM PACT2. Terčíky byly poté opatrně vyjmuty z horní části transportního bajonetu a stále udržovány pod hladinou kapalného dusíku. Terčíky byly přeneseny do označených plastových nádobek předem vložených v dusíkové lázni. Nádobky s terčíky, naplněné kapalným dusíkem byly vyjmuty z dusíkové lázně a přeneseny do malé polystyrénové krabice naplněné kapalným dusíkem, kde byly ponechány až do dalšího kroku automatické mrazové substituce ledu.

### 3.3.4. Mrazová substituce (FS)

Kryofixované neuroblasty zabudované do speciálních nosičů (Leica) používaných v přístroji EM PACT2 byly umístěny do komory přístroje Leica EM FS, který byl nastaven na program mrazové substituce (tab. 1).

Tabulka 1: Program mrazové substituce přístroje Leica EM FS.

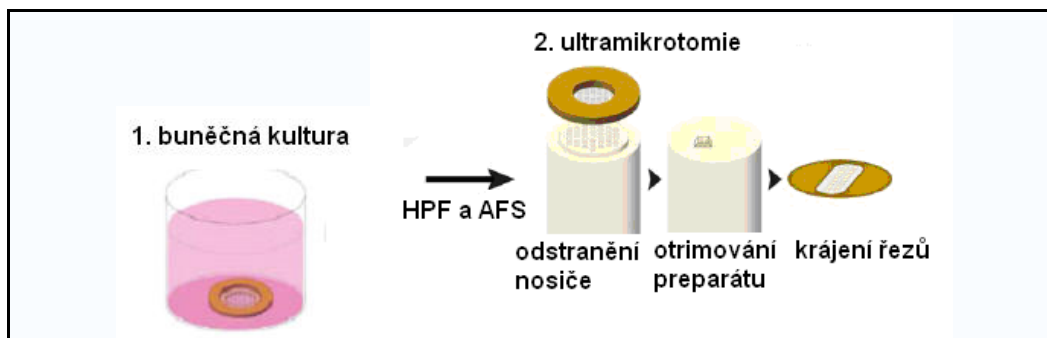
Programové kroky	Teplota ve stupních °C	Čas v hodinách
T1	-90 °C	96
S1	5 °C/h	14
T2	-20 °C	23
S2	5 °C/h	10

V komoře přístroje Leica EM FS, který byl nastaven na teplotu -90 °C, bylo nejdříve vychlazen substituční medium (2% OsO<sub>4</sub> v 100% acetonu) v několika skleněných dražových lahvičkách o objemu cca 5 ml. Terčíky s buňkami (infikované a neinfikované) byly odděleně v samostatných označených lahvičkách. Terčíky s kryofixovanými buňkami byly rychle přeneseny z dusíkové lázně přístroje EM PACT2 do přístroje EM FS, kde byly vloženy do vychlazeného substitučního média. Mrazová substituce proběhla podle výše nastaveného programu (tab. 1), kde byly vzorky ponechány až do dosažení teploty 5 °C. Poté byly vzorky z přístroje vyjmuty a 3x promyty v 100% acetonu. Po promytí byly vzorky prosycovány ve směsích pryskyřice Epon a 100% aceton (v poměru 1:2, 1:1 a 2:1) a skleněné lahvičky byly vloženy do třepacího zařízení nastaveného na malý třepací výkon. V jednotlivých směsích o objemu cca 5 ml byly kovové terčíky s buňkami ponechány vždy 1 hodinu při pokojové teplotě. Nakonec byla k terčíkům přidána čistá pryskyřice EPON a vzorky byly vloženy na 24 hodin do exsikátoru. Druhý den byly terčíky s buňkami vloženy do speciálních plastových formiček (SPI) tak, aby buňky na nosičích směřovaly vzhůru ode dna formičky. Formičky byly naplněny pryskyřicí Epon a vloženy do termostatu k polymerizaci (62 °C po dobu 48 hodin).

Po uplynutí doby polymerizace byly bločky s kovovými nosiči a terčíky s buňkami z plastových formiček pomocí skalpele vyříznuty. Bločky s kovovými nosiči a terčíky byly upevněny do speciálního držáku na bločky od Leica ultramikrotomu. Kovové nosiče a terčíky byly po všech stranách nejdříve očištěny od přebytečné pryskyřice pomocí žiletky kromě strany s buňkami. Takto odhalené kovové nosiče a terčíky v bločku byly zasazeny do držáku ultramikrotomu. Poté byly bločky s nosiči a terčíky ponořeny do tekutého dusíku na několik vteřin a vloženy do termobloku vyhřátého na 80 °C dokud se terčík neorosil (několik vteřin). Držák s bločkem a oroseným terčíkem byl vyjmut z termobloku a terčík

s buňkami byl opatrně odstraněn pomocí skalpelu. V bločku zůstaly zachovány jen samotné buňky bez poškození. Buňky byly poté krájeny na ultratenké řezy o tloušťce 70-90 nm pomocí ultramikrotomu Leica Ultracut UCT.

Ilustračně znázorněný pracovní postup zpracování živých buněk metodou HPF a FS s následnou ultramikrotomií je uveden v obr. 13.



**Obrázek 13:** Pracovní postup ultramikrotomie po zmražení živých buněčných kultur zpracovaných metodou HPF a FS. 1. Živé buňky v kultivačním médiu naadherované na aklovém disku zasazené do pozlaceného nosiče. Živé buňky po zpracování metodou HPF a FS (šipka) prochází procesem přípravy pro ultramikrotomii. 2. Z bločku musí být nosič odstraněn a v místě s největší koncentrací vzorku je trimováním připravena pyramidka, ze které jsou poté krájeny ultratenké řezy (Spiegelhalter a kol., 2010; upraveno).

### 3.4. Imunolokalizace virového proteinu E, ER a mikrotubulárních vláken pomocí fluorescenční a konfokální mikroskopie

Do 24-jamkového sterilního panelu (Costar) s krycími sklíčky (o průměru 15 mm) bylo umístěno  $1 \times 10^6$  buněk (virem KE infikované a neinfikované neuroblasty) na jednu jamku. Buňky byly kultivovány při 37 °C v Incovu upraveném Dulbecovu médiu (IMDM) s přídatkem 10% fetálního telecího séra (FCS) a 1% směsi penicilinu a streptomycinu (Sigma). Kultivační médium bylo odsáto a k buňkám byl přidán ledový metanol. Buňky byly fixovány při -20 °C po dobu 20 minut. Po důkladném promytí buněk v 0,01 M PBS s přídatkem 0,15 M NaCl (PBS) byl do jamky přidán blokující roztok (3% BSA, 5% NGS, PBS a 0,05% Tween 20). Buňky byly blokovány 1 hodinu při pokojové teplotě. Po odsátí blokujícího roztoku byla k buňkám přidána primární protilátka (2 hodiny při 4 °C). Po důkladném promytí v PBS byla k buňkám přidána sekundární protilátka s fluorescenční značkou. Inkubace probíhala 1 hodinu ve tmě při pokojové teplotě. Po důkladném promytí v PBS byly buňky barveny po dobu 10 minut v roztoku fluorescenční látky DAPI (Sigma) naředěné v PBS (1,5 µg/1 ml PBS). Po důkladném promytí byla sklíčka zalita do montovacího média pro fluorescenci MOWIOL (Sigma). Obarvené infikované a neinfikované buňky byly pozorovány v konfokálním mikroskopu Olympus IX 81 (FV 1000 fluoview, FV 10-ASW).

Použité primární protilátky:

- pro virový protein E (19/75 izolovaná z myše, ředěná v poměru 1:100, 1µg/1 ml PBS, poskytl Prof. Mathias Niedrieg, Institut Roberta Kocha, Berlín)
- pro endoplazmatické retikulum (proteinová disulfidová izomeráza, PDI, ředěná v poměru 1:100, koncentrace protilátky dodavatel uvádí Cell Signaling technology)

- pro mikrotubulární vlákna ( $\alpha$ -tubulin, 1  $\mu$ g/l ml PBS, Jackson Immunoresearch)

Použité sekundární protilátky:

- pro detekci virového proteinu E:  $\alpha$ -mouse IgG konjugovaná s FITC (1  $\mu$ g/l ml PBS, Jackson Immunoresearch)
- pro detekci ER:  $\alpha$ -rabbit IgG konjugovaná s TRITC (1  $\mu$ g/l ml PBS, Jackson Immunoresearch)
- pro detekci mikrotubulárních vláken:  $\alpha$ -rat IgG konjugovaná s TRITC (1  $\mu$ g/1 ml PBS, Jackson Immunoresearch)

Jako negativní kontroly byly použity neinfikované neuroblasty imunofluorescenčně značené jen sekundární protilátkou (místo primární protilátky bylo použito PBS).

## 4. Výsledky

### 4.1. Studium ultrastrukturních změn neuroblastů po infekci virem KE pomocí transmisní elektronové mikroskopie

#### 4.1.1. Metoda dvoustupňové chemické fixace pomocí 2,5% glutaraldehydu a 2% OsO<sub>4</sub>

Neuroblastové suspenze buněk neinfikované a infikované virem KE (48 hodin p.i) byly připraveny standardně používanou metodou chemické fixace. Buňky byly fixovány různými způsoby:

- 2,5% glutaraldehyd ve fosfátovém roztoku (PB) při pokojové teplotě 24h, a přes noc při 4°C
- 50% glutaraldehyd přidaný do kultivačního média s výslednou koncentrací 2,5% při pokojové teplotě 24h, a přes noc při 4°C.

Buňky byly postfixovány 2% oxidem osmičelým (OsO<sub>4</sub>) a zality do epoxidové pryskyřice. Časový interval fixace, různá teplota při fixaci, a způsob přípravy 2,5% glutaraldehydu neukázaly rozdílné změny v zachování buněčné ultrastruktury. Ve výsledcích byla použita pouze obrazová fotodokumentace neuroblastů fixovaných 2,5% glutaraldehydem přes noc při 4°C s postfixací OsO<sub>4</sub>.

##### 4.1.1.1. Ultrastruktura neuroblastů infikovaných virem KE po chemické fixaci

Na ultratenkých řezech neuroblasty infikovanými virem KE (obr. 5A a B) byla pozorována extrakce buněčného materiálu. Buňky měly protáhlý, oválný nebo kulovitý tvar a cytoplazmatická membrána nebyla dostatečně zachovalá (obr. 4). Velká buněčná jádra vykazovala nepravidelný tvar (obr. 4) a měla nedostatečně zachovalou jadernou membránu s častými invaginacemi (obr. 5A). Nukleové kyseliny uvnitř buněčného jádra tvořily nepravidelné agregované shluky elektron-denzního heterochromatinu a méně denzního euchromatinu (obr. 5A). Uvnitř buněčného jádra byla přítomná výrazná kulovitá, elektron-denzní jádérka s nukleolonematy (obr. 5A). Nukleolonemata vykazovala pentlicovitou vláknitou strukturu tvořenou elektron-denzními fibrilárními centry a méně elektron-denzními místy (obr. 5A).

