

Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká Fakulta

3D elektronová tomografie a korelativní mikroskopie

Disertační práce

Mgr. Tomáš Bílý

Školitel: **Ing. Jana Nebesářová, CSc.**

Přírodovědecká fakulta, Jihočeská Univerzita, České Budějovice

Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha

Biologické Centrum AVČR, Parazitologický ústav, České Budějovice

Školitelé specialisté:

RNDr. Marie Vancová, Ph.D.

Přírodovědecká fakulta, Jihočeská Univerzita, České Budějovice

Biologické Centrum AVČR, Parazitologický ústav, České Budějovice

Mgr. David Kaftan, Ph.D.

Přírodovědecká fakulta, Jihočeská Univerzita, České Budějovice

České Budějovice 2019

This thesis should be cited as (citace disertační práce):

Bílý T, 2019: 3D elektronová tomografie a korelativní mikroskopie. (3D electron tomography and correlative microscopy, Ph.D. Thesis, in Czech), Ph.D. Thesis Series No. 8. University of South Bohemia, Faculty of Science, České Budějovice, Czech Republic, 142 pp.

Annotation

Electron tomography allows visualization of objects in a form of reconstructed 3D virtual volumes with resolution power of electron microscopy. The thesis is focused primarily on biological applications of electron tomography applied on tilt series images acquired in transmission electron microscope at room temperature. Specifically, the interaction of tick-borne encephalitis virus with neural cells and 3D ultrastructure of the central electron-dense part of the flagellum 9 + “1” (*Caryophyllaeides fennica*) were investigated. Finally, electron tomography was combined and correlated with atomic force microscopy to allow repetitive examination of ultrathin sections on electron microscopy grids.

Anotace

Elektronová tomografie umožňuje zobrazovat pozorované objekty ve formě zrekonstruovaných trojrozměrných virtuálních objemů s patřičným rozlišením odpovídajícím metodě elektronové mikroskopie. Tato práce je zaměřena především na aplikaci elektronové tomografie využívající náklonné série projekčních snímků pořízených transmisním elektronovým mikroskopem k zobrazení biologických preparátů za pokojové teploty. Prakticky byla zkoumána interakce viru klíšťové encefalitidy s nervovými buňkami a trojrozměrná ultrastruktura centrální elektrondenzní části bičíku 9 + „1“ (*Caryophyllaeides fennica*). Dále byla elektronová tomografie kombinována s mikroskopii atomárních sil jako korelativní technika umožňující opakované pozorování ultratenkých řezů umístěných na elektronmikroskopické síťce.

Prohlášení:

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své disertační práce, a to v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 29. března 2019

.....

Tomáš Bílý

Tato disertační práce vznikla na základě spolupráce Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity a Biologického centra Akademie věd podporujících doktorské studie v oboru Biofyzika



Biology Centre CAS
Branišovská 31
České Budějovice CZ-370 05

Faculty of Science
Branišovská 1760
České Budějovice CZ-370 05

Tato práce vznikla za podpory následujících projektů:

Czech Science Foundation project No. P502/11/2116 and P302/12/2490

Technology Agency of the Czech Republic (TE 01020118)

AdmireVet project CZ.1.05./2.1.00/01.006 (ED006/01/01)

Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic
(Czech BioImaging LM2015062 and CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_013/0001775)

Poděkování

Tímto bych chtěl vyjádřit obrovské díky své školitelce a vedoucí Laboratoře elektronové mikroskopie v jedné osobě – Janě Nebesářové, která mi umožnila tuto práci uskutečnit, a především díky za její, mnohdy nadstandardní podporu. Marii Vancové děkuji za její odborný dohled a konzultace, které mi v mnoha případech otevíraly obzory. Magdaléně Bruňanské děkuji za její odbornou pomoc a konzultace, ke kterým přispěla pod jejím vedením i Martina Matoušková. Oběma děkuji, také za jejich pomoc při stáži v Košicích. Davidu Kaftanovi děkuji za jeho podporu v začátcích práce a za veškerou jeho pomoc s AFM. Chtěl bych také poděkovat panu profesoru Vávrovi *in memoriam* za jeho odborné vedení při práci na perloočkách. Dále bych chtěl poděkovat všem spoluautorům vzniklých článků Danielovi, Martinovi, Margaritě, Hassanovi, Ashlie. a v neposlední řadě také spoluautorům, a především vedoucím pracovníkům Biologického Centra v.v.i. profesoru Juliusi Lukešovi a profesoru Liborovi Grubhofferovi. Děkuji vedoucímu EM laboratoři Yannickovi Schwabovi do EMBLu v Heidelbergu za velice přínosnou stáž v jeho laboratoři.

Speciální dík patří mým milým kolegům, kteří stáli po mém boku v Laboratoři elektronové mikroskopie: Jan Langhans, Jana Kopecká, Jiří Vančček, Lucie Kocová, Martin Strnad, Martina Tesařová, Petra Masařová, Zdenko Gardian a ani Janu Jungwirthovou nevyjímaje.

Také bych chtěl poděkovat všem mým spolužákům, se kterými jsem se potkal na katedře Biofyziky a zejména doktorských seminářích, jmenovitě: Alexandrovi Dulebovi, Václavovi Šloufovi, Ondřeji Kroutilovi, Olze Dvořákové, a především Josemu Romelovi Malapascua.

Poděkování bych chtěl uzavřít mými přáteli a blízkými, kteří mi byli především oporou, jakož největší dík patří mým rodičům a mému otci, bohužel *in memoriam*.

Seznam použitých zkratk

2D	Dvoudimenzionální
3D	Trojdimenzionální
ADA-SIRT	Střídavý dvouosý SIRT
AFM	Mikroskopie atomárních sil
ART	Algebraická rekonstrukční technika
BPJ	Zpětná projekce/rekonstrukce
BSE	Zpětně odražené elektrony
CCD	Zařízení s vázanými náboji
CT	Výpočetní tomografie
CTF	Přenosová funkce kontrastu
DQE	Detekční kvantová účinnost
EFTEM	Energiově filtrovaný TEM
EM	Elektronová mikroskopie
ET	Elektronová tomografie
FFT	Rychlá Fourierova transformace
FIB	Zaostřený iontový svazek
FT	Fourierova transformace
HAADF	Zobrazování pomocí prstenců tvořených elektrony rozptýlenými do vysokých úhlů
HPF	Zamrazování pomocí vysokého tlaku
HVTEM	Vysokonapěťový TEM
LVSEM	Nízkonapěťový SEM
MED	Multi energiová dekonvoluce
MRA	Multi referenční zarovnání
NMR	Nukleární magnetická rezonance
SBF	Odkrajování sériových řezů z bločku pro pozorování čelní strany
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
SIRT	Simultánně iterativní rekonstrukční technika
SART	Simultánně ART
SPA	Jednočásticová analýza
STEM	Skenovací transmisní elektronová mikroskopie
TEM	Transmisní elektronová mikroskopie
TF-ART	ART využívající náklonné série a přeastřování
WBPJ	Vážená BPJ

Články zahrnuté v disertaci

ČLÁNEK 1. Infection and injury of human astrocytes by tick-borne encephalitis virus, Martin Palus, **Tomáš Bílý**, Jana Elsterová, Helena Langhansová, Jiří Salát, Marie Vancová and Daniel Růžek, Journal of General Virology, Volume 95, Pages 2411–2426, 2014 (IF=3,18) [Kapitola 4]

TB prováděl ET, měření a analýzu dat, podílel se na psaní manuskriptu a revizi textu.

ČLÁNEK 2. Electron Tomography Analysis of Tick-Borne Encephalitis Virus Infection in Human Neurons, **Tomáš Bílý**, Martin Palus, Luděk Eyer, Jana Elsterová, Marie Vancová and Daniel Růžek, Scientific Reports, Volume 5, 2015 (IF=5,23) [Kapitola 5]

TB prováděl ET, měření a analýzu dat, podílel se na psaní části manuskriptu a revizi textu.

ČLÁNEK 3. Ultrastructural, cytochemistry and electron tomography analysis of *Caryophyllaeides fennica* (Schneider, 1902) (Cestoda: Lytocestidae) reveals novel spermatology characteristics in the Eucestoda, Martina Matoušková, **Tomáš Bílý**, Magdaléna Bruňanská, John S. Mackiewicz and Jana Nebesářová, Parasitology Research, Volume 117, Issue 10, Pages 3091–3102, 2018 (IF=2,56) [Kapitola 6]

TB prováděl ET, měření a analýzu dat, podílel se na psaní části manuskriptu a revizi textu.

ČLÁNEK 4. Occurrence, pathology, and ultrastructure of iridovirus and cytoplasmic polyhedrosis viruses in daphnids from the Czech Republic, Jiří Vávra, **Tomáš Bílý**, Jana Nebesářová and Brian A. Federici, Journal of Invertebrate Pathology, Volume 140, Pages 35–38, 2016 (IF=2,38) [Kapitola 7]

TB prováděl EM, ET a AFM, měření a analýzu dat, podílel se na psaní části manuskriptu a revizi textu.

KAPITOLA 1. ÚVOD	1
1.1 METODY ELEKTRONOVÉ TOMOGRAFIE.....	3
1.1.1 <i>Historie elektronové mikroskopie</i>	3
1.1.2 <i>Elektronová tomografie (obecně)</i>	3
1.1.3 <i>Sériové řezy</i>	4
1.1.3.I Počítačové zpracování	5
1.1.3.II Rozlišení tomografie ze sériových řezů.....	6
1.1.3.III Příprava biologického preparátu	7
1.1.3.IV Automatické snímání v SEM	7
1.1.4 <i>Náklonné série projekčních snímků řezů (ET)</i>	10
1.1.4.I Rozlišení a rekonstrukční techniky.....	11
1.1.4.II Rozlišení, víceosá ET a redukce chybějících dat	14
1.1.4.III ET v plném rozsahu náklonu	17
1.1.4.IV Automatizace snímání náklonných snímků.....	18
1.1.4.V ET software a spojování tomogramů	21
1.1.4.VI ET při STEM režimu v TEM a SEM	24
1.1.4.VII Kryo ET a její limity	25
1.1.5 <i>Metoda jednočásticové analýzy (SPA)</i>	28
1.1.5.I Rozlišení SPA.....	29
1.1.6 <i>Korelativní mikroskopie a elektronová tomografie</i>	30
1.2 ET Z NÁKLONNÉ SÉRIE ZA POKOJOVÉ TEPLoty	31
1.2.1 <i>Zpětná rekonstrukce</i>	31
1.2.2 <i>Fourierova transformace</i>	34
1.2.3 <i>Schéma práce při ET</i>	35
KAPITOLA 2. CÍLE DISERTACE	41
KAPITOLA 3. SEZNAM ČLÁNKŮ	45
3.1 ČLÁNKY ZAHRNUTÉ V DISERTACI.....	47
3.1.1 <i>Interakce viru klíšťové encefalitidy s nervovými buňkami</i>	47
3.1.2 <i>Ultrastruktura centrální části bičíku 9+1</i>	47
3.1.3 <i>Korelativní mikroskopie EM a AFM</i>	47
3.2 CITOVANÉ AUTORSKÉ ČLÁNKY	48
KAPITOLA 4. ČLÁNEK 1	51
KAPITOLA 5. ČLÁNEK 2	71
KAPITOLA 6. ČLÁNEK 3	89
KAPITOLA 7. ČLÁNEK 4	105
KAPITOLA 8. DISKUZE A ZÁVĚR	113
KAPITOLA 9. LITERATURA	123

Kapitola 1.ÚVOD

1.1 METODY ELEKTRONOVÉ TOMOGRAFIE

1.1.1 Historie elektronové mikroskopie

Počátky elektronové mikroskopie můžeme datovat do roku 1931, kdy Ernst Ruska sestrojil prototyp transmisního elektronového mikroskopu (TEM), za jehož objev mu byla roku 1986 udělena Nobelova cena za fyziku [1, 2]. Jak název napovídá obraz je tvořen rozptylem primárních elektronů při průchodu tenkým vzorkem (v řádu nanometrů) jako projekční. Princip skenovacího elektronového mikroskopu (SEM) byl navržen Ardennem roku 1938 a byl sestrojen později roku 1942 Zworykinem [3]. Obraz ve skenovacím elektronovém mikroskopu je tvořen skenovacím způsobem, kdy svazek primárních elektronů vytváří pružným i nepružným rozptylem uvnitř tlustého vzorku různé signály (zpětně odražené elektrony, sekundární elektrony, rentgenové záření, Augerovy elektrony, katodoluminiscence), které zachytává detektor.

1.1.2 Elektronová tomografie (obecně)

Původní smysl slovního spojení „elektronová tomografie“ vychází z řeckých slov „tómos“ a „graphé“, jejichž význam je řez a zapisovat [4]. V nejširším slova smyslu lze chápat elektronovou tomografii jako rekonstrukci objemu pozorovaného objektu pomocí jeho rozdělení do řezů, ať už reálných, virtuálních či zobrazovaných pomocí elektronové mikroskopie. Historicky je název elektronová tomografie (ET) primárně spojen s 3D rekonstrukcí ze série náklonných snímků (viz. kapitola 1.1.4). Podobně jako se označuje pojmem výpočetní tomografie (CT) 3D rekonstrukce z projekčních snímků pořízených pomocí rentgenového záření pod různými úhly. Přehled metod elektronové tomografie s odkazy na jednotlivé kapitoly této práce je uveden viz. tabulka 1 (zmíněné metody lze provádět jak za pokojové teploty, tak i za kryo podmíněk).

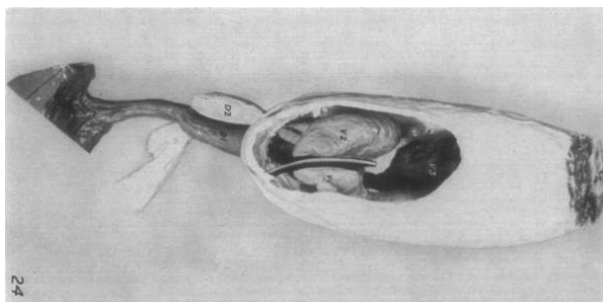
Metody elektronové tomografie	
TEM	SEM
Sériové řezy [kapitola 1.1.3]	Sériové řezy [kapitola 1.1.3.IV]
Elektronová tomografie pomocí náklonné série projekčních snímků (ET) [kapitola 1.1.4 a 1.2]	Sériové řezy krájené uvnitř komory (SBF) [kapitola 1.1.3.IV]
Jednočásticová analýza (SPA) [kapitola 1.1.5]	Odprašování povrchu bločků intovým svazkem (FIB) [kapitola 1.1.3.IV]
	Elektronová tomografie pomocí náklonné série projekčních snímků (ET) [kapitola 1.1.4.VI]

Tabulka 1: Přehled metod elektronové tomografie

1.1.3 Sériové řezy

Zkoumání živočišných a rostlinných tkání v transmisním elektronovém mikroskopu bylo možné až od roku 1948, kdy Pease a Baker byli schopni krájet 100 – 200 nm tenké řezy. Myši játra byla připravena do bločku chemickou cestou – prosycena 2 % oxidem osmičelým podle Claude a Fullama [6] (zafixuje tkáň a zároveň zvýší kontrast), poté byla aplikována alkoholová série (odvodní tkáň) s přidáním 3 %, 6 % a 10 % kolodia, které bylo následně zpevněno chloroformem. Vzorek byl převeden do karbo-xylenu a prostoupen při 65 °C parafinem. Bloček byl poté krájen skleněným nožem. Řezy byly sbírány na elektron mikroskopické sítky (Mesh 200). Samotné prohlížení v TEM bylo možné až po odstranění části nebo veškerého zalévacího materiálu pomocí xylenu nebo benzenu [5].

V roce 1953 vyvinut první hojně rozšířený ultramikrotom [7], díky kterému byla o rok později aplikována první z metod elektronové tomografie založená na rekonstrukci trojrozměrných objektů pomocí sériových řezů. Výstupem bylo osmnáct sériových snímků slinných žláz larvy *Drosophila melanogaster* [8]. Metoda zobrazování pomocí sériových řezů byla dále vyvíjena Sjøstrandem. V roce 1958 vytvořil trojrozměrné modely (viz. Obrázek 1) zrekonstruované synapse tyčinky ze sítnice oka morčete domácího pomocí snímků čtyřiceti sériových řezů. Tyto modely byly vytvářeny obkreslením kontur objektů z jednotlivých snímků na celuloidové desky, které byly následně vyřezávány a spojovány do výsledného 3D modelu [9].



Obrázek 1: 3D model synapse tyčinky ze sítnice oka morčete domácího vytvořeného ze čtyřiceti sériových řezů – jednotlivé objekty byly vyřezány do celuloidových desek. (V1, V2, V3 – synaptické vakuoly, D1, D2 – Dendrity) [9]

1.1.3.I Počítačové zpracování

S vývojem a rozšířením výpočetní techniky byla tvorba reálných modelů pomocí sériových řezů nahrazena tvorbou virtuálních modelů. Počítačový model axonu a dendritického trnu publikovali Willey et al. v roce 1973, který byl vytvořen překreslením kontur objektů z elektron-mikroskopických snímků do virtuálních dat pomocí tabletu. Správné zarovnání jednotlivých objektů na snímcích bylo stále děláno překrýváním reálných snímků [10]. V roce 1990 Born et al. zpracovali digitalizované snímky Merkelových kožních buněk (Obrázek 2) do výsledného 3D modelu reprezentujícího celý objem buňky. Implementovali algoritmy, které automaticky normalizovali a poté zvyšovali kontrast všech snímků. Také automaticky označovali oblast ohraničující objem buňky a na základě takto získaného tvaru buňky zarovnávali jednotlivé snímky. Byl aplikován matematický model, který umožnil uspokojivě řešit deformace řezů, tak aby jednotlivé kontury vzájemně na sebe navazovaly. Samotné zarovnání jednotlivých řezů bylo řešeno na základě korelace výrazných objektů v buňce. Pokud se takové objekty v buňce nenacházely, tak autoři vytvořili excimerovým laserem (na vlnové délce 193 nm) vlastní značku ve tvaru válce o průměru 5 μ m s hloubkou 250 – 500 μ m [11, 12].



Obrázek 2: 3D virtuální model jádra Merklovy kožní buňky pokryté hlubokými prasklinami, jaderné póry nejsou viditelné [12]

Další vývoj je již zásadně propojen s využitím výpočetní techniky. Na tomto poli byla zásadní publikace algoritmu rychlé Fourierovy transformace (FFT) Jamese Cooleyho a Johna Tukey z roku 1965. Algoritmus snížil výpočetní čas neboli asymptotickou složitost $O(n)$ Fourierovy transformace (FT) z $O(N^2)$ na $O(N \cdot \log N)$ pro FFT [13]. FFT se využívá např. pro výpočet zpětné rekonstrukce [14]. Výpočet vektoru posunutí vzájemně posunutých obrazů (křížová korelace) [15], filtraci obrazu (např. odšumění) [16] a stanovení rozlišení obrazu [17]. Mezi roky 1979 a 1996 se objevila řada softvérových balíčků účelově zaměřených na elektronovou tomografii, z nichž několik se stalo dodnes vyžívaným standardem: Semper [14], MRC programy [18], spirálová rekonstrukce [19], EM-systém [20], Imagic [21], Spider [22] a IMOD [24] [23].

1.1.3.II Rozlišení tomografie ze sériových řezů

Rozlišení tomografie ze sériových řezů v ose Z je určeno dvojnásobkem tloušťky jednotlivých řezů [29], což vyplývá z teorie vzorkování: Nyquist–Shenonova teorému [30, 31]. V roce 1997 využili autoři vlastní programový balíček IMOD pro rekonstrukci 3D objektů z extrémně tenkých sériových řezů o tloušťce ~ 10 nm [25]. Se současnou technikou pro krájení ultratenkých řezů využívající např. vibračních nožů [26] se pořád jedná o proces s vysokými ztrátami, protože dochází ke kompresi a distorzi řezů až po jejich zničení. Reálně lze uříznout i tenčí řezy ~ 5 nm [27]. Pro účely tomografie pomocí sériových řezů se považuje tloušťka ~ 40 nm [28] za udržitelnou,

myšleno s minimálními fluktuacemi krájené tloušťky řezů, po celou dobu snímání série, která může obsahovat stovky řezů (viz. obrázek 4).

Laterální rozlišení (rovina X, Y) je určeno především rozlišovací schopností mikroskopu, potažmo zvětšením použitým při snímání. Aktuálně TEM s korekcemi aberací dosahují rozlišení pod 50 pm [32]. Nynější světové maximum je 39 pm [33]. Tyto hodnoty byly ale dosaženy ve skenovacím režimu (STEM) na vhodně upravených materiálových vzorcích. Pro konvenční zobrazování lze očekávat hodnoty v řádu 100 pm [34]. Přesto stále hovoříme o rozlišení, kterého je schopen dosáhnout TEM. Avšak nejmenší rozlišitelný detail kontrastované biologické struktury se pohybuje mezi 3 a 7 nm [35]. Aplikováním Nyquist–Shenonova teorému [30, 31] dojdeme k potřebnému zvětšení, při němž TEM dosáhne rozlišení odpovídající alespoň poloviční hodnotě nejmenšího rozlišitelného biologického detailu. Vzhledem k tomu, že rozlišovací schopnost TEM je zhruba o řád lepší než nejmenší rozlišitelný biologický detail. V praxi se jedná především o volbu velikosti pixelu snímku, která by měla být nejméně dvakrát menší než velikost zobrazované biologické struktury.

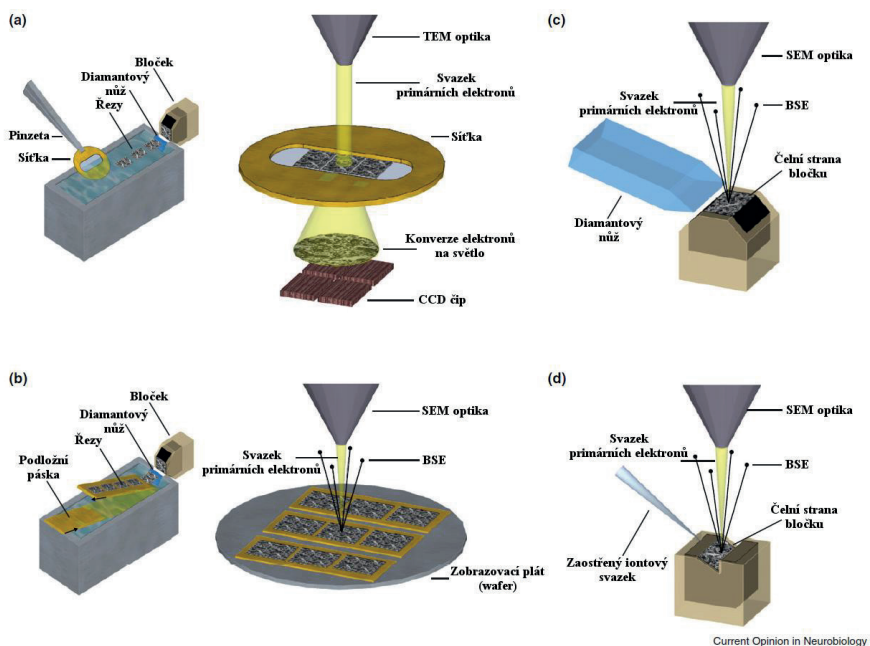
1.1.3.III Příprava biologického preparátu

Do šedesátých let dvacátého století byl biologický vzorek připravován pro sériové řezy chemickou cestou, díky čemuž docházelo k výraznému odplavení části biologického materiálu. Hans Moor proto vyvíjel šetrnější způsob přípravy preparátů pro elektronovou mikroskopii za pomoci vysokotlakého mražení (HPF) s pracovním tlakem okolo 2000 bar umožňující ultra rychlé zamražení vzorku garantující uchování veškeré vody ve fázi amorfního ledu. Takto zmražený vzorek lze poté použít pro kryo elektronovu mikroskopii nebo jej upravit pro prohlížení při pokojové teplotě s následným nahrazením vody a prosycením pryskyřicí za nízkých teplot [36]. V průběhu osmdesátých let dokončil vývoj do fáze komerčně dostupného produktu [37]. V kvalitě zachování tkání a množství neodplaveného biologického materiálu, oproti metodám přípravy preparátu za pokojové teploty (a vyšší) je zdokumentována jako jednoznačně lepší metoda HPF [37].

1.1.3.IV Automatické snímání v SEM

Další vývojový stupeň v 3D rekonstruování ze sériových řezů je spojen s vývojem SEM, který využívá nízké energie primárních elektronů interagujících

se vzorkem < 5 keV (LVSEM) (pozn. je možné generovat svazek primárních elektronů s nízkou energií, nebo je možné svazek primárních elektronů s vyšší energií brzdit před dopadem na vzorek pomocí elektrostatického pole, což umožňuje zachovat velikost stopy při snižování energie dopadajících elektronů) [39, 40, 41, 42, 43, 44]. Dalším vývojem bylo zlepšeno laterální rozlišení [45, 46, 47] a především se při těchto energiích zmenšuje interakční objem [48]. Díky tomu lze v LVSEM zobrazovat povrch pyramidy skrojeného bločku ve zpětně odražených elektronech (BSE) s dostatečným rozlišením umožňujícím zobrazení zalitých biologických preparátů s maximálním detailem, který lze biologicky rozlišit včetně Nyquist–Shannonova teorému [30, 31, 38]. Takovýto obraz v BSE je pak paralelou k TEM obrazu, oproti kterému má ve stupních šedi invertované odstíny šedi. V roce 2004 Denk a Horstmann publikovali další z metod elektronové tomografie využívající ultramikrotom, který zkrajuje bloček přímo uvnitř komory SEM (SBF), z nově odhalené plochy je snímán obraz reprezentující následný řez [49] (viz. obrázek 3 a obrázek 4). Další metoda využívající SEM se objevila v roce 2008, k odhalení nové vrstvy bločku používá zaostřený iontový svazek (FIB) [50]. Obě metody, jak SBF-SEM, tak FIB-SEM, jsou schopny zobrazovat objem bločku automatizovaně s laterálním rozlišením v řádu jednotek nm. V ose Z je rozlišení dáno tloušťkou odstraněného materiálu, což je pro SBF-SEM ~ 30 [51] – 20 nm [52] a v případě FIB-SEM ~ 5 nm. Výhodou je, že dochází k minimálnímu pokřivení obrazu oproti sériovým řezům, které se mohou fyzicky zkroutit. Nevýhodou je, že odhalováním nové plochy ztrácíme původní zdrojový materiál, protože v případě SBF řezy padají na dno komory SEM a v případě FIB jsou vyráženy atomy z preparátu. Ilustrativní přehled výše zmíněných metod je vyobrazen viz. obrázek 3 a orientační parametry těchto metod viz. tabulka 2 [28].



Obrázek 3: Zjednodušené schéma objemových 3D rekonstrukčních technik využívající sériových řezů. a) sériové řezy prohlíženy v TEM, b) Sériové řezy umístěné na pásku nebo wafer, c) SBF, d) FIB SEM [28]

Typické parametry	Seriové řezy TEM	Seriové řezy SEM	SBF	FIB SEM
Rozlišení x, y [nm]	4	4	10	5
Tloušťka řezu [nm]	40	30	25	5
Snímná hrana [μm]	21	65	40	10

Tabulka 2: Orientační parametry jednotlivých metod založených na sériových řezech [28]

SBF-SEM byl dále vyvíjen firmou FEI (dnes ThermoFisher SCIENTIFIC), která si patentovala v roce 2012 princip dekonvoluce virtuálních řezů z různých hloubek vzorku tvořených ze série snímků skenovaných při různém urychlovacím napětí – metoda multi energiové dekonvoluce (MED). MED SEM je založena na faktu, že se zvyšujícím se urychlovacím napětím se zvětšuje interakční objem uvnitř vzorku. Poté lze z řady SEM snímků snímaných při různých urychlovacích napětích v BSE dekonvoluovat obraz pro různé hloubky uvnitř vzorku [53]. Takto lze v SBF-SEM reálné řezy tloušťky 40 nm ještě rozdělit pomocí dekonvoluce na virtuální řezy o tloušťce ~10 nm a zlepšit tak rozlišení v ose Z [54].

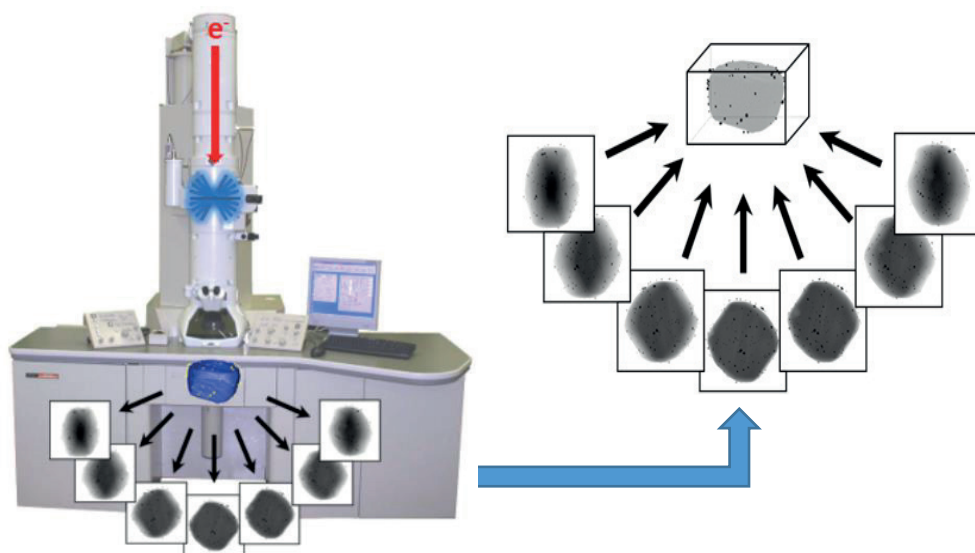


Obrázek 4: 3D model Krásnoočka zrekonstruovaný z přibližně 750 řezů metodou SBF. Světle šedá je jádro, šedá je jadérko a červeně je mitochondriální síť [související čl.- 6].

1.1.4 Náklonné série projekčních snímků řezů (ET)

Další z metod zobrazování trojrozměrné struktury je založena na trojrozměrné rekonstrukci objemu ultratenkých řezů. První pokusy využívaly zobrazování pomocí stereo páru publikované v roce 1966, které se v poměrně krátké době ukázaly jako velmi limitované. Nicméně je lze s úspěchem využít pro zorientování se ve 3D struktuře vzorku zalitého uvnitř řezu [55, 56]. Základní principy ET pomocí série náklonných snímků, kde každý snímek představuje projekční obraz řezu pod určitým úhlem vůči primárnímu svazku, byl představen De Rosierem a Klugem v roce 1968. Autoři diskutují potřebné množství projekcí v závislosti na rotační symetrii rekonstruovaného objektu. Obecně lze říci, že čím větší symetrie, tím méně je potřeba projekcí pro rekonstrukci objektu. K rekonstrukci šroubově symetrického objektu postačí jedna projekce (např. stažitelný krček T4 bakteriofágu), kdežto pro více stěn (např. dvacetistěn – viry z rodiny *tombusviridae*) je potřeba dvě a více projekcí, a pro objekty bez symetrie přibližně 30 a více projekcí.

Tyto projekce lze pak ve 3D Fourierově prostoru sečíst a zpětnou FT získáme zrekonstruovaný virtuální objekt (tomogram) [57]. Celá tato matematická operace se označuje jako zpětná projekce/rekonstrukce (BPJ). Schématické znázornění rekonstrukce viz. obrázek 5.



Obrázek 5: Schématická reprezentace 3D rekonstrukce pomocí náklonné série. (vlevo) snímání náklonné série jako soubor projekčních snímků s různým úhlem náklonu vzorku, (vpravo) zpětná rekonstrukce jako virtuální objekt a jeho vizualizace [74, 58]

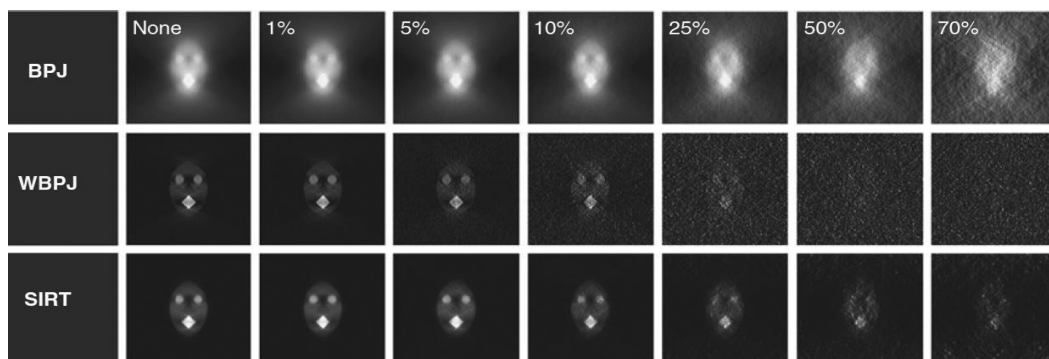
1.1.4.I Rozlišní a rekonstrukční techniky

Crowther s autory publikovali v roce 1970 článek, kde je odvozen matematický aparát zpětné rekonstrukce s faktory ovlivňující rozlišení ET. Dále odvodili rovnici (Rovnice 1.) označovanou jako Crowtherův vztah definující rozlišení ET δ [nm], které se zvyšuje s menším krokem náklonu vzorku $\Delta\alpha$ [rad], zvyšuje se s počtem projekcí N a zmenšuje s tloušťkou rekonstruovaného objektu D [nm] [59].

$$\delta = D \cdot \Delta\alpha = \frac{D \cdot \pi}{N} \quad \text{Rovnice 1}$$

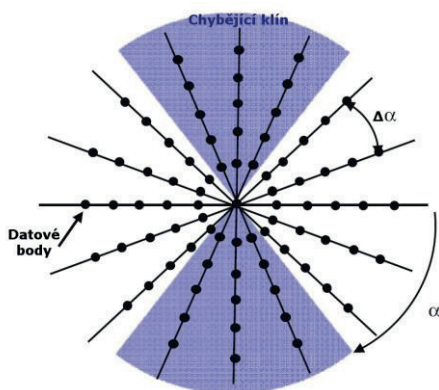
V případě použití ET k vizualizaci 3D struktury biologických objektů zalitých do pryskyřice je maximální rozlišení ET omezeno především nejmenším rozlišitelným biologickým detailem (viz. kapitola 1.1.3.II). Maximální rozlišení ET a rozlišení snímků (velikost pixelu) by mělo být úměrné velikosti biologického

detailu včetně Nyquist–Shenonova teorému [30, 31]. Základní diskuze ohledně rozlišení ET byla založena na množství vzorkovacích dat ve Fourierově prostoru a způsobu jejich interpolace do ekvidistantního Fourierova prostoru [59]. Bohužel reálná data jsou zatížena optickými vadami a různým stupněm šumu vzniklým buď během tvorby obrazu v elektron-optické části TEM, nebo při záznamu a digitalizaci. To vedlo spolu s optimalizací výpočtu k vývoji dalších rekonstrukčních algoritmů, kde vedle prosté zpětné projekce (BPJ) byla publikována v roce 1970 algebraická rekonstrukční technika (ART). ART hledá rekonstrukci objektu reprezentovaného souborem hustot jako řešení algebraických rovnic, které jsou tvořeny projekcemi [60]. V roce 1972 vznikla simultánně iterativní rekonstrukční technika (SIRT), jenž v každém iteračním kroku rekonstrukce reprezentované rovnicemi odečítá od sumy reálných projekcí sumu pseudo projekcí tvořených zrekonstruovanými hustotami objektu z předchozího kroku [61]. K základním rekonstrukčním algoritmům (BPJ, ART, SIRT) byl v roce 1984 publikován Andersenem a Kakem simultánní ART (SART), který simultánně počítá a koriguje chybu pro každý pseudo projekční svazek získaný ART rekonstrukcí [62]. Z pohledu šumu a rozlišení 3D rekonstrukce objektu byla v roce 1976 publikována práce Hegerla a Hoppeho, kteří matematicky dokázali, že 3D rekonstrukce vyžaduje stejnou integrální dávku ozáření svazkem primárních elektronů jako konvenční 2D snímek za podmínky, že hladina významnosti a rozlišení jsou identické [63]. Midgley a Weyland porovnali vliv šumu a rekonstrukční techniky BPJ, WBPJ (je varianta BPJ, ale s potlačením nízkých frekvencí [64]) a SIRT na výslednou rekonstrukci, která se liší jak pro danou techniku, tak s procentuálním množstvím šumu viz. obrázek 6 [65].



Obrázek 6: Porovnání rekonstrukčních technik v závislosti na šumu s využitím virtuálního testovacího objektu [65].

Crowtherovo rozlišení δ pro elektronovou tomografii bylo odvozeno na základě počtu projekcí N , které jsou ekvidistantní a předpokládá se náklon v rozsahu $\pm 90^\circ$, tedy v rozsahu π radiánů. Maximální úhel náklonné série je pro konvenční držák sítěk reálně omezen jeho rozměry a vzdáleností mezi pólovými nastavci obvykle na $\pm (70^\circ - 80^\circ)$. Data, která chybí do 90° se označují jako chybějící klín viz. obrázek 7 [66].



Obrázek 7: Fourierův prostor vyplněný datovými vzorky z náklonných snímků, modrý prostor vyjadřuje chybějící data díky omezení maximálního úhlu náklonu [65].

Nejzazší limit náklonu vzorku je dán střední volnou dráhou primárních elektronů při daném urychlovacím napětí [67] a geometrií vzorku, kde se dráha prodlužuje goniometrickou funkcí s úhlem náklonu. Pokud je tomografie rekonstruována z náklonné série, která není v rozsahu $\pm 90^\circ$, tak Crowtherův vztah vyjadřuje nejlepší rozlišovací schopnost tomografie, která je v laterální rovině a v kolmém směru k ose rotace. Nejhorší rozlišovací schopnost tomografie δ_z je v ose Z a je dána maximálním úhlem náklonu držáku α (Rovnice 2) [68].

$$\delta_z = \delta \cdot e = \delta \cdot \sqrt{\frac{\alpha + \sin \alpha \cdot \cos \alpha}{\alpha - \sin \alpha \cdot \cos \alpha}} \quad \text{Rovnice 2}$$

Parametr e udává natáhnutí Crowtherova rozlišení v ose Z, potažmo prodloužení veškerých objektů v tomogramu podél osy Z [69], viz. tabulka 3, kde je vyjádřeno násobné prodloužení v závislosti na maximálním úhlu náklonu α .

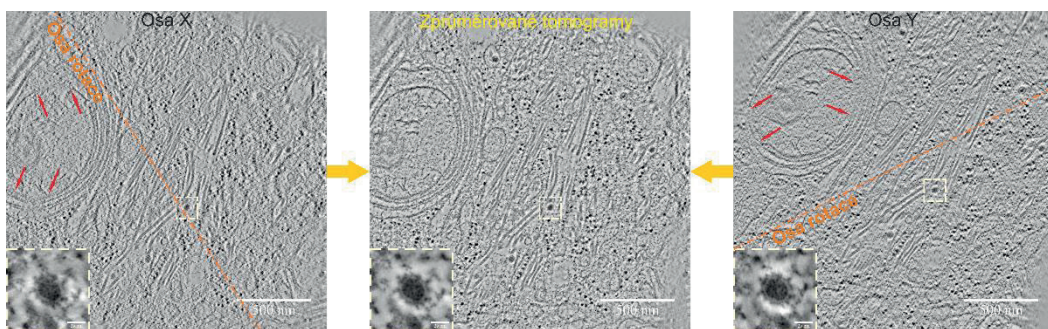
Maximální úhel náklonu α [°]	Koeficient prodloužení e
60	1,55
65	1,42
70	1,31
75	1,21
80	1,13

Tabulka 3: Prodloužení v ose Z v závislosti na max. úhlu náklonu
(vypočteno z rovnice 2) [69]

1.1.4.II Rozlišení, víceosá ET a redukce chybějících dat

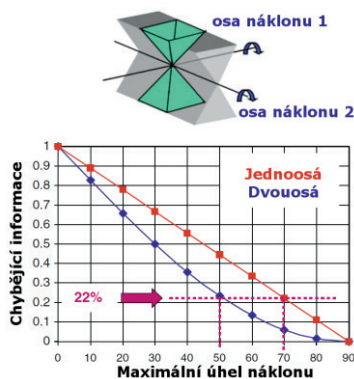
Rozlišení v ose rotace bylo empiricky změřeno v práci Mezerji et al., které se velikostně pohybuje mezi hodnotami rozlišení vypočteném pro dvě ostatní osy. Měření bylo vyhodnocováno na objektech zrekonstruovaného tomogramu [70]. Bylo dokázáno, že objekty např. membrány tvaru tenkého plátu, jejichž plocha je kolmá k ose rotace a zároveň je tato plocha sklopena v prostoru (podél osy v laterálním směru kolmé k ose rotace) v rozsahu od okolo 45° až po paralelní pozici vůči ose rotace, nejsou ve všech náklonech svojí plochou kolmo k svazku primárních elektronů. V případě tenké membrány nebude nikdy v náklonné sérii zachycena hrana takového objektu a ve zpětné projekci bude vždy zobrazena, jako rozmazaná, případně zanikne v pozadí tvořeném zalévacím médiem nebo šumem viz. obrázek 8. Tento problém byl jasně demonstrován na kruhových membránách a jeho řešení spočívá v použití dvouosé tomografie publikované poprvé v roce 1995 [71, 72].

Z této skutečnosti vyplývá, že stanovení rozlišení pro jednoosou tomografii bude vždy zatíženo touto chybou. V případě dvouosé tomografie, pak lze vyjádřit rozlišení v ose X a Y jako rovné Crowtherovu rozlišení [70] (s určitým zanedbáním). Prodloužení v ose Z je způsobeno omezením maximálního úhlu náklonu, které geometricky vymezuje tvar chybějícího klínu vyjadřující oblast bez dostupných projekčních dat



Obrázek 8: Virtuální řezy zrekonstruovaného tomogramu nervových buněk nakažených virem klíšťové encefalidity. Všechny snímky zobrazují stejný virtuální objem, krajní reprezentují jednotlivé osy dvouosého tomogramu, prostřední snímek je tvořen jejich průměrem a výsledný tomogram je orientován tak, aby respektoval reálné umístění řezu a osu rotace. Červené šipky ukazují rozmazané membrány vlivem prostorové orientace vůči ose rotace. Vsazený snímek je detail žlutě orámované oblasti obsahující vir klíšťové encefalidity [článek 1].

Tato oblast je v jednoosé tomografii podél rotační osy omezena pouze velikostí objektu, naopak při dvouosé tomografii je zmenšena a omezena maximálním úhlem náklonu. Objem dat chybějícího klínu je omezen mechanicky, jednak vzdáleností pólových nástavců (při použití korektorů vad může být mezera natolik velká, že neomezuje držák v rotaci), nebo pak velikostí držáku sítěk [73, 74, 75, 76] viz. obrázek 9.



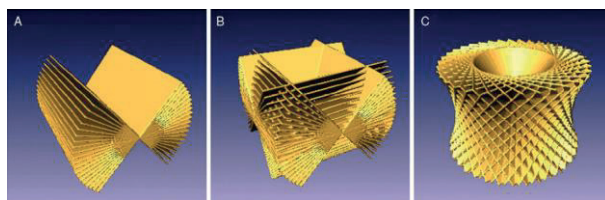
Obrázek 9: Oblast a množství chybějících dat v závislosti na počtu os rotace náklonné série [65]

V souvislosti s dvouosou tomografií byl publikován další z mnoha rozšiřujících rekonstrukčních algoritmů, kterým byl střídavý dvouosý algoritmus SIRT (ADA-SIRT). Algoritmus v první fázi zrekonstruuje objekt, stejně jako ostatní běžně používané algoritmy (viz. Mastronarde 1997 [72]). Rekonstrukce tedy probíhá pro obě náklonné série zvlášť, a zrekonstruované série

se spojí v zrekonstruovaný objekt. Poté v druhém kroku probíhá iterativní smyčka metody SIRT, v níž porovnává sudé a liché pseudo projekce vzniklé ze zrekonstruovaného objemu v předchozím kroku s aktuálně zrekonstruovanými částmi jednotlivých náklonných sérií dvouosé tomografie. Metoda ADA-SIRT vykazuje lepší rozlišení a lepší výsledky s obrazem zatíženým šumem než dvouosá tomografie metodou SIRT, a to i při celkově menším množství projekcí [77]. Pro redukci chybějícího klínu byla využita i víceosá tomografie Massauoudim et al., kteří vyvinuli softwarový modul pro imageJ a jeho variace [78, 79, 80] umožňující zpracovávat n -osé tomogramy. Metoda víceosé tomografie vykazuje jednoznačně nejlepší výsledky oproti ostatním metodám (jednoosá a dvouosá). Zajímavým závěrem zkoumání této metody je, že přináší korektní výsledky pro víceosé náklonné série již v rozsahu $\pm 45^\circ$ při šesti osé náklonné sérii. To je zajímavá aplikace pro laboratoře, které nedisponují vybavením umožňující vysoké úhly náklonu ($> 60^\circ$) [81]. N -osá tomografie neboli konická s rostoucím počtem n projekcí se přibližuje z chybějícího klínu na tvar chybějícího kužele (viz. obrázek 10) a posléze lze s čím dál menším zanedbáním vyjádřit rozlišení v rovině X, Y jako izotropní [82]. Phan et al. vyjádřili část $q(n)$ chybějících dat ve Fourierově prostoru v závislosti na zobrazovaném laterálním rozměru L , tloušťce vzorku L_z a maximálního úhlu náklonu θ_{\max} (rovnice 3). Při $\theta_{\max} = 60^\circ$ je $q(2) = 11,1 \%$, $q(4) = 9,2 \%$, $q(8) = 8,84 \%$ a $q(16) = 8,73 \%$. Z informačního a kvalitativního hlediska má n -osá tomografie smysl ve spojení se snímáním v režimu nízké dávky, který minimalizuje osvit snímaného místa využíváním okolí k seřizovacím procedurám [82]. Využívá se i stabilizace řezu před ozářením, kdy se řez zpočátku ztenčuje rychleji a poté ztenčování výrazně pomalejší [83, 84].

$$q_{(n)} = \frac{n}{6} \tan\left(\frac{\pi}{2n}\right) \cdot \left(\frac{L_z}{L} \cdot \frac{1}{\tan \theta_{\max}}\right) \quad \text{Rovnice 3}$$

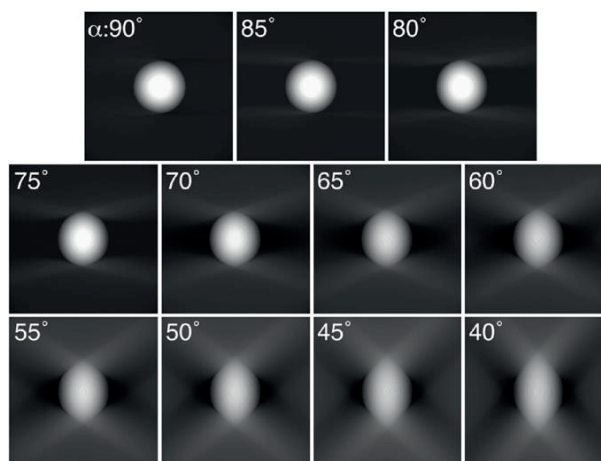
Mimo snahy vyplnit chybějící klín reálnými daty byla snaha aproximace těchto chybějících informací na základě např. množin konvexních projekcí [85, 86], maximalizace entropie [87] či s využitím sekvenční statistické rekonstrukce odhadující během rekonstrukce míru vlivu chybějícího klínu [88].



Obrázek 10: Grafické znázornění oblastí chybějících dat tomografie
A) jednoosá B) dvouosá C) konická [83].

1.1.4.III ET v plném rozsahu náklonu

Další redukce chybějícího klínu logicky vedla k tomografii v plném rozsahu náklonu tedy 180° neboli $\pm 90^\circ$. V roce 1992 Barnard et al. upevnili do speciálně upraveného držáku mikropipetu s napařeným uhlíkem na jejím povrchu, na který se přichytily spory pýchavky. K tomografii využili TEM vybavený stolkem umožňující rotaci v rozsahu $\pm 90^\circ$ využívající vysoké urychlovací napětí (HVTEM) 1 MV, které bylo dostatečné k penetraci elektronů stěnami mikropipety spolu s objemem spory tak, aby bylo možné elektron optické zobrazování. Autoři byli schopni zrekonstruovat spory bez prodloužení v ose Z s využitím jednoosé tomografie. Zajímavým výsledkem bylo, že tomografie $\pm 80^\circ$ téměř nejevila deformaci zrekonstruovaných objektů způsobenou chybějícími daty [89] (viz. obrázek 11 simulace na sférické částici, která koreluje s reálnými daty [94]), protože těchto parametrů lze dosáhnout s použitím současných komerčních držáků pro vysoké náklony [74, 75, 76] s řezy umístěnými na elektron mikroskopických sítkách.



Obrázek 11: Simulace X-Z virtuálního řezu zrekonstruovaného tomogramu skrze sférickou částici v závislosti na maximálním úhlu náklonu α [94].

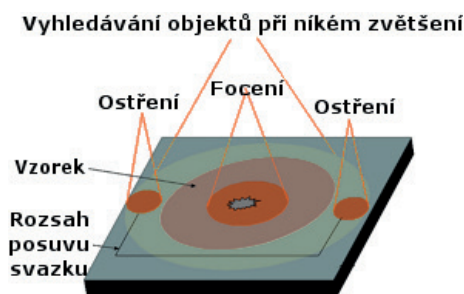
Kaneka et al. využívají kopolymerový blok zkrojený do tvaru hranolu o velikosti hrany 200 nm spolu s řezy tloušťky 200 nm, které porovnávají s využitím jednoosé tomografie v rozsahu od $\pm 10^\circ$, $\pm 20^\circ$ po $\pm 60^\circ$ a pro hranol navíc $\pm 70^\circ$. Prodloužení analyzují na nanočásticích, které používají jako zaměřovací značky. Poprvé byly nanočástice použity v roce 1984 Berrimanem et al. ke změření tloušťky řezu a napařeného uhlíku pomocí náklonné série (bez použití tomografie) [90]. Pro účely tomografie v roce 1990 otestovali Jing a Sachs funkčnost algoritmů zarovnání projekčních snímků metodou nejmenších čtverců pomocí detekce těžiště zaměřovacích značek [91], a aplikace nanočástic jako zaměřovacích značek byla publikována Lawrenceem v roce 1992 [92]. Kaneka et al. změřili, že prodloužení v ose Z u hranolu koreluje s Crowtherovo vztahem [59], ale tomografie z řezu vykazuje větší prodloužení, které vysvětlují prodloužením dráhy uvnitř řezu se zvyšujícím se úhlem náklonu neboli efektivní tloušťkou [93]. Kawase et al. publikovali v roce 2007 práci, kde použili FIB k vytvoření válcového tvaru vzorku o průměru 150 nm a byli tak schopni nasnímat tomografii v rozsahu $\pm 90^\circ$ bez artefaktů způsobených prodloužením [94]. Na tuto práci navázali Kato et al., kteří zkoumali možnosti maximálního průměru válcového vzorku (ZrO_2 /polymer nanokompozit), který lze ještě zobrazit pomocí tomografie při 200 a 300 kV a v jednom případě při 1250 kV [95]. Xu et al. vyvinuli a publikovali v roce 2008 piezo elektricky ovládaný držák vzorku umožňující translační pohyb ve všech směrech, a především rotaci kolem své osy v plném rozsahu 360° . Držák byl vyvinut pro TEM firmy JEOL používající držáky s průměrem ~ 15 mm [74]. Také je lze jednoduše použít v TEM, i když není vybaven tomografickým stolcem [95]. Tomografie v rozsahu $\pm 90^\circ$ s využitím válcového vzorku byla dále vylepšena o automatické korekce posuvu vzorku při náklonné sérii. Program využívá k detekci posuvu křížové korelace, kterým předchází příprava jednotlivých obrázků pomocí filtru propouštějícího nízké frekvence [97] a Sobelova filtru detekující hrany [98][99].

1.1.4.IV Automatizace snímání náklonných snímků

Na vývoji tomografie v přechodí části lze pozorovat jasné směřování k plně automatizovanému procesu, které je podpořeno, především od 90 let, rapidním rozvojem elektroniky a výpočetní techniky. Koster et al. v roce 1987 publikovali teoretickou práci zaměřenou na možnost automatizace elektronové tomografie, zabývali se matematicko-fyzikálním aparátem automatického ostření a měření

posunutí obrazu [100]. Na tuto práci navázali technicky zaměřené práce s implementací předchozích principů do praxe včetně technických podrobností [101, 102]. Další z navazujících prací je zaměřena na implementaci automatické tomografie pro snímání biologických objektů/preparátů zalitých do ledu (kryo preparáty) vysoce citlivých na radiační poškození (viz. obrázek 12). Automatizace umožňuje použití systému snímání při nízkých dávkách, které se provádí vychýlením svazku do [103]:

- 1) Místa pro hrubé určení translačního posunu obrazu po naklonění.
- 2) Místa pro automatické zaostření.
- 3) Snímaného místa pro jemné určení posunu obrazu a finální snímání.



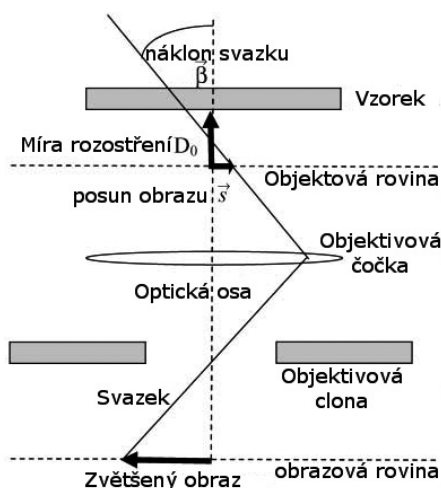
Obrázek 12: Princip snímání při nízkých dávkách využívající posuvu svazku k minimalizaci osvitů focené oblasti [103].

Technika snímání při nízkých dávkách byla implementována spolu s automatickým snímáním i pro zobrazení vzorku při pokojových teplotách. Tkáň krejčovského svalu žáby byla připravena metodou zmrazení za vysokého tlaku (HPF) a následně zalita do epoxidové pryskyřice. Snímání tomogramu v rozsahu $\pm 60^\circ$ trvalo okolo 5 hodin [104]. Snímání a zpracování tomogramu má některé společné úlohy, na které je aplikována automatizace. Jedná se o korekci posuvu obrazu, kdy při snímání se porovnávají dvojice snímků vůči sobě, kdežto u zpracování tomogramu je nutné zarovnat snímky na sebe tak, aby rotovaly kolem osy. Tuto úlohu lze řešit již zmíněným způsobem, tedy pomocí zaměřovacích značek, nejčastěji ve formě nanočástic. Další možností je porovnávání jednotlivých náklonných snímků vůči sobě pomocí křížových korelací [105], anebo využití principu společných linií [106], které jsou neměnné pro libovolné dvě projekce, obvykle představují osu rotace ve Fourierově prostoru. V roce 1996 se pak objevuje první software umožňující snímání i zpracování

tomogramu [107]. Další urychlení tomografie přinesl algoritmus využívající měření posuvu obrazu před samotným snímáním projekčních snímků, na jejichž základě koriguje zaostření a posuv obrazu. Metoda přinesla zrychlení až na 20 minut pro nasnímání 151 projekcí [108]. V roce 2003 Ziese et al. prokázal, že automatické měření zaostření, tak jak jej navrhli Koster et al. [100], není přesné pro větší úhel náklonu. Měření využívá dva snímky, kdy jeden je bez naklonění svazku a druhý s určitým náklonem β , pak lze z posuvu \vec{s} podle rovnice 4 vypočítat míru rozostření D (viz. obrázek 13).

$$\vec{s} = D \cdot \tan(\vec{\beta})$$

Rovnice 4



Obrázek 13: Schématický diagram znázorňující vliv přeostrění D_0 a náklonu svazku β na posuv obrazu s [109].

Pro větší úhly náklonu se projeví naklonění svazku protažením nebo stažením objektů v obraze, dle toho, jestli bude náklon svazku kladný nebo záporný viz. obrázek 14. Zobrazení vzorku s rozostřením D je závislé na pozici objektu x v obraze a úhlu náklonu vzorku α (rovnice 5).

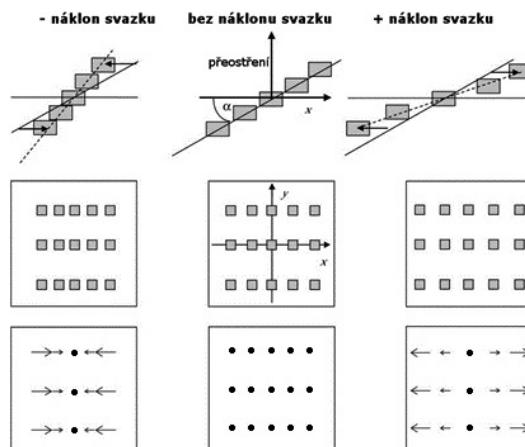
$$D = x \cdot \tan(\alpha)$$

Rovnice 5

Spojením rovnice 4 a rovnice 5 dostaneme rovnice 6 podle, které program správně vyhodnotí míru rozostření i při vyšších úhlech náklonu vzorku [109].

$$\vec{s} = x \cdot \tan(\alpha) \cdot \tan(\vec{\beta})$$

Rovnice 6



Obrázek 14: Změna pozice objektů v obraze vlivem naklonění vzorku α a svazku β . Horní řádek ukazuje pozice objektů v rovině X-Z a prostřední v rovině X-Y. Spodní řádek ukazuje indikovaný posun objektů s náklonem a bez náklonu svazku [109].

1.1.4.V ET software a spojování tomogramů

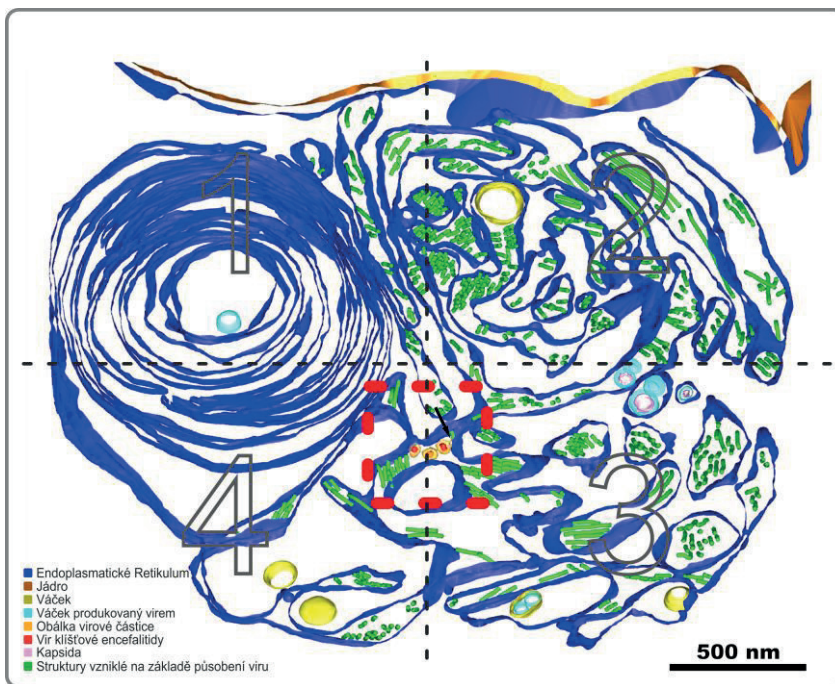
V roce 2005 publikoval D. Mastronarde článek v němž představuje program SerialEM, určený pro elektronovou tomografii, který se stal světově jedním z nejpoužívanějších. SerialEM umožňuje snímání jednoosé i dvouosé tomografie, snímání v konvenčním TEM režimu i v STEM režimu, použití filtrace elektronů (filtr propouštějící elektrony ve zvoleném energiovém rozsahu), snímání sériových snímků i tomogramů, snímání montáží (spojování snímků v laterální ose) [110] i v režimu tomografie, dále podporuje systém snímání s nízkou dávkou a využívá křížové korelace, automatickou korekci zaostření, kontrolu intenzity svazku primárních elektronů, predikci posuvu vzorku po naklonění i v ose Z. Program je vybaven navigátorem, který umožňuje zadat více míst pro automatické snímání náklonných sérií [111]. Nasnímaná data lze zpracovat v IMODu (dříve zmíněný od stejného autora) [24] – oba programy se vzájemně doplňují. Program IMOD Mastronarde rozšířil v roce 2008 o korekci natažení obrazu způsobenou nekolmostí svazku vůči ose rotace [112]. Tento problém definovali Díez et al [113] a nezávisle na něm poskytli metodiku řešení Levine et al. [114]. Dále Mastronarde a Held v roce 2017 doplnili mechanismus automatického zpracování náklonné série až do finálního tomogramu pomocí skriptu [115], zde je nutné z vlastní zkušenosti dodat, že tato automatika selhává pro např. silně zašuměné náklonné série, popř. nějakým způsobem defektní data. Oba programy jsou neustále vyvíjeny a

doplňovány o nové funkce [116, 117]. Dalším programem umožňující zpracování tomogramů a jejich montáže v laterální rovině je TxBR, který navíc zahrnuje možnosti zpracování n -osých tomogramů [118]. Spojování tomogramů v laterální rovině lze dělat třemi způsoby:

- 1) Před zpětnou projekcí jako montáže jednotlivých náklonných snímků. To vyžaduje snímání map 2×2 (viz. obrázek 15), 3×3 , atd. pro daný uhel náklonu, plocha je omezena maximálním možným posunem svazku [119].
- 2) Po zpětné projekci jako standardní náklonnou sérii jako super-montáže. Vyžaduje náročnější zpracování 3D korelace objemů, teoreticky plocha není omezena, prakticky je omezena výpočetními možnostmi a fyzickými rozměry řezů [119].