Cytoplazmatická membrána nebyla dobře zachovalá a uvnitř cytoplazmy byly pozorovány extrémně hypertrofované a zvětšené cisterny drsného endoplazmatického retikula (RER) (obr. 4 a 5A). Cisterny RER měly nepravidelný tvar a tvořily většinu objemu cytoplazmy infikované buňky (obr. 4 a 5A). Membrána cisteren RER po chemické fixaci nebyla dostatečně zachovalá. Na membráně RER byla pozorovaná místa bez navázaných ribozomů (obr. 5B). V cytoplazmě se kromě cisteren RER vyskytovaly další buněčné organely jakou jsou mitochondrie, které měly nedostatečně zachovalou membránu a krysty uvnitř (obr. 6).

##### 4.1.1.2. Morfologické změny neuroblastů infikovaných virem KE

U některých buněk infikovaných virem KE jsem pozorovala známky buněčné smrti: apoptózy a nekrózy (obr. 4). Buňky vykazující známky apoptózy (obr. 4 a 7) se vyznačovaly smrštěním celého buněčného objemu, který byl způsoben proteolytickou degradací intracelulárních proteinů. Cytoplazma buňky byla v porovnání s jinými buňkami (bez známek apoptózy) výrazně elektron-denzní (obr. 4 a 7). Dalším pozorovaným znakem apoptó-

zy byla přítomnost mnoha vakuol na periferii buněčné cytoplazmy. Uvnitř buněčného jádra v perinukleární oblasti byla pozorována kondenzace heterochromatinu do kompaktních elektron-denzních shluků (obr. 7). Shluky kondenzované nukleové kyseliny byly v pozdějších stádiích apoptózy od sebe oddělené (obr. 7 a 8) a buněčné jádro bylo fragmentované (obr. 7). Uvnitř elektron-denzní cytoplazmy poblíž buněčného jádra se vyskytovalo množství dilatovaných cisteren RER a také viriony navázané pravděpodobně na mikrotubulární vlákna (detail na obr. 7).

Kromě buněk se známkami apoptózy byly pozorované také buňky vykazující známky jak apoptózy, tak i nekrózy (obr. 8). U těchto buněk se projevovaly již výše popsané známky apoptózy. Počátky nekrózy se projevovaly narušením integrity cytoplazmatické a jaderné membrány (obr. 8). Pozorované byly také změny integrity ještě zachovalých, ale rozšířených cisteren RER s velkým množstvím elektron-denzních virionů uvnitř (obr. 8).

Buňky vykazující pouze známky nekrózy měly poškozenou cytoplazmatickou a jadernou membránu (obr. 9B). Cytoplazma u některých nekrotických buněk obsahovala vakuoly (obr. 9A) a rozpadlé nebo úplně rozpuštěné buněčné jádro (karyolýza; obr. 9B). Buněčné organely, které se v cytoplazmě nacházely, nebyly dobře rozlišitelné (obr. 9A).

#### ***4.1.1.3. Intracelulární vývoj viru klíšťové encefalitidy***

Jedním z dominantních znaků vývoje viru KE byla přítomnost virových částic (virionů) pohybující se v průměru 40-50 nm uvnitř hypertrofovaných a zvětšených cisteren RER. Cisterny RER se nacházely poblíž buněčného jádra (obr. 5A). Cisterny RER byly uvnitř vyplněny jemným osmiofilním materiálem a množstvím elektron-denzních virionů (obr. 5B). U některých buněk byly cisterny RER úplně rozpadlé. Přítomné viriony a jemné membránové struktury (SMS) se nacházely mezi cisternami RER (obr. 6).

Dalším výrazným znakem pozorovaným v cytoskeletu neuroblastů byla přítomnost proteinových vláken, pravděpodobně mikrotubulárních vláken mezi cisternami RER. Na mikrotubulárních vláknech bylo navázané různé množství virionů (obr. 6). Virové částice byly navázané nejen po stranách, ale i mezi jednotlivými mikrotubulárními vlákny (detail na obr. 6).

#### ***4.1.1.4. Ultrastruktura neinfikovaných neuroblastů po chemické fixaci***

Na ultratenkých řezech neinfikovanými neuroblasty (negativní kontroly) byla pozorována extrakce materiálu (obr. 2) a nedostatečně zachovalá cytoplazma. Buněčné jádro mělo nepravidelný tvar s častou invaginací jaderné membrány (obr. 1). Nukleové kyseliny uvnitř buněčného jádra tvořily nepravidelné agregované shluky elektron-denzního heterochromatinu a méně elektron-denzního euchromatinu (obr. 1 a 2). Ultrastruktura jaderné a cytoplazmatické membrány po chemické fixaci nebyla dobře zachovalá (obr. 2).

V cytoplazmě byly přítomné nedostatečně rozlišitelné buněčné struktury (obr. 2), které obsahovaly množství bílých míst pravděpodobně vzniklých extrakcí buněčného materiálu (detail na obr. 2). Cisterny RER nebyly v cytoplazmě neinfikovaných buněk dobře rozlišitelné (obr. 2). Ojediněle některé neinfikované buňky obsahovaly mitochondrie s dostatečně zachovalými kristami, výrazná tuková tělíska s navázanými ribozomy a sekundární lysozomy (obr. 3).

#### **4.1.2. Kryofixační metoda „high pressure freezing“ a následná mrazová substituce ledu**

Infikované a neinfikované neuroblasty byly kultivované v jedné vrstvě na různých nosičích (aklarové fólie, safírové disky). Buňky byly rychle kryofixovány za vysokého tlaku (high pressure freezing; HPF) s následnou mrazovou substitucí ledu v 2% OsO<sub>4</sub> a 100% acetonu. Chemicky stabilizovaný a odvodněný materiál byl zalit do epoxydové pryskyřice. Pro porovnání ultrastrukturních změn infikovaných a neinfikovaných neuroblastů byly vybrány jen obrázky neuroblastů kultivovaných na safírových discích.

##### **4.1.2.1. Ultrastruktura neuroblastů infikovaných virem KE po kryofixaci**

Infikované neuroblasty se po kryofixaci a FS vyznačovaly dobře zachovalou ultrastrukturou buněčných organel a membrán bez známek extrakce buněčného materiálu a agregačních artefaktů (obr. 16). Infikované buňky měly zakulacený tvar (obr. 14). Ojedinelé se vyskytovaly buňky nepravidelných tvarů (obr. 16). Tvar buněčného jádra byl často nepravidelný a nukleové kyseliny měly homogenní strukturu (obr. 14 a 15). V buněčném jádře se vyskytovaly elektron-denzní shluky kondenzovaného heterochromatinu s rovnoměrnou zrnitostí, a místa tvořená méně elektron-denzním euchromatinem (obr. 16). Ultrastruktura jaderné membrány byla dobře zachovalá (obr. 15B) a vykazovala časté invaginace (obr. 14). U některých buněk byla dvouvrstvá jaderná membrána vnější stranou spojená s cisternou RER (obr. 20B). Uvnitř buněčného jádra byla dobře viditelná elektron-denzní jádérka (obr. 16), u kterých nebyla pozorována pentlicovitá struktura.

Cytoplazma obsahovala velký počet různých buněčných organel, membránových struktur a membrán, které ve srovnání s chemickým způsobem přípravy vykazovaly nižší kontrast (obr. 14, 15 a 16). Cytoplazma obsahovala cisterny RER, které měly zvětšený objem, různý tvar a zaujímaly největší část buněčné cytoplazmy. Cisterny RER byly vyplněny jemným osmiofilním materiálem a uvnitř se nacházelo velké množství virionů. Kromě dobře zachovalých cisteren RER se vyskytovaly cisterny Golgiho aparátu (GA) (obr. 15B).

Dobré zachování buněčné ultrastruktury umožnilo pozorování dalších buněčných organel vyskytujících se v cytoplazmě infikovaných neuroblastů např. mitochondrií, sekrečních vakuol, sekundárních lyzozomů, multilamelárních tělísek a membránových tělísek tvořených mnoha váčky atd. (obr. 15A a B, 16 a 17).

##### **4.1.2.2. Morfologické změny neuroblastů infikovaných virem KE**

U infikovaných neuroblastů byly pozorovány různé změny týkající se tvaru buňky a uspořádání buněčných organel např. RER jako reakce na přítomnost a vývoj viru KE (obr. 16). Mezi infikovanými buňkami se objevovala řada buněk se známkami apoptózy a nekrózy (obr. 14). Apoptóza indukovaná virem KE se vyskytovala poměrně často a projevovala se nejen smrštěním celé buňky, ale také změnou uspořádání cytoplazmy a cytoplazmatické membrány. Změny na cytoplazmatické membráně způsobené rozkladem cytoskeletu se projevovaly vznikem váčkovitých výrůstků (výběžků membrány; obr. 23A). Změna uspořádání cytoplazmy se projevovala výskytem velkého počtu vakuol na periférii buňky (obr. 23A). Tyto buňky měly výrazně elektron-denzní cytoplazmu a kondenzovaný heterochromatin na periférii buněčného jádra, které bylo často fragmentované (obr. 14 a 23A).

Mezi infikovanými neuroblasty byly pozorovány buňky vykazující známky apoptózy a zároveň také nekrózy (obr. 23B). Nekrotické známky byly pozorovány u buněčného já-

dra, které mělo často porušenou jadernou membránu. Obsah jádra nebyl u pozdějších stádií nekrózy vůbec ohraničený (rozpuštění buněčného jádra; obr. 14 a 23B). Cytoplazma obsahovala množství rozpadlých buněčných organel a vakuol (obr. 14). Cytoplazmatická membrána byla u některých buněk se známkami nekrózy poškozená (obr. 14), u jiných zachovalá (obr. 23B). Nekrotické buňky byly pozorované ojedinele, na rozdíl od buněk se známkami apoptózy.

#### **4.1.2.3. Intracelulární vývoj viru klíšťové encefalitidy**

Přítomnost a vývoj viru jsem pozorovala v perinukleární oblasti buněčné cytoplazmy, kde nejvíce objemu zaujímaly hypertrofované a zvětšené cisterny RER. Uvnitř RER se vyskytovalo velké množství virových částic (virionů) o velikosti 40-50 nm (obr. 17A a B). V prostoru RER se kromě virionů nacházely také proteinová vlákna, pravděpodobně mikrotubulární vlákna (obr. 21). Zajímavým jevem pozorovaným u infikovaných neuroblastů byl výskyt virionů v cisterně RER ohraničující buněčné jádro, kde dvouvrstvá jaderná membrána byla vnější stranou spojená s cisternou RER (obr. 20B).