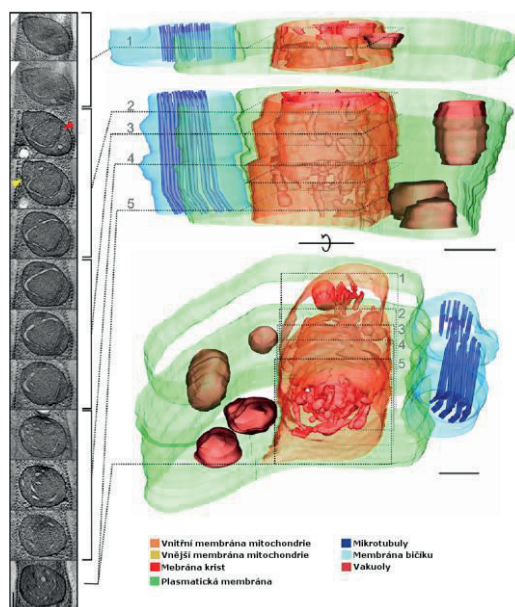
Postupy 1) a 2) lze vzájemně kombinovat [119].

- 3) V průběhu zpětné projekce, kde se zpracovávají všechny projekční snímky najednou. Omezení velikosti je stejné jako předchozí, ale výpočetně je náročnější, protože se pracuje se všemi snímky [118].



Obrázek 15: 3D model zrekonstruovaného tomogramu nervových buněk napadených virem klíšové encefalitidy. Náklonná série byla snímána jako mapa 2×2 [Bílý, Vancová: Článek 2]

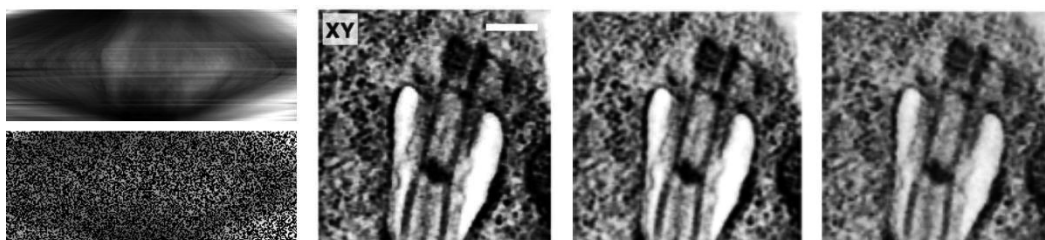
Spojování tomogramů v ose Z se provádí na zrekonstruovaných tomogramech (viz. obrázek 16). Jedná se o paralelu k sériovým řezům a projevují se zde stejné problémy jako je natažení řezů, zvlnění řezů, ztráta materiálu z krájených povrchů atd. Tyto artefakty způsobené krájením znesnadňují automatické korelace 3D objemů, což vedlo k různým řešením, jak sériové tomogramy vzájemně napojit. IMOD využívá poloautomatické křížové korelace konce a začátku řezů s možnostmi natáhnutí v libovolném směru laterální roviny a zvětšování. Ruční jemná korekce vykazuje lepší výsledky [120]. Tyto postupy lze aplikovat na korelování sériových tomogramů s využitím například buněčných stěn nebo výrazných organel rozměrově zasahujících do více řezů [121], případně aktinových vláken, tubulů, či obecně trubkových/vláknových struktur, které lze poměrně snadno identifikovat, a mnohdy procházejí přes několik řezů [122, 123, 124, související čl.- 5]. Plně automatické trasování tubulárních vláken a napojování tomogramů naprogramovali a publikovali Weber et al. v roce 2014 [125]. Komerční programy mají funkci trasování trubkových/vláknových struktur obvykle implementovanou vlastním řešením (např. Amira, Imaris [75, 126]).



Obrázek 16: 3D model části *Trypanosoma brucei* zrekonstruované ze sériových tomogramů – byl zde ovlivněn multiproteinový komplex zajišťující mitochondriální kontaktní místa a organizaci krist v mitochondrii (MICOS). V levé části jsou virtuální řezy z tomogramů reprezentující jednotlivé řezy značené 1–5 (mezi řezy 1 a 2 došlo ke ztrátě jednoho řezu). Měřítka reprezentují 200 μm [související čl.- 5].

1.1.4.VI ET při STEM režimu v TEM a SEM

Náklonné série v TEM jsou standardně snímány při průměru svazku, kterým se ozařuje pozorovaná oblast. Naproti tomu lze svazek primárních elektronů zaostřit do bodu, v kterém při jejich průchodu bude docházet k rozptylu elektronů do prostorových úhlů v závislosti na typu rozptylu (pružný nebo nepružný). Skenovacím způsobem pak lze vytvořit obraz skenované oblasti. Detekce signálu se provádí segmentovým detektorem detekujícím počet dopadlých elektronů na jednotlivé segmenty, které reprezentují určitý rozsah úhlů. Obraz odpovídající TEM amplitudovému kontrastu vzniká pro každý bod v obraze vyčítáním signálu z oblasti detektoru pro světlé pole. Začátky ET v STEM byly založeny, na základě fyzikálního principu metody s materiálními vzorky, kdy v roce 2001 Koguchi et al. zobrazili pomocí STEM v 3D ZnO nano-částice [127]. V roce 2002 využili Midgley a Weyland v STEM režimu elektrony rozptýlené do velkých úhlů k 3D zobrazování objektů v kontrastu závislém na atomovém čísle (HAADF) a navíc aplikovali energiovou filtraci elektronů (EFTEM) [128]. Pro biologické vzorky použili STEM režim Yakushevskaja et al. v roce 2007 a porovnávali struktury (např. membrány) ve výsledném tomogramu s předlohou, přičemž získali procentuálně vyšší schodu ET v STEM oproti ET v TEM [129]. Výhoda STEM režimu tedy spočívá v lepším poměru signál-šum, dále ve vyšším rozlišení, které je úměrné dosažitelné velikosti zaostřené stopy [130] a možnosti tomografie tlustších vzorků (> 500 nm) než pro standardní ET v režimu TEM, což bylo v první fázi teoreticky nasimulováno metodou Monte Carlo [131]. Prakticky byla zobrazena mikrometrová vrstva nanokompozitu [132] nebo řezy pankreatických buněk o tloušťce jednoho mikrometru [133]. Bohužel metoda STEM způsobuje extrémní radiační poškození, především biologického vzorku. Za účelem snížení dávky byl vyvinut systém náhodného snímání bodů tomogramu (namísto skenování celé plochy snímku) s redukcí dat-bodů (např. 50 %), kdy metoda spolu s upraveným algoritmem rekonstrukce dosahuje podobných výsledků jako rekonstrukce plnohodnotného tomogramu, metoda byla aplikována na kryo vzorky viz. obrázek 19 [134, 135]. Dahmen et al. publikovali netradiční řešení STEM tomografie kombinované s víceosým snímáním a proostřováním v ose Z, kde nasnímaná data rekonstruuje iterativní algebraickou rekonstrukční technikou pro náklonné a přeostřované série (TF-ART) [136]. Softwarová aplikace TF-ART je pak ve formě rozšiřujícího modulu „Attention“ do IMOD software [137, 138].



Obrázek 17: ET v režimu STEM s náhodným skenováním. Levé dva obrázky reprezentují: horní standardní tomogram, spodní náhodně skenovaný tomogram (X-osa: koordináty projekční roviny, Y-osa: úhel náklonu). Další zleva X-Y virtuální řez zrekonstruovaného tomogramu: Standardní snímání (měřítko 500 nm), náhodně snímané plochy 50 % a 20 % [134].

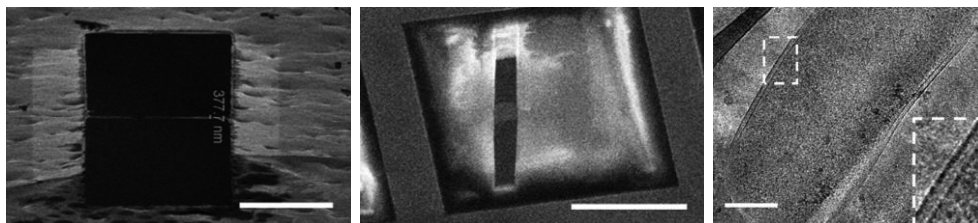
STEM metoda byla aplikována také v SEM, zde jsou však výrazná omezení vyplývající z nízké energie svazku primárních elektronů a z možností náklonu držáku síťky uvnitř SEM [139].

1.1.4.VII Kryo ET a její limity

Nativní vzorky zmražené v amorfním ledu vykazují minimální omezení biologického detailu, který lze zkoumat až na úroveň atomárního rozlišení. Hlavním omezením rozlišitelného detailu biologického vzorku je kvalita zamražení. V roce 1981 Jacques Dubochet publikoval metodu zmražení prudkým ponořením do tekutého propanu nebo etanu [140], která se stala standardem pro mražení biologického materiálu ve formě suspenze (V roce 2017 za vývoj této metody Jacques Dubochet obdržel jako jeden ze tří laureátů Nobelovu cenu za chemii [2]). Tloušťka kvalitně zamražené suspenze v tekutém dusíku se pohybuje okolo 100 nm [141]. Zamražení v tekutém ethanu nebo propanu je spolehlivé až do tloušťky okolo 1 μm [142]. Důvodem je, že oproti nim tekutý dusík přijímá přibližně poloviční množství výparného tepla a tyto plyny mají větší rozsah teplot pro kapalnou fázi (N: tání $-210\text{ }^\circ\text{C}$, varu $-195,8\text{ }^\circ\text{C}$, Etan: tání $-182,8\text{ }^\circ\text{C}$, varu $-89\text{ }^\circ\text{C}$ | Propan: tání $-188\text{ }^\circ\text{C}$, varu $-42\text{ }^\circ\text{C}$). Vzorky až do velikosti okolo 100 – 300 μm lze zmrazit pomocí HPF [143, 144]. ET je možné snímat, buď přímo ze zmražených vzorků s vhodnou maximální tloušťkou, nebo jako jsou např. makromolekuly [145], organely [146] a celé prokaryotické buňky [147], savčí buňky – pouze tloušťka jejího okraje umožnila děláni tomografie [148], nebo lze snímat ultratenké kryo-řezy [149], které podléhají ve větší míře tvorbě artefaktů (praskliny, komprese, stopy nože) než vzorky krájené z pryskyřicových bločků [150]. Zde je nutné zmínit, že termínem kryo-řezy se také označují i řezy připravené pro metodu

imunolokalizace podle Tokuyasu krájené za kryo-podmínek (přibližně v rozsahu $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$). Takovýto vzorek je lehce předfixován, infiltrován sacharózou a zamražen. Povrchy řezů mají odhalené a nepoškozené antigeny, díky tomu je možné s vysokou účinností je imunoznačit, oproti zalitým vzorkům, poté kontrastovat a prohlížet při pokojové teplotě [151, 152, 153]. Tokuyasu řezy je výhodné kombinovat s ET, která umožní přesnou lokalizaci nanočástic k vazebným místům, jako v případě detekce aktinových vláken zprostředkujících pohyb výtrusanky (A. Hartigan, ..., M. Vancová, T. Bílý et al.) [související čl.- 4, související čl.- 5].

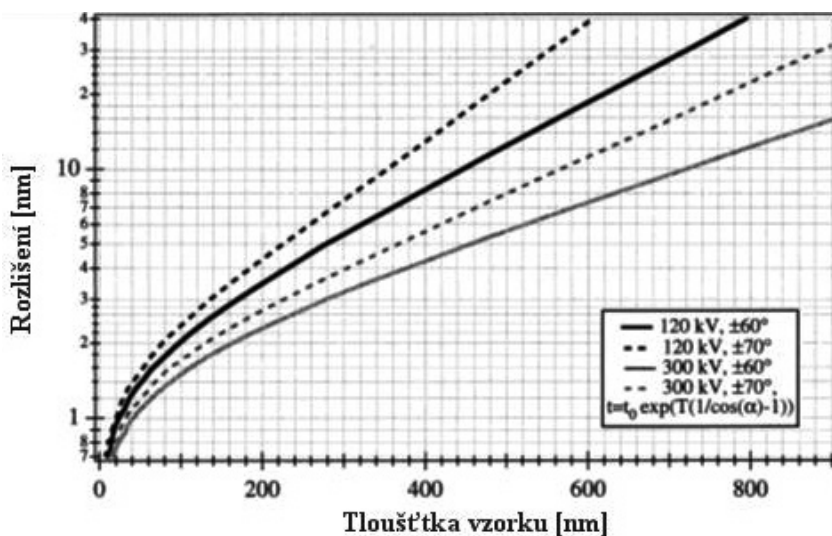
V roce 2006 Marko et al. demonstrovali možnost frézování vitrifikované vody bez známek rekrystalizace pomocí zaostřeného iontového svazku v SEM (FIB SEM) [154] a v následujícím roce tento postup využili k přípravě vzorku pro ET (pomocí FIB SEM ztenčili buňku bakterie *Escherichia coli* ve vitrifikovaném ledu na tloušťku použitelnou pro kryo ET) viz. obrázek 18 [155, 156].



Obrázek 18: Příprava lamely pro TEM z kryo zmrzaženého vzorku *E. coli* frézovaného iontovým svazkem. Levý: vertikální pohled na lamelu (měřítko $10\text{ }\mu\text{m}$). Prostřední: pohled na lamelu pod náklonem (měřítko $50\text{ }\mu\text{m}$). Pravý: TEM cryo náhled při nízké dávce (čárkovaná oblast je zvětšená, měřítko 300 nm) [156].

ET z kryo-řezů prohlížených při kryo-teplotách není náročná pouze z hlediska krájení řezů, ale i samotného snímání z důvodu omezené kumulativní dávky ozáření elektronovým svazkem, která se pohybuje podle typu vzorku a stability ledu mezi 2500 až 15000 elektrony na nanometr čtvereční [158]. Kumulativní dávka spolu s tloušťkou vzorku a energií primárních elektronů určuje rozlišení ET (obrázek 19). Tento graf byl sestaven pro kumulativní dávku 6000 elektronů na nanometr čtvereční a dávku pět elektronů na jeden pixel. CCD čipu kamery (zařízení s vázanými náboji [157]). Dle zkušeností autorů se jedná o nižší hodnota v použitelném rozsahu kamery. Expoziční čas t byl přepočítán z

expoziční doby t_0 odpovídající nulovému úhlu náklonu vzorku α a tloušťce vzorku T [159].



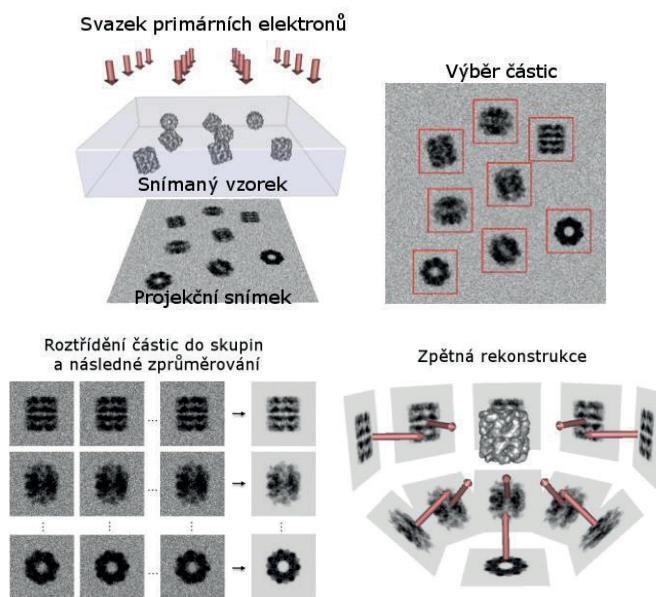
Obrázek 19: Rozlišení tomografie v závislosti na tloušťce vzorku pro dané urychlovací napětí a maximální úhel náklonu [159]

Zlepšení rozlišení ET je také možné dosáhnout průměrováním částí objemů tomogramů obsahující tvarově identické objekty (např. Pfeffer et al. řešili 3D strukturu ribozomu asociovaného k membráně endoplazmatického retikula pomocí průměrování sub-tomogramů reprezentujících objem jednotlivých ribozomů [160]). Zároveň je možné zcela vykompenzovat efekt chybějícího klínu a zlepši se odstup signál-šum. Průměrování je možné aplikovat, jak pro vzorky prohlížené za pokojové teploty [161], tak pro kryo-vzorky [162, 163]. V kryo-elektronové mikroskopii biologických vzorků se standardně využívá kompenzace přenosové funkce kontrastu (CTF) [164] pro korekci 2D snímků s podostřením větším než 1 μm , kterým se dosahuje zvýšení kontrastu zmražených hydratovaných vzorků – obvykle bez jakýchkoli přísady kontrastujících činidel [165]. V roce 2017 byl publikován Turoňovou et al. článek s aplikací 3D CTF korekce, která umožnila dosáhnout rozlišení ET 0,34 nm u zprůměrovaných objemů tomogramů [166]. V tomto článku byl ke snímání projekčního obrazu použit místo CCD čipu přímý detektor elektronů, který umožňuje mnohem efektivněji využít kumulativní dávku pro snímání náklonné série. Obrázek 19 znázorňuje graf detekční kvantové účinnosti (DQE) pro různé typy detektorů obrazu tvořeného elektrony. CCD čip v porovnání s přímým detektorem vykazuje mnohonásobně vyšší kvantovou účinnost. Obecně lze porovnat jednotlivé

detektory v závislosti na publikovaném maximálním rozlišení pro jednočásticovou analýzu: s CCD detektory bylo dosaženo rozlišení 10 – 25 Å, <7 Å s filmy a s pomocí přímých detektorů <5 Å [167]. Obrovská výhoda přímých kamer oproti CCD kamerám je v počtu snímků za sekundu (fps). Přímé kamery jsou schopny až 400 – 1500 fps, kdežto CCD kamery v řádů desítek fps (např. Gatan OneView Camera ~ 25 fps). Pokud je použit binning (sdružování pixelů dohromady např. 2×2 nebo 3×3), pak rychlost může být vyšší (např. Gatan OneView Camera ~ 300 fps při binningu 8), ale za cenu dramatického snížení rozlišení. Díky těmto rychlostem přímých kamer je možné kompenzovat drift vzorku, který je neustále přítomný [76].

1.1.5 Metoda jednočásticové analýzy (SPA)

Metoda SPA je založena na projekčních snímcích jednotlivých částic, které mají v ideálním případě všechny stejný tvar. Díky čemuž je možné z mnoha snímků (obvykle desetitisíce až statisíce) jednotlivých částic různě orientovaných v prostoru (jedná se o rotace kolem osy β a γ – osy paralelní k rovině řezu) nalézt skupiny stejně orientovaných objektů a jejich projekčních snímků (tzv. charakteristické pohledy), neboli třídy (s libovolnou pozicí v X, Y a rotací kolem osy α – osa kolmá k rovině řezu), které lze po nalezení vzájemného překrytí zprůměrovat a zlepšit tak rozlišení [168, 169, 170]. Poté je možné aplikovat rekonstrukční algoritmus, podobně jako v ET [57, 59] (viz. obrázek 20). Vylepšení algoritmu zarovnání částic tak, aby se vzájemně překrývaly, bylo spojeno s porovnáváním vůči re-projekci zrekonstruovaného objektu jako reference – multi referenční zarovnání (MRA) [171]. Pomocí angulární rekonstrukční techniky je možné určit směr dané projekce částice bez znalosti její orientace v prostoru [172, 173]. Tato technika se zakládá na již zmíněném principu společných linií [106]. Oproti snímání jednotlivých náhodně orientovaných částic byla použita i technika náklonných sérií v kombinaci se SPA [174, 175], tato technika ale oproti snímání v nulovém náklonu vyžaduje korekce po naklonění vzorku, díky čemuž dochází ke ztrátám v rozlišení [176].



Obrázek 20: Princip metody jednočásticové analýzy. 1) Snímání, 2) Výběr částic 3) Roztřídění částic a průměrování vrámci skupin 4) Zpětná rekonstrukce 3D objemu [177]

1.1.5.I Rozlišení SPA

Pozorování negativně kontrastovaných vzorků ovlivňuje distribuce těžkých atomů, jejich granularitu a v režimu prohlížení při pokojové teplotě i jejich dehydrataci, která může vést až k zploštění vzorku. Výsledné rozlišení lze očekávat nejlépe mezi 1 a 2 nm [178, 179, 180]. Při použití negativního kontrastu spolu s pozorováním vzorku ve vitrifikovaném ledu se rozlišení pohybuje okolo hranice 1 nm [176, 180]. U nekontrastovaných kryo vzorků je nejmenší biologický detail určen pouze jeho molekulární strukturou, podobně jako v ET. Pro pozorování zamražených vzorků byla vyvinuta již zmíněná příprava vzorku prudkým ponořením [141] a zároveň bylo nutné vzorky udržovat během prohlížení při kryo teplotách (~ -135 °C [181]) a je nutná antikontaminační past chlazená dusíkem, aby nedocházelo k depozici molekul na vzorku [142, 182]. Rozsah celkové dávky jednotlivých částic ozářených svazkem primárních elektronů je relativně široký, nejběžněji užívané $1000-3000 \text{ e}^- \text{nm}^{-2}$, až po dávky okolo $10000 \text{ e}^- \text{nm}^{-2}$ [183]. Co se týče rozlišení SPA, tak stejně jako v EM byl obrovský skok s nasazením přímých kamer a dnes se maximální rozlišení dostalo pod hranici 0,2 nm (0,18 nm pro glutamát dehydrogenázu GDH-336 kDa). Velmi podstatný je však fakt, že konformace proteinů v kryo SPA zůstává nezměněna oproti rentgenové difrakci zkrystalizovaných proteinů [184].

Za vývoj kryo elektronové mikroskopie pro určení struktury biomolekul v roztoku při vysokém rozlišení obdrželi v roce 2017 spolu s již zmíněným Jacques Dubochetem Nobelovu cenu za chemii také dva, v této kapitole citovaní laureáti: Joachim Frank a Richard Henderson [2].

1.1.6 Korelativní mikroskopie a elektronová tomografie

Korelování dat mezi různými mikroskopickými/zobrazovacími technikami a elektron-mikroskopickými 3D rekonstrukčními technikami umožňuje vzájemné propojení informací o vzorku dosažitelné jednotlivými technikami. Jedná se o velice široké téma, kdy je možné vzájemně korelovat nejrůznější techniky, proto zde budou zmíněny pouze některé.

Nejčastěji korelovanými technikami jsou SPA proteinových struktur v 2D [185] nebo v 3D a rentgenová difrakce zkrystalizovaných proteinů, respektive jejich trojrozměrný model, který lze dle velikosti určit i pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR) [186].

ET pomocí náklonných snímků z řezů ze vzorků zalitých v pryskyřici lze zobrazit objekty tvořené proteinovými strukturami navázané uvnitř tkání nebo buněk a tyto data korelovat s proteinovou strukturou získanou SPA nebo/a rentgenovou difrakcí [187]. Vávra, Bílý, Nebesářová et al. jako první použili korelace ultrastruktury řezů pomocí ET a mikroskopie atomárních sil (AFM). Poukázali na disproporce v zobrazení ET související s krájením a kontrastováním řezů. Při krájení řezů ze střeva dafnie obsahujícího virové částice cytoplasmatického polyhedrozního viru, které bylo zalité do pryskyřice, docházelo k vypadávání virových částic z povrchu řezů. V kroku kontrastování se tyto díry zaplnily kontrastujícím činidlem. V ET „nakontrastované“ díry vykazují podobnou strukturu jako reálné virové částice. Dále pozorovali, že docházelo k většímu záhytu kontrastujícího činidla u virových částic, které byly v kontaktu s krystalem [Kapitola 7], jehož původ je spojen s působením viru [188] a také u částic, které byly proříznuty při krájení [Kapitola 7].

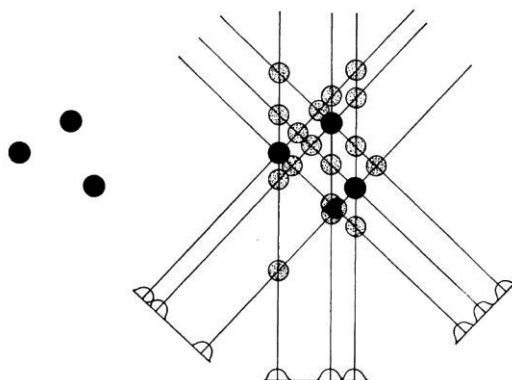
Další korelativní mikroskopické techniky jsou spojeny se světelnou mikroskopií a pozorováním živých buněk, které jsou následně prohlíženy v EM s využitím různých technik ET. K pozorování buněk v živém stavu lze využít např. světelný, fluorescenční nebo konfokální mikroskop. Buňky lze pozorovat ve světelném mikroskopu i za kryo režimu. V dalším kroku je možné buňky po pozorování světelnou mikroskopií zpracovat tak, aby je bylo možné prohlížet

v EM. Jednou možností je prohlížení buněk při pokojové teplotě zalité do pryskyřice, druhou možností je prohlížet je ve zmraženém stavu v režimu kryo. Zásadní je vyhledat a pozorovat stejné místo v obou typech mikroskopií, např. je možnost softwarově vzájemně korelovat stejné objekty a jejich rozložení (tvar buněk a jejich rozmístění, bodové značky (nanočástice) atd.). Další možností je hledat objekty podle pozice v prostoru, kterou lze určit např. pozicí držáku pomocí značených sítěk, značené podložky obtisknuté do pryskyřice, anebo pomocí laserem vypálenými značkami [189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196].

1.2 ET Z NÁKLONNÉ SÉRIE ZA POKOJOVÉ TEPLoty

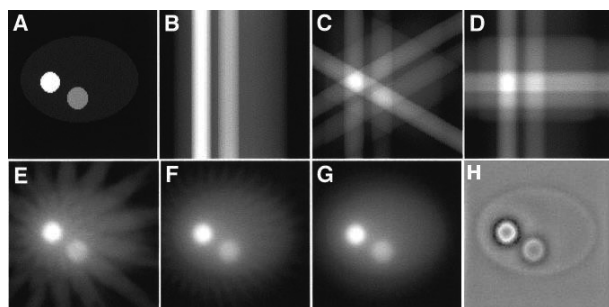
1.2.1 Zpětná rekonstrukce

Základní princip zpětné rekonstrukce (BPJ) byl popsán v části 1.1.4, grafické znázornění algoritmu zpětné rekonstrukce je viz. obrázek 21, kde ze tří projekcí vycházejí (zpětně) projekční svazky, které se v místě protnutí složí v zrekonstruované objekty. Jsou zde vidět i objekty se slabším kontrastem tvořené menším počtem protínajících se projekčních svazků nebo s těsným přiblížením všech tří projekčních svazků bez ideálního protnutí, které vytvářejí nereálné objekty a zvyšují intenzitu pozadí. Takovéto pozadí je charakterizované nižšími obrazovými frekvencemi, jejich korekce se řeší filtrem potlačujícím nízké frekvence (WBPJ).



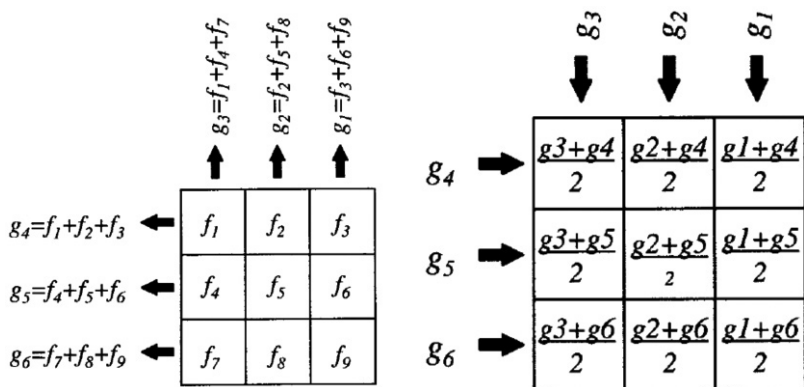
Obrázek 21: Grafické znázornění principu zpětné projekce. V levé části je zrekonstruovaný objekt a v pravé části jeho rekonstrukce ze tří projekcí [59].

Princip zpětné rekonstrukce (viz. obrázek 22) je opět vidět na obrázku A, kde je zobrazen rekonstruovaný objekt a B–D vyobrazují jeho rekonstrukce ze zvětšujícího se počtu projekčních snímků. Především pro nižší počet projekčních snímků je opět patrné výrazné pozadí. Aplikace WBPJ je patrná na snímku H viz. obrázek 22.



Obrázek 22: Objekty rekonstruované z projekcí. A) originální objekt, B–G rekonstrukce z jeho projekcí (počet projekcí: 1, 3, 4, 16, 32 a 64), H filtrovaná rekonstrukce z obrazu G [199].

Matematické řešení BPJ vychází z i -tých projekčních dat g_i (úměrná počtu nerozptýlených elektronů) zachycených na jednom pixelu kamery, které jsou součtem i -tých denzit f_i reprezentujících jednotlivé body objektu (denzity představují množství nerozptýlených elektronů v daném objemu), kterými prochází jeden pomyslný projekční svazek primárních elektronů. BPJ se pak počítá jako suma projekčních dat g_i procházející rekonstruovaným f_i bodem děleno počtem náklonných projekcí neboli každý bod reprezentuje průměrnou hodnotu jim prošlých pomyslných projekčních svazků viz. obrázek 23.



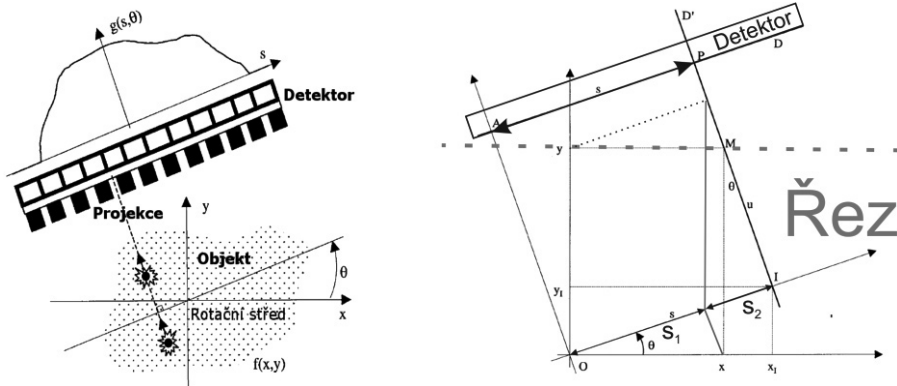
Obrázek 23: Princip BPJ. Levý obrázek reprezentuje projekční data g_i daná denzitami vzorku f_i a pravý obrázek reprezentuje rekonstruovaný objekt [199].