Výskyt virionů (další stádium vývoje viru) byl pozorován také v oblasti označované jako ERGIC, která se nachází mezi RER a GA (obr. 18). V oblasti ERGIC se kromě virionů nacházely také tzv. pre-Golgiho elektron-denzní osmiofilní meziproducty (pGm), které se svou morfologií podobaly virionům, ale lišily se velikostí. Viriony se nacházely nejen v cisternách RER, ale také poblíž cisteren GA a meziproductů (pGm, obr. 19A). Viriony byly nejčastěji pozorovány uvnitř nebo mezi cisternami RER a GA (obr. 19B). Poblíž cisteren GA byl také pozorován transportní váček s virionem. Virion měl dobře zachovalou elektron-denzní nukleokapsidu a membránový obal (obr. 20A).

V pokročilém stádiu infekce byla pozorována poškozená membrána cisteren RER. Pro toto stádium byla typická přítomnost velkého množství virionů (obr. 21). Mezi rozpadlými cisternami RER, poblíž buněčného jádra, byly pozorovány osmiofilní kulovité neurosekreční váčky o průměru 70-90 nm, které se vyskytovaly jednotlivě nebo ve skupinách (obr. 20B a 21). Neurosekreční váčky měly výrazné elektron-denzní jádro, kolem jádra méně elektron-denzní meziprostor a jemný membránový obal (obr. 22). Ojedinele byly viriony pozorovány navázané na neurosekreční váček (detail na obr. 21).

#### **4.1.2.4. Ultrastruktura neinfikovaných neuroblastů po kryofixaci**

Ultrastruktura neinfikovaných neuroblastů (negativní kontroly) byla po kryofixaci dobře zachována a buňky měly pravidelný kulovitý tvar (obr. 10). Jaderná membrána byla dobře zachovalá a uvnitř buněčného jádra nebyly pozorované shluky nukleových kyselin (obr. 11 a 12). Uvnitř buněčného jádra bylo dobře viditelné velké jadérko kulovitého nebo oválného tvaru, vyplněné elektron-denzním fibrilárním materiálem. Jadérko nevykazovalo pentlicovitou strukturu (obr. 11). Chromatin uvnitř buněčného jádra byl tvořen jemně zrnitými shluky elektron-denzního heterochromatinu a méně elektron-denzního euchromatinu (obr. 11).

Obsah cytoplazmy bohatý na buněčné organely a membránové struktury vykazoval nižší kontrast a nejevil známky extrakce (obr. 11, 12 a 13). V cytoplazmě bylo pozorované velké množství dobře zachovalých buněčných organel: mitochondrie, GA (obr. 11), velké kulovité sekundární lysozomy, zbytková tělíska (tzv. multilamelární) tvořená velkým množstvím elektron-denzních fosfolipidů (obr. 11). Další pozorované buněčné struktury byly fagocytické vakuoly tzv. fagozomy, sekreční vakuoly (obr. 11), výrazná elektron-denzní tuková tělíska s navázanými ribozomy a velké fagolysozomy (obr. 12).

Díky dobře zachovalé buněčné ultrastruktuře byl pozorován uvnitř cytoplazmy buněk intracelulární transport zahrnující proces endocytózy (pohlčení) a sekrece (vyloučení) různých částic (obr. 13A-D). Pinocytóza (tzv. absorpční endocytóza) pohlčení malého množství tekutiny do pinocytického váčku byla dobře zachycená na ultratenkém řezu cytoplazmou neuroblastu (obr. 13B-D). Uvnitř cytoplazmy byla pozorována jednotlivá stádia pinocytózy: invaginace cytoplazmatické membrány a vytvoření tzv. panožky (obr. 13B); odštěpení a vznik pinocytického váčku (obr. 13C) a těsné spojení pinocytického váčku s cytoplazmatickou membránou (obr. 13D).

## **4.2. Studium morfologických změn neuroblastů po infekci virem KE pomocí skenovací elektronové mikroskopie**

Buněčné kultury neuroblastů neinfikované a infikované virem KE (48 h p.i.) byly kultivované na krycích sklíčkách v jedné vrstvě. Neuroblasty před zpracováním pro SEM vykazovaly pod světelným mikroskopem vrcholný CPE. Buňky byly chemicky fixovány 2,5% glutaraldehydem ve fosfátovém roztoku a postfixovány 2% oxidem osmičelým. U infikovaných neuroblastů patřily změny tvaru a povrchu buněk mezi hlavní morfologické změny. Infikované buňky měly zakulacený tvar (obr. 24B) v porovnání s neinfikovanými buňkami, které měly tvar protáhlý (obr. 24A).

Hladký povrch byl pozorován u neinfikovaných buněk. Povrch infikovaných buněk byl drsný a členitý (obr. 24B). Povrchy buněk často pokrývaly zbytky rozpadlých nekrotických buněk (obr. 24A a B). Krátké výběžky, tzv. dendrity a tenká bodcovitá filopodia vycházela z těla neinfikovaných a infikovaných buněk (obr. 24A a B).

## **4.3. Imunolokalizace virového proteinu E v ER a v asociaci s $\alpha$ -tubulinem pomocí fluorescenční a konfokální mikroskopie**

Buňky neinfikované (negativní kontroly) a infikované virem KE (48 h p.i.) byly kultivovány na krycích sklíčkách. Vzhledem k tomu, že neuroblasty byly určeny pro imunodekci, je nebylo možné fixovat glutaraldehydem. Buňky byly fixovány ledovým metanolem při  $-20^{\circ}\text{C}$ . Pro imunofluorescenci a konfokální mikroskopii byly použity tři primární protilátky pro detekci virového proteinu E, endoplazmatického retikula (proteinová disulfidová izomeráza; PDI) a mikrotubulárních vláken ( $\alpha$ -tubulin). Detekce fluorescenčního signálu u infikovaných neuroblastů byla porovnávána s fluorescenčním signálem neinfikovaných buněk. K vyhodnocení výsledků byla použita fotodokumentace získaná z konfokálního mikroskopu.

Jelikož byly neuroblasty fixovány ledovým metanolem, buňky nevykazovaly dobré zachování ultrastruktury a byla pozorována slabá reakce protilátek proti virovému proteinu E, mikrotubulárním vláknům a endoplazmatickému retikulu. Vzhledem ke slabému signálu protilátky proti virovému proteinu E (malé množství virů nebo nespecifická reakce) a špatnému zachování ultrastruktury, bylo těžké určit, kde se virové částice proteinu E vyskytují, a zda jsou v kontaktu s mikrotubulárními vlákny. Velmi slabá a nespecifická vazba protilátek (pravděpodobně způsobená nedostatečným zachováním ultrastruktury) komplikovala vyhodnocení výsledků.

### **4.3.1. Detekce virového proteinu E v ER pomocí PDI protilátky**

PDI protilátka prokázala přítomnost ER nejen v perinukleární oblasti, ale také v celém cytoskeletu buňky (obr. 25A). Vzhledem k slabému signálu proteinu E nebylo možné potvrdit kolokalizaci obou struktur.



### **4.3.2. Detekce virového proteinu na mikrotubulárních vláknech**

Intenzivnější signál virového proteinu E se vyskytoval výhradně v perinukleární oblasti v porovnání s nízkým signálem  $\alpha$ -tubulinu (mikrotubulární vlákna), který byl rozptýlen v celém cytoskeletu buňky (obr. 25B). Jelikož protilátka proti  $\alpha$ -tubulinu vykazovala velmi slabou intenzitu signálu, nebylo možné zcela potvrdit, zda detekovaný signál proteinu E je soustředěn v těsném kontaktu s mikrotubulárními vlákny (obr. 25B).

## 5. Diskuze

Jedním z cílů této magisterské práce bylo studium maturace viru KE a distribuce virových částic (virionů) v lidských neuronálních buňkách (neuroblastech). Dalším cílem byl popis morfologických změn indukovaných vývojem viru KE v neuroblastech na ultrastrukturní úrovni.

### 5.1. Studium ultrastrukturních změn neuroblastů po infekci virem KE pomocí transmisní elektronové mikroskopie

Ke studiu ultrastrukturních změn neuroblastů po infekci virem KE a sledování intracelulárního vývoje viru byly použity dvě různé metody přípravy: (1) *chemická fixace*, postfixace a odvodnění při pokojové teplotě (viz 3.3.2.) a (2) *kryofixace* pomocí HPF a následná FS (viz 3.4.).

#### 5.1.1. Extrakce a agregovaný vzhled ultrastruktury

Neuroblastové buňky připravené metodou chemické fixace byly fixovány různými způsoby: 1) fixační činidlo bylo přidáno přímo do média (výsledná koncentrace byla 2,5%); 2) buňky před fixací byly promyty a poté chemicky fixovány 2,5% glutaraldehydem; 3) buňky byly fixovány při různých teplotách. Buňky zpracované různými způsoby chemické fixace však nevykazovaly rozdílný vzhled ultrastruktury. Ultrastruktura buněčných organel a membrán chemicky fixovaných neuroblastů nebyla dostatečně zachovalá. Na ultratenkých řezech neuroblastů byla pozorována extrakce buněčného materiálu (obr. 5A a B). Ultrastruktura buněčného jádra především nukleové kyseliny měly agregační vzhled (obr. 5A). Uvádí se, že problém při standardní metodě chemické fixace spočívá zejména v pomalém pronikání použitého aldehydového fixačního činidla (několik minut/hodin, Small, 1981). Při pomalé chemické fixaci buněk dochází k buněčné autolýze a pomalé buněčné smrti. Při dalším kroku přípravy, „dehydrataci“, dochází k extrakci nedostatečně fixovaných molekul, které mohou měnit svoje původní pozice uvnitř buňky a způsobují tzv. „fixační artefakty“. Vhodná metoda fixace biologických preparátů by měla imobilizovat, zachovávat ultrastrukturu membrán, tvar buněčných organel a dalších buněčných struktur bez těchto fixačních artefaktů. Uvádí se, že imobilizace tzv. „volně plovoucích molekul“ v prostředí buněčné cytoplazmy je při standardní chemické fixaci nemožná (Dubochet a kol., 2001; McDonald a Auer, 2006). Volně plovoucí molekuly mají tendenci agregovat nebo zůstávají přilepené k chemicky fixovaným strukturám (z angl. „agregation artefacts“). Extrakce buněčné cytoplazmy, agregační artefakty a smrštění mezibuněčných organel způsobené nevhodnou fixací, dehydratací při pokojové teplotě a vysušením preparátů způsobily velké poškození ultrastruktury neuroblastů a prakticky znemožnily pozorování změn ultrastruktury, vývoj viru KE a povrchů infikovaných neuroblastů.