Takto zrekonstruované objekty budou vykazovat vyšší intenzitu nízkých frekvencí, které lze potlačit filtrem (WBPJ).

Operace BPJ lze definovat jako spojitou funkci rekonstruovaných hustot $b(x, y)$ určených integrálem projekční spojitě funkce $g(s, \theta)$ podle rovnice 7. Rekonstruovaný bod na pozici x a y je tedy dán sumou všech projekcí procházejících tímto bodem pod úhly θ vůči kolmici na podélnou stranu vzorku v rozsahu od 0 do π radiánů. Vzdálenost s je kolmá vzdálenost na projekci při určitém úhlu vzorku θ od osy rotace O viz. obrázek 24.

$$b(x, y) = \int_0^\pi g(s, \theta) d\theta$$

Rovnice 7



Obrázek 24: Odvození BPJ. Levý obrázek znázorňuje geometrii projekce objektu nakloněného pod úhlem θ vůči detektoru, který zaznamená projekční obraz jako funkci $g(s, \theta)$. Svazek primárních elektronů procházející vzorkem dopadá vždy kolmo na detektor. Pravý obraz vyobrazuje detailně geometrii projekce na detektor, kde u je úsečka mezi body I a M reprezentující interakční místa uvnitř vzorku. Vzdálenost s je vzdálenost mezi body A a P nebo I a O reprezentující pozici na osvětleném detektoru nebo kolmou vzdálenost projekčního svazku od osy rotace a je rovna součtu s_1 a s_2 [199].

Vzdálenost s ozářeného pixelu na detektoru nebo také kolmou vzdálenost pomyslného projekčního svazku od osy rotace vzorku O lze určit pomocí trigonometrie jako součet $s_1 + s_2$ viz rovnice 8.

$$s = s_1 + s_2 = \cos\theta \cdot x + \sin\theta \cdot y$$

Rovnice 8

Vzhledem k diskrétní povaze detektoru a limitovaným počtům projekcí rovnice 8 může být přepsána do formy rovnice 9, kde k je k -tá pozice pixelu na detektoru a p je počet projekcí.

$$\tilde{b}(x, y) = \sum_{k=1}^p g(s_k, \theta_k) \cdot \Delta\theta$$

Rovnice 9

Pro výpočet BPJ je nejčastěji využíváno sčítání projekčních snímků ve Fourierově prostoru, kde jsou jednotlivé snímky, reprezentující projekční hustoty řezu, transformovány Fourierovo transformací a přičteny pod daným úhlem náklonu do Fourierova prostoru, který reprezentuje rekonstruovaný objem řezu. Proces zpětné rekonstrukce (BPJ) spočívá v zpětné Fourierově transformaci tohoto Fourierova prostoru vzniklého sumací jednotlivých projekcí.

1.2.2 Fourierova transformace

Fourierova transformace $f[f(t)]$ je dána komplexní funkcí Fourierova obrazu $F(v)$ o jedné reálné proměnné v , jenž je transformován z komplexní funkce $f(t)$ o jedné reálné proměnné t podle rovnice 10. Inverzní Fourierova transformace $f^{-1}[F(t)]$ se počítá podle rovnice 11.

$$F(v) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t) \cdot e^{-2\pi i v t} dt \quad \text{Rovnice 10}$$

$$f(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} F(v) \cdot e^{2\pi i v t} dv \quad \text{Rovnice 11}$$

V případě projekcí je používána diskrétní forma Fourierovy transformace (rovnice 12) a inverzní Fourierovy transformace (rovnice 13), kde $x(n)$ je řada komplexních čísel $x_0, x_1, x_2, \dots, x_{N-1}$ o N vzorcích a podobně $X(k)$ je řada komplexních čísel.

$$X_k = \sum_{n=0}^{N-1} x_n \cdot e^{\frac{-2\pi i n k}{N}} \quad \text{Rovnice 12}$$

$$x_n = \sum_{k=0}^{N-1} X_k \cdot e^{\frac{2\pi i n k}{N}} \quad \text{Rovnice 13}$$

Pro počítačové zpracování se však používá rychlá Fourierova transformace, kde se transformace viz. rovnice 12 rozdělí na dvě části a vzniknou sudé (E_k) a liché (O_k) členy, poté n je nahrazeno pro sudé $n = 2m$ a pro liché $n = 2m+1$. Obě poloviny (X_k a $X_{k+N/2}$ – rovnice 14, rovnice 15) díky periodicitě exponenciálu obsahují sudé a liché členy. Zrychlení výpočtu (viz. 1.1.3.I) spočívá v použití vypočtených sudých a lichých členů

v obou polovinách výpočtu FFT s využitím motýlkového schématu, které umožňuje použít rekurzivní algoritmus.

$$\begin{aligned}
 X_k &= \sum_{m=0}^{\frac{N}{2}-1} x_{2m} \cdot e^{\frac{-2\pi i 2mk}{N}} + \sum_{m=0}^{\frac{N}{2}-1} x_{2m+1} \cdot e^{\frac{-2\pi i (2m+1)k}{N}} = \\
 &= \sum_{m=0}^{\frac{N}{2}-1} x_{2m} \cdot e^{\frac{-2\pi i mk}{\frac{N}{2}}} + e^{\frac{-2\pi i k}{N}} \sum_{m=0}^{\frac{N}{2}-1} x_{2m+1} \cdot e^{\frac{-2\pi i mk}{\frac{N}{2}}} =
 \end{aligned}$$

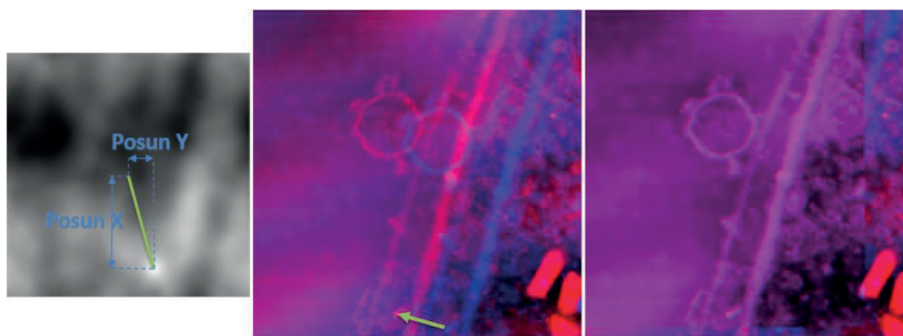
Rovnice 14

$$= E_k + e^{\frac{-2\pi i k}{N}} O_k$$

$$X_{k+\frac{N}{2}} = E_k - e^{\frac{-2\pi i k}{N}} O_k$$

Rovnice 15

Diskrétní FFT ve formě 2D se nepoužívá pouze na výpočet BPJ, ale také na křížové korelace, kterými lze měřit vzájemné posunutí dvou snímků obsahující alespoň určitou identickou část. Posuv obrazů se vyhodnotí hledáním vzdálenosti nejsvětlejšího bodu v obraze vypočteného jako $FFT^{-1}[FFT(\text{obraz1}) \times FFT(\text{obraz1})]$ viz. obrázek 25.



Obrázek 25: Aplikace křížové korelace na výpočet posunu dvou snímků. Levý obraz – zvětšený obraz křížové korelace s naznačenou vzdáleností posunutí mezi středem a nejsvětlejším bodem obrazu. Prostřední obraz – původní dva posunuté snímky (modrý a červený). Pravý obraz – Vzájemně zkorelované snímky. Jedná se o AFM snímky povrchu řezů, snímané v rámci článku (nepublikovaný výsledek T. Bílý) viz. kapitola 7 – vypočteno pomocí Matlabu.

1.2.3 Schéma práce při ET

Jedná se především o stat' se základními empirickými zkušenostmi s ET na TEM JEOL 2100 F pracujícím primárně při 200 kV za pokojové teploty na preparátech zalitých do pryskyřice.

1) Velikost nejmenšího biologického detailu

Lze očekávat nejmenší zobrazitelnou velikost biologického detailu v rozsahu 3 až 7 nm [35], které je dáno chemickou přípravou, krájením řezů, kontrastováním vzorku apod.

2) Rozlišení ET (Crowtherův vztah – rovnice 1 [59])

a. Volba tloušťky řezů

Klady a zápory zvyšující se tloušťky řezů:

- + V tomogramu bude zachycen větší objem (ten je do jisté míry určen velikostí objektu)
- Nižší rozlišení tomogramu
- Zvětšující se počet překrývajících se objektů, což znesnadňuje orientaci v objektech
- Narůst radiační poškození vzorku

Empiricky zjištěná hodnota optimální tloušťky řezu je ~100–160 nm pro 200 kV TEM. S volbou tloušťky řezů souvisí volba zaměřovacích značek, respektive velikost nanočástic. Pro řezy tloušťky do 120–150 nm lze použít nanočástice o průměru <10 nm, pro tlustší řezy jsou výhodnější průměry >12 nm. Je potřeba přihlídnout k rozlišení mikroskopu pixelu při daném zvětšení (viz další bod) tak, aby velikost nanočástic respektovala velikost pixelu.

b. Určit krok náklonu

Větší krok znamená menší rozlišení (viz. tabulka 4), ale dochází k menšímu radiační poškození. Obecně nejpoužívanější velikost kroku je 1°.

		Tloušťka řezu [nm]			
		50	100	150	200
krok	Rozlišení [nm]				
	2	1,75	3,49	5,24	6,98
1	0,87	1,75	2,62	3,49	
0,8	0,70	1,40	2,09	2,79	
0,7	0,61	1,22	1,83	2,44	
0,6	0,52	1,05	1,57	2,09	
0,5	0,44	0,87	1,31	1,75	

Tabulka 4: Rozlišení ET při zvolených parametrech (krok je v úhlových stupních) v laterální rovině. Vypočteno z rovnice 1.

c. Určit maximální úhel náklonu α

Může být omezen volbou předchozích parametrů, neboť dochází s funkcí $\frac{1}{\cos \alpha}$ k prodloužení efektivní tloušťky (dráha/tloušťka, kterou prochází elektron skrze řez při daném úhlu náklonu) se zvětšujícím se úhlem náklonu α viz. tabulka 5.

Dále může být omezen rozměry pólových nástavců objektivové čočky, případně fyzickými rozměry držáku a pozicí snímaného místa, která vyžaduje posunout osu rotace mimo fyzickou osu držáku (tzv. eucentrická laterální pozice a výška).

Maximální úhel náklonu určuje prodloužení objektů v ose Z (rovnice 2 [68]) – hodnoty koeficientu prodloužení jsou viz. tabulka 3.

D [nm] / α [°]	45	50	55	60	65	70	75	80
40	57	62	70	80	95	117	155	230
50	71	78	87	100	118	146	193	288
70	99	109	122	140	166	205	270	403
90	127	140	157	180	213	263	348	518
100	141	156	174	200	237	292	386	576
120	170	187	209	240	284	351	464	691
150	212	233	262	300	355	439	580	864
180	255	280	314	360	426	526	695	1037
200	283	311	349	400	473	585	773	1152

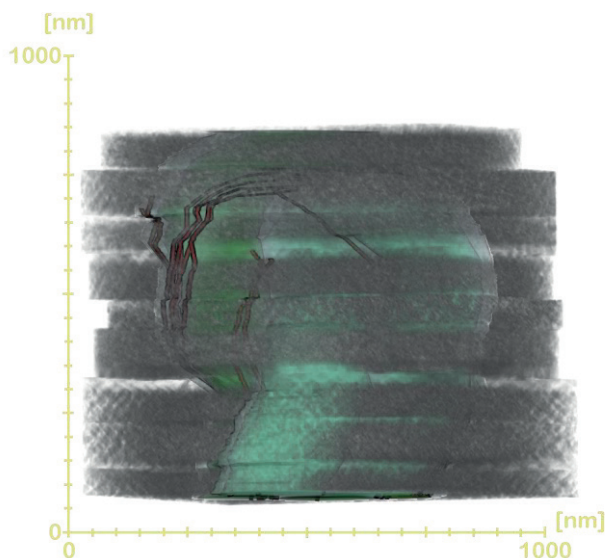
Tabulka 5: Hodnoty efektivního prodloužení v [nm] pro danou tloušťku řezu a úhel náklonu. Empiricky zjištěná obvyklá použitelnost pro 200 kV TEM (může se lišit dle specifické hustoty vzorku, způsobu kontrastování atd.): zelená-v pořádku, oranžová-může dojít k rozmazání obrazu vlivem zvyšující se efektivní tloušťky, červená-v extrémních náklonech může začít chybovat automatika snímání, hnědá-nerealizovatelné. [T. Bílý]

d. Volba jednoosé nebo dvouosé tomografie

Při jednoosé tomografii může nastat v zrekonstruovaném tomogramu rozmazání membrán díky jejich poloze v 3D viz. 1.1.4.II. Nevýhodou dvouosé tomografie je větší radiační poškození vzorku, pokud není speciální držák, tak může dojít k poškození vzorku při manipulaci a naposledy zpracování je časově i technicky náročnější.

3) Rozlišení snímku

Je určeno rozlišovací schopností mikroskopu při daném zvětšení a tedy velikostí pixelu v obrazu. Rozlišení snímku by mělo reflektovat Nyquist–Shennonův teorém [29, 30]. Empiricky se osvědčilo 4× menší velikost pixelu než rozlišení ET. To může vést k relativně velkým zvětšením, při nichž může být rekonstruovaná plocha nedostatečná. Tuto situaci lze řešit snížením nároků v předchozích parametrech nebo použitím spojování tomogramů v laterální rovině. Podobně i volba tloušťky může vést k nutnosti použít slučování sériových tomogramů viz. obrázek 26.



Obrázek 26: Aplikace sloučených devíti sériových tomogramů ke zobrazení 3D objemu bakterie *Borrelia burgdorferi*. Nepublikovaný výsledek ve formě manuskriptu. (Objem zrekonstruovaný v aplikaci AMIRA – nepublikované výsledky T. Bílý, M. Vancová)

Po volbě rozlišení určující parametry náklonné série se vykoná samotné snímání a následné zpracování tomogramu, tj. zpětná rekonstrukce a vizualizace. Pro zpětnou rekonstrukci lze využít některý z řady dostupných programů: Etomo (bio3d.colorado.edu), ImageJ/TomoJ/Fiji (imagej.nih.gov, www.cmib.fr, fiji.sc), TxBR (confluence.crbs.ucsd.edu), Amira nebo Tomography nebo DM nebo Inspect 3D (www.fei.com), protomo (www.electrontomography.org), TOM Toolbox (www.biochem.mpg.de), Ettention (www.ettention.org).

Software pro vytváření modelů a vizualizací: Imod (bio3d.colorado.edu), Chimera (www.cgl.ucsf.edu), Population (www.population-image.fr), Reconstruct (synapseweb.clm.utexas.edu/software-0), PyTom (pytom.org), Jinx (confluence.crbs.ucsd.edu), Cytoseg (confluence.crbs.ucsd.edu), SLASH (sites.google.com/site/slashsegmentation/tools/slash-3d-viewer), BioView3D (<http://www.dimin.net/software/bioview3d/>), Amira, Imaris (www.bitplane.com), BioVis3D (www.biovis3d.com), 3DSlicer (www.slicer.org), MIB (mib.helsinki.fi), ilastik (www.ilastik.org), EM3D (em3d.stanford.edu).

Kapitola 2. CÍLE DISERTACE

1. Interakce viru klíšťové encefalitidy s nervovými buňkami zdokumentovat pomocí ET.

- a. Zobrazit reorganizované membránové struktury vlivem infekce**
- b. Zobrazit využití intracelulárního transportu virem uvnitř buněk**

Reorganizované membrány endoplazmatického retikula se mění ve složité membránové struktury s replikačními centry viru. Velmi často není možné v rámci projekčních snímků rozeznat oblasti patřící do endoplazmatického retikula, které jsou ohraničené membránami.

Podobně na projekčním snímku vir nacházející se v blízkosti mikrotubulu, domněle využívající intracelulární transport, se může ve skutečnosti nacházet nad tubulem bez jakékoli možnosti funkčního kontaktu.

Tento cíl vychází a navazuje na práci Růžek, Vancová et al. [197].

2. Zobrazit 3D strukturu centrální elektrondenzní části bičíku typu 9 + „1“

Bičík 9 + „1“ s elektrondenzní centrální částí byl detailně ultrastrukturálně studován v práci Silveiry [198], kde byla centrální elektrondenzní oblast popsána v 3D pouze jako podlouhlý element.

3. Korelace dat mezi ET a AFM mikroskopií

ET selhává ve zobrazení povrchů řezů, které mají členitý profil vzniklý krájením biologického materiálu zalitého do pryskyřice, protože u zrekonstruovaných objemů dochází v této oblasti ke změnám kontrastu. AFM nabízí způsob, jak tuto oblast detailně prozkoumat s možností zobrazení až s atomárním rozlišením. Cílem bylo najít podmínky, které umožní snímat řezy přímo na EM síťkách jak v TEM, tak v AFM bez jejich poškození a porovnat tato data.

Kapitola 3. SEZNAM ČLÁNKŮ

Publikované články zahrnuté v disertaci a citované spoluautorské články

3.1 ČLÁNKY ZAHRNUTÉ V DISERTACI

3.1.1 Interakce viru klíšťové encefalitidy s nervovými buňkami

Tyto výsledky měly za snahu rozšířit poznání ohledně interakce viru klíšťové encefalitidy (TBEV) s nervovými buňkami. Během infekce TBEV dochází k rozsáhlé reorganizaci hrubého endoplazmatického retikula (ER) ve složitou membránovou síť s replikačními centry a k tvorbě váčků uvnitř kterých probíhá replikace viru. U pozorování zakládajících se na 2D projekčních snímcích ultratenkých řezů dochází k překrývání struktur, které znemožňuje orientaci v 3D organizaci objektů. ET jsme použili k zobrazení a popsání změn v buňkách vyvolaných TBEV.

TBEV využívá k opuštění buňky její sekreční systém spojený s intracelulárním transportem a pomocí ET jsme chtěli popsat poprvé interakci TBEV s mikrotubulárním systémem cytoskeletu.

[Kapitola 4] ČLÁNEK 1. Infection and injury of human astrocytes by tick-borne encephalitis virus, Martin Palus, **Tomáš Bílý**, et al.

[Kapitola 5] ČLÁNEK 2. Electron Tomography Analysis of Tick-Borne Encephalitis Virus Infection in Human Neurons, **Tomáš Bílý**, Martin Palus, et al.

3.1.2 Ultrastruktura centrální části bičíku 9+1

Trojrozměrná struktura elektrondenzní centrální části bičíku byla v minulosti popsána jako podlouhle orientovaná část. V této práci a v další [související čl.- 2] vyobrazujeme s pomocí ET 3D rekonstrukci jejího tvaru.

[Kapitola 6] ČLÁNEK 3. Ultrastructural, cytochemistry and electron tomography analysis of *Caryophyllaeides fennica* (Schneider, 1902) (Cestoda: Lytocestidae) reveals novel spermatology characteristics in the Eucestoda, Martina Matoušková, **Tomáš Bílý**, et al.

3.1.3 Korelativní mikroskopie EM a AFM

V práci popisujeme nález irido viru a cytoplazmatického polyhedrozního viru (CPV). Je zobrazena jejich 3D struktura uvnitř tkáně. U řezů s CPV jsem pozoroval odlišný kontrast virů vyskytujících se mimo krystal a u virů nacházejících se u povrchu řezů. Pomocí AFM jsem zkoumal odlišnosti ve zobrazení pomocí EM, ET a AFM.

[Kapitola 7] ČLÁNEK 4. Occurrence, pathology, and ultrastructure of iridovirus and cytoplasmic polyhedrosis viruses in daphnids from the Czech Republic, Jiří Vávra, **Tomáš Bílý**, et al.

3.2 CITOVANÉ AUTORSKÉ ČLÁNKY

- související čl.- 1.** Characterisation of Zika virus infection in primary human astrocytes, Michal Stefanik, Petra Formanova, **Tomas Bíly**, Marie Vancova, Ludek Eyer, Martin Palus, Jiri Salat, Carla Torres Braconi, Paolo M. de A. Zanotto, Ernest A. Gould and Daniel Ruzek, BMC neuroscience, Volume 19, Nuber 5, 2018 (IF=2,17)
- související čl.- 2.** Nippotaenia mogurndae Yamaguti et Myiata, 1940 (Cestoda, Nippotaeniidea): first data on spermiogenesis and sperm ultrastructure, Magdalena Brunanska, **Tomas Bíly** and Jana Nebesarova, Parasitology Research, Volume 114, Issue 4, Pages 1443–1453, 2015 (IF=2,03)
- související čl.- 3.** Identification and Characterization of Anaplasma phagocytophilum Proteins Involved in Infection of the Tick Vector, Ixodes scapularis, Margarita Villar, Nieves Ayllon, Katherine M. Kocan, Elena Bonzon-Kulichenko, Pilar Alberdi, Edmour F. Blouin, Sabine Weisheit, Lourdes Mateos-Hernandez, Alejandro Cabezas-Cruz, Lesley Bell-Sakyi, Marie Vancova, **Tomas Bíly**, Damien F. Meyer, Jan Sterba, Marinela Contreras, Nataliia Rudenko, Libor Grubhoffer, Jesus Vazquez and Jose de la Fuente, PLoS ONE, Volume 10, Issue 9, 2015 (IF=3,06)
- související čl.- 4.** New cell motility model observed in parasitic cnidarian Sphaerospora molnari (Myxozoa: Myxosporidia) blood stages in fish, A. Hartigan, I. Estensoro, M. Vancova, **T. Bíly**, S Patra, E. Eszterbauer and A. S. Holzer, Scientific Reports, Volume 6, 2016 (IF=4,26)
- související čl.- 5.** The Diverged Trypanosome MICOS Complex as a Hub for Mitochondrial Cristae Shaping and Protein Import, Iosif Kaurov, Marie Vancová, Bernd Schimanski, Lawrence

Rudy Cadena, Jiří Heller, **Tomáš Bílý**, David Potěšil, Claudia Eichenberger, Hannah Bruce, Silke Oeljeklaus, Bettina Warscheid, Zbyněk Zdráhal, André Schneider, Julius Lukeš and Hassan Hashimi, *Current Biology*, Volume 28, Pages 3393–3407, 2018 (IF=9,25)

Obrázek na titulní straně:

související čl.- 6. Cover Image, **Tomáš Bílý**, Michal Petrov (Tescan), Eva Dobáková, Marie Vancová, Jana Nebesářová, Julius Lukeš, *Genome Biology and Evolution*, Volume 9, Issue 4, <https://academic.oup.com/gbe/issue/9/4#299117-3064432> (IF=3,94)

Kapitola 4. ČLÁNEK 1

INFECTION AND INJURY OF HUMAN ASTROCYTES BY TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS

*Martin Palus †, Tomáš Bílý †, Jana Elsterová, Helena Langhansová, Jiří Salát,
Marie Vancová a Daniel Růžek*

(† Tito autoři přispěli k této studii stejně)

Journal of General Virology, Volume 95, Pages 2411–2426, 2014

DOI 10.1099/vir.0.068411-0

Infection and injury of human astrocytes by tick-borne encephalitis virus

Martin Palus,^{1,2,3†} Tomáš Bílý,^{1,2†} Jana Elsterová,^{1,2,3}
Helena Langhansová,^{1,2} Jiří Salát,³ Marie Vancová^{1,2} and Daniel Růžek^{1,2,3}

¹Institute of Parasitology, Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic, Branišovská 31, CZ-37005 České Budějovice, Czech Republic

²Faculty of Science, University of South Bohemia, Branišovská 31, CZ-37005 České Budějovice, Czech Republic

³Department of Virology, Veterinary Research Institute, Hudcova 70, CZ-62100 Brno, Czech Republic

Tick-borne encephalitis (TBE), a disease caused by tick-borne encephalitis virus (TBEV), represents the most important flaviviral neural infection in Europe and north-eastern Asia. In the central nervous system (CNS), neurons are the primary target for TBEV infection; however, infection of non-neuronal CNS cells, such as astrocytes, is not well understood. In this study, we investigated the interaction between TBEV and primary human astrocytes. We report for the first time, to the best of our knowledge, that primary human astrocytes are sensitive to TBEV infection, although the infection did not affect their viability. The infection induced a marked increase in the expression of glial fibrillary acidic protein, a marker of astrocyte activation. In addition, expression of matrix metalloproteinase 9 and several key pro-inflammatory cytokines/chemokines (e.g. tumour necrosis factor α , interferon α , interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8, interferon γ -induced protein 10, macrophage inflammatory protein, but not monocyte chemoattractant protein 1) was upregulated. Moreover, we present a detailed description of morphological changes in TBEV-infected cells, as investigated using three-dimensional electron tomography. Several novel ultrastructural changes were observed, including the formation of unique tubule-like structures of 17.9 \pm 0.15 nm diameter with associated viral particles and/or virus-induced vesicles and located in the rough endoplasmic reticulum of the TBEV-infected cells. This is the first demonstration that TBEV infection activates primary human astrocytes. The infected astrocytes might be a potential source of pro-inflammatory cytokines in the TBEV-infected brain, and might contribute to the TBEV induced neurotoxicity and blood–brain barrier breakdown that occurs during TBE. The neuropathological significance of our observations is also discussed.

INTRODUCTION

Tick-borne encephalitis (TBE) is a serious viral infection of the central nervous system (CNS) caused by tick-borne encephalitis virus (TBEV). TBEV is a single-stranded positive-sense RNA virus belonging to the genus *Flavivirus*, family *Flaviviridae* (Mansfield *et al.*, 2009). More than 13 000 clinical cases of TBE, including numerous deaths, are reported annually in Europe and north-eastern Asia (Mansfield *et al.*, 2009).

Despite the medical importance of this disease, some crucial steps in the development of encephalitis remain poorly understood. In humans, TBEV may produce a variety of clinical symptoms. The clinical spectrum of acute TBE ranges from symptoms of undifferentiated febrile illness or mild meningitis to severe meningoencephalitis with or without myelitis (Haglund & Günther, 2003; Růžek *et al.*, 2010). Chronic TBE occurs less frequently and has been reported only in some regions of Russia, mainly in Siberia and the Far East,

where this form comprises 1–3% of all TBE cases (Gritsun *et al.*, 2003)

† These authors contributed equally to this study.

A supplementary movie is available with the online version of this paper.

Major hallmarks of TBEV neuropathogenesis are neuroinflammation followed by neuronal death and disruption of the blood–brain barrier (BBB) (Růžek *et al.*, 2009a, 2011; Palus *et al.*, 2013, 2014). The response of TBEV infection in the brain is characterized by massive inflammatory events, including the production of cytokines

antigen staining. (b) TBEV titres in culture supernatant from HBCAs collected at 0, 1, 2, 3, 7, 9 and 15 days p.i. were determined by plaque assay using porcine kidney stable cells. Viral titres are expressed as p.f.u. ml⁻¹. Data represent means±SEM. (c) Total RNA extracted from HBCA cell lysates at 0, 2, 7, and 15 days p.i. was used to determine the number of intracellular TBEV RNA copies by quantitative RT-PCR. Values represent means±SEM. (d) The percentage of HBCAs that were positive for TBEV antigen in culture at 3, 7, 10 and 15 days p.i. was determined. Data were obtained based on a total of 23 000 cells counted in at least seven independent fields.

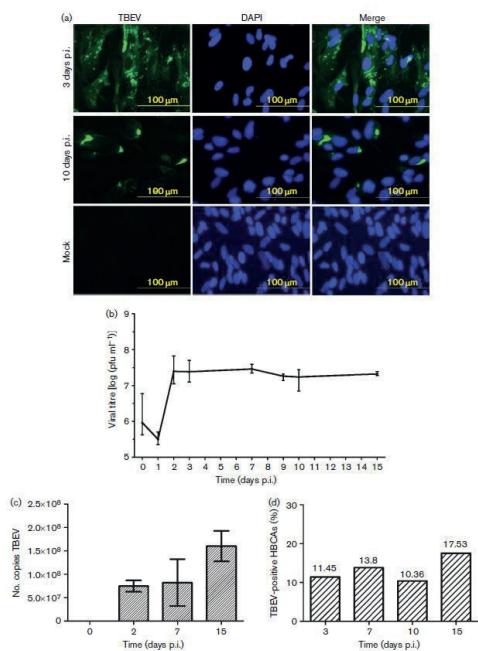


Fig. 1. TBEV can infect human primary astrocytes. (a) HBCAs grown and fixed on slides at days 3 and 10 post-infection (p.i.) were stained with anti-flavivirus envelope antibody (green) and counterstained with DAPI (blue). TBEV-infected HBCAs immunostained with flavivirus-specific antibody demonstrated virus replication in the cytoplasm, with antigen aggregates forming at day 3 p.i. At later time points (10 days p.i.), only the brightly stained aggregates of viral antigen were observed. Mockinfected HBCAs stained with primary and secondary antibodies were used as a negative control, and did not exhibit any TBEV

(e.g. IFN- γ , TNF- α , and IL-1 β , IL-6 and IL-10) and chemokines [e.g. monocyte chemoattractant protein (MCP)-1/CCL2, IFN- γ -induced protein 10 (IP-10)/CXCL10, macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α and RANTES] (Palus *et al.*, 2013). Microglia and astrocytes are classically believed to serve as the predominant source of these cytokines and chemokines in the CNS, and therefore may act as important processors of neuroinflammation and neurodegeneration (Ramesh *et al.*, 2013). The pro-inflammatory chemokines attract immunocompetent cells to the CNS (Réaux-Le Goazigo *et al.*, 2013), including CD8⁺ T-cells, which may mediate immunopathology during TBE (Růžek *et al.*, 2009a). Moreover, the pro-inflammatory molecules can further activate downstream apoptotic signalling pathways in neurons, resulting in neuronal death (Kumar *et al.*, 2010) or inducing breakdown of the BBB (Růžek *et al.*, 2011; Erickson *et al.*, 2012; Palus *et al.*, 2014). We used a rodent model to demonstrate that TBEV infection is associated with the dramatic BBB breakdown that occurs during the later stages of infection. The BBB breakdown most likely represents a bystander effect of virus-induced cytokine/chemokine overproduction in the brain (Růžek *et al.*, 2011). However, the specific cell types that express these cytokines and chemokines have not been characterized.

Although neurons are primary targets after TBEV enters the CNS (Hirano *et al.*, 2014), other brain cells may also be infected (Potokar *et al.*, 2014). Infection of non-neuronal CNS cells including astrocytes has,

albeit infrequently, been reported in cases of flavivirus encephalitis (Desai *et al.*, 1995; Nogueira *et al.*, 2002; German *et al.*, 2006; Balsitis *et al.*, 2009; de Araújo *et al.*, 2009; Sips *et al.*, 2012). It was shown recently that TBEV infects cultured primary rat astrocytes without affecting their viability. Therefore, it was suggested that astrocytes might represent an important reservoir of TBEV in brain during the infection (Potokar *et al.*, 2014). Astrocytes are the most abundant glial cell population in the human brain (Nedergaard *et al.*, 2003) and have various leading roles in the brain, including integrating neuronal functions, neuronal support and regulation of the BBB. Thus, astrocytes serve as a structural and functional bridge between endothelial cells of the BBB and neurons; together, they form the ‘neurovascular unit’ (Stanimirovic & Friedman, 2012), which regulates blood flow, the integrity of the BBB and neuronal activity in response to physiological and pathophysiological changes (Husmann *et al.*, 2013).

Astrocytes are key players in the inflammatory response during neural infections caused by flaviviruses, namely Japanese encephalitis (Bhowmick *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2012) and West Nile encephalitis (Diniz *et al.*, 2006; Verma *et al.*, 2011; Husmann *et al.*, 2013); however, their role in the development of TBE remains largely unstudied. Here, we aimed to investigate the sensitivity of primary human astrocytes to TBEV infection, virus growth, virus-induced astrocyte activation, and cytokine and chemokine production. We demonstrate here for the first time, to the best of our knowledge, that TBEV is capable of productive, persistent infection in primary human astrocytes, and that this infection is associated with astrocyte activation and the production of various pro-inflammatory cytokines and chemokines.

On the ultrastructural level, the infection causes massive morphological changes that include the proliferation and rearrangement of the rough endoplasmic reticulum (RER) and lead to the formation of new compartments with an optimal microenvironment that provides functional sites for protein synthesis, processing and RNA replication, whilst providing

protection against the host immune system (Welsch *et al.*, 2009; Gillespie *et al.*, 2010; Offerdahl *et al.*, 2012; Miorin *et al.*, 2013). These newly transformed compartments are represented by vesicles or vesicle packets that contain a pore opening to the cytosol (Offerdahl *et al.*, 2012; Miorin *et al.*, 2013) and convoluted membranes with a putative polyprotein processing function (Welsch *et al.*, 2009). A number of other functions have been ascribed to the proliferation of this membrane network, including the concentration of virus replication machinery, the provision of a solid-state platform for viral protein synthesis and replication, and the sequestration of viral dsRNA (the replicative form) from innate immune sensors (Overby *et al.*, 2010; Offerdahl *et al.*, 2012).

We also used electron tomography to provide important insights into the three-dimensional (3D) morphology of the infected cells, and, to the best of our knowledge, this is the first description of the 3D architecture of the tubule-like structures found in the RER of TBEV-infected human astrocytes. Taken together, our findings suggest that astrocytes can significantly contribute to the development of inflammation in the CNS during TBE. This information may facilitate novel strategies for treating this important neural infection.

RESULTS

TBEV can infect and replicate in human astrocytes

We employed a plaque assay and immunofluorescence staining for viral antigen to determine TBEV infection and replication kinetics in primary human brain cortex astrocytes (HBCAs) (Fig. 1). Viral antigen was not detected in mockinfected HBCAs (Fig. 1a) or in cells stained with secondary antibody alone. Based on a total of 23 000 cells counted in at least seven independent fields, approximately 11% of HBCAs were infected with TBEV at day 3, 14% at day 7, 10% at day 10 and 18% at day 15 post-infection (p.i.) (Fig. 1d).

TBEV replication was quantified using a plaque assay in TBEV-infected cell supernatants collected

daily from days 0 to 3 and then at 7, 9, 10 and 15 days p.i. Productive TBEV replication in the form of release of virions was first detected at day 2 after infection, and day 2 also represented the limit of virus production (Fig. 1b). Intracellular TBEV replication assessed by quantitative real-time reverse transcription (RT)-PCR also confirmed virus replication for the first 15 days p.i., and the number of TBEV RNA copies increased in a time-dependent manner (Fig. 1c). We also used phasecontrast microscopy to examine TBEV-infected astrocytes for cytopathogenic effect (CPE) and cell death; neither was observed at any time point (data not shown).

Immunofluorescence staining revealed that the TBEV antigen was distributed mostly diffusely throughout the entire body of the astrocyte at early time points after infection (Fig. 1a). However, at later time points (as early as day 3 after infection), we observed brightly staining aggregates of viral antigen. A co-localization study with protein disulfide isomerase family A, member 3 (PDIA3) antigen (also known as Erp57, Er-60 and GRP58) suggested that the antigen was localized primarily in extremely hypertrophied and rearranged endoplasmic reticulum of the cells as early as day 3 p.i. (Fig. 2).

TBEV induces the expression of multiple proinflammatory cytokines/chemokines in human astrocytes

Pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 β and TNF- α , play an important role in mediating neuronal death and neuroinflammation in various diseases. Therefore, we investigated the effect of TBEV infection on the mRNA expression of key pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN- α and TNF- α . We also measured the expression of MCP-1/CCL2, MIP-1 β /CCL4 and IP-10/CXCL10 mRNAs in infected and control astrocytes (Figs 3 and 4). On day 1 p.i., we observed no significant increase in the mRNA expression of any cytokine/chemokine.

The expression of CCL2/MCP-1 mRNA did not change significantly at any time point (Fig. 3f). Robust upregulation of TNF- α mRNA was detected

at 3 and 4 days p.i.; however, the expression was decreased at 15 days p.i. (Fig. 3a). IFN- α mRNA expression was slightly upregulated only at day 4 p.i. (Fig. 3b). Although the expression of IL-1 β , IL-6 and IL-8 mRNAs increased from day 3 to 4, no upregulation was observed at day 15 p.i. (Fig. 3c–e, respectively). We observed strong increases of CCL4/MIP-1 β and CXCL10/IP-10 mRNA expression from 3 to 4 days p.i.; however, at day 15, the expression level for these molecules was similar in infected cells and control cells (Fig. 4a, c).

We used ELISA to investigate the release of secreted MIP-1 β /CCL4 and IP-10/CXCL10 cytokines/chemokines in the culture medium of TBEV-infected and control cells. The amount of soluble MIP-1 β /CCL4 did not increase until day 4 p.i. At day 5 p.i., the amount of soluble MIP-1 β /CCL4 was significantly increased (Fig. 4d). Basal levels of IP-10/CXCL10 in culture media were very low. Starting on day 2 p.i. the amount of soluble IP-10/CXCL10 increased substantially ($P < 0.001$; Fig. 4b).

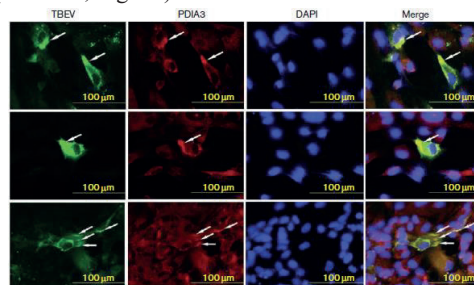


Fig. 2. TBEV antigen is co-localized with PDIA3 antigen in infected HBCAs at later times p.i. HBCAs grown and fixed at day 3 p.i. were stained with anti-flavivirus envelope antibody (green) and anti-PDIA3 antibody (red), and counterstained with DAPI (blue). Co-localization of TBEV and PDIA3 antigens was observed at all investigated time points p.i. Three representative examples are shown. Mock-infected HBCAs stained with primary anti-flavivirus and secondary antibodies (or cells stained with secondary antibodies only) were used as negative controls and did not exhibit any TBEV or PDIA3 antigen staining (not shown).

TBEV infection induces the production of matrix metalloproteinase 9 by astrocytes

The expression of matrix metalloproteinases (MMPs), especially MMP-9, correlates with BBB disruption during many neuroinflammatory diseases. Therefore, we investigated the effect of TBEV infection on the production of MMP-9 by astrocytes. The release of soluble MMP-9 into the culture medium of mock- and TBEV-infected astrocytes was detected using ELISA. Starting at day 2 after infection, the amounts of soluble MMP-9 increased continuously until the end of the experiment, with a dramatic increase at day 7 (Fig. 5).

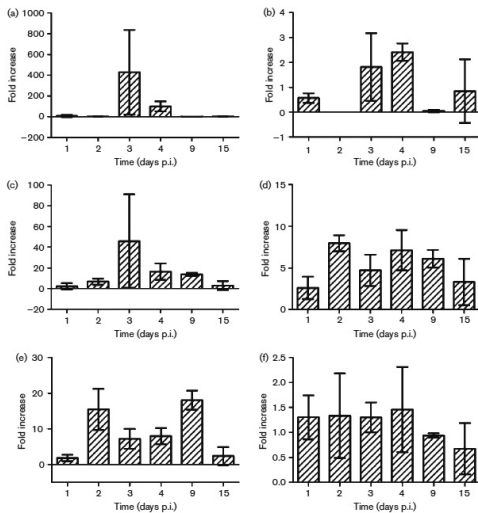


Fig. 3. TBEV differentially modulates the expression of pro-inflammatory cytokines and chemokines in HBCAs. Total RNA from mock-infected and TBEV-infected HBCAs at days 1–4, 9 and 15 p.i. were used to determine the fold change of TNF- α (a), IFN- α (b), IL-1 β (c), IL-6 (d), IL-8 (e) and MCP-1/CCL2 (f) mRNAs with quantitative RT-PCR. Changes in cytokine and chemokine levels were first normalized to the expression of housekeeping genes (human β -actin and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) and the fold change in the infected cells was calculated compared with the corresponding controls. Data are expressed as means \pm SEM.

TBEV infection is associated with the activation of infected astrocytes, as demonstrated by increased glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression

To provide additional evidence that TBEV infection per se causes astrocyte activation, we measured the production of GFAP, a marker of astrocyte activation, in mock-infected and TBEV-infected astrocytes, as well as in cells treated with lipopolysaccharide (LPS) at various times p.i. Flow cytometry indicated that the intensity of GFAP production increased significantly in TBEV-infected HBCAs at 3, 7 and 15 days p.i. compared with mock-infected and LPS-treated cells, clearly demonstrating astrocyte activation (Fig. 6a, b). The intensity of GFAP production in the TBEV- and mock-infected cells was also visualized with fluorescence microscopy using a specific anti-GFAP antibody (Fig. 6c).

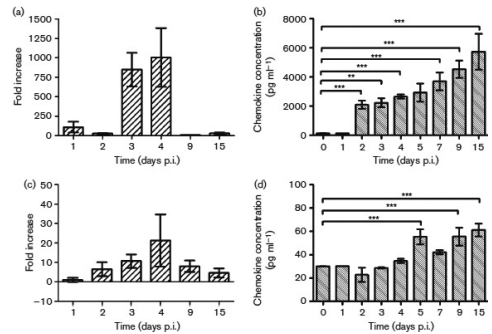


Fig. 4. TBEV increases the production of IP-10/CXCL10 and MIP-1 β /CCL4 in infected HBCAs. (a, c) Total RNA from mockinfected and TBEV-infected HBCAs at 1–4, 9 and 15 days p.i. was used to determine the fold change of IP-10/CXCL10 (a) and MIP-1 β /CCL4 (c) mRNAs with quantitative RT-PCR. Changes in the cytokine and chemokine mRNA levels were first normalized to the expression of housekeeping genes (human β -actin and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) and the fold change in the infected cells was calculated compared with corresponding controls. Data are expressed as means \pm SEM. (b, d) Levels of IP-10/CXCL10 (b) and MIP-1 β /CCL-4 (d) in culture supernatants were determined using ELISA at 0–7, 9 and 15 days p.i. Data represent mean concentrations \pm SEM. **P,0.01; ***P,0.001.

TBEV causes dramatic ultrastructural morphological changes in infected astrocytes

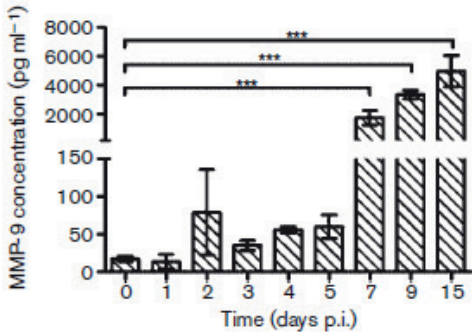


Fig. 5. TBEV-infected HBCAs release large quantities of MMP-9. Levels of MMP-9 in culture supernatants were determined using ELISA at 0–7, 9 and 15 days p.i. Data represent mean concentrations±SEM. ***P,0.001.

We used transmission electron microscopy and electron tomography to investigate ultrastructural changes in mock and TBEV-infected HBCAs at 3 and 9 days p.i. At 3 days p.i., we observed rearranged cisterns of the RER with typical virus-induced vesicles and viral particles, as described elsewhere (Fig. 7a) (Růžek *et al.*, 2009b). Next, we observed that many enveloped TBEVs were crowded into the Golgi complex (Figs 7b and 8b). In contrast, at 9 days p.i., we observed a lower number of viral particles in the cisterns of the RER (Fig. 7c) and in vacuoles close to the Golgi complex (Fig. 7d). At 9 days p.i., we observed intra-mitochondrial electron-dense granules that formed annular structures in the mitochondrial matrix (Fig. 7c). Moreover, these cells contained both swollen mitochondria with mitochondrial cristae located in the periphery, and mitochondria that apparently lacked any alteration in morphology (Fig. 7e). Furthermore, some infected cells displayed other culture and the same time interval (Fig. 7f), which is in accordance with immunofluorescence staining for viral antigen. The ultrastructure of these cells was similar to that induced by TBEV infection involved almost all cell compartments (RER, Golgi complex, mitochondria and phagosomes) as visible on the 3D model of the infected cells (Fig. 8b).

TBEV induces the formation of tubule-like structures in the endoplasmic reticulum of some infected astrocytes

We observed tubule-like structures, which were located inside the RER cisternal space of only a very few of the infected astrocytes (Fig. 9 and Movie S1, available in the online Supplementary Material). The tubule-like structures were laid out in many parallel groupings of bundle-like fascicles. The electron density of these tubule-like structures was consistent throughout their shape (Fig. 10a–c), and they were 17.9 nm (±0.2 nm; n=101) in diameter.

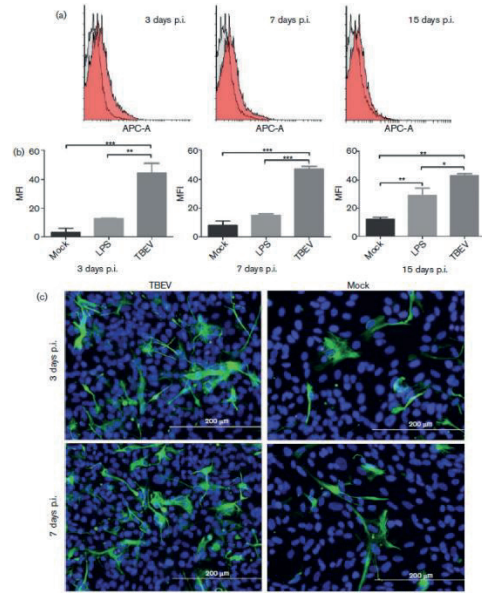


Fig. 6. TBEV infection activates HBCAs, as demonstrated by increased GFAP production. (a) Flow cytometry analysis of GFAP production in mock-infected and TBEV-infected HBCAs at 3, 7 and 15 days p.i. is shown as overlapping histograms of relative fluorescence intensity of the analysed cells. (b) The mean fluorescence intensity (MFI) of GFAP-positive cells in culture after mock infection or TBEV infection and LPS treatment at 3, 7 and 15 days p.i. was determined by flow cytometry; it was significantly increased in TBEV-infected HBCAs at all time points investigated. (c) HBCAs grown and fixed at days 3 and 7 p.i. were stained with anti-GFAP antibody (green) and counterstained with DAPI (blue). HBCAs stained with secondary antibody alone were used as a negative control and

did not exhibit any GFAP antigen staining (not shown). *P,0.05; **P,0.01; ***P,0.001.

In contrast, when viewed using the electron microscope, cellular microtubules outside the ER appeared to be less electron-dense on the inside and were bordered on the outside by two dense lines; the diameter of these microtubules was 20.3 nm (microtubules in Fig. 10d–f). All enveloped viral particles were observed in the lumen of the RER, and most were directly connected to the tubulelike structures (Fig. 11a–d). The diameter of the enveloped viral particles was 42.5 nm (± 0.7 nm; n=12), and the diameter of the nucleocapsid was 26.1 nm (± 0.7 nm; n=12).

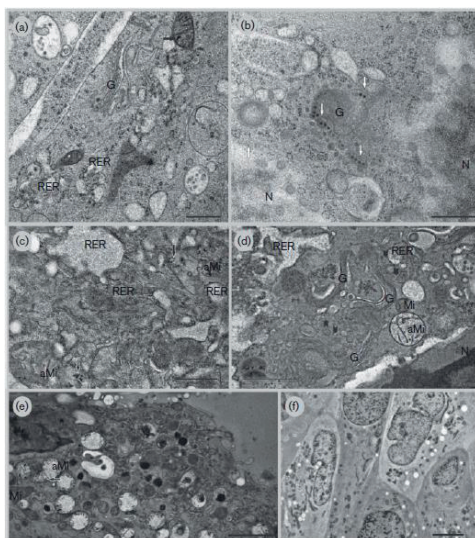


Fig. 7. Morphological changes in TBEV-infected HBCAs at 3 (a, b) and 9 (c–f) days p.i. (a) TBEV particles located inside the remodelled RER and the Golgi complex (G). In particular, note the mitochondrion with the electron-dense granules (black arrow). (b) Viral particles (white arrows) accumulated in the periphery of the Golgi stack (G). N, nucleus. (c–e) Ultrastructural alterations were observed in infected cells at 9 days p.i.: enlarged cisternae of the RER, rearranged RER membranes, swollen mitochondria (aMi) with annularly arranged granules (black arrows) and mitochondria without structural changes (Mi), as well as viral particles inside vacuoles (arrowheads). (f) Transmission electron

microscopy did not reveal any ultrastructural abnormalities in several HBCAs at 9 days p.i. Bars: 500 nm (a, b), 100 nm (c); 1 μ m (d); 2 μ m (e); 5 μ m (f).

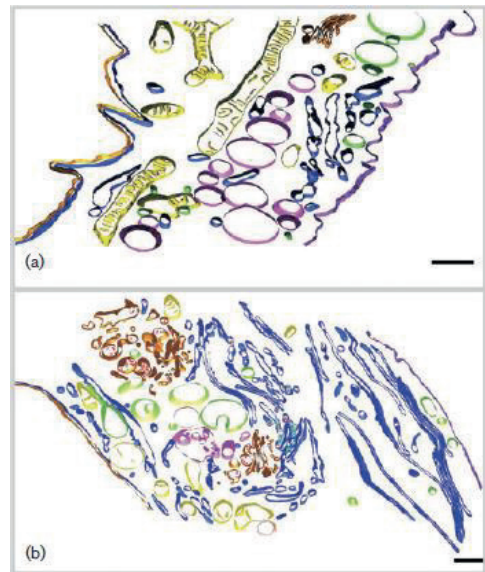


Fig. 8. 3D models of mock-infected (a) and TBEV-infected HBCAs (b) at 3 days p.i. TBEV infection causes extensive morphological changes, including membrane reorganization of the RER; differences are evident in the Golgi complex, mitochondria and phagosomes. 3D reconstructions of single axis tomograms are shown. Tilt series images were collected with either $\pm 60^\circ$ tilt range in 0.65° increments (a) or $\pm 65^\circ$ tilt range in 16 increments (b). The final 3D reconstructed thicknesses are 52 nm (a) and 56 nm (b). Pixel resolution: 1.66 nm (a), 2.16 nm (b). Orange, the Golgi complex; red, TBEV particles; light blue, TBEV-induced structures; dark blue, RER; yellow, mitochondria; green, vacuole; pink, phagosome/endosome; violet, cell membrane; brown, nuclear membrane. Bars, 500 nm.

Several TBEV-induced vesicles that were nearly spherical and ranged from 60 to 90 nm in diameter were observed in close proximity to viral enveloped particles. Some TBEV-induced vesicles were connected in a manner identical to that described regarding the tubule-like structures (Fig. 11e–h). We also noted the presence of a subviral particle enclosed in a vesicle in close proximity to the tubule-

like structures. The presence of subviral particles (Fig. 11i, j) indicated defective virus assembly.

DISCUSSION

Although TBEV is a significant cause of encephalitis in humans, relatively little attention has been given to TBEV infection of cells in the human CNS. Neurons are primary targets for TBEV (Hirano *et al.*, 2014) in the CNS, and other brain cells may also be infected (Potokar *et al.*, 2014). Although TBEV antigen was not detected in astrocytes in a study investigating brains from fatal human TBE cases (Gelpi *et al.*, 2005), data from other studies indicate that non-neuronal CNS cells including astrocytes are also, albeit infrequently, infected in cases of flavivirus encephalitis (Desai *et al.*, 1995; Nogueira *et al.*, 2002; German *et al.*, 2006; Balsitis *et al.*, 2009; de Araújo *et al.*, 2009; Sips *et al.*, 2012). Infection of non-neuronal cells might play some role in the entry of the virus into the CNS, development of neuroinflammation and viral persistence in the CNS during chronic infection. A recent report demonstrated that primary rat astrocytes are sensitive to TBEV infection, although the infection did not affect cell viability (Potokar *et al.*, 2014). Therefore, it was suggested that astrocytes might represent an important reservoir of dormant TBEV during chronic brain infection (Potokar *et al.*, 2014), for example in cases of chronic TBEV infections reported in humans in Siberia and the Far East (Gritsun *et al.*, 2003). Moreover, an increasing number of studies have demonstrated the important role of astrocytes during encephalitis caused by other flaviviruses, such as West Nile virus and Japanese encephalitis virus (Chen *et al.*, 2000, 2004; Diniz *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2010; Verma *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2012; Hussmann *et al.*, 2013; Hussmann & Fredericksen, 2014). However, cultured astrocytes were not sensitive to infection with dengue virus (Imbert *et al.*, 1994). In this study, we showed that primary human astrocytes could be infected with TBEV and produce relatively high virus titres (Fig. 1). The viability of the infected cells was not altered during the monitored time interval after infection (15 days), which is in accordance with the findings of a study on primary rat astrocytes (Potokar *et al.*, 2014).

In agreement with other authors (Potokar *et al.*, 2014), we can conclude that primary human astrocytes are much more resilient to TBEV infection than other cell types, such as human neuroblastoma, glioblastoma and medulloblastoma cells (Růžek *et al.*, 2009b). However, the number of infected cells in the culture did not exceed 20 % during the entire investigated period, suggesting that only a fraction of the cells is sensitive to infection, whilst the rest remain resistant. It remains unknown exactly what renders some cells sensitive to the infection and others resistant.

TBEV infection in the brain is associated with the induction of several cytokines and chemokines. Accumulation of cytokines and chemokines in the CNS may accentuate the progression of encephalitis instead of restricting virus replication (Ramesh *et al.*, 2013). Although viral infection is not generally as robust in human glial cells as in neurons, they secrete much higher levels of immune mediators, such as cytokines and chemokines (Verma *et al.*, 2011). Therefore, during the inflammatory response, astrocytes and other glial cells may influence the balance between host protection and neurotoxicity. We reported previously in a mouse study that high expression of various cytokines/chemokines during TBE is able to mediate immunopathology, and might be associated with a more severe course of infection and increased fatality (Palus *et al.*, 2013). In the present study, we observed that TBEV infection of astrocytes is associated with the dramatically increased production of various pro-inflammatory cytokines and chemokines. In particular, quantitative real-time RT-PCR and ELISA indicated that the expression/production of IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN- α , TNF- α , IP-10/CXCL10 and MIP-1 β /CCL4 was significantly elevated in TBEV-infected astrocytes (Figs 3 and 4), which is consistent with other studies describing cytokine/chemokine production by flavivirus-infected astrocytes (Verma *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2012; Hussmann & Fredericksen, 2014). The greatest increase in cytokine/chemokine production was observed between days 2 and 3 p.i. (Figs 3 and 4). This finding was consistent

with the time of peak virus production in HBCAs (Fig. 1b).

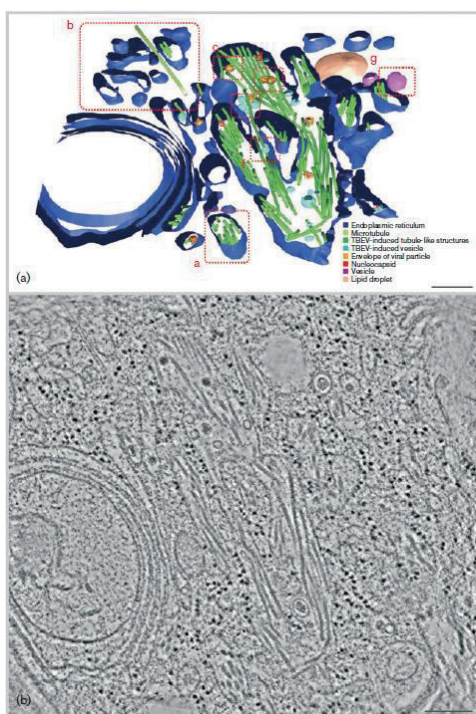


Fig. 9. Tubule-like structures observed in TBEV-infected HBCAs at 3 days p.i. This is a 3D reconstruction of a dual axis tomogram (a) and a slice of the tomogram (b). Tilt series images were collected in the range $\pm 65^\circ$ in 0.65° increments. The final reconstructed section thickness was approximately 60 nm, which was divided into 75 slices. Pixel resolution: 0.81 nm. Bars, 200 nm. This tomogram is shown in Movie S1.

Cytokines such as $\text{TNF-}\alpha$ and $\text{IL-1}\beta$ have been reported as potent inducers of neuronal injury (Brabers & Nottet, 2006; Ghoshal *et al.*, 2007; McColl *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2010; Verma *et al.*, 2011). $\text{IL-1}\beta$, IL-6 and IL-8 are endogenous pyrogens that exert multiple downstream inflammatory signalling pathways (Verma *et al.*, 2011). These cytokines are elevated during various CNS infections, including TBE (Palus *et al.*, 2013). Increased concentrations of pro-inflammatory cytokines, including $\text{TNF-}\alpha$ and

IL-6 , were detected in sera from TBE patients, and their elevated levels corresponded with the acute phase of the disease (Atrasheuskaya *et al.*, 2003). The chemokine IP-10 has the ability to attract activated T-cells in the CNS (Klein *et al.*, 2005). Excessively high levels of IP-10 in the CNS can be very harmful to the host (Sasseville *et al.*, 1996; Westmoreland *et al.*, 1998; Sui *et al.*, 2006), possibly by activating a calcium-dependent apoptotic pathway (Sui *et al.*, 2004). In human TBE patients, higher levels of IP-10 can be detected in serum, as well as in cerebrospinal fluid (Lepej *et al.*, 2007; Zajkowska *et al.*, 2011). The attraction of CD8^+ T-cells to the CNS by IP-10 can have important consequences for viral clearance, as well as for immunopathological reactions observed during TBE (Růžek *et al.*, 2009a). Similar to our study, astrocytes have been described as a predominant source of IP-10 in Japanese encephalitis (Bhowmick *et al.*, 2007). The expression of MCP-1/CCL2 , a compound that is able to disrupt the integrity of the BBB and modulate the progression of neuroinflammation (Yao & Tsirka, 2014), is highly upregulated in TBEV-infected brain tissue (Palus *et al.*, 2013). However, its expression was not increased in astrocytes after TBEV infection in the present study, suggesting that astrocytes are not responsible for the production of this cytokine in the CNS during TBE. Together, TBEV-infected astrocytes produce a variety of cytokines that can mediate a diverse range of neurodegenerative functions, including disruption of the BBB, chemoattraction of peripheral immune cells into the CNS and neuronal damage.

We reported previously that TBE is associated with the disruption of BBB integrity, which is most likely caused by cytokine/chemokine overproduction in the brain (Růžek *et al.*, 2011). In human TBE patients, higher levels of MMP-9 (a compound with multiple functions, including disruption of the BBB) have been observed in serum (Palus *et al.*, 2014) and cerebrospinal fluid (Kang *et al.*, 2013). However, it was not clear which cells were involved in MMP-9 production and BBB disruption. In the present study, we observed that TBEV-infected astrocytes produced large quantities of MMP-9 (Fig. 5), and therefore might

represent the main cell population responsible for the increase of BBB permeability during TBE.

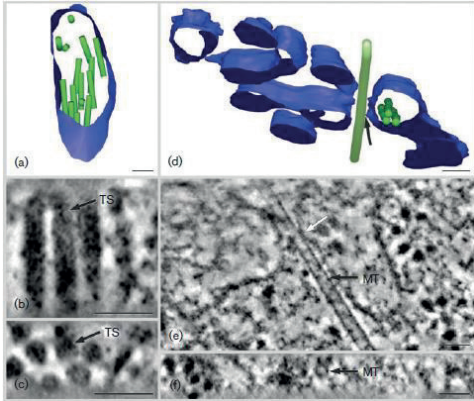


Fig. 10. Comparison of the ultrastructure of tubule-like structures (a–c) and a microtubule (d, e) in TBEV-infected HBCAs. (a–c) Detail of tubule-like structures from Fig. 9(a), area a. The model is shown in (a), a slice of a dual axis tomogram in (b) and the side view in (c). (d–f) Detail of microtubule from Fig. 9(a), area b. The model is shown in (d), a slice of a dual axis tomogram in (e) and the side view in (f). The white arrow in (e) indicates a connection between the microtubule and the membrane of the RER. Tilt series images were collected in the range $\pm 65^\circ$ in 0.65° increments. The final reconstructed section thickness was approximately 60 nm, which was divided into 75 slices. Pixel resolution: 0.81 nm. Bars, 50 nm.

The entry of TBEV into the CNS precedes the breakdown of the BBB (Růžek *et al.*, 2011). The invasion of TBEV into the CNS brings the virus into close proximity with the second component of the BBB, astrocytes (Hussmann *et al.*, 2013). TBEV-activated astrocytes then produce MMP-9, which might cause the BBB breakdown. Moreover, MMP-9 is capable of causing neuronal apoptosis (del Zoppo, 2010).

Additional evidence of astrocyte activation by TBEV was demonstrated by the increased production of GFAP (Fig. 6). GFAP is involved in many important CNS processes, including cell communication and BBB function. Increased GFAP expression/production as a marker of astrocyte

activation has been documented in many studies (Brodie *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 2004; Pozner *et al.*, 2008; Watanabe *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2010; Fan *et al.*, 2011; Ojeda *et al.*, 2014), represents one of the earliest responses to CNS injury and is a distinguishing feature of reactive astrogliosis (Montgomery, 1994). The activation of glial cells including astrocytes represents one of the major histopathological features of TBE (Környey, 1978; Gelpi *et al.*, 2006). The astrocyte activation leads to a downstream cascade of inflammatory cytokine production that results in the death of neurons (Kumar *et al.*, 2010; Pekny *et al.*, 2014).