Buněčná cytoplazma neuroblastů připravená kryofixační metodou (HPF s následnou FS) se jevila více elektron-denzní (infikované buňky obr. 14; neinfikované buňky obr. 10) v porovnání s neuroblasty připravenými metodou chemické fixace (infikované buňky obr. 4; neinfikované buňky obr. 1). Buněčná cytoplazma neuroblastů připravených (viz. 4.1.2) nevykazovala extrakci materiálu a obsahovala méně agregačních artefaktů (obr. 11, 12 a 16). Je možné usuzovat, že dehydratace buněk při nízké teplotě během mrazové substituce eliminovala agregační artefakty a extrakci cytoplazmy. Obdobné výsledky byly pozorovány např. u epitelových buněk, které byly připraveny kryofixací s následnou metodou FS (Reipert a kol., 2004). Neuroblasty infikované virem KE připravené metodou kryofixace pomocí HPF vykazovaly velmi dobré zachování buněčné ultrastruktury se slabším kontras-

tem membrán (obr. 14) v porovnání s chemicky fixovanými neuroblasty (obr. 4). Slabší kontrast membrán u neuroblastů připravených pomocí HPF byl pravděpodobně způsobený chybějící extrakcí okolní buněčné cytoplazmy. Membrány měly slabší kontrast i když bylo použito substituční médium, které obsahovalo 2% OsO<sub>4</sub>.

Z literární studie o absenci agregačních artefaktů pozorovaných u různých buněk v závislosti na metodě přípravy vyplynulo, že oblasti výskytu kondenzovaného heterochromatinu, euchromatinu a jaderné membrány se liší u preparátů chemicky fixovaných a kryofixovaných (HPF). U neuroblastů připravených metodou kryofixace vykazovala/měla jaderná membrána (karyolema) dobře zachovalou homogenní ultrastrukturu (pravidelné ohraničení dvouvrstvé fosfolipidové membrány, obr. 11 a 16). U chemicky fixovaných neuroblastů (neinfikované obr. 2; infikované buňky obr. 5A) byla jaderná membrána tvořena pouze nepravidelnými shluky elektron-denzního heterochromatinu, které se vyskytovaly také uvnitř buněčného jádra v prostoru vyplněném méně elektron-denzním euchromatinem. Nedostatečně zachovalá jaderná membrána u chemicky fixovaných buněk byla pravděpodobně způsobena kompresními tlaky působícími při agregaci jaderného a cytoplazmatického materiálu připojeného k jaderné membráně. Kondenzovaný heterochromatin u kryofixovaných neuroblastů byl jemný a pravidelně zrnitý (neinfikovaná buňka obr. 11; virem KE infikovaná buňka obr. 16). Oblasti vyplněné euchromatinem uvnitř buněčného jádra se jevily jako husté suspenze materiálu s nízkým kontrastem (obr. 11 a 16).

U kryofixovaných neuroblastů pozorovaných pomocí TEM měly celé buňky a jejich okolí rovnoměrný kontrast (obr. 10, 11, 14, 16). Jemná cytoplazmatická membrána byla dobře zachovalá (obr. 11, 12, 13A) a některé buněčné organely (mitochondrie, transportní a lysozomální váčky, sekundární lysozomy, multilamelární a tuková tělíska) se jevily znatelně elektron-denzněji v porovnání s chemicky fixovanými neuroblasty (obr. 2). Dobré zachování buněčné ultrastruktury pomocí kryometod bylo pozorováno na různých buněčných organelách. Například GA nebyl chemickou cestou přípravy materiálu vůbec pozorován.

### 5.1.2. Ultrastruktura buněčného jádra

U chemicky fixovaného materiálu jsem pozorovala elektron-denzní jádérka s nukleolonematy (obr. 5A). Nukleolonemata vykazovala pentlicovitou vláknitou strukturu tvořenou elektron-denzními fibrilárními centry a méně elektron-denzními místy. Popsané struktury jsem u kryofixovaných neuroblastů nepozorovala.

Buněčná jádra neuroblastů kryofixovaných pomocí HPF nevykazovala známky extrakce materiálu a agregace (obr. 11, 12). Podobné výsledky pozoroval u biologických preparátů připravených metodou kryofixace Dubochet a kol. (2001). Uvádí se, že kvalitu dobré fixace uvnitř buňky lze posuzovat s ohledem na tvar buněčného jádra (McDonald, 2007). Tvar buněčného jádra u většiny živých buněk pozorovaných světelnou mikroskopií (LM) je většinou kulovitý nebo oválný. Na ultratenkém řezu částí buněčného jádra se jeho vzhled jeví jako kruh nebo elipsa, a jaderná membrána tvoří jemné křivky. Naopak některé buňky mají přirozený nepravidelný tvar jádra a jaderná membrána je charakteristická častými invaginacemi (Schmidt a kol., 1994). Nádorové buňky, mezi něž patří i neuroblasty, vykazovaly nepravidelný tvar buněčného jádra s častými invaginacemi jaderné membrány byly pozorovány také autory Locker a kol. (1968). Funkce a proces, kterým tyto invaginace vznikají, jsou zatím nejasné. Invaginace jaderné membrány byly pozorovány jak u chemicky fixovaných (obr. 1 a 5A) tak i u kryofixovaných neuroblastů (neinfikovaných obr. 12; infikovaných virem KE obr. 14). Invaginace jaderné membrány a přítomnost cytoske-

letálních vláken uvnitř invaginací byly označeny za přechodné struktury pozorované pouze během procesu buněčné diferenciaci (Clubb a Locke, 1998).

Rychlá fixace biologických preparátů pomocí HPF umožňuje stabilizaci buněčného materiálu bez znatelného poškození struktur tvorbou velkých krystalů vody. Na buněčném jádře (po nesprávně provedené kryofixaci) můžeme pozorovat artefakty způsobené rekrytalizací zbytkové vody častěji než v cytoplazmě buňky. Buněčné jádro u neuroblastů nevykazovalo přítomnost velkých krystalů (obr. 11 a 16). Mezi některými infikovanými neuroblasty byly nekrotické buňky, u nichž se objevily uvnitř rozpadlého buněčného jádra malé krystaly (mikrokrystaly, obr. 14). Domnívám se, že výskyt krystalů byl způsoben nekvalitní kryofixací preparátu.

Jedna studie buněk kultivovaných na safírových discích a rychle zmražených pomocí HPF s následnou mrazovou substitucí acetonem ukázala na arteficiální odtržení buněčného jádra (Wild a kol., 2001). Podobné artefakty jsem nepozorovala.

### 5.1.3. Intracelulární vývoj viru klíš'ové encefalidity

#### *Vývoj viru KE uvnitř RER*

V perinukleární oblasti byly pozorovány zvětšené a hypertrofované cisterny RER s množstvím elektron-denzních virových částic (virionů) o velikosti 40-50 nm (obr. 5). Uvádí se, že místem skládání *flavivirů* (v případě maturace typu *trans*) je cisterna RER, kde se virové částice shromažďují a replikují (Novoa a kol., 2005). Lokalizace virionů uvnitř zvětšených cisteren RER u neuroblastů potvrdila hlavní místo skládání a replikace viru KE následkem infekce.

Sledováním intracelulárního vývoje viru KE v perinukleární oblasti neuroblastů připravených chemickou cestou i kryopřípravou se ukázalo, že viriony nebyly přítomné jen uvnitř cisteren RER, ale vyskytovaly se volně ležící mezi cisternami RER (obr. 6). Kromě virionů se mezi cisternami RER objevovaly i elektron-denzní dlouhá, rovná mikrotubulární vlákna, na kterých byly v různém počtu navázané viriony (detail na obr. 6). Vazbu virionů na mikrotubulární vlákna jsem nepozorovala u neuroblastů připravených kryometodami. Přítomnost mikrotubulárních vláken byla potvrzena pouze u neuroblastů infikovaných virem KE. U medulloblastů a glioblastů infikovaných virem KE se vazba virů na mikrotubulární vlákna neprokázala (Růžek a kol., 2009). Uvádí se, že proteinová vlákna, která vytváří cytoskelet buňky jsou schopna transportovat viry. Někteří autoři (Urs a kol., 2006) zjistili, že intracelulární transport virů je závislý na mikrotubulech, aktinových a intermediálních vláknech. Vzhledem k přítomnosti mikrotubulárních vláken a jejich přímé asociaci s viriony pozorované u infikovaných neuroblastů se domnívám, že virus KE je schopen využívat intracelulární transport pomocí mikrotubulárních vláken a dosáhnout tak míst replikace a skládání nových virových částic.

Další pozorované buněčné struktury, které se objevovaly v malém počtu složené ve shlucích mezi cisternami RER byly váčky označované jako SMS (obr. 6). Tyto váčky měly průměrnou velikost 100-200 nm a byly přítomné ve shlucích. Tyto struktury jsem pozorovala jen u chemicky fixovaného materiálu. SMS struktury byly pozorovány ve velkém množství uvnitř protáhlých cisteren RER u medulloblastů a glioblastů infikovaných virem KE (Růžek a kol., 2009). *Flavivirem* indukované SMS struktury přítomné poblíž cisteren RER se vyskytovaly např. u myších neuronů infikovaných virem Japonské encefalidity a jsou popsány v řadě dalších studií popisujících vývoj flavivirů v buňkách (Hase a kol., 1993; Wang a kol., 1997; Mackenzie a kol., 1999). Lokalizace hypertrofovaných cisteren RER a SMS struktur byla také pozorována u Vero buněk infikovaných Kunjin virem. Indukované

membránové struktury jsou zde popsány jako váčkovité balíčky (z angl. „vesicles packet“; Ng a Hong, 1989; Westaway a kol., 1997a). V literatuře tyto struktury bývají označovány jako svinuté membrány (z angl. „convoluted membranes; Mackenzie a kol., 1999; Novoa a kol., 2005). Předpokládá se, že nejen cisterny RER, ale také SMS struktury jsou považovány za místa, kde dochází k replikaci *flavivirů*. Tato místa bývají označována jako virové továrny (Mackenzie a kol., 1999; Mackenzie a kol., 2001; Novoa a kol., 2005).

U neuroblastů infikovaných virem KE byly pozorované skupiny mitochondrií (obr. 5) v blízkosti míst replikace viru KE (kolem RER a SMS). Tato pozorování jsou ve shodě s pozorováním myších buněk CNS a buněčných kultur nervových buněk infikovaných virem Japonské encefalitidy (Hase a kol., 1993; Wang a kol., 1997).