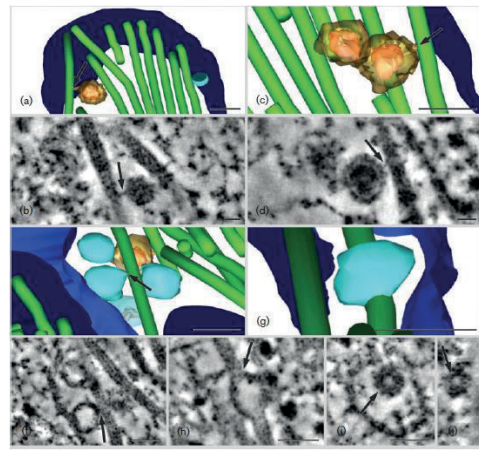


Fig. 11. 3D architecture of tubule-like structures observed in TBEV-infected HBCAs. The connection (arrow) between tubulelike structures and enveloped virions in the model (a, c, e, g) and in a slice of a dual axis tomogram (b, d, f, h). Enlargement of Fig. 9(a), areas c (a, b), d (c, d), e (e, f) and f (g, h) is shown. Supposed subviral particle enclosed in the vesicle outside the RER, detail from Fig. 9(a), area g, is shown in the tomogram top view (i) and side view (j). Tilt series images were collected in the range $\pm 65^\circ$ in 0.65° increments. The final reconstructed section thickness was approximately 60 nm, which was divided into 75 slices. Pixel resolution, 0.81 nm. Bars, 50 nm.

In our study, GFAP production was higher in TBEV-infected astrocytes than in mock-infected or LPS-stimulated astrocytes. Treatment with LPS had no effect on GFAP production at 3 and 7 days after

treatment, which is in accordance with a previous study that demonstrated that LPS downregulates the expression of GFAP mRNA (Letournel-Boulland *et al.*, 1994). However, on day 15 post-treatment, LPS treatment increased GFAP production in astrocytes compared with controls, although at a lower level than in TBEV-infected cells (Fig. 6a, b).

We demonstrated previously that TBEV infection of human neural cells (neuroblastoma, medulloblastoma and glioblastoma cells) is associated with a number of morphological changes. The infection of medulloblastoma and glioblastoma cells led to proliferation of the RER and extensive rearrangement of cytoskeletal structures (Růžek *et al.*, 2009b). With the exception of typical remodelling of the RER (Figs 7 and 8), here we have described the morphology and 3D organization of TBEV-induced structures, called tubule-like structures, located in the RER of infected HBCAs (Figs 9–11). Tubular structures (also called elongated vesicles or rod-like particles) of sizes ranging from 50 to 100 nm in diameter and 100 nm to 3.5 μm in length have been reported previously inside the RER of other cells infected with either tick-borne flaviviruses (Lorenz *et al.*, 2003; Offerdahl *et al.*, 2012) or mosquito-borne flaviviruses (Welsch *et al.*, 2009). Tubules with closed ends and without pores or connections to other tubules or other structures have been observed in the RER of ISE-6 tick cells persistently infected with Langat virus (Offerdahl *et al.*, 2012). Tubular structures measuring 50 nm in diameter have been found in mammalian COS-1 cells expressing proteins prM and E of TBEV (Lorenz *et al.*, 2003). We supposed that enveloped virus particles were also connected to tubule-like structures in TBEV-infected neuroblastoma cells (Růžek *et al.*, 2009b; Fig. 5). However, the tubular structures that we observed in TBEV-infected astrocytes differed from those reported previously with respect to diameter and the appearance of the inner part of the structure. The presence of these tubule-like structures solely in the RER and their small diameter dispute their microtubular origin. Although the function and origin of the tubule-like structures remain

unexplained, these structures appear to be a feature of persistent infection (Lorenz *et al.*, 2003; Offerdahl *et al.*, 2012). We propose that viral activity leads to the production of tubule-like structures, either directly as a result of defective virus assembly, or due to disruption of the host's cellular metabolism.

In TBEV-infected HBCAs at 9 days p.i., we observed the presence of swollen mitochondria next to mitochondria without any ultrastructural alterations. This finding might indicate irreversible injury of some astrocytic mitochondria that is connected with the permeability of mitochondrial membranes and the uptake of water from the cytosol. The remaining mitochondria inside astrocytes may help maintain the energy balance, supporting cell survival and thus contributing (as the glial cells) to neuronal protection. The absence of TBEV particles and lack of ultrastructural alteration in other HBCAs in the culture is in accordance with immunofluorescence staining and the observation of Potokar *et al.* (2014) regarding the resistance of astrocytes to TBEV-mediated cell death. In contrast to previous observations of TBEV infections of neural cells, we did not observe any signs of apoptosis (Růžek *et al.*, 2009b) or the formation of structures described recently as laminal membrane structures in neurons (Hirano *et al.*, 2014).

In summary, these results demonstrate for the first time, to the best of our knowledge, that cultured human primary astrocytes are sensitive to TBEV infection and are a potential source of pro-inflammatory cytokines in TBEV-infected brain cells, which might contribute to TBEV-induced neurotoxicity and/or BBB breakdown during TBE.

METHODS

Virus and cells. The TBEV strain Neudoerfl, a prototype strain of the European subtype, kindly provided by Professor F. X. Heinz from the Medical University of Vienna, was used in all experiments. The virus was originally isolated from the tick *Ixodes ricinus* in Austria in 1971. The virus has been characterized extensively, including its genome sequence

(GenBank accession no. U17495) and the 3D structure of its envelope protein, E (Rey *et al.*, 1995). The virus was passaged four times by infecting suckling mice intracranially before its use in the present study.

HBCAs were purchased from ScienCell at passage 1 and propagated in CSC Complete Medium with 10% serum (ACBR) at 37 °C and 5% CO₂. In all experiments, low-passage-number cells were used. Porcine kidney stable (PS) cells (Kožuch & Mayer, 1975) were grown at 37 °C in L-15 medium supplemented with 3% newborn calf serum and a 1% antibiotic mixture of penicillin and streptomycin (Sigma).

Viral growth in HBCAs. Monolayer HBCA cultures grown in 96-well plates were inoculated with virus diluted in the culture medium to an m.o.i. of 5. Virus-mediated CPE was investigated using light microscopy. At 0, 1, 2, 3, 5, 7, 9 and 15 days p.i., supernatant medium from appropriate wells was collected and frozen at -70 °C. Titres were determined by plaque assay.

Plaque assay. Virus titres were assayed on PS cell monolayers, as described previously (De Madrid & Porterfield, 1969). Briefly, 10-fold dilutions of the virus sample were placed in 24-well tissue culture plates and PS cells were added in suspension (0.6×10^5 – 1.5×10^5 cells per well). After incubation for 4 h, the suspension was overlaid with carboxymethylcellulose (1.5% in L-15 medium). After incubation for 5 days at 37 °C, the plates were washed with PBS, and the cell monolayers were stained with naphthalene black. Infectivity was expressed as p.f.u. ml⁻¹.

Immunofluorescence staining. Infected and non-infected cells on slides were subjected to cold acetone : methanol (1 : 1) fixation for 10 min, rinsed in PBS and blocked with 10% FBS. Cells were labelled with flavivirus-specific mAb (1 : 250; Sigma-Aldrich) or with anti-GFAP antibody conjugated with Alexa Fluor 488 (1 : 200, eBioscience) for 1 h at 37 °C. Flavivirus-specific, mouse mAb and anti-PDIA3 rabbit antibody (1 : 250; Sigma-Aldrich) were used for double labelling.

After washing with Tween 20 (0.05 %, v/v) in PBS, the cells were labelled with anti-mouse, goat secondary antibody conjugated with FITC (1 : 500; Sigma-Aldrich) or anti-rabbit, goat secondary antibody conjugated with Atto 550 NHS (1 : 500, Sigma-Aldrich) for 1 h at 37 °C. The cells were counterstained with DAPI (1 mgml⁻¹; Sigma) for 30 min at 37 °C, mounted in 2.5% 1,4-diazabicyclo(2.2.2)octane (Sigma) and examined with an Olympus BX-51 fluorescence microscope equipped with an Olympus DP-70 CCD camera.

Flow cytometry. HBCAs were cultured in a 96-well plate at a concentration of 5×10^4 cells ml⁻¹ and infected with the TBEV strain Neudoerfl (m.o.i. of 5) 1 day after seeding. Mock-infected or LPStreated (at a final concentration of 100 ng ml⁻¹) cells were used as controls. Cells were harvested at 3, 7 and 15 days p.i. Astrocytes were fixed with a Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience). Briefly, the cultured cells were washed twice with Dulbecco's PBS (Sigma-Aldrich), trypsinized, inactivated with FCS and centrifuged at 160 g for 5 min at 4 °C. Harvested cells were fixed and permeabilized for 45 min according to the manufacturer's protocol. An anti-flavivirus group antigen antibody (1 : 500; Merck-Millipore) and a secondary FITC-conjugated anti-mouse polyvalent antibody (1 : 500; Sigma-Aldrich) were used to stain the TBEV-positive cells. An anti-GFAP antibody (1 : 100, Santa Cruz) conjugated to Alexa Fluor 488, was used to stain GFAP-positive cells. The cells were washed with 16 permeabilization buffer after each staining and centrifuged at 300 g for 5 min at room temperature. Finally, the cells were resuspended in 1% FCS and used for flow cytometry analysis on a BD FACS Canto II with BDFACS Diva software. Obtained data were analysed using Flowing Software 2, version 2.5.1 (Perttu Terho, University of Turku, Finland).

Quantitative real-time RT-PCR. Total RNA was extracted from TBEV-infected HBCAs and control cells and cDNA was synthesized by reverse transcription using an Ambion Cells-to-CT kit (Applied Biosystems)

according to the manufacturer's instructions. The synthesized cDNAs were used as templates for quantitative real-time PCR. The PCR was performed using pre-developed TaqMan Assay Reagents [Assay IDs: IL-6 (Hs00985639_m1), IL-1 β (Hs01555410_m1), IL-8 (Hs00174103_m1), IFN- α (Hs00819693_sH), TNF- α (Hs00174128_m1), MIP-1b/CCL4 (Hs99999148_m1), MCP-1/CCL2 (Hs00234140_m1) and IP-10 (Hs01124251_g1)] and TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) on a Rotor Gene-3000 (Corbett Research). Human b-actin (Hs99999903_m1) and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Hs03929097_g1) were used as housekeeping genes. The amplification conditions were as follows: 2 min at 50 °C (to allow UNG to destroy any contaminating templates); 10 min at 95 °C (to denature UNG and activate the enzymes); 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s and annealing/extension at 60 °C for 1 min.

To calculate the fold change in gene expression, the cycle threshold (C_t) of the housekeeping genes was subtracted from the C_t of the target gene to yield ΔC_t . Change in expression of the normalized target gene was expressed as $2^{-\Delta\Delta C_t}$, where $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t\text{sample}} - \Delta C_{t\text{control}}$, as described previously (Livak & Schmittgen, 2001).

Viral RNA was quantified in cells grown in 96-well plates at 0, 2, 7 and 15 days p.i. with TBEV strain Neudoerfl (m.o.i. of 5). The cells were lysed using an Ambion Cells-to-CT kit and subsequently subjected to RNA purification with a QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Viral RNA was quantified using a TBEV Real-time RT-PCR kit (Liferiver) on a Rotor Gene-3000 (Corbett Research) following the manufacturer's instructions.

ELISA. We used human ELISA kits (Invitrogen) to measure the effect of TBEV exposure on cytokine/chemokine and MMP-9 expression in HBCAs. Mock-infected and TBEV-infected HBCAs were plated in 96-well plates at a density of 2×10^4 cells per well and infected 24 h later. The cells were infected with TBEV

(m.o.i. of 5) and mock infected with the same dilution of brain suspension without virus. At 0, 1, 2, 3, 4, 5, 9 and 15 days p.i., supernatant medium from appropriate wells was collected and frozen at -70 °C. Cell supernatants were then assayed for CXCL10/IP10 (Human ELISA kit, KAC2361; Invitrogen), MIP-1b (Human ELISA kit, KAC2291; Invitrogen) and MMP-9 (Human ELISA kit, KHC3061; Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

Transmission electron microscopy and electron tomography. TBEV-infected and control HBCAs that had been grown on sapphire discs were high-pressure frozen at either 3 or 9 days p.i. in the presence of 20% BSA diluted in growing medium using a Leica EM PACT2 high-pressure freezer. Freeze substitution (Leica EM AFS2) was carried out in 2% osmium tetroxide diluted in 100% acetone at -90 °C for 16 h, and then warmed up at a rate of 5 °C h^{-1} to remain at -20 °C for 14 h, and finally warmed up again at the same rate to a final temperature of 4 °C. Samples were rinsed three times in anhydrous acetone at room temperature and infiltrated stepwise in acetone mixed with SPI-pon resin (SPI) (acetone : SPI ratios of 2 : 1, 1 : 1 and 1 : 2, for 1 h at each step). The samples, now in pure resin, were polymerized at 60 °C for 48 h.

Sections were prepared using a Leica Ultracut UCT microtome (Leica Microsystems) and collected on 300 mesh copper grids. Staining was performed using alcoholic uranic acetate for 30 min and in lead citrate for 20 min. Images were obtained using a JEOL 2100F or JEOL 1010 transmission electron microscope. For electron tomography, protein A-conjugated 10 nm gold nanoparticles (Aurion) were added to both sides of each section as fiducial markers.

Tilt series images were collected in the range of $\pm 65^\circ$ with 0.65° increments using a 200 kV JEOL 2100F transmission electron microscope equipped with a high-tilt stage and Gatan camera (Orius SC 1000) and controlled by SerialEM automated acquisition software (Mastronarde, 2005). Images were aligned using the fiducial markers. Electron tomograms

were reconstructed using the IMOD software package. Manual masking of the area of interest was employed to generate a 3D surface model (Kremer et al., 1996).

Statistical analysis. Data were analysed using version 5.04 of the GraphPad Prism5 software program (GraphPad Software). ELISA measurements of increased chemokine and cytokine production were analysed using one-way ANOVA (Tukey's multiple comparison test). All other data were analysed using one-way ANOVA (Newman-Keuls multiple comparison test). Differences of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are indebted to Professors Jan Kopecký and Libor Grubhoffer and Dr Jana Nebesářová for general support of our work. This work was supported by the Academy of Sciences of the Czech Republic (Z60220518), Czech Science Foundation (projects nos P502/11/2116, P302/12/2490 and GA14-29256S), the MEYS of the Czech Republic (project LO1218) under the NPU I programme, Grant Agency of the University of South Bohemia (127/2014/P), and Technology Agency of the Czech Republic (TE 01020118). The founders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

REFERENCES

- Atrasheuskaya, A. V., Fredeking, T. M. & Ignatyev, G. M. (2003). Changes in immune parameters and their correction in human cases of tick-borne encephalitis. *Clin Exp Immunol* **131**, 148–154.
- Balsitis, S. J., Coloma, J., Castro, G., Alava, A., Flores, D., McKerrow, J. H., Beatty, P. R. & Harris, E. (2009). Tropism of dengue virus in mice and humans defined by viral nonstructural protein 3-specific immunostaining. *Am J Trop Med Hyg* **80**, 416–424.
- Bhowmick, S., Duseja, R., Das, S., Appaiahgiri, M. B., Vrati, S. & Basu, A. (2007). Induction of IP-10 (CXCL10) in astrocytes following Japanese encephalitis. *Neurosci Lett* **414**, 45–50.
- Brabers, N. A. & Nottet, H. S. (2006). Role of the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β in HIV-associated dementia. *Eur J Clin Invest* **36**, 447–458.
- Brodie, C., Weizman, N., Katzoff, A., Lustig, S. & Kobiler, D. (1997). Astrocyte activation by Sindbis virus: expression of GFAP, cytokines, and adhesion molecules. *Glia* **19**, 275–285.
- Chen, C. J., Liao, S. L., Kuo, M. D. & Wang, Y. M. (2000). Astrocytic alteration induced by Japanese encephalitis virus infection. *Neuroreport* **11**, 1933–1937.
- Chen, C. J., Chen, J. H., Chen, S. Y., Liao, S. L. & Raung, S. L. (2004). Upregulation of RANTES gene expression in neuroglia by Japanese encephalitis virus infection. *J Virol* **78**, 12107–12119.
- de Araújo, J. M., Schatzmayr, H. G., de Filippis, A. M., Dos Santos, F. B., Cardoso, M. A., Britto, C., Coelho, J. M. & Nogueira, R. M. (2009). A retrospective survey of dengue virus infection in fatal cases from an epidemic in Brazil. *J Virol Methods* **155**, 34–38.
- De Madrid, A. T. & Porterfield, J. S. (1969). A simple micro-culture method for the study of group B arboviruses. *Bull World Health Organ* **40**, 113–121.
- del Zoppo, G. J. (2010). The neurovascular unit, matrix proteases, and innate inflammation. *Ann N Y Acad Sci* **1207**, 46–49.
- Desai, A., Shankar, S. K., Ravi, V., Chandramuki, A. & Gourie-Devi, M. (1995). Japanese encephalitis virus antigen in the human brain and its topographic distribution. *Acta Neuropathol* **89**, 368–373.
- Diniz, J. A., Da Rosa, A. P., Guzman, H., Xu, F., Xiao, S. Y., Popov, V. L., Vasconcelos, P. F. &

- Tesh, R. B. (2006).** West Nile virus infection of primary mouse neuronal and neuroglial cells: the role of astrocytes in chronic infection. *Am J Trop Med Hyg* **75**, 691–696.
- Erickson, M. A., Dohi, K. & Banks, W. A. (2012).** Neuroinflammation: a common pathway in CNS diseases as mediated at the blood–brain barrier. *Neuroimmunomodulation* **19**, 121–130.
- Fan, Y., Zou, W., Green, L. A., Kim, B. O. & He, J. J. (2011).** Activation of Egr-1 expression in astrocytes by HIV-1 Tat: new insights into astrocyte-mediated Tat neurotoxicity. *J Neuroimmune Pharmacol* **6**, 121–129.
- Gelpi, E., Preusser, M., Garzuly, F., Holzmann, H., Heinz, F. X. & Budka, H. (2005).** Visualization of Central European tick-borne encephalitis infection in fatal human cases. *J Neuropathol Exp Neurol* **64**, 506–512.
- Gelpi, E., Preusser, M., Laggner, U., Garzuly, F., Holzmann, H., Heinz, F. X. & Budka, H. (2006).** Inflammatory response in human tick-borne encephalitis: analysis of postmortem brain tissue. *J Neurovirol* **12**, 322–327.
- German, A. C., Myint, K. S., Mai, N. T., Pomeroy, I., Phu, N. H., Tzartos, J., Winter, P., Collett, J., Farrar, J. & other authors (2006).** A preliminary neuropathological study of Japanese encephalitis in humans and a mouse model. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **100**, 1135–1145.
- Ghoshal, A., Das, S., Ghosh, S., Mishra, M. K., Sharma, V., Koli, P., Sen, E. & Basu, A. (2007).** Proinflammatory mediators released by activated microglia induces neuronal death in Japanese encephalitis. *Glia* **55**, 483–496.
- Gillespie, L. K., Hoenen, A., Morgan, G. & Mackenzie, J. M. (2010).** The endoplasmic reticulum provides the membrane platform for biogenesis of the flavivirus replication complex. *J Virol* **84**, 10438–10447.
- Gritsun, T. S., Frolova, T. V., Zhankov, A. I., Armesto, M., Turner, S. L., Frolova, M. P., Pogodina, V. V., Lashkevich, V. A. & Gould, E. A. (2003).** Characterization of a Siberian virus isolated from a patient with progressive chronic tick-borne encephalitis. *J Virol* **77**, 25–36.
- Haglund, M. & Günther, G. (2003).** Tick-borne encephalitis–pathogenesis, clinical course and long-term follow-up. *Vaccine* **21** (Suppl. 1), S11–S18.
- Hirano, M., Yoshii, K., Sakai, M., Hasebe, R., Ichii, O. & Kariwa, H. (2014).** Tick-borne flaviviruses alter membrane structure and replicate in dendrites of primary mouse neuronal cultures. *J Gen Virol* **95**, 849–861.
- Hussmann, K. L. & Fredericksen, B. L. (2014).** Differential induction of CCL5 by pathogenic and non-pathogenic strains of West Nile virus in brain endothelial cells and astrocytes. *J Gen Virol* **95**, 862–867.
- Hussmann, K. L., Samuel, M. A., Kim, K. S., Diamond, M. S. & Fredericksen, B. L. (2013).** Differential replication of pathogenic and nonpathogenic strains of West Nile virus within astrocytes. *J Virol* **87**, 2814–2822.
- Imbert, J. L., Guevara, P., Ramos-Castañeda, J., Ramos, C. & Sotelo, J. (1994).** Dengue virus infects mouse cultured neurons but not astrocytes. *J Med Virol* **42**, 228–233.
- Kang, X., Li, Y., Wei, J., Zhang, Y., Bian, C., Wang, K., Wu, X., Hu, Y., Li, J. & Yang, Y. (2013).** Elevation of matrix metalloproteinase-9 level in cerebrospinal fluid of tick-borne encephalitis patients is associated with IgG extravasation and disease severity. *PLoS ONE* **8**, e77427.
- Klein, R. S., Lin, E., Zhang, B., Luster, A. D., Tollett, J., Samuel, M. A., Engle, M. & Diamond, M. S. (2005).** Neuronal CXCL10 directs CD8⁺ T-cell recruitment and control of West Nile virus encephalitis. *J Virol* **79**, 11457–11466.

- Környey, S. (1978).** Contribution to the histology of tick-borne encephalitis. *Acta Neuropathol* **43**, 179–183.
- Kožuch, O. & Mayer, V. (1975).** Pig kidney epithelial (PS) cells: a perfect tool for the study of flaviviruses and some other arboviruses. *Acta Virol* **19**, 498.
- Kremer, J. R., Mastronarde, D. N. & McIntosh, J. R. (1996).** Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. *J Struct Biol* **116**, 71–76.
- Kumar, M., Verma, S. & Nerurkar, V. R. (2010).** Pro-inflammatory cytokines derived from West Nile virus (WNV)-infected SK-N-SH cells mediate neuroinflammatory markers and neuronal death. *J Neuroinflammation* **7**, 73.
- Lepej, S. Z., Misić-Majerus, L., Jeren, T., Rode, O. D., Remenar, A., Sporec, V. & Vince, A. (2007).** Chemokines CXCL10 and CXCL11 in the cerebrospinal fluid of patients with tick-borne encephalitis. *Acta Neurol Scand* **115**, 109–114.
- Letournel-Boulland, M. L., Fages, C., Rolland, B. & Tardy, M. (1994).** Lipopolysaccharides (LPS), up-regulate the IL-1-mRNA and downregulate the glial fibrillary acidic protein (GFAP) and glutamine synthetase (GS)-mRNAs in astroglial primary cultures. *Eur Cytokine Netw* **5**, 51–56.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001).** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods* **25**, 402–408.
- Lorenz, I. C., Kartenbeck, J., Mezzacasa, A., Allison, S. L., Heinz, F. X. & Helenius, A. (2003).** Intracellular assembly and secretion of recombinant subviral particles from tick-borne encephalitis virus. *J Virol* **77**, 4370–4382.
- Mansfield, K. L., Johnson, N., Phipps, L. P., Stephenson, J. R., Fooks, A. R. & Solomon, T. (2009).** Tick-borne encephalitis virus – a review of an emerging zoonosis. *J Gen Virol* **90**, 1781–1794.
- Mastronarde, D. N. (2005).** Automated electron microscope tomography using robust prediction of specimen movements. *J Struct Biol* **152**, 36–51.
- McColl, B. W., Rothwell, N. J. & Allan, S. M. (2008).** Systemic inflammation alters the kinetics of cerebrovascular tight junction disruption after experimental stroke in mice. *J Neurosci* **28**, 9451–9462.
- Miorin, L., Romero-Brey, I., Maiuri, P., Hoppe, S., Krijnse-Locker, J., Bartenschlager, R. & Marcello, A. (2013).** Three-dimensional architecture of tick-borne encephalitis virus replication sites and trafficking of the replicated RNA. *J Virol* **87**, 6469–6481.
- Montgomery, D. L. (1994).** Astrocytes: form, functions, and roles in disease. *Vet Pathol* **31**, 145–167.
- Nedergaard, M., Ransom, B. & Goldman, S. A. (2003).** New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* **26**, 523–530.
- Nogueira, R. M., Filippis, A. M., Coelho, J. M., Sequeira, P. C., Schatzmayr, H. G., Paiva, F. G., Ramos, A. M. & Miagostovich, M. P. (2002).** Dengue virus infection of the central nervous system (CNS): a case report from Brazil. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **33**, 68–71.
- Offerdahl, D. K., Dorward, D. W., Hansen, B. T. & Bloom, M. E. (2012).** A three-dimensional comparison of tick-borne flavivirus infection in mammalian and tick cell lines. *PLoS ONE* **7**, e47912.
- Ojeda, D., López-Costa, J. J., Sede, M., López, E. M., Berria, M. I. & Quarleri, J. (2014).** Increased in vitro glial fibrillary acidic protein expression, telomerase activity, and telomere length after productive human immunodeficiency virus-1 infection in murine astrocytes. *J Neurosci Res* **92**, 267–274.
- Overby, A. K., Popov, V. L., Niedrig, M. & Weber, F. (2010).** Tick-borne encephalitis virus delays interferon induction and hides its

- doublestranded RNA in intracellular membrane vesicles. *J Virol* **84**, 8470–8483.
- Palus, M., Vojtíšková, J., Salač, J., Kopecký, J., Grubhoffer, L., Lipoldová, M., Demant, P. & Růžek, D. (2013).** Mice with different susceptibility to tick-borne encephalitis virus infection show selective neutralizing antibody response and inflammatory reaction in the central nervous system. *J Neuroinflammation* **10**, 77.
- Palus, M., Zampachová, E., Elsterová, J. & Růžek, D. (2014).** Serum matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 levels in patients with tick-borne encephalitis. *J Infect* **68**, 165–169.
- Pekny, M., Wilhelmsson, U. & Pekna, M. (2014).** The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. *Neurosci Lett* **565**, 30–38.
- Potokar, M., Korva, M., Jorgačevski, J., Avšič-Županc, T. & Zorec, R. (2014).** Tick-borne encephalitis virus infects rat astrocytes but does not affect their viability. *PLoS ONE* **9**, e86219.
- Pozner, R. G., Collado, S., Jaquenod de Giusti, C., Ure, A. E., Biedma, M. E., Romanowski, V., Schattner, M. & Gómez, R. M. (2008).** Astrocyte response to Junín virus infection. *Neurosci Lett* **445**, 31–35.
- Ramesh, G., MacLean, A. G. & Philipp, M. T. (2013).** Cytokines and chemokines at the crossroads of neuroinflammation, neurodegeneration, and neuropathic pain. *Mediators Inflamm* **2013**, 480739.
- Réaux-Le Goazigo, A., Van Steenwinckel, J., Rosègne, W. & Mélik Parsadaniantz, S. (2013).** Current status of chemokines in the adult CNS. *Prog Neurobiol* **104**, 67–92.
- Rey, F. A., Heinz, F. X., Mandl, C., Kunz, C. & Harrison, S. C. (1995).** The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* **375**, 291–298.
- Růžek, D., Salát, J., Palus, M., Gritsun, T. S., Gould, E. A., Dyková, I., Skallová, A., Jelínek, J., Kopecký, J. & Grubhoffer, L. (2009a).** CD8⁺ T-cells mediate immunopathology in tick-borne encephalitis. *Virology* **384**, 1–6.
- Růžek, D., Vancová, M., Tesařová, M., Ahantarig, A., Kopecký, J. & Grubhoffer, L. (2009b).** Morphological changes in human neural cells following tick-borne encephalitis virus infection. *J Gen Virol* **90**, 1649–1658.
- Růžek, D., Dobler, G. & Donoso Mantke, O. (2010).** Tick-borne encephalitis: pathogenesis and clinical implications. *Travel Med Infect Dis* **8**, 223–232.
- Růžek, D., Salát, J., Singh, S. K. & Kopecký, J. (2011).** Breakdown of the blood-brain barrier during tick-borne encephalitis in mice is not dependent on CD8⁺ T-cells. *PLoS ONE* **6**, e20472.
- Sasseville, V. G., Smith, M. M., Mackay, C. R., Pauley, D. R., Mansfield, K. G., Ringler, D. J. & Lackner, A. A. (1996).** Chemokine expression in simian immunodeficiency virus-induced AIDS encephalitis. *Am J Pathol* **149**, 1459–1467.
- Sips, G. J., Wilschut, J. & Smit, J. M. (2012).** Neuroinvasive flavivirus infections. *Rev Med Virol* **22**, 69–87.
- Stanimirovic, D. B. & Friedman, A. (2012).** Pathophysiology of the neurovascular unit: disease cause or consequence? *J Cereb Blood Flow Metab* **32**, 1207–1221.
- Sui, Y., Potula, R., Dhillon, N., Pinson, D., Li, S., Nath, A., Anderson, C., Turchan, J., Kolson, D. & other authors (2004).** Neuronal apoptosis is mediated by CXCL10 overexpression in simian human immunodeficiency virus encephalitis. *Am J Pathol* **164**, 1557–1566.
- Sui, Y., Stehno-Bittel, L., Li, S., Loganathan, R., Dhillon, N. K., Pinson, D., Nath, A., Kolson, D., Narayan, O. & Buch, S. (2006).** CXCL10-induced cell death in neurons: role of calcium dysregulation. *Eur J Neurosci* **23**, 957–964.

- Verma, S., Kumar, M. & Nerurkar, V. R. (2011).** Cyclooxygenase-2 inhibitor blocks the production of West Nile virus-induced neuroinflammatory markers in astrocytes. *J Gen Virol* **92**, 507–515.
- Watanabe, C., Kawashima, H., Takekuma, K., Hoshika, A. & Watanabe, Y. (2008).** Increased nitric oxide production and GFAP expression in the brains of influenza A/NWS virus infected mice. *Neurochem Res* **33**, 1017–1023.
- Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C. K., Walther, P., Fuller, S. D., Antony, C., Krijnse-Locker, J. & Bartenschlager, R. (2009).** Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe* **5**, 365–375.
- Westmoreland, S. V., Rottman, J. B., Williams, K. C., Lackner, A. A. & Sasseville, V. G. (1998).** Chemokine receptor expression on resident and inflammatory cells in the brain of macaques with simian immunodeficiency virus encephalitis. *Am J Pathol* **152**, 659–665.
- Yang, C. M., Lin, C. C., Lee, I. T., Lin, Y. H., Yang, C. M., Chen, W. J., Jou, M. J. & Hsiao, L. D. (2012).** Japanese encephalitis virus induces matrix metalloproteinase-9 expression via a ROS/c-Src/PDGFR/PI3K/Akt/MAPKs- dependent AP-1 pathway in rat brain astrocytes. *J Neuroinflammation* **9**, 12.
- Yao, Y. & Tsirka, S. E. (2014).** Monocyte chemoattractant protein-1 and the blood–brain barrier. *Cell Mol Life Sci* **71**, 683–697.
- Zajkowska, J., Moniuszko-Malinowska, A., Pancewicz, S. A., Muszyn´ska-Mazur, A., Kondrusik, M., Grygorczuk, S., Swierzbinska-Pijanowska, R., Dunaj, J. & Czupryna, P. (2011).** Evaluation of CXCL10, CXCL11, CXCL12 and CXCL13 chemokines in serum and cerebrospinal fluid in patients with tick borne encephalitis (TBE). *AdvMed Sci* **56**, 311–317.
- Zhou, B. Y., Liu, Y., Kim, Bo., Xiao, Y. & He, J. J. (2004).** Astrocyte activation and dysfunction and neuron death by HIV-1 Tat expression in astrocytes. *Mol Cell Neurosci* **27**, 296–305.