### *Maturace viru KE*

Buňky infikované *Flaviviry* obecně rozdělujeme podle jejich způsobu maturace na *cis* nebo *trans* (Hase a kol., 1989). Pro maturaci typu *cis* jsou charakteristické fragmentované cisterny RER. Skládání virových částic probíhá volně v cytoplazmě. Nukleokapsidy pučí přes vakuolární membránu do vnitřního prostoru vakuoly a nebo přímo přes cytoplazmatickou membránu do extracelulárního prostoru (Hase a kol., 1987a, 1989; Ng a kol., 2001; Šenigl, 2000a; Šenigl a kol., 2006). Pro *trans* maturaci jsou charakteristické dilatované a hypertrofované cisterny RER. Skládání a maturace virionů probíhá v cisternách RER a ve spojení s SMS. Zralé viriony jsou poté sekreční cestou transportovány k plazmatické membráně hostitelské buňky a vyloučeny ven z buňky procesem exocytózy (Hase a kol., 1987a; Ng, 1987, Ng a Hong, 1989; Šenigl, 2000a; Šenigl a kol., 2006). Některé *flaviviry* dokonce projevují oba typy maturace *cis* a *trans* v závislosti na virovém kmeni a typu hostitelské buňky (Hase a kol., 1987a, b; Ng, 1987; Ng a Hong, 1989; Ng a kol., 1994, 2001; Mackenzie a kol., 1999; Mackenzie a Westaway, 2001; Chu a Ng, 2002; Šenigl a kol., 2006). U neuroblastů byla pozorovaná přítomnost virionů uvnitř cisteren RER, která vypovídala spíše o maturaci typu *trans*. Jelikož se viriony nacházely nejen uvnitř RER, ale i volně v cytoplazmě mezi cisternami RER nebo v asociaci s mikrotubulárními vlákny, lze tato pozorování řadit také k maturaci typu *cis*. Z pozorovaných výsledků vývoje viru KE uvnitř buněčné cytoplazmy neuroblastů nemůžeme tedy proces maturace viru KE řadit jednoznačně k *cis* nebo *trans* typu. Podobné důkazy rozdílného způsobu maturace *cis* nebo *trans* byly pozorovány také u savčích buněk PS a klíštěcích buněk infikovaných virem KE (Šenigl a kol., 2006. Šenigl, 2000a). Domnívám se, že maturace viru KE u neuroblastů probíhá následujícím způsobem: translace virové RNA pravděpodobně probíhá na ribozomech vázaných na cisternách RER, které hypertrofují během tohoto procesu. Tyto cisterny RER představují perinukleární ohniska, kde dochází k replikaci a maturaci virionů. Způsob jakým virion získává svůj membránový obal nebyl z pozorování u neuroblastů připravených metodou chemické fixace a kryofixace zřejmý. Identifikace a izolace volných „nahých“ virových částic (nukleokapsid) u *flavivirem* infikovaných buněk není snadné pozorovat pomocí EM (Roingard a kol., 2004). Pučící (nově vznikající) viriony mohou podstupovat sekreční cestu hostitele a fúzí na buněčných membránách (membrána splyne) jsou zralé viriony (virové částice s obalem) uvolněny do extracelulárního prostoru.

### *Transport viru KE*

Z výsledků získaných pomocí metody kryofixace (HPF) se ukázalo, že dalšímu vývoji viru KE u neuroblastů dochází v oblasti ERGIC (mezi RER a trans-GA; obr. 18, 19A a B). Viriony se také nacházely uvnitř protáhlých cisteren GA (obr. 19B) a v jejich těsné blízkosti (obr. 18). V cytoplazmě infikovaných neuroblastů jsem pozorovala transport virionu uvnitř tzv. „*transportního membránového váčku*“. Virion (obr. 20A) pozorovaný

poblíž GA byl pravděpodobně transportován do cisterny GA a odtud dále do trans-GA. V oblasti trans-GA byla pozorována přítomnost virionů společně s výskytem elektron-denzních osmiofilních pre-Golgiho meziproductů (pGm). Meziproducty pGm se morfologií podobaly nahým virovým částicím bez obalu, ale lišily se velikostí (obr. 19A). Moje pozorování transportu viru KE pomocí transportního váčku u neuroblastů jsou ve shodě s pozorováním transportu viru KE u savčích buněk PS (Šenigl, 2000a; Šenigl a kol., 2006). Šenigl ve své studii pozoroval putování virionů v transportních váčcích z RER do GA, kde docházelo ke glykosylaci některých virových proteinů. Odtud byly viriony transportovány v transportních váčcích k cytoplazmatické membráně, kde procesem exocytózy došlo k uvolnění virionů do extracelulárního prostoru.

#### *Sekreční dráha viru KE*

Uvádí se, že u nádorových buněk studovaných pomocí EM můžeme pozorovat přítomnost různých buněčných struktur, např. intermediárních vláken, neurotubulárních vláken a elektron-denzních jaderných neurosekrečních váčků (granul) atd. (Llombart-Bosch a kol., 1987). U některých nádorových buněk byly pozorovány v okolí zánětu synaptické váčky, u jiných nádorových buněk (neuroblastů) se vyskytovaly ve velkém množství neurosekreční váčky (Iwakura a kol., 2008). Přítomnost tzv. „**neurosekrečních váčků**“ (obr. 20B, 21 a 22) a výskyt pravděpodobně **mikrotubulárních vláken** (obr. 21) byla pozorována v cytoplazmě neuroblastů infikovaných virem KE připravených pouze metodou kryofixace (HPF). Neurosekreční váčky o velikosti 70-90 nm se velice podobaly virionům s obalovou membránou, ale jejich velikost tomu neodpovídala. Velké neurosekreční váčky obsahovaly elektron-denzní jádro, obalovou membránu a vyskytovaly se: jednotlivě (obr. 20B, 21), ve shlucích uvnitř RER (obr. 22) a v cytoplazmě mezi cisternami RER (obr. 21). Některé neurosekreční váčky jsem pozorovala navázané na vnitřní stranu membrány cisterny RER (obr. 22), jiné byly navázány na viriony (detail na obr. 21). Výskyt neurosekrečních váčků v okolí membránových struktur byl pozorován u buněk, infikovaných virem West Nile (Novoa a kol., 2005). Podobné váčky o průměru 40-70 nm s elektron-denzním jádrem pozoroval u klíččících buněk infikovaných virem KE Šenigl (2000a).

Mohu potvrdit pozorování, která popisují přítomnost neurosekrečních váčků v cytoplazmě mezi cisternami RER u neuroblastů. V těsné blízkosti neurosekrečních váčků jsem pozorovala další membránové váčky, které neměly elektron-denzní jádro (obr. 22). Domnívám se, že pozorované membránové váčky bez elektron-denzního jádra by mohly být synaptické váčky, které byly pozorovány u transgenních myších nádorových buněk neuroblastů (Iwakura a kol., 2008). Také by se mohlo jednat o SMS, které jsem pozorovala u neuroblastů připravených chemickou fixací (obr. 6). Další výskyt synaptických a neurosekrečních váčků potvrzuje klinická studie o leukemiích a lymfómech pozorovaná u nádorových buněk (z angl. „neuroblastoma“, Dickersin, 1987). Uvádí se, že sekreční granula (velké jaderné neurosekreční váčky) u neuronů slouží k zásobování a uvolňování neuropeptidů a proces exocytózy je spouštěn signály z okolí buňky (Burgess a Kelly, 1987). Domnívám se, že průkaz neurosekrečních váčků (obr. 20B, 21, 22) a pravděpodobně synaptických váčků (obr. 22) vyskytujících se v těsné blízkosti virionů u virem KE infikovaných neuroblastů připravených pomocí HPF potvrzuje využití regulované sekreční dráhy viru KE po opuštění trans-Golgiho aparátu.

#### *Imunolokalizace virového proteinu E, ER a $\alpha$ -tubulinu*

Lokalizace jednotlivých virových komponent, zejména proteinů, je ještě poměrně málo prozkoumána. Abychom blíže objasnily mechanismus replikace a maturace *flavivirů* bylo hlavní úsilí zaměřeno na lokalizaci obalového virového proteinu E. Existuje několik

prací, které tento protein E lokalizovali na Vero buňkách a C6/36 infikovaných virem dengue-2 z kmene New Guinea B (Rahman a kol., 1998). Lokalizaci proteinu E a nestrukturního proteinu NS1 studoval Šenigl (2000a) u savčích buněk PS a klíštěcích buněk RA-257 infikovaných virem KE. U savčích buněk byl protein E lokalizován v cytoplazmě a protein NS1 na membráně ER. U klíštěcích buněk byla distribuce obou proteinů odlišná.

Pomocí specifických protilátek a protilátek konjugovaných s fluorescenční značkou jsem se pokusila potvrdit lokalizaci virového proteinu E v ER, vazbu virového proteinu E na mikrotubulární vlákna a dále průkaz mikrotubulárních vláken v perinukleární oblasti cytoplazmy infikovaných neuroblastů. Infikované neuroblasty byly fixovány ledovým metanolem a nevykazovaly dostatečně zachovalou ultrastrukturu (obr. 25B a 26B). Pravděpodobně nedostatečně zachovalá ultrastruktura a slabší specifita protilátek proti virovému proteinu E,  $\alpha$ -tubulinu (mikrotubulárním vláknům) a PDI (ER) byla příčinou slabého signálu u neuroblastů (obr. 25B a 26B). Ze získaných výsledků bylo těžké určit, zda se virové proteiny E vyskytovaly v ER a v asociaci s mikrotubulárními vlákny. Vzhledem k tomu, že světelná fluorescenční mikroskopie pracuje s malou rozlišovací schopností je nutné k potvrzení pozorovaných výsledků z konfokální mikroskopie provést další imunoznačení a detekci pomocí TEM. Distribuce mikrotubulárních vláken a virového proteinu E byla prokázána u medulloblastů, glioblastů a makrofágů infikovaných virem KE (Růžek a kol., 2009; Ahantaring a kol., 2009).

#### **5.1.4. Morfologické změny infikovaných neuroblastů virem KE**

##### *Apoptóza a nekróza*

Existují dva druhy buněčného poškození způsobené virovou infekcí: apoptóza a nekróza (Stewart a kol., 2002). Mnoho virů využívá při napadení a působení uvnitř hostitelské buňky schopnosti určitým způsobem spouštět proces apoptózy (Stewart a kol., 2002). U neuroblastů po infekci (48 h p.i.) virem KE byly mezi infikovanými buňkami pozorovány buňky se známkami pozdní apoptózy a nekrózy (obr. 4, 7, 8, 9A a B). Mezi neinfikovanými neuroblasty se ojediněle vyskytovaly buňky se známkami apoptózy a nekrózy. Apoptóza se projevovala celkovým zmenšením buňky (smrštěním, obr. 4) a výraznou elektron-denzní cytoplazmou (obr. 7) na rozdíl od ostatních buněk (obr. 4). Buněčné jádro bylo fragmentované a vykazovalo shluky kondenzovaného heterochromatinu na periférii jaderné membrány (obr. 7). Pokročilý stupeň apoptózy byl spojen s přítomností velkého množství vakuol v elektron-denzní cytoplazmě (obr. 7). U většiny buněk se známkami apoptózy se vyskytovaly viriony uvnitř zvětšených cisteren RER v perinukleární oblasti cytoplazmy. Virem KE indukovaná apoptóza pozorovaná u infikovaných neuroblastů projevovala podobné charakteristické morfologické znaky, které byly popsány u dalších typů buněk (Fairbairn a kol., 1994; Edstrom a kol., 1996; Shinomiya a kol., 1994). Výskyt infikovaných neuroblastů se známkami apoptózy a nekrózy je v souladu s pozorováním medulloblastů a glioblastů infikovaných virem KE (Růžek a kol., 2009). Z výše uvedených poznatků se domnívám, že apoptóza pozorovaná u infikovaných neuroblastů indukovaná virem KE je aktivním procesem buněčné destrukce, která vede k mortalitě neuroblastů. Apoptóza hraje roli v mechanismu patofyziologie KE, která není dosud zcela objasněna. Dalším nedostatečně prozkoumaným projevem je průběh apoptózy u lidských neuronálních buněk infikovaných virem KE *in vivo*.

Méně častým charakteristickým morfologickým znakem buněčného poškození způsobeného virovou infekcí KE pozorovaným u infikovaných a neinfikovaných neuroblastů byla přítomnost nekrotických buněk (obr. 9A a B). Nekrotické buňky měly poškozenou cytoplazmatickou a jadernou membránu, shluky kondenzovaného heterochromatinu a

v cytoplazmě přítomné vakuoly (8, 9A a B). Virem KE indukovaná buněčná nekróza vedla k narušení rovnováhy vnitřního prostředí buňky, což mělo za následek rozpad buňky (obr. 9A a B). Nekróza v CNS indukovaná jinými *flaviviry* např. virem Japonské encefalitidy (Esiri, 1997) a virem West Nile (Camenga a kol., 1974) byla pozorována během virové infekce.

## 5.2. Studium morfologických změn neuroblastů po infekci virem KE pomocí skenovací elektronové mikroskopie

Morfologické změny pozorované u neuroblastů neinfikovaných a infikovaných virem KE se projevily zejména změnou tvaru a členitosti povrchu. Neinfikované buňky měly tvar protáhlý (obr. 24A), zatímco infikované neuroblasty vykazovaly tvar zakulacený (obr. 24B). Domnívám se, že zakulacený tvar buněk je známkou pozorované apoptózy indukované virem KE. Charakteristickým znakem apoptózy je smrštění a zakulacení buněk. Změny tvaru buněk následkem infekce viru KE byly *in vitro* pozorovány u medulloblastů, glioblastů a makrofágů (Růžek a kol., 2009; Ahantaring a kol., 2009).

Povrch infikovaných neuroblastů byl drsný a členitý (obr. 24B). Neinfikované neuroblasty vykazovaly povrch hladší (obr. 24A). Povrchy neinfikovaných i infikovaných buněk byly kontaminovány zbytky rozpadlých nekrotických buněk (obr. 24A a B). Podobné kontaminace byly pozorovány na povrchu medulloblastů, glioblastů a makrofágů infikovaných virem KE (Růžek a kol., 2009; Ahantaring a kol., 2009). Na povrchu infikovaných a neinfikovaných neuroblastů byly přítomné mikroklky (obr. 24A a B). Podobné struktury byly pozorovány na povrchu maligních buněk retinoblastů (McFall a kol., 1978). Zvýšený počet mikroklků a velké členění povrchu bylo pozorováno u fibroblastů (Willingham a kol., 1977). Uvádí se, že mikroklky jsou mikroskopické, buněčné, membránové výstupky vyčnívající z cytoplazmy, které zvětšují povrch buňky. Mikroklky se účastní celé řady buněčných funkcí: absorpce, sekrece, adheze, transportu atd. (Erickson a Trinkaus, 1976).

Další povrchové struktury, např. filopodia a lamelipodia byly pozorovány u různých typů suspenzí buněk a buněčných kultur (Porter a kol., 1974). Buňka vysunuje z předního okraje krátkých výběžků (dendritů) tenká úzká filopodia a tenká listovitá lamelipodia pozorovaná u neuroblastů (neinfikovaných a infikovaných; obr. 24A a B). Domnívám se, že pomocí těchto struktur jsou infikované a neinfikované neuroblasty přichyceny k povrchu např. sklíčka. Morfologické změny v podobě přilnutí buněk pomocí filopodií nebo zploštěním rozprostřené cytoplazmy k substrátu byly pozorovány u adherentních retinoblastů (McFall a kol., 1978). Schopnost buněk adherovat, může indukovat morfologické změny, zejména jedná-li se o nádorové buňky, jako jsou např. neuronální buňky (neuroblasty), které se mohou dále diferencovat v jiné buňky (McFall a kol., 1978). Filopodia neuroblastů mohou sloužit jako antény k prozkoumání okolí a k pohybu buněk (Davenport a kol., 1993). Lamelipodia a filopodia byla popsána na povrchu makrofágů infikovaných virem KE (Ahantaring a kol., 2009).



## 6. Závěry

Pomocí skenovací elektronové mikroskopie se podařilo studovat morfologické změny projevující se na povrchu neuroblastů po infekci virem KE a bylo zjištěno:

- Pomocí topografického kontrastu sekundárními elektrony byly zaznamenány povrchové a tvarové změny buněk, které můžeme shrnout do tzv. cytopatického efektu (CPE) produkovaného virem KE.
- Infikované neuroblasty vykazovaly zakulacený tvar a drsný členitý povrch, který byl pokryt zbytky rozpadlých nekrotických buněk.
- Neinfikované neuroblasty měly tvar protáhlý a povrch hladký, který byl ojedinele pokryt zbytky rozpadlých nekrotických buněk.

Pomocí transmisní elektronové mikroskopie se podařilo sledovat intracelulární vývoj viru KE (způsob replikace a maturace) v cisternách RER a cytoplazmě infikovaných neuroblastů a pozorovat ultrastrukturní změny buněk způsobené infekcí viru KE. U neuroblastů připravených pomocí dvou rozdílných metod přípravy preparátů pro TEM (chemická fixace a kryofixace, HPF) bylo pozorováno:

*Metoda chemické fixace a odvodnění při pokojové teplotě*

- Ultrastruktura buněčných organel a membrán neuroblastů nebyla po chemické fixaci dostatečně zachovalá. Buněčný materiál vykazoval známky extrakce a agregační artefakty. Na ultratenkém řezu infikovaných neuroblastů byly pozorovány změny tvaru buňky a uspořádání buněčné cytoplazmy vlivem infekce viru KE v porovnání s neinfikovanými buňkami.
- V cytoplazmě infikovaných neuroblastů zaujímal nejvíce objemu RER, které bylo zvětšené a hypertrofované. Viriony se vyskytovaly uvnitř zvětšených cisteren RER a volně v cytoplazmě mezi rozpadlými cisternami RER, které neměly dobře zachovalé membrány.
- Mezi cisternami RER byla pozorována přítomnost mikrotubulárních vláken s navázanými viriony a jemné membránové struktury.
- Mezi infikovanými neuroblasty se vyskytovaly častěji buňky se známkami apoptózy, které měly elektron-denzní cytoplazmu. Uvnitř buněčného jádra byly pozorovány shluky kondenzovaného heterochromatinu. Ojedinele se vyskytovaly buňky se známkami nekrózy, které měly narušenou cytoplazmatickou a jadernou membránu. Cytoplazma byla nevýrazná a obsahovala rozpadlé buněčné organely a jádro.

*Metoda kryofixace pomocí rychlého mražení za vysokého tlaku (HPF) a následná mrazová substituce ledu (FS)*

- Metoda kryofixace pomocí HPF a FS u neuroblastů (neinfikovaných a infikovaných virem KE) výrazně zlepšila zachování ultrastruktury buněčných organel a membránových struktur. Buněčné jádro a cytoplazma neuroblastů nejevila známky extrakce materiálu a agregaci nukleových kyselin (shluky uvnitř jádra v porovnání s metodou chemické fixace). Buněčná cytoplazma byla více elektron-denzní a vykazovala nižší kontrast buněčných organel a membrán.

- Pomocí metody HPF bylo dosaženo zachování buněčných struktur, např. intermediárních vláken a GA, které chemickou fixací zachovány nebyly.
- Neuroblasty vykazovaly zakulacený tvar buněk v porovnání s neuroblasty po chemické fixaci, které měly nepravidelný protáhlý tvar.
- Vývoj, replikace a maturace viru KE uvnitř cytoplazmy neuroblastů v pokročilém stádiu infekce (48 p.i.) byly pozorovány v ER a GA, ERGIC a trans-GA. Dobrá ultrastruktura cytoplazmy a buněčných organel v cisternách RER, oblast ERGIC, GA a fixace v řádu milisekund je nezbytná pro podrobný popis dynamických procesů uvnitř buňky. Kryometoda pomocí HPF umožnila sledování intracelulárního vývoje virionů narozdíl od metody chemické fixace a odvodnění při pokojové teplotě.
- Během vývoje viru KE v neuroblastu se viriony vyskytovaly zpočátku uvnitř zvětšených a hypertrofovaných cisteren RER, později se objevovaly v přechodném kompartmentu ERGIC, cisternách GA a trans-GA. Velké množství přítomných virionů uvnitř zvětšených cisteren RER infikovaných neuroblastů potvrdila hlavní místo skládání a replikace viru KE a potvrzuje spíše maturaci typu trans. Přítomnost virionů volně v cytoplazmě mezi cisternami RER nebo v asociaci s mikrotubulárními vlákny naznačuje také maturaci typu cis. Z pozorovaných výsledků vývoje viru KE uvnitř buněčné cytoplazmy neuroblastů nemůžeme tedy proces maturace viru KE řadit jednoznačně k cis nebo trans typu.
- Způsob, jakým virus KE získává svůj obal, nebyl z pozorování neuroblastů připravených různými metodami pro transmisní elektronovou mikroskopii zřejmý.
- U infikovaných neuroblastů připravených pomocí HPF byl potvrzen výskyt pravděpodobně mikrotubulárních vláken v prostoru RER, ale viriony na vlákna navázány nebyly (v porovnání s buňkami připravenými chemickou fixací). Mikrotubulární vlákna u neinfikovaných neuroblastů nebyla pozorována.
- U infikovaných buněk připravených pomocí HPF nebyly prokázány virem indukované jemné membránové struktury (v porovnání s chemicky fixovanými infikovanými neuroblasty).
- Transport viru KE byl pozorován u neuroblastů pomocí transportního membránového váčku přítomného v sousedství cisteren GA.
- Výskyt velkých membránových neurosekrečních váčků s elektron-denzním jádrem a pravděpodobně synaptických váčků, které se nacházely uvnitř a mezi cisternami RER byl pozorován pouze u infikovaných neuroblastů připravených pomocí HPF a pravděpodobně potvrzuje využití regulované sekreční dráhy viru KE.
- Pokročilé stádium infekce viru KE mezi infikovanými neuroblasty se projevilo častým výskytem buněk se známkami apoptózy a nekrózy v porovnání s neinfikovanými buňkami, kde byl výskyt jen ojedinělý. Buňky se známkami apoptózy byli smršťené, projevovaly změny na cytoplazmatické membráně (výběžky z membrány) a vykazovaly elektron-denzní cytoplazmu s velkým množstvím vakuol. Na periférii buněčného jádra se vyskytovaly shluky kondenzovaného heterochromatinu. Nekrotické buňky měly většinou porušenou

jadernou a cytoplazmatickou membránu. Méně elektron-denzní cytoplazma obsahovala rozpadlé buněčné organely a vakuoly.

*Detekce virového proteinu E v ER a v asociaci s  $\alpha$ -tubulinem pomocí imunofluorescence a konfokální mikroskopie*

- Nespecifické reakce a slabý fluorescenční signál zcela neprokázaly, ani nevyvrátily přítomnost virových proteinů E v ER a na mikrotubulárních vláknech u infikovaných neuroblastů.