Kapitola 5. ČLÁNEK 2

ELECTRON TOMOGRAPHY ANALYSIS OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS INFECTION IN HUMAN NEURONS

*Tomáš Bílý †, Martin Palus †, Luděk Eyer, Jana Elsterová, Marie Vancová a
Daniel Růžek*

(† Tito autoři přispěli k této studii stejně)

Scientific Reports, Volume 5, 2015

DOI 10.1038/srep10745

Electron Tomography Analysis of Tick-Borne Encephalitis Virus Infection in Human Neurons

Tomáš Bílý^{1,2,*}, Martin Palus^{1,2,3,*}, Luděk Eyer³, Jana Elsterová^{1,2,3}, Marie Vancová^{1,2} & Daniel Růžek^{1,2,3}

¹Institute of Parasitology, Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic, Branišovská 31, CZ-37005 České Budějovice, Czech Republic.

²Faculty of Science, University of South Bohemia, Branišovská 31, CZ-37005 České Budějovice, Czech Republic.

³Department of Virology, Veterinary Research Institute, Hudcova 70, CZ-62100 Brno, Czech Republic.

Tick-borne encephalitis virus (TBEV) causes serious, potentially fatal neurological infections that affect humans in endemic regions of Europe and Asia. Neurons are the primary target for TBEV infection in the central nervous system. However, knowledge about this viral infection and virus-induced neuronal injury is fragmental. Here, we directly examined the pathology that occurs after TBEV infection in human primary neurons. We exploited the advantages of advanced high-pressure freezing and freeze-substitution techniques to achieve optimal preservation of infected cell architecture. Electron tomographic (ET) reconstructions elucidated high-resolution 3D images of the proliferating endoplasmic reticulum, and individual tubule-like structures of different diameters in the endoplasmic reticulum cisternae of single cells. ET revealed direct connections between the tubule-like structures and viral particles in the endoplasmic reticulum. Furthermore, ET showed connections between cellular microtubules and vacuoles that harbored the TBEV virions in neuronal extensions. This study was the first to characterize the 3D topographical organization of membranous whorls and autophagic vacuoles in TBEV-infected human neurons. The functional importance of autophagy during TBEV replication was studied in human neuroblastoma cells; stimulation of autophagy resulted in significantly increased dose-dependent TBEV production, whereas the inhibition of autophagy showed a profound, dose-dependent decrease of the yield of infectious virus.

*These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to D.R. (email: ruzekd@paru.cas.cz)

Tick-borne encephalitis virus (TBEV), a member of the *Flaviviridae* family, genus *Flavivirus*, causes tick-borne encephalitis (TBE) in humans, a neuroinfection prevalent in large areas of Europe and North-eastern Asia. Humans develop a febrile illness, and a subset of cases progress to neurological manifestations ranging from mild meningitis to severe encephalomyelitis^{1,2}. Despite the medical importance of TBE, some crucial steps in the development of encephalitis remain poorly understood. TBEV is mainly transmitted to the host when infected ticks feed. Virus replication is first

detected in draining lymph nodes; this is followed by development of viremia; during the secondary viremic phase, the virus crosses the blood-brain barrier (BBB) and enters the brain³. Major hallmarks of TBEV neuropathogenesis are neuroinflammation, followed by neuronal death^{4,5}, and disruption of the BBB^{3,6}. Neuronal injury may be directly caused by viral infection, but destruction has also been attributed to infiltrating immunocompetent cells (mainly CD8⁺ T-cells), inflammatory cytokines, and activated microglial cells^{2,7,8}. Tissue culture models of TBEV infections in primary

neurons can distinguish between injuries caused by the virus and those caused by the immune response^{9,10}. Various cellular models, including neuronal cell lines, primary cultures of embryonic or neonatal mouse and rat neuronal cells, and neurons derived from embryonic stem cells, have been used to explore infections with various neurotropic viruses (e.g., polio, herpes simplex type 1, varicella-zoster, West Nile, Japanese encephalitis, and rabies)^{10–13}. We previously examined TBEV infections in human neural (neuroblastoma, glioblastoma, and medulloblastoma) cell lines¹⁴. On the ultrastructural level, the infection caused massive morphological changes in cells, including the proliferation and rearrangement of rough endoplasmic reticulum (RER) and signs of apoptosis or necrosis¹⁴.

Recently, replication features of neurotropic flaviviruses, West Nile virus, Japanese encephalitis virus, and TBEV were compared in primary mouse neuronal cultures. Viral antigen accumulation in neuronal dendrites was induced to a greater extent in a TBEV infection than in infections with the other flaviviruses¹⁵. TBEV replication induced characteristic ultrastructural membrane alterations in neurites, known as laminal membrane structures (LMSs)¹⁵. However, conventional chemical fixation for sample visualization presents obstacles in obtaining sufficient morphological detail¹⁶. Therefore, in the present study, we exploited the advantages of high-pressure freezing and freeze-substitution techniques to improve the preservation of virally modified structures in TBEV-infected neurons.

Here, we visualized TBEV infections in primary human neurons in three-dimensional (3D) space at ultrastructural resolution with electron tomography. To the best of our knowledge, this study was the first to visualize the architecture of cellular components involved in TBEV replication and transport in neurons and the major ultrastructural changes that occur in response to TBEV infections. These novel data revealed the neuronal injury caused by TBEV infections, independent of the immune system response. Our results may facilitate

the development of novel strategies for treating this serious human neuroinfection.

RESULTS

Replication of TBEV and distribution of virus antigen in human neurons. We employed a plaque assay to determine TBEV infection and replication kinetics in human neurons (HNs; Fig. 1A). The HNs were infected with TBEV, and at 0, 3, 5, 7, and 12 days post infection (p.i.), cell supernatants were collected. Productive TBEV replication was detected in the form of released virions on day 3 p.i. The virus titer in the culture supernatant remained the same until the end of the experiment (Fig. 1A).

Immunofluorescence staining was used to assess viral antigen distribution in HNs. Viral antigen was not detected in mock-infected HNs. Immunofluorescence staining revealed that TBEV antigen was mostly distributed diffusely throughout the entire neuron bodies at early time points after infection (Fig. 1B). However, at later time points, we observed brightly stained aggregates of viral antigen in some cells (Fig. 1B). A co-localization study with protein disulphide isomerase family a, member 3 (PDIA3) antigen (also known as Erp57, Er-60, and GRP58) suggested that the viral antigen was localized primarily in the hypertrophied, rearranged RER. Occasionally, we observed viral antigen accumulation in the dendrites of TBEV-infected HNs (Figs. 1B,2A,B, yellow arrows). Viral antigen also accumulated in association with RER alterations, such as large whorl formations (Fig. 2B, white arrows), or in places that exhibited a local loss of network structure (Fig 2C). In the latter locations, RER alterations were accompanied by the presence of numerous longitudinal fibers (white arrows) that were positively immunolabeled with anti-viral protein E (Figs. 1B, 2C).

TBEV-induced RER alterations and formation of tubule-like structures in HNs. Mock-infected and TBEV-infected HNs were examined with transmission electron microscopy at two time points (3 and 12 days p.i.) to delineate TBEV-induced morphological structures that were associated with early and late phases

of the infection. Compared to mock-infected HNs, TBEV-infected cells exhibited a broad range (a complex set) of virus-induced subcellular structural changes at both time points.

At 3 days p.i., HN RER cisternae contained several resident virions (approximately 45 nm in diameter), virus-induced vesicles, and tubule-like structures (Fig. 3). Virus-induced vesicles were often arranged in two tightly apposed cisterns of the RER. Some of these vesicles contained electron-dense material, which represented newly-formed nucleocapsids (Fig. 3C,D). In other parts of the RER compartment, the cisterns accommodated tubule-like structures that ran either in parallel lines or in different directions (Fig. 3C,D, movie S1). The tubule-like structures measured 22 ± 1.3 nm ($N = 51$) in diameter.

The tubule-like structures were frequently observed at both investigated time points in TBEV-infected HNs. In several cases, tubule-like structures with different diameters (e.g., 22 ± 1.3 nm and 43.8 ± 4.3 nm, $N = 7$) were observed separately in the RER cisternae of single cells (Fig. 4A–D, movie S2); typically, virus-induced vesicles and virions were observed in neighboring RER spaces (Fig. 4B–D; Fig. 3C,D).

A prominent morphological change in TBEV-infected HNs was proliferation of the RER membranes that harbored sites of TBEV replication (Fig. 5A,B, movie S3). The proliferative parts of the RER were devoid of ribosomes (Fig. 5A, inset; movie S3, whitearrows). At the later time point (12 days p.i.), proliferated RER had rearranged into large whorls (Fig. 5C,D, movie S4). The 3D reconstruction showed complex, lamellar whorls that enclosed a central space containing the cytoplasm of the same structure, and an electron-density as outside, limited by four membranes (Fig. 5D, light blue, movie S5). Numerous flattened ER cisternae were located on the periphery (Fig. 5D, blue). Electron tomography confirmed a continuation/connection of this peripheral part with the RER space, which accommodated TBEV-induced structures (vesicles or tubule-like structures) (Fig. 5D). These observations suggested

that the membranous whorls were formed from the peripheral parts of the ER due to extensive ER stress. The large whorls did not contain virions or virus-induced structures. The central part of the whorl had features of an autophagosome, but it did not show signs of degraded content. Finally, we observed a tiny connection between two primary virus-induced structures, as shown in detail in a slice of the tomogram (Fig. 5E) and in the 3D model (Fig. 5F; movie S5).

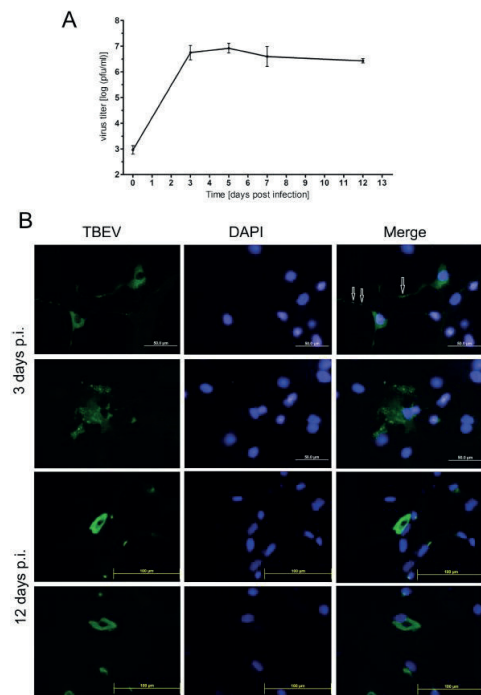


Figure 1. TBEV can infect human neurons. (A) TBEV titers in culture supernatants from HNs collected at 0, 3, 5, 7, and 12 days post-infection (p.i.) were determined in plaque assays with porcine kidney stable cells. Viral titers are expressed as pfu/ml. Data represent means \pm SEM. (B) HNs grown and fixed on slides at days 3 and 12 p.i. were stained with anti-flavivirus envelope antibody (green) and counterstained with DAPI (blue). TBEV-infected HNs immunostained with flavivirus-specific antibody demonstrated virus replication in the cytoplasm at an early time point (3 days p.i.); antigen accumulated into aggregates at later a time point (12 days p.i.). Mock-infected HNs stained with primary and secondary antibodies were used

as a negative control, and did not exhibit any TBEV antigen staining (not shown). The arrows indicate accumulation of viral antigen in dendrites of the infected HNs.

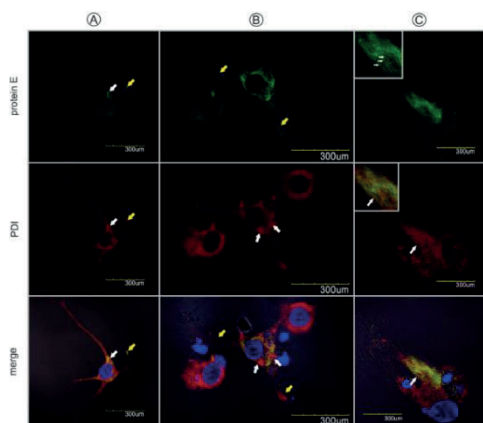


Figure 2. Confocal images of human neurons infected with TBEV. Neurons were fixed at (A,B) 3 days p.i. and (C) 12 days p.i. and double immunolabeled with antibodies against TBEV protein E (green) (*top panels*), PDIA3 (red) (*middle panels*), and (*merge panels*) counterstained with DAPI. (A) Replication complexes were observed in the perikaryon (white arrow) and dendrites (yellow arrow). (B) Infected cells with intact endoplasmic reticulum networks were observed next to infected cells with large whorls (white arrows). (C) Localization of viral protein E in the numerous longitudinal fibers (white arrows) associated with the ER.

Signs of autophagy observed in TBEV-infected HNs. In several cases, particularly in HN extensions, which represented dendrites, we observed that the TBEV replication space was enclosed by flattened ER cisternae. This suggested the formation of autophagosomes that sequestered cell structures damaged by TBEV. Electron tomography was performed to view the complex architecture of these structures. In most cases, the sequestration was incomplete, as shown in Fig. 6A–E (movie S6 and movie S7), even when the projection images suggested that the structure might be interpreted as an autophagic vacuole (Fig. 6B).

The TBEV particles and virus-induced vesicles resided in the RER (Fig. 6A,C,D, black arrows), but the enclosing ER cisternae lacked ribosomes (Fig. 6D, white arrows). Lipid droplets were also found associated with these structures (Fig. 6D,E). No morphologically similar structures were found in the extensions of mock-infected HNs (Fig. 6F). However, in the perikaryon (Fig. 6G), several autophagosomes or autophagolysosomes (with signs of degraded material) were observed. In some TBEV-infected HN extensions, we observed autophagosomes with all the typical morphological features (Fig. 7 and movie S8). These autophagosomes were limited by numerous membranes that did not have ribosomes, but they resembled rearranged, small, membranous ER whorls. In the 3D reconstruction, we have identified numerous membranes that sequestered intact mitochondria, lipid droplets, and vacuoles within the inner space with TBEV particles (Fig. 7B).

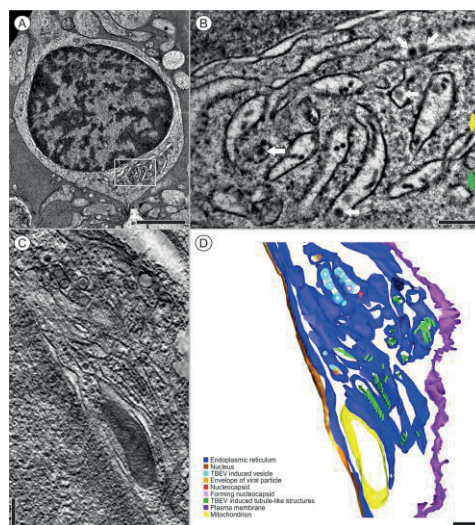


Figure 3. HNs infected with TBEV for 3 days. (A) A neuron with two cytoplasmic extensions on opposite sides of the cell body. D- Dendrite. (B) Detail of the boxed region in (A) shows the RER, which contains viral particles (44.75 nm, $n = 4$, white arrows), virus-induced vesicles (green arrow), and tubule-like structures (yellow arrow). (C,D) The presence of tubule-like structures (22 ± 1.3 nm, $N = 51$) inside the RER. (C)

A slice of the tomogram was rendered as (D) a 3D reconstruction of a single axis of the tomogram. A series of images were collected in a $\pm 65^\circ$ tilt range with 0.65° increments. Pixel resolution: 1.1 nm. This single-axis tomogram is shown in movie S1. Bars: (A) 2 μ m, (B-D) 200 nm. The transmission electron microscope images were acquired with (A,B) a JEOL 1010 80 kV and (C,D) a JEOL F2100 200 kV

Autophagy induction enhances TBEV replication.

To study whether autophagy plays a role in TBEV replication, we treated human neuroblastoma cells with rapamycin, an autophagy inducer. The cells were subsequently infected with TBEV at m.o.i. 0.1 pfu per cell. Culture supernatants were harvested after 24, 48, and 72 hours, and viral titers were determined by plaque assay. The viral yields were increased in cells treated with a range of concentrations rapamycin on day 2 and 3 p.i. (Fig. 7C). The induction levels were quite high reaching $1.5 \log_{10}$ pfu/ml higher titers in cells treated either with 0.05 or 0.1 μ M of rapamycin in comparison with the untreated control on day 3 p.i. (Fig. 7C).

Suppression of autophagy reduces TBEV replication.

To investigate the effect of spautin-1, a compound known to be an effective autophagy inhibitor, on viral replication in the neuronal cells, we tested its effects on TBEV growth in human neuroblastoma cells. The cells pretreated with a range of concentrations of spautin-1 for 30 min, were infected with TBEV at m.o.i. 0.1 pfu per cell, after which the incubation was continued in the presence of the drug. Culture supernatants were harvested after 24, 48, and 72 hours, and viral titers were determined by plaque assay. Treatment with a range of concentrations of spautin-1 showed a profound, dose-dependent inhibition of the yield of infectious virus, with statistically significant drops in TBEV titer of more than two orders of magnitude at the highest spautin-1 concentration (10 μ M) on day 3 p.i. (Fig. 7D).

Transport of the TBEV in the neuron.

One projection image of a 40-nm thick ultrathin

section showed that, in the extensions of TBEV-infected HNs, two virions (48.2 nm and 48.9 nm diameters, with nucleocapsids of 30.3 and 30.9 nm diameters, respectively) were located separately inside vacuoles that were directly connected to cellular microtubules (Fig. 8A). The presence of that connection was confirmed by examining a double-axis electron tomography ($\pm 60^\circ$ tilt range with 0.6° increments, pixel resolution: 0.55 nm), and then creating a 3D reconstruction (Fig. 8B, movie S9). Both connections are shown in detail on slices of the tomogram (Fig. 8C,D, arrows). Extensions of mock-infected HNs contained vesicles with electron-dense cores with diameters that ranged from 70 to 90 nm; those vesicles were observed in direct contact with the cytoplasm (Fig. 9A,B). Electron-dense granules (similar to the vacuoles that contained virions in Fig. 8A) were found in close proximity to bunches of microtubules and mitochondria, as seen in the transverse section (Fig. 9A). Other vesicles, 43.8 nm in diameter, but different in structure from virions (for comparison see Fig 8A), were observed in the control cells (Fig. 9C).

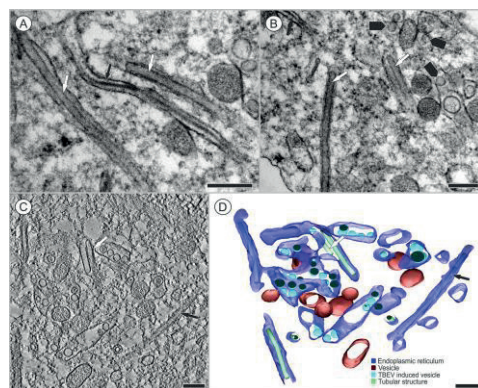


Figure 4. Tubule-like structures of different diameters were localized inside a single neuron infected with TBEV. Transmission electron microscope images were acquired at (A) 3 days p.i. or (B) 12 days p.i. (A) Inside the ER, tubules of 43.8 ± 4.3 nm ($N = 7$) in diameter (white arrows) were observed; other cisternae contained tubules of 22 ± 1.3 nm in diameter (black arrow). (B) The TBEV infection induced ER

rearrangements (black arrowheads). (C) A slice of the tomogram and (D) a 3D reconstruction of a single axis tomogram. Tilt series images were collected in the $\pm 65^\circ$ tilt range with 1° increments. Pixel resolution: 0.8 nm. This single-axis tomogram is shown in movie S2. Bars: 200 nm. (A–D) The transmission electron microscope images were acquired with a JEOL 2100F 200 kV.

We used nocodazole to assess the effect of microtubule destabilizing agent on virus growth in human neuronal cells. Nocodazole is known to induce depolymerization of actin filaments and microtubules. Human neuroblastoma cells pretreated with a range of non-cytotoxic concentrations of nocodazole for 30 min were infected with TBEV at m.o.i. 0.1 pfu per cell, after which the incubation was continued in the presence of the drug. Culture supernatants were harvested after 24, 48, and 72 hours, and viral titers were determined by plaque assay. Treatment with a range of concentrations of nocodazole showed a profound inhibition of the yield of infectious virus, with statistically significant drops in TBEV titer of more than two orders of magnitude at the all concentrations of nocodazole on days 2 and 3 p.i. (Fig. 8E).

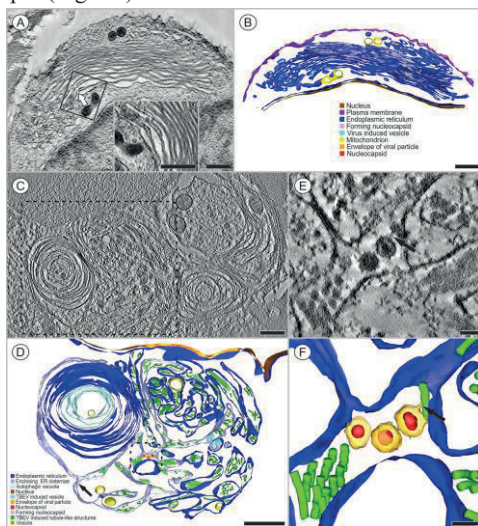


Figure 5. Proliferation of the endoplasmic reticulum observed in HNs infected with TBEV. Transmission electron microscope images

were acquired at (A,B) 3 days p.i. and (C–E) 12 days p.i. (A) TBEV particles and TBEV-induced vesicles are located inside the proliferated and reorganized cisterns of the rough endoplasmic reticulum; the boxed region is enlarged in the inset. (B) The image in (A) was rendered as a colored 3D model. (C) Large whorls are clearly observed in abnormal endoplasmic reticulum. (D) The boxed region in (C) is rendered in a 3D model to clarify the different components. (E) Lamellar whorls are surrounded by cisternae (light purple) arising (arrow) from the rough endoplasmic reticulum (blue), which accommodates tubule-like structures (green). The central part of the whorls comprises concentric circles of flattened ER cisternae (light blue). We observed several lipid droplets (yellow) in proximity of the whorls. (F) Detailed image of the boxed region in (D) shows the connection between a TBEV particle and a tubule-like structure (arrow) inside the rough endoplasmic reticulum. (F) The image in (E) was rendered as a colored 3D model. (A) A single axis tomogram; $\pm 65^\circ$ tilt range with 0.65° increments, pixel resolution: 2.2 nm; (C) a single axis tomogram, 2×2 montage, $\pm 65^\circ$ tilt range with 1° increments, pixel resolution: 0.8 nm. Bars: (A–D) 500 nm, (E,F) 50 nm. (A–F) The transmission electron microscope images were acquired with JEOL F2100 200 kV.

DISCUSSION

We demonstrated that neuronal TBEV infections produced cell-free, infectious virus by using the supernatant from TBEV-infected HNs to infect PS cells and measuring the viral titers with a plaque assay. TBEV replication was detected in the form of released virions on day 3 p.i., and the culture supernatant maintained a virus titer of approximately 107 pfu/ml until the end of the experiment (Fig. 1A). This finding suggested that the TBEV-infected HNs had apparently transitioned from an acute to a persistent infection. In a previous study, we compared TBEV growth in human neuroblastoma, glioblastoma, medulloblastoma, and PS cells. That study showed that virus replication in neural cell lines was more than 100 times more efficient than in the PS cells¹⁴. In the present study,

we showed that primary HNs were also highly sensitive to TBEV infection, and they also produced high virus titers.

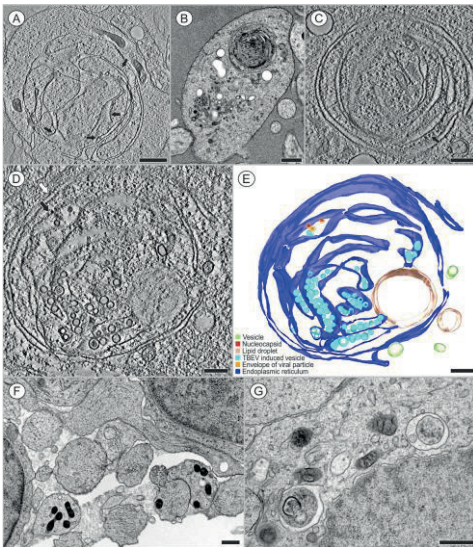


Figure 6. Formation of autophagic vacuoles in HNs infected with TBEV. Transmission electron microscope images were acquired at (A–C) 3 days p.i., (D,E) 12 days p.i., and in (F,G) mock-infected cells. (A,B) The RER (ribosomes are indicated with black arrows), which contain TBEV particles and virus-induced structures, were nearly completely sequestered by peripheral cisterns (see electron tomography in supplement) in neuronal extensions. (C) Detail of (B) shows the coiled RER with TBEV-induced structures. (D) The cisterns of the RER (ribosomes indicated with black arrow) with replicating TBEV particles and virus-induced vesicles are surrounded by one flattened ER cistern that nearly encloses this space, and a lipid droplet. Enclosing cisternae of the ER were devoid of ribosomes (white arrow). (E) 3D model of (D). (F) Similar vacuoles/autophagosomes were not observed in control neuronal extensions. (G) Several vacuoles that sequestered cell parts (debris, fragments of degraded membranes) were found in the cell body of control neurons. Bars: (A,B,F,G) 500 nm, (C–E) 200 nm. (A,C,D) Slices of a single axis tomogram; $\pm 65^\circ$ tilt range with 1° increments, pixel resolution: (A) 1.1 nm, (C) 0.7 nm; (D) 0.8 nm. Transmission electron

microscope images were acquired with (A,C–E) JEOL f2100 200 kV and (B,F,G) JEOL 1010 80 kV.

A previous study in primary mouse neurons showed that TBEV antigen accumulated in the dendrites of infected neurons¹⁵. Viral proteins were synthesized principally in the neuronal cell bodies in the early stages of infection, but they were distributed to dendrites later¹⁵. In the present study, TBEV-infected HNs also showed antigen accumulation in dendrites (Fig. 1B, arrows), but this was not a frequent event. At early time points after infection, virus antigen was present in practically the whole body of the neuron (Figs. 1B,2); at later time points, antigen accumulation appeared mainly in highly reorganized, proliferated RER (demonstrated in the co-localization experiments with the PDIA3 antigen) (Fig. 2), and only occasionally in dendrites. Viral protein accumulation in dendrites may affect neural function¹⁵ and TBEV infections can arrest neurite outgrowth¹⁷. It was hypothesized that viral protein accumulation in dendrites might affect the distribution and function of host proteins, which in turn, might cause neural dysfunction and cellular degeneration¹⁵.

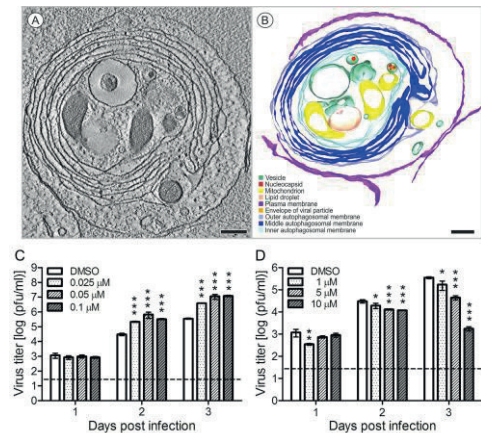


Figure 7. An autophagosome in a neural extension observed 3 days after TBEV infection. The cytoplasm contains mitochondria and TBEV particles in vacuoles, encircled by several double membranous structures, apparently of RER origin (but devoid of ribosomes). (A) A slice of a single axis

tomogram; $\pm 65^\circ$ tilt range with 0.6° increments, pixel resolution: 0.8 nm. (B) A 3D model of (A). Bars: 200 nm. (A,B) Transmission electron microscope images were acquired with JEOL F2100 200 kV. (C,D) Autophagy enhanced TBEV production in human neuroblastoma cells. The cells were pretreated with the solvent control (DMSO), rapamycin (0.025, 0.05, or $0.1 \mu\text{M}$) (C), or spautin-1 (1, 5, or $10 \mu\text{M}$) (D) then infected with TBEV at m.o.i. of 0.1 pfu per cell for 24, 48, or 72 hours. The culture supernatants were collected for plaque assay on PS cells. The virus titers (pfu/ml) are shown as the means \pm SEM. The horizontal dashed line indicates the minimum detectable threshold. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Our results suggested that vesicles containing TBEV particles were transported in infected neurons, based on observations that TBEV-containing vesicles were associated with microtubules in HNs (Fig. 8A–D). In human neuroblastoma cells, non-cytotoxic concentrations of nocodazole, a compound which disrupts microtubules by binding to β -tubulin and preventing formation of one of the two interchain disulfide linkages and thus inhibiting microtubules dynamics, resulted in significant reduction in virus infectivity (Fig. 8E). Viral spread in neurons is generally mediated by fast axonal transport, a microtubule-associated, anterograde and retrograde transport system. In West Nile virus (WNV) infections, transneuronal viral spread required axonal release of viral particles. WNV underwent bidirectional spread in neurons, and axonal transport promoted viral entry into the CNS¹⁸.

Here, we also described the morphology and 3D organization of TBEV-induced, tubule-like structures located in the RER of infected HNs (Figs. 3B,4A–D). Similar structures were previously demonstrated in the RER of other vertebrate or arthropod cells infected with TBEV19, Langat virus²⁰, and mosquito-borne flaviviruses^{16,21,22}. In a previous study, we observed virus-induced vesicles and viral particles directly attached to tubule-like structures in the RER of TBEV-infected human primary astrocytes¹⁹. The tubule-like structures were only occasionally

seen in acutely infected cells, but the number of tubules increased dramatically in persistently infected cells²⁰. Unlike previous studies, we frequently observed the presence of tubule-like structures in TBEV-infected neurons.