## 7. Seznam použité literatury

- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P., 1998. *Základy buněčné biologie*. Espero Publishing, Ústí nad Labem. 630 pp.
- Adle-Biassette, H., Levy, M., Colombel, M. et al., 1995. Neuronal apoptosis in HIV infection in adults. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 21: 218-227.
- Ahantarig, A., Ruzek, D., Vancova, M. et al., 2009. Tick-borne encephalitis virus infection of cultured mouse macrophages. *Intervirology.* 52: 283-290.
- Allison, S. L., Schalich, J., Stiasny, K., Mandl, C. W., Kunz, C. and Heinz, F. X., 1995. Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by acidic pH. *J. Virol.* 69: 695-700.
- Banzhoff, A., Bröker, M. and Zent, O., 2008. Protection against tick-borne encephalitis (TBE) for people living in and travelling to TBE-endemic areas. *Travel. Med. Infect. Dis.* 6: 331-341.
- Bauerfeind, R., Jelinek, R., Hellwig, A. and Huttner, B. W., 1995. Neurosecretory vesicles can be hybrid of synaptic vesicles and secretory granules. *Neurobiol.* 92: 7342-7346.
- Beer, S., Brune, N. and Kesselring, J., 1999. Detection of anterior horn lesions by MRI in central European tick-borne encephalomyelitis. *J. Neurol.* 246: 1169-1171.
- Burgess, T. L. and Kelly, R. B., 1987. Constitutive and regulated secretion of proteins. *Ann. Rev. Cell Biol.* 3: 243-293.
- Calisher, C. H. and Gould, E. A., 2003. Taxonomy of the virus family flaviviridae. *Flaviviruses: Structure, Replication and Evolution.* 59: 1-19.
- Camenga, D. L., Nathanso, N., Cole, G. A., 1974. Cyclophosphamide-potentiated west nile viral encephalitis - relative influence of cellular and humoral-factors. *J. Infect. Diseases.* 130: 634-641.
- Clubb, B. H. and Locke, M., 1998. 3T3 cells have nuclear invaginations containing F-actin. *Tissue & Cell.* 30: 684-691.
- Daniel, M., Kříž, B., Danielová, V. and Beneš, Č., 2008. Sudden increase in tick-borne encephalitis CASE in the Czech Republic, 2006. *Int. J. Med. Microbiol.* 298, Suppl. 1: 81-87.
- Davenport, R. W., Dou, P., Rehder, V. and Kater, S. B., 1993. A sensory role of neuronal growth cone filopodia. *Nature.* 361: 721-724.
- Despres, P., Flamand, M., Ceccaldi, P. E. et al., 1996. Human isolates of dengue type 1 virus induce apoptosis in mouse neuroblastoma cells. *J. Virol.* 70: 4090-4096.
- Despres, P., Frenkiel, M. P., Ceccaldi, P. E., Dos Cantos, C. D. and Deubel, V., 1998. Apoptosis in the mouse central nervous system in response to infection with mouse-neurovirulent dengue viruses. *J. Virol.* 72: 823-829.
- Dickersin, G. R., 1987. Electron-microscopy of leukemias and lymphomas. *Clin. Lab. Med.* 7: 199-247.
- Dubochet, J., Adrian, M., Chang, J. J., Homo, J. C., Lepault, J., McDowell, A. W. and Schultz, P., 1988. Cryo elektron microscopy of vitrified specimen. *Quart. Rev. Biophysic.* 21/2: 129-228.
- Dubochet, J. and Blanc, S. N., 2001. The cell in absence of aggregation artifacts. *Micron.* 32: 91-99.
- Dumpis, U., Crook, D. and Oksi, J., 1999. Tick-borne encephalitis. *Clin. Infect. Dis.* 28: 882-890.
- Edstrom, A., Ekstrom, P. A. R. and Tonge, D., 1996. Axonal out-growth and neuronal apoptosis in cultured adult mouse dorsal root ganglion preparations: effects of

- neurotrophins, of inhibition of neurotrophin actions and of prior axotomy. *Neuroscience*. 75: 1165-1174.
- Ericsson, C. A. and Trinkaus, J. P., 1976. Microvilli and blebs as source of reserve surface membrane during cell spreading. *Exp. Cell. Res.* 99: 375-384.
- Esiri, M. M., 1997. Viruses and rickettsiae. *Brain Pathol.* 7: 695-709.
- Fairbairn, D. W., Carnahan, K. G., Thwaites, R. N., Grigsby, R. V., Holyoak, G. R. and O'Neill, K. L., 1994. Detection of apoptosis induced DNA cleavage in Scrapie-infected sheep brain. *FEMS Microbiol. Lett.* 115: 341-346.
- Filshie, B. K. and Řeháček, J., 1968. Studies of the morphology of Murray Halley encephalitis and Japanese encephalitis viruses growing in cultured mosquito cells. *Virology*. 34: 435-443.
- Gilkey, J. C. and Staehelin, L. A., 1986. Advances in ultra-rapid freezing for the preservation of cellular ultrastructure. *J. Electron. Techn.* 3: 177-210.
- Grešíková, M. and Nosek, J., 1981. *Arbovírusy v Československu*. Veda, Bratislava. 140 pp.
- Gritsun, T. S., Lashkevich, V. A. and Gould, E. A., 2003. Tick-borne encephalitis. *Antivir. Res.* 57: 129-146.
- Guirakhoo, F., Heinz, F. X. and Kunz, C., 1989. Epitope model of tick-borne encephalitis virus envelope glycoprotein E: Analysis of structural properties, role of carbohydrate side chain, and conformational changes occurring at acidic pH. *Virology*. 169: 90-99.
- Hase, T., Dubois, D. R., Summers, P. L., Dosna, M. B. and Ussery, M. A., 1993. Comparison of replication rates and pathogenecities between the SA14 parent and SA14-14-2 vaccine strains of Japanese encephalitis virus in mouse brain neurons. *Arch. Virol.* 130: 131-143.
- Hase, T., Summers, P. L. and Eckels, K. H., 1989. Flavivirus entry into cultured mosquito cells and human peripheral-blood monocytes. *Arch. Virol.* 104: 129-143.
- Hase, T., Summers, P. L., Eckels, K. H. and Baze, W. B., 1987a. An electron and immunoelectron microscopic study of dengue-2 virus infection of cultured mosquito cells: maturation events. *Arch. Virol.* 92: 273-291.
- Hase, T., Summers, P. L., Eckels, K. H. and Baze, W. B., 1987b. Maturation proces sof Japanese encephalitis virus in cultured mosquito cells in vitro and mouse brain cells in vivo. *Arch. Virol.* 96: 135-151.
- Heinz, F. X., Auer, G., Stiasny, K., Holzmann, H., Mandl, C., Guirakhoo, F. and Kunz, C., 1994. The interaction of the flavivirus envelope proteins: implications for virus entry and release. *Arch. Virol. Suppl.* 9: 339-348.
- Helenius, A., 1995. Alphavirus and flavivirus glycoproteins: structure and functions. *Cell*. 81: 651-653.
- Hay, S. and Kannourakis, G., 2002. A time to kill: viral manipulation of the cell death program. *J. Gener. Virol.* 83: 1547-1564.
- Holzmann, H., Stiasny, K., York, H. et al., 1995. Tick-borne encephalitis virus envelope protein E specific monoclonal antibodies for the study of low pH induced conformational changes and immature virions. *Arch. Virol.* 140: 213-221.
- Chambers, T. J. and Rice, C. M., 1987. Molecular-biology of the flaviviruses. *Microb. Sci.* 4: 219-223.
- Chambers, T. J., Hahn, C. S., Galler, R. and Rice, C. M., 1990a. Flavivirus geonome organization, expression and replication. *Ann. Rew. Microb.* 44: 649-688.
- Chambers, T. J., Mccourt, D. W. and Rice, C. M., 1990b. Production of yellow fever virus proteins in infected cells: Identification and discrete polyprotein species and

- analysis of cleavage kinetics using region-specific polyclonal antisera. *Virology*. 177: 159-174.
- Charles, R. N., Attoui, H., Butenko, A. M., Clegg, J. C., Deubel, V., Frolova, 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. and Lamballerie, X., 2004. Tick-borne virus diseases of human interest in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 10: 1040-1055.
- Charrel, R. N., Attoui, H., Butenko, A. M. et al., 2004. Tick-borne virus diseases of human interest in Europe. *Clin. Microbiol. Infection*. 10: 1040-1055.
- Chu, J. J. H. and Ng, M. L., 2002. Trafficking mechanism of West Nile (Sarafend) virus structural proteins. *J. Med. Virol.* 67: 127-136.
- Chu, J. J. H. and Ng, M. L., 2003. The mechanism of cell death during West Nile virus infection is dependent on initial infectious dose. *J. Gener. Virol.* 84: 3305-3314.
- Iwakura, H., Ariyasu, H., Kanamoto, N., Hosoda, K., Nakao, K., Kangawa, K. and Akamizu, T., 2008. Establishment of novel neuroblastoma mouse model. *Int. J. Oncol.* 33: 1195-1199.
- Kanno, H., Speedy, R. J. and Angell, C. A., 1975. Supercooling of water to -92 degrees C under pressure. *Science*. 189: 880-881.
- Kříž, B., Beneš, Č. and Daniel, M., 2009. Alimentary transmission of tick-borne encephalitis in the Czech Republic (1997-2008). *Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 58: 98-103.
- Lindquist, L. and Vapalahti, O., 2008. Tick-borne encephalitis. *Lancet*. 371: 1861-1871.
- Llombart-Bosch, A., Lacombe, M. J., Contesso, G. and Peydro-Olaya, A., 1987. Small round blue cell sarcoma of bone mimicking atypical Ewing's sarcoma with neuroectodermal features. *Cancer*. 60: 1570-1582.
- Locker, J., Goldblat, P. J. and Leighton, J., 1968. Some ultrastructural features of Yoshida ascites Hepatoma. *Cancer Res.* 28: 2039-2050.
- Mackenzie, J. M., Jones, M. K. and 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. *J. Virol.* 73: 9555-9567.
- Mackenzie, J. M., Khromykh, A. A. and Westaway, E. G., 2001. Stable expression of noncytopathic Kunjin replicons simulates both ultrastructural and biochemical characteristics observed during replication of Kunjin virus. *Virol.* 279: 161-172.
- Mackenzie, J. M. and 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. *J. Virol.* 75: 10787-10799.
- McDonald K., 2007. Cryopreparation methods for electron microscopy of selected model systems. *Met. Cell. Biol.* 79: 23-180.
- McDonald, K. L. and Auer, M., 2006. High-pressure freezing, cellular tomography, and structural cell biology. *Biotechniques*. 41: 137-143.
- McDowall, A. W., Chang, J. J., Freeman, R. et al., 1983. Electron-microscopy of frozen hydrated sections of vitreous ice and vitrified biological samples. *J. Microscopy-Oxford*. 131: 1-9.
- McFall, R. C., Nagy, R. S., Nagle, B. T. and McGreevy, L. M., 1978. Scanning electron microscopic observation of two retinoblastoma cell lines. *Cancer Res.* 38: 2827-2835.
- Moor, H., 1987. Theory and practice of high pressure freezing. In: Steinbrecht, R. A. and Zierold, K. (eds.) *Cryotechnique in Biological Electron Microscopy*. Springer Verlag, Berlin. pp. 175-191.