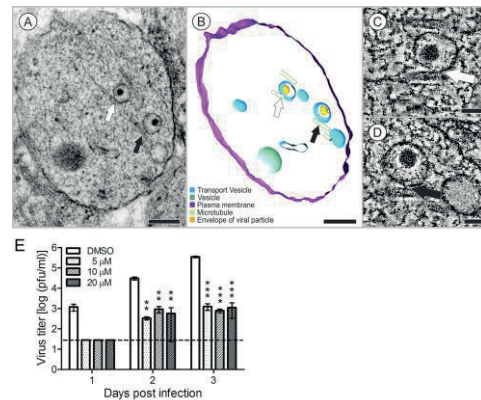


Figure 8. Two vacuoles that accommodated TBEV particles in a neuronal extension at 12 days after infection. (A–D) Arrows indicate connections between vacuoles and microtubules. (A) The projection image and (B) the 3D model. (C,D) Images show slices of a double-axis tomogram acquired with a $\pm 60^\circ$ tilt range in 0.6° increments; pixel resolution: 0.55 nm Bars: (A,B) 200 nm; (C,D) 50 nm. Transmission electron microscope images were acquired with (A) JEOL 1010 80 kV and (C,D) JEOL F2100 200 kV. (E) Nocodazole treatment inhibits TBEV replication in human neuroblastoma cells. The cells were pretreated with the solvent control (DMSO), or nocodazole (5, 10, or $20 \mu\text{M}$) then infected with TBEV at m.o.i. of 0.1 pfu per cell for 24, 48, or 72 hours. The culture supernatants were collected for plaque assay on PS cells. The virus titers (pfu/ml) are shown as the means \pm SEM. The horizontal dashed line indicates the minimum detectable threshold. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

To the best of our knowledge, this study was the first to demonstrate the simultaneous presence of two sizes of tubule-like structures in the RER of single infected cells (Fig. 4A–D). Inside the RER, we observed tubules that were $43.8 \pm 4.3 \text{ nm}$ ($N = 7$) in diameter,

and in other cisternae, we observed tubules that were 22 ± 1.3 nm in diameter (Fig. 4A–D). Previous studies reported tubule-like structures that ranged from 50 to 100 nm in diameter and from 100 nm to $3.5 \mu\text{m}$ in length^{20–23}. In TBEV-infected human astrocytes, we previously observed tubule-like structures of 17.9 nm (± 0.2 nm) in diameter¹⁹. The function of tubule-like structures is not clear. These structures may represent features of replication, aberrant structures, or features of a cellular process that aims to restrict the infection²⁰. With immunofluorescence and confocal microscopy, we observed fibrillary structures composed of viral E protein in cisterns of the ER; these structures suggested that E protein was present in the tubule-like structures (Figs. 1B,2). The functional contribution of these tubule-like structures to TBEV replication should be addressed in future studies.

Our detailed 3D ultrastructural analysis clearly demonstrated that the TBEV infection triggered a remarkable alteration in the ER membrane structures of HNs (Fig. 5B,D). Previous studies have shown alterations in ER membranes by flaviviruses, which included formations of vesicle pockets and convoluted structures that represented a platform for viral RNA replication and virion assembly^{15,24,25}. These replication compartments also shielded double-stranded RNA from host cell-intrinsic surveillance mechanisms^{24–26}.

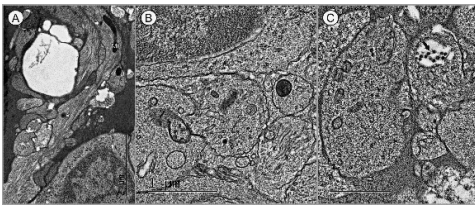


Figure 9. Mock infected HNs examined at 3 days p.i. (A,B) HN extensions contained a few probable secretion granules with electron-dense cores, with diameters of (A) about 70 nm and (B) 90 nm, that were in direct contact with the cytoplasm. (C) Different vesicles of 43.8 nm ($n = 5$) in diameter were located outside the cells (black arrow). Bar 1 μm . (A–C) Transmission electron microscope images were acquired with JEOL 1010 80 kV.

In TBEV-infected mice, Hirano et al.¹⁵ described characteristic ultrastructural changes in neurite membranes, called LMSs. They hypothesized that LMSs were formed by membrane reconstitutions triggered by the viral replication, and that the LMS might serve as a platform for dendritic viral replication and virion assembly¹⁵. In the present study, we observed TBEV replication sites in dendrites, but also in perinuclear regions of TBEV-infected HNs. However, our 3D tomography data strongly suggested that, in several cases, the TBEV replication sites were enclosed inside newly formed autophagosomes. Moreover, we observed virions inside autophagosomes that were surrounded by numerous membranes (Figs. 5,6,7) with many typical morphological features. Autophagosome-limiting membranes did not have ribosomes, and they always had two or more limiting membranes²⁷. Additionally, we observed interactions with lipid droplets (LDs)²⁸ in both newly forming autophagosomes and fully-formed autophagosomes of TBEV-infected HNs. A recent report noted the existence of a physical connection between the endoplasmic reticulum and newly forming autophagosomes^{29,30}. We confirmed this observation (Fig. 5C,D and Fig. 6).

Upon autophagy induction, the initial event is the formation of a membranous cistern called the phagophore, or isolation membrane. Autophagy begins with the isolation of double-membrane structures in the cytoplasm. Later, these membrane structures elongate and mature. The elongated double-membranes form autophagosomes (large vesicles with diameters of 500–1500 nm in mammalian cells), which become mature with acidification; then, they fuse with lysosomes to become autolysosomes. The sequestered content is then degraded by lysosomal hydrolases³¹.

There are many proposals for the role of autophagy during virus infection in neurons. In post-mitotic, long-lived cell types, such as neurons, basal and stress-induced autophagy may be particularly

important for maintaining cellular health. In addition, it represents an important neuronal antiviral defense mechanism for the sequestration and elimination of viral proteins, viral particles, and viral replication complexes³². Thus, autophagy represents an adaptive, pro-survival process, rather than a maladaptive, pro-death response, during CNS viral infection³². Autophagy has been shown to restrict the replication of several viruses in neurons, including Rift Valley fever virus³³, Sindbis virus³⁴, and herpes simplex virus type 1³⁵. However, the growth of WNV has been shown to be independent of WNV-induced autophagy in neuronal cultures³⁶. Although autophagy is a cellular homeostatic mechanism involved in the antiviral response, it can be also subverted to support viral growth. Virus-induced autophagy promoted the replication of dengue virus^{37,38}, enterovirus 71³¹, poliovirus, and coxsackievirus B4³⁹. Japanese encephalitis virus growth is dependent on autophagy activation during the early stages of infection⁴⁰. Our study was the first to demonstrate that autophagy occurred during TBEV replication in HNs, and is also the first report that autophagy enhances TBEV replication. We treated TBEV-infected neuroblastoma cells with rapamycin (inducer of autophagy, as inhibition of mTOR mimics cellular starvation by blocking signals required for cell growth and proliferation), and spautin-1 (highly specific and potent autophagy inhibitor in mammalian cells, which promotes the degradation of Vps34 PI3 kinase complexes by inhibiting two ubiquitin specific peptidases, USP10 and USP13 that target the Beclin1 subunit of Vps34 complexes) and investigated the effect of the treatment of TBEV growth. The induction of autophagy in human neuroblastoma cells by rapamycin increased TBEV replication (Fig. 7C), whereas the inhibition of autophagy by spautin-1 reduced significantly viral titers (Fig. 7D), indicating that autophagy positively regulates TBEV replication.

As mentioned above, we observed direct interactions between autophagosomes and LDs in TBEV-infected HNs (Fig. 6D,E, Fig. 7). A previous report showed that autophagosomes could target cellular

lipid stores (LDs) to generate energy for the cell⁴¹. For example, dengue viral-infection-induced autophagy stimulated the delivery of lipids to lysosomal compartments, which resulted in the release of free fatty acids. These fatty acids underwent β -oxidation in the mitochondria to generate ATP, which produced a metabolically favorable environment for viral replication²⁸. Thus, aside from the many roles of autophagy in regulating cellular homeostasis, its regulation of lipid metabolism can represent a major contributor to robust viral replication⁴¹. The role of autophagy as a provider of free fatty acids as an energy source for RNA replication during viral infection will be a subject of our further studies.

In conclusion, we directly investigated the morphological changes induced by TBEV infections in HNs with advanced high-pressure freezing, freeze-substitution, and electron tomography techniques, with the purpose of achieving optimal preservation of ultrastructure for electron tomography visualization of cellular architecture. These methods enabled clear visualization of connections between microtubules and vacuoles that harbored TBEV virions in neuronal extensions, connections between tubule-like structures and virions, 3D organizations of proliferating endoplasmic reticulum membranes, membranous whorls, and the formation of autophagic vacuoles. These data provided insight into the process of TBEV-induced injury in HNs, and our findings will promote future studies that aim to understand the molecular mechanism of TBEV infection in the human CNS.

METHODS

Virus and cells. The virus used in this study was the TBEV strain, Neudoerfl, kindly provided by Professor F. X. Heinz from the Medical University in Vienna. The strain was originally isolated from the tick *Ixodes ricinus* in Austria in 1971. The virus represents a prototype strain of the European subtype of TBEV and was characterized extensively, including its genome sequence and the 3D structure of its envelope protein

E⁴². The virus underwent four passages in the brains of suckling mice before use in this study.

Human neurons (HNs) were isolated from the human brain and characterized by immunofluorescence with antibodies specific to neurofilament, microtubule associated protein 2 (MAP2), and β -tubulin III (purchased at passage zero from ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA). HNs were propagated in Neuronal Medium (ScienCell) with 1% neuronal growth supplement and 1% penicillin/streptomycin (ScienCell) at 37 °C and 5% CO₂. In all experiments, cells were used at passage zero.

Human neuroblastoma cells UKF-NB-4¹⁴ were cultured at 37 °C and 5% CO₂ in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma) and 1% mixture of penicillin and streptomycin (Sigma).

Porcine kidney stable (PS) cells⁴³ were cultured in L-15 medium supplemented with 3% newborn calf serum and 1% penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich) at 37 °C.

Viral growth in HNs. HNs were seeded onto gelatin (0.2%) coated wells of 96-well plates at 20,000–25,000 cells/cm². After establishing the culture, cells were inoculated with the virus diluted in culture medium to 5 multiplicity of infection units (MOI). Virus-mediated cytopathic effect (CPE) was investigated with light microscopy. At 0, 3, 5, 7, and 12 days p.i., supernatant medium from appropriate wells was collected and frozen at -70 °C. Viral titers were determined by plaque assay.

Plaque assay. PS cells were used to determine virus titers according to a protocol described previously, with minor modifications⁴⁴. Tenfold dilutions of the virus samples were placed in 24-well tissue culture plates, and suspended PS cells were added (5×10⁴ cells per well). After incubating for 4 h, the suspension was overlaid with carboxymethylcellulose (1.5% in L-15 medium). After incubating for 5 days at 37 °C, the plates were washed with PBS, and the cells

were stained with naphthalene black (Sigma Aldrich). Virus titer was expressed in units of pfu/ml.

Immunofluorescence staining. TBEV-infected and control HNs were grown on slides. Then, cells were fixed in 4% formaldehyde for 1 h at room temperature, rinsed three times in 0.1 M phosphate buffer (PB) with 0.02 M glycine, permeabilized with 0.1% Triton X-100 with 1% normal goat serum in 0.1 M PB for 30 min, and blocked with 5% normal goat serum. Cells were labeled with flavivirus-specific mouse mAb (1:250; Millipore) for 1.5 h at 37 °C. Flavivirus-specific mAb and rabbit anti-PDIA3 antibody (1:250, Sigma-Aldrich) were used for double labeling. After washing with ten-fold diluted blocking solution, the cells were labeled with goat anti-mouse secondary antibody conjugated with FITC (1:500, Sigma-Aldrich) or goat anti-rabbit secondary antibody conjugated with Atto 550 NHS (1:500, Sigma-Aldrich) for 1.5 h at 37 °C. The cells were counterstained with DAPI (1 μ g/ml, Sigma-Aldrich) for 10 min at 37 °C, mounted in 2.5% 1,4-diazabicyclo(2.2.2)octane (Sigma-Aldrich), and examined with an Olympus BX-51 fluorescence microscope equipped with an Olympus DP-70 CCD camera. Confocal microscopy was performed with an Olympus FV-1000; serial Z-series images were acquired in blue, red, and green channels.

Transmission electron microscopy and electron tomography. TBEV-infected and control HNs were grown on sapphire discs. At either 3 or 12 days p.i., cells were high-pressure frozen in the presence of 20% BSA diluted in Neuronal Medium with a Leica EM PACT2 high-pressure freezer. Freeze substitution was carried out in 2% osmium tetroxide diluted in 100% acetone, as described previously¹⁹, with a Leica EM AFS2 at -90 °C for 16 h. The samples were then warmed at a rate of 5 °C/h, incubated at -20 °C for 14 h, and finally warmed again at the same rate to a final temperature of 4 °C. The samples were rinsed three times in anhydrous acetone at room temperature and infiltrated stepwise in acetone mixed with SPI-pon resin (SPI) (acetone:SPI ratios of 2:1, 1:1, 1:2, for 1 h

at each step). The samples in pure resin were polymerized at 60 °C for 48 h.

Sections were prepared with a Leica Ultracut UCT microtome and collected on 300 mesh cooper grids. Staining was performed with alcoholic uranic acetate for 30 min, and then, lead citrate for 20 min. Images were obtained with a JEOL 2100F or JEOL 1010 transmission electron microscope. For electron tomography, protein A-conjugated 10 nm gold nanoparticles (Aurion) were added to both sides of each section as fiducial markers.

Tilt series images were collected in the range of $\pm 60^\circ$ to 65° , with 0.6° to 1° increments. Images were acquired with a 200 kV JEOL 2100F transmission electron microscope equipped with a high-tilt stage and a Gatan camera (Orius SC 1000) and controlled with SerialEM automated acquisition software⁴⁵. Images were aligned based on the fiducial markers. Electron tomograms were reconstructed with the IMOD software package. Manual masking of the area of interest was employed to generate 3D surface models⁴⁶.

Autophagy stimulation and inhibition, and microtubule disruption. Stocks of rapamycin (Sigma-Aldrich) as an autophagy stimulator, spautin-1 (Sigma-Aldrich), an autophagy inhibitor, and nocodazole (Sigma-Aldrich) as a microtubule disruptor, were prepared in DMSO. Monolayers of human neuroblastoma cells in 96-well plates were pretreated with different concentrations of either drug (or DMSO as a negative control) for 30 min at 37 °C and infected with TBEV at a multiplicity of infection of 0.1 pfu per cell. Infection was always performed in triplicate. Supernatants were harvested at 24, 48, and 72 hours p.i. and titers were determined by plaque assay as described above.

Statistical analysis. Statistical analyses were performed using version 5.04 of the GraphPad Prism5 (GraphPad Software, Inc., USA). Data were transformed by use of the $X' = \log(X)$ formula and analysed using one-way ANOVA

(Dunnett's Multiple Comparison Test). p-values < 0.05 were considered significant.

REFERENCES

1. Mansfield, K. L. *et al.* Tick-borne encephalitis virus - a review of an emerging zoonosis. *J. Gen. Virol.* **90**, 1781–94 (2009).
2. Růžek, D., Dobler, G., & Donoso Mantke, O. Tick-borne encephalitis: pathogenesis and clinical implications. *Travel Med. Infect. Dis.* **8**, 223–32 (2010).
3. Růžek, D., Salát, J., Singh, S. K., & Kopecký, J. Breakdown of the blood-brain barrier during tick-borne encephalitis in mice is not dependent on CD8+ T-cells. *PLoS One* **6**, e20472 (2011).
4. Gelpi, E. *et al.* Visualization of Central European tick-borne encephalitis infection in fatal human cases. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **64**, 506–12 (2005).
5. Gelpi, E. *et al.* Inflammatory response in human tick-borne encephalitis: analysis of postmortem brain tissue. *J. Neurovirol.* **12**, 322–7 (2006).
6. Palus, M., Žampachová, E., Elsterová, J., & Růžek, D. Serum matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 levels in patients with tick-borne encephalitis. *J. Infect.* **68**, 165–9 (2014).
7. Růžek, D. *et al.* CD8+ T-cells mediate immunopathology in tick-borne encephalitis. *Virology* **384**, 1–6 (2009).
8. Hayasaka, D. *et al.* Mortality following peripheral infection with tick-borne encephalitis virus results from a combination of central nervous system pathology, systemic inflammatory and stress responses. *Virology* **390**, 139–50 (2009).
9. Diniz, J. A. *et al.* West Nile virus infection of primary mouse neuronal and neuroglial cells: the role of astrocytes in chronic infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **75**, 691–6 (2006).

10. Shrestha, B., Gottlieb, D., & Diamond, M. S. Infection and injury of neurons by West Nile encephalitis virus. *J. Virol.* **77**, 13203–13 (2003).
11. Couderc, T., Guivel-Benhassine, F., Calaora, V., Gosselin, A. S., & Blondel, B. An ex vivo murine model to study poliovirus-induced apoptosis in nerve cells. *J. Gen. Virol.* **83**, 1925–30 (2002).
12. Kennedy, P. G., Gairns, J., & MacLean, A. R. Replication of the herpes simplex virus type 1 RL1 mutant 1716 in primary neuronal cell cultures—possible relevance to use as a viral vector. *J. Neurol. Sci.* **179**, 108–14 (2000).
13. Nazmi, A., Dutta, K., & Basu, A. RIG-I mediates innate immune response in mouse neurons following Japanese encephalitis virus infection. *PLoS One* **6**, e21761 (2011).
14. Růžek, D. et al. Morphological changes in human neural cells following tick-borne encephalitis virus infection. *J. Gen. Virol.* **90**, 1649–58 (2009).
15. Hirano, M. et al. Tick-borne flaviviruses alter membrane structure and replicate in dendrites of primary mouse neuronal cultures. *J. Gen. Virol.* **95**, 849–61 (2014).
16. Junjhon, J. et al. Ultrastructural characterization and three-dimensional architecture of replication sites in dengue virus-infected mosquito cells. *J. Virol.* **88**, 4687–97 (2014).
17. Wigerius, M., Melik, W., Elväng, A., & Johansson, M. Rac1 and Scribble are targets for the arrest of neurite outgrowth by TBE virus NS5. *Mol. Cell. Neurosci.* **44**, 260–71 (2010).
18. Samuel, M. A., Wang, H., Siddharthan, V., Morrey, J. D., & Diamond, M. S. Axonal transport mediates West Nile virus entry into the central nervous system and induces acute flaccid paralysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 17140–5 (2007).
19. Palus, M. et al. Infection and injury of human astrocytes by tick-borne encephalitis virus. *J. Gen. Virol.* **95**, 2411–26 (2014).
20. Offerdahl, D. K., Dorward, D. W., Hansen, B. T., & Bloom, M. E. A three-dimensional comparison of tick-borne flavivirus infection in mammalian and tick cell lines. *PLoS One* **7**, e47912 (2012).
21. Welsch, S. et al. Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe* **5**, 365–75 (2009).
22. Gillespie, L. K., Hoenen, A., Morgan, G., & Mackenzie, J. M. The endoplasmic reticulum provides the membrane platform for biogenesis of the flavivirus replication complex. *J. Virol.* **84**, 10438–47 (2010).
23. Lorenz, I. C. et al. Intracellular assembly and secretion of recombinant subviral particles from tick-borne encephalitis virus. *J. Virol.* **77**, 4370–82 (2003).
24. Miorin, L., Albornoz, A., Baba, M. M., D’Agaro, P., & Marcello, A. Formation of membrane-defined compartments by tick-borne encephalitis virus contributes to the early delay in interferon signaling. *Virus Res.* **163**, 660–6 (2012).
25. Miorin, L. et al. Three-dimensional architecture of tick-borne encephalitis virus replication sites and trafficking of the replicated RNA. *J. Virol.* **87**, 6469–81 (2013).
26. Overby, A. K., Popov, V. L., Niedrig, M., & Weber, F. Tick-borne encephalitis virus delays interferon induction and hides its double-stranded RNA in intracellular membrane vesicles. *J. Virol.* **84**, 8470–83 (2010).
27. Eskelinen, E. L. To be or not to be? Examples of incorrect identification of autophagic compartments in conventional transmission electron microscopy of mammalian cells. *Autophagy* **4**, 257–60 (2008).
28. Heaton, N. S., & Randall, G. Dengue virus-induced autophagy regulates lipid metabolism. *Cell Host Microbe* **8**, 422–32 (2010).

29. Hayashi-Nishino, M. et al. A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat. Cell. Biol.* **11**, 1433–7 (2009).
30. Ylä-Anttila, P., Vihinen, H., Jokitalo, E., & Eskelinen, E. L. 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy* **5**, 1180–5 (2009).
31. Huang, S. C., Chang, C. L., Wang, P. S., Tsai, Y., & Liu, H. S. Enterovirus 71-induced autophagy detected in vitro and in vivo promotes viral replication. *J. Med. Virol.* **81**, 1241–52 (2009).
32. Orvedahl, A., & Levine, B. Autophagy and viral neurovirulence. *Cell. Microbiol.* **10**, 1747–56 (2008).
33. Moy, R. H. et al. Antiviral autophagy restricts Rift Valley fever virus infection and is conserved from flies to mammals. *Immunity* **40**, 51–65 (2014).
34. Orvedahl, A. et al. Autophagy protects against Sindbis virus infection of the central nervous system. *Cell Host Microbe* **7**, 115–27 (2010).
35. Yordy, B., & Iwasaki, A. Cell type-dependent requirement of autophagy in HSV-1 antiviral defense. *Autophagy* **9**, 236–8 (2013).
36. Beatman, E. et al. West Nile virus growth is independent of autophagy activation. *Virology* **433**, 262–72 (2012).
37. Lee, Y. R. et al. Autophagic machinery activated by dengue virus enhances virus replication. *Virology* **374**, 240–8 (2008).
38. Mateo, R. et al. Inhibition of cellular autophagy deranges dengue virion maturation. *J. Virol.* **87**, 1312–21 (2013).
39. Yoon, S. Y. et al. Autophagy in coxsackievirus-infected neurons. *Autophagy* **5**, 388–9 (2009).
40. Li, J. K., Liang, J. J., Liao, C. L., & Lin, Y. L. Autophagy is involved in the early step of Japanese encephalitis virus infection. *Microbes Infect.* **14**, 159–68 (2012).
41. Heaton, N. S., & Randall, G. Dengue virus and autophagy. *Viruses* **3**, 1332–41 (2011).
42. Rey, F. A., Heinz, F. X., Mandl, C., Kunz, C., & Harrison, S. C. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* **375**, 291–8 (1995).
43. Kozuch, O., & Mayer, V. Pig kidney epithelial (PS) cells: a perfect tool for the study of flaviviruses and some other arboviruses. *Acta Virol.* **19**, 498 (1975).
44. De Madrid, A. T., & Porterfield, J. S. A simple micro-culture method for the study of group B arboviruses. *Bull. World Health Organ.* **40**, 113–21 (1969).
45. Mastronarde, D. N. Automated electron microscope tomography using robust prediction of specimen movements. *J. Struct. Biol.* **152**, 36–51 (2005).
46. Kremer, J. R., Mastronarde, D. N., & McIntosh, J. R. Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. *J. Struct. Biol.* **116**, 71–6 (1996).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are greatly indebted to Professors Jan Kopecký and Libor Grubhoffer and to Dr. Jana Nebesářová for general support of our work. This study was supported by the Czech Science Foundation projects Nos. P502/11/2116 and GA14-29256S, the Technology Agency of the Czech Republic (TE 01020118), and by project LO1218, with financial support from the MEYS of the Czech Republic under the NPU I program. The funders played no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.V. and D.R. conceived and designed the experiments and wrote the manuscript. T.B., M.P., L.E., and J.E. performed the experiments and analyzed the data. All authors reviewed the manuscript.

ADDITIONAL INFORMATION

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Bílý, T. et al. Electron tomography analysis of tick-borne encephalitis virus infection in human neurons. *Sci. Rep.* 5, 10745; doi: 10.1038/srep10745 (2015).

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Kapitola 6. ČLÁNEK 3

ULTRASTRUCTURAL, CYTOCHEMISTRY AND ELECTRON
TOMOGRAPHY ANALYSIS OF *CARYOPHYLLAEIDES FENNICA*
(SCHNEIDER, 1902) (CESTODA: LYTOCESTIDAE) REVEALS NOVEL
SPERMATOLOGY CHARACTERISTICS IN THE EUCESTODA

*Martina Matoušková, Tomáš Bílý, Magdaléna Bruňanská, John S. Mackiewicz,
Jana Nebesářová*

Parasitology Research, Volume 117, Issue 10, Pages 3091–3102, 2018

DOI 10.1007/s00436-018-6001-9

Ultrastructural, cytochemistry and electron tomography analysis of *Caryophyllaeides fennica* (Schneider, 1902) (Cestoda: Lytocestidae) reveals novel spermatology characteristics in the Eucestoda

Martina Matoušková¹, Tomáš Bílý^{2,3}, Magdaléna Bruňanská¹, John S. Mackiewicz⁴, Jana Nebesářová^{2,3}

¹Institute of Parasitology, Slovak Academy of Sciences, Hlinkova 3, 040 01 Košice, Slovak Republic

²Institute of Parasitology, Biology Centre of the Czech Academy of Sciences, České Budějovice, Czech Republic

³Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

⁴Department of Biological Sciences, University at Albany, State University of New York, Albany, New York, USA

Spermatozoon formation in *Caryophyllaeides fennica* (Schneider, 1902) is characterised by the following: (1) apical electron-dense material in the zone of differentiation, (2) typical striated roots situated unconventionally in opposite directions in early stages of spermiogenesis, (3) intercentriolar body composed of three electron-dense and two electron-lucent plates, (4) free flagellum and a flagellar bud that correspond to a greatly reduced flagellum and (5) rotation of free flagellum and a flagellar bud to the median cytoplasmic process at 90°. The development of two flagella of significantly unequal length clearly supports a derived form of spermiogenesis in the Caryophyllidea. New for cestodes is a finding of two additional striated roots situated opposite each other, in conjunction with both the flagellar bud and free flagellum. Mutual position of additional striated roots and typical striated roots is parallel in early stages and perpendicular in advanced stages of spermiogenesis. A complete proximodistal fusion gives rise to a mature spermatozoon consisting of one axoneme, parallel cortical microtubules, a nucleus and a moderately electron-dense cytoplasm with glycogen particles, detected by a technique of Thiéry (*J Microsc* 6:987–1018, 1967), in the principal regions (II, III, IV). Electron tomography analysis of the free flagellum and one axoneme of a mature spermatozoon of *C. fennica* provides clear evidence, for the first time, that two tubular structures are present in the central axonemal electron-dense core. Phylogenetically important aspects of spermiogenesis of the Caryophyllidea with one axoneme, and other cestodes with one or two axonemes, are briefly reviewed and discussed.

Section Editor: David Bruce Conn

Author contact: Magdaléna Bruňanská brunan@saske.sk

Caryophyllidean tapeworms, intestinal parasites of freshwater cypriniform and siluriform fishes, represent a unique group of the Eucestoda in having a monopleuroid body plan with the absence of internal proglottidisation or external

segmentation, possessing a single set of reproductive organs (Mackiewicz 2003). With this array of characters, the Caryophyllidea have long attracted the attention of evolutionary biologists. Although the basal or nearly-basal position

of the group within the Eucestoda is generally accepted (Mariaux 1998; Hoberg et al. 2001; Olson et al. 2001), phylogenetic relationships within the order Caryophyllidea and systematic position of some caryophyllidean tapeworms are an ongoing theme (Waeschenbach et al. 2012; Caira and Littlewood 2013).

Sperm characters provide important data sets useful for phylogeny (Justine 1998, 2001, 2003; Bruňanská 2010; Levron et al. 2010). Until now, spermatology of five caryophyllidean taxa of two families (Capingentidae and Caryophyllacidae) is available (Kazacos and Mackiewicz 1972; Świdorski and Mackiewicz 1976, 2002; Gamil 2008; Miquel et al. 2008; Yoneva et al. 2011, 2012a; Bruňanská and Kostič 2012). Significant differences have been reported between genera and even within species of the family Caryophyllacidae.

centrioles are oriented in opposite directions. Bar = 70 nm. **c** Cross section of the zone of differentiation in early stages of spermiogenesis reveals one typical striated root and two additional striated roots (R1, R2) associated with one centriole. Bar = 500 nm. **d** The centriole is joined with one typical striated root and two smaller additional striated roots (R1, R2) also in advanced stages of spermiogenesis. R1 and R2 are situated opposite each other. Bar = 500 nm. Inset: detail of the ICB shows that it consists of three electron-dense layers (arrows) and two electron-lucent zones (1, 2). Bar = 125 nm. **e** The presence of typical striated roots in advanced stages of spermiogenesis when the nucleus becomes elongated and moves towards the median cytoplasmic process (MCP). Bar = 500 nm. **f** Parallel disposition of the free flagellum and flagellar bud to the MCP in very advanced stages of spermiogenesis. Bar = 500 nm. **g** Additional striated roots (R1, R2) of the free flagellum are situated perpendicular to the typical striated root, which is parallel with the nucleus in very advanced stages of spermiogenesis. Bar = 500 nm. **h** The centriole of the free flagellum may be associated with one typical striated root and the two additional striated roots (R1, R2) immediately before proximodistal fusion has started. Bar = 800 nm. **i** Cross section of the MCP and the free flagellum before proximodistal fusion. The two small arrows indicate attachment zones. Bar = 250 nm. **j** Cross section of the MCP reveals four attachment zones (small arrows). Bar = 170 nm. **k** Cross section of the MCP and incorporated flagellum (Ax) after the proximodistal fusion. Bar = 250 nm. **l** Cross section of the spermatid with the nucleus after proximodistal fusion. Bar = 250 nm. **m** Longitudinal section of the oneaxoneme (Ax) spermatid. Bar = 250 nm. **n** Longitudinal section of a nucleated part of the spermatid. Bar = 250 nm. AM arching membranes, Ax axoneme, C centriole, CM cortical microtubules, DM apical electron-dense material, F flagellum, FB flagellar bud, N nucleus, R typical striated root.

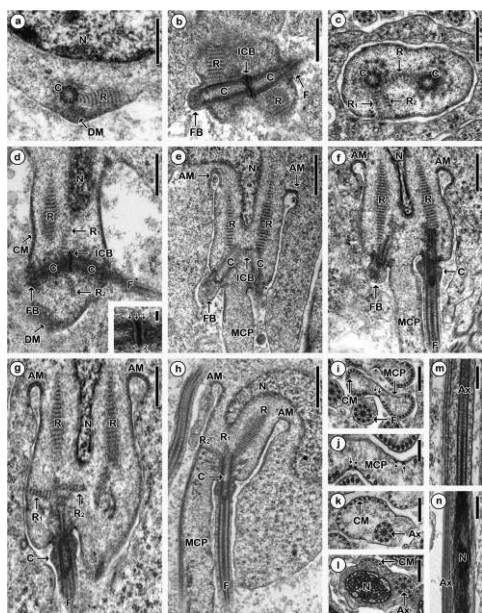


Fig. 1 Early and advanced stages of spermiogenesis in *Caryophyllacidae*. **a** Early stage of spermiogenesis documented in the longitudinal section of a young spermatid. The typical striated root of a centriole is situated tangential to the long axis of the nucleus. Bar = 500 nm. **b** An intercentriolar body (ICB) is situated between the two centrioles which are arranged in the same plane. The typical striated roots of both

Sperm features within the family Lytocestidae are of particular interest in connection with the still unknown