- Moor, H. and Höchli, M., 1970. The influence of high pressure freezing on living cells. In: Favard, P. (ed.) *Proc. 7th Int. Congr. EM. Grenoble. Société Francoise de Microscopie Electronique, Paris*. pp. 449-450.
- Moor, H., Bellin, G., Sandri, C. and Akert, K., 1980. The influence of high pressure freezing on mammalian nerve tissue. *Cell. Tis. Res.* 209: 201-216.
- Müller-Reichert, T., 2006 Spindle organization in three dimensions. *Habilitationschrift*. pp 1-132
- Nawa, M., 1998. Effects of bafilomycin A1 on Japanese encephalitis virus in C6/36 mosquito cells. *Arch. Virol.* 143: 1555-1568.
- Ng, M. L., 1987. Ultrastructural studies of Kunjin virus-infected *Aedes albopictus* cells. *J. Gener. Virol.* 68: 577-582.
- Ng, M. L. and Hong, S. S., 1989. Flavivirus infection: Essentials ultrastructural changes and association of Kunjin virus NS3 protein with microtubules. *Arch. Virol.* 106: 103-120.
- Ng, M. L., Tan, S. H. and Chu, J. J., 2001. Transport and budding at two distinct sites of visible nucleocapsids of West Nile (Sarafend) virus. *J. Med. Virol.* 65: 758-764.
- Ng, M. L., Yeong, F. M. and Tan, S. H., 1994. Cryosubstitution technique reveals new morphology of flavivirus-induced structures. *J. Virol. Met.* 49: 305-314.
- Novoa, R. R., Calderita, G., Arranz, R. et al., 2005. Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis. *Biol. Cell.* 97: 147-172.
- Osetowska, E. and Wróblewska-Mularczyk, Z., 1966. Neuropathology of the experimental tick-borne encephalitis II. Brain lesions in adult mice after peripheral infection and in suckling mice after peripheral and intracerebral infection. *Pol. Med. J.* 5: 1418-1435.
- Porte, K. R., Fonte, V. and Weiss, G., 1974. A scanning microscope study of the topography of Hela cells. *Cancer Res.* 34: 1385-1394.
- Rahman, A., Kefer, J., Bando, M. et al., 1998. E-selectin expression in human endothelial cells by TNF-alpha-induced oxidant generation and NF-kappa B activation. *Am. J. Physiol. - Lung Cel. Mol. Physiol.* 19: L533-L544.
- Rajčány, J. and Čiampor, F., 2006: *Lekárska virológia*. Veda, Bratislava. 573 pp.
- Reipert, S., Fischer, I. and Wiche G., 2004. High-pressure freezing of epithelial cells on sapphire coverslips. *Int. Biochem. Mol. Cell. Biol.* 213: 81-85.
- Reipert, S. and Wiche, G., 2008. High-pressure freezing and low-temperature fixation of cell monolayers grown on sapphire coverslips. *Introduction to Electron Microscopy for Biologist.* 88: 165-180.
- Rey, F. A., Heinz, F. X., Mandl, C., Kunz, C. and Harrison, S. C., 1995. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature.* 375: 291-298.
- Riedle, U. and Höchli, M., 1973. The theory and technique of high pressure freezing. In: Benedetti, E. L., Favard, P. (eds), *Freeze-etching technique and applications*. Société Francoise de Microscopie Electronique, Paris. pp. 31-61.
- Robards a kol., 1985. *Low temperature methods in biological electron microscopy*. Elsevier.
- Roingeard, P., Hourieux, C., Blanchard, E. et al., 2004. Hepatitis C virus ultrastructure and morphogenesis. *Biol. Cell.* 96: 103-108.
- Růžek, D., Vancová, M., Tesařová, M., Ahantaring, A., Kopecký, J. and Grubhoffer, L., 2009. Morphological changes in human neural cells following tick-borne encephalitis virus infection. *J. Gener. Virol.* 90: 1649-1658.
- Sawaguchi, A., McDonald, K. L., Karvar, S. et al., 2002. A new approach for high-pressure freezing of primary culture cells: the fine structure and stimulation-

- associated transformation of cultured rabbit gastric parietal cells. *J. Microscopy-Oxford*. 208: 158-166.
- Seitelberger, F. and Jellinger, K., 1966. Neuropathology of tick-borne encephalitis (with comparative studies of arbovirus encephalitis and of poliomyelitis). *Neuropatol. Pol.* 4: 366-400.
- Shinomiya, N., Shinomiya, M., Wakiyama, H., Katsura, Y. and Rokutanda, M., 1994. Enhancement of CDDP cytotoxicity by caffeine is characterised by apoptotic cells death. *Exp. Cell. Res.* 210: 236-242.
- Schellinger, P. D., Schmutzhard, E., Fiebach, J. B. et al., 2000. Poliomyelitic-like illness in central European encephalitis. *Neurology*. 55: 299-302.
- Schmidt, M., Lewald, J., Vandertogt, C. et al., 1994. The contribution of GABA-mediated inhibition to response properties of neurons in the nucleus of the optic tract in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 6: 1656-1661.
- Simon, J., Slonim, D. and Zavadova, H., 1966. Experimentelle untersuchungen von klinischen und subklinischen formen zeckenencephalitis an unterschiedlich empfanglichen wirten-mausen hamstern und affen. 1. Weisse maus. *Acta Neuropathologica*. 7: 70.
- Simon, J., Slonim, D. and Zavadova, H., 1967. Experimentelle untersuchungen von klinischen und subklinischen formen der zeckenencephalitis an unterschiedlich empfanglichen wirten. 3. Das histologische bild der zeckenencephalitis bei affen. B. Dynamik der morphologischen veränderungen nach intracerebraler inoculation und seine beziehung zur virusproduktion. *Acta Neuropathol.* 8: 35.
- Small, W. C. and Goldstein, J. H., 1981. The effect of changing extracellular osmolality on water transport in human red-blood-cell as measured by the cell water residence time and the activation energy of water transport. *Bioch. Biophys. Acta.* 640: 430-438.
- Spiegelhalter, C., Tosch, V., Hentsch, D. et al., 2010. From dynamic live cell imaging to 3D ultrastructure: Novel Integrated methods for high pressure freezing and correlative light-electron microscopy. *Plos One*. 5: art.number. e9014.
- Stadler, K., Allison, S. L., Schalich, J. and Heinz, F. X., 1997. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *J. Virol.* 71: 8475-8481.
- Stewart, A. L., Mhashiklar, A. M., Yang, X. H. H. et al., 2002. PI3K blockade by Ad-PTEN inhibits invasion and induces apoptosis in radial growth phase and metastatic melanoma cells. *Mol. Med.* 8: 451-461.
- Stiasny, K., Allison, S. L., Marchler-Bauer, A., Kunz, C. and Heinz, F. X., 1996. Structural requirements for low-pH-induced rearrangement in the envelope glycoprotein of tick-borne encephalitis virus. *J. Virol.* 70: 8142-8147.
- Studer, D., Hennecke, H. and Miller, M., 1992. High-pressure freezing of soybean nodules leads to an improved preservation of ultrastructure. *Planta*. 188: 155-163.
- Studer, D., Michel, M., Wohlwend, M., Hunziker, E. B. and Buschmann, M. D., 1995. Vitrification of articular cartilage by high-pressure freezing. *J. Microsc.* 179: 321-332.
- Šenigl, F., 2000a. Expres antigenů a maturace viru klíšťové encefalitidy v savčích a klíšťecích buňkách. Magisterská diplomová práce, BF JU, České Budějovice.
- Šenigl, F., 2000b. Maturation of tick-borne encephalitis virus in tick and mammalian cells. In: *Proceedings of the 3rd International conference on ticks and tick-borne pathogens: Into the 21st century*. Bratislava. pp. 29-37.
- Šenigl, F., Grubhoffer, L. and Kopecký, J., 2006. Differences in maturation of tick-borne encephalitis virus in mammalian and tick cell line. *Intervirology*. 49: 239-248.



- Urs, A. N., Dammer, E. and Sewer, M. B., 2006. Sphingosine regulates the transcription of CYP17 by binding to steroidogenic factor-1. *Endocrinology*. 147: 5249-5258.
- Van Harreveld, A., Crowell, J. and Malhotra, S. K., 1965. A study of extracellular space in central nervous tissue by freeze substitution. *J. Cell. Biol.* 25: 117-137.
- Vanhecke, D., Graber, W. and Studer, D., 2008. Close-to-native ultrastructural preservation by high pressure freezing. *Met. Cell. Biol.* 88: 151-164.
- Votova, M., Černohorská, L., Heroldová, M., Holá, V., Mejzlíková, L., Ondrovčík, P., Růžička, F., Dvořáčková, M., Woznicová, V. and Zahradníček, O., 2003. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Neptun, Brno. 495 pp.
- Wang, J. J., Liao, C. L., Chiou, Y. W., Chiou, C. T., Huang, Y. L. and Chen, L. K., 1997. Ultrastructure and localization of E proteins in cultured neuron cells infected with Japanese encephalitis virus. *Virology*. 238: 30-39.
- Westaway, E. G. 1987. Flavivirus replication strategy. *Advances in Virus Research*. 33: 45-90.
- Westaway, E. G., Khromykh, A. A., Kenney, M. T., Mackenzie, J. M. and Jones, M. K., 1997a. Proteins C and NS4B of the flavivirus Kunjin translocate independently into the nucleus. *Virology*. 234: 31-41.
- Wild, P., Schraner, E. M., Adler, H. et al., 2001. Enhanced resolution of membranes in cultured cells by cryoimmobilization and freeze-substitution. *Microscopy Res. Techn.* 53: 313-321.
- Willingham, M. C., Yamada, K. M., Yamada, S. S., Pouyssegur, J. and Pastan, I., 1977. Microfilament bundles and cell shape are related to adhesiveness to substratum and are dissociable from growth control in cultured fibroblasts. *Cell*. 10: 375-380.
- Wyllie, A. H., Kerr, K. F. R. and Currie, A. R., 1980. Cell death - the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68: 251-306.
- Zhang, P., Klutch, M., Muller, J. and Marcus-Sekura, C. J., 1993. St Louis encephalitis virus establishes a productive, cytopathic and persistent infection of Sf9 cells. *J. Gener. Virol.* 74: 1703-1708.
- Zhu, H., Shen, Y. Q. and Shen, T., 1995. Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins block apoptosis. *J. Virol.* 69: 7960-7970.

## **8. Obrazové přílohy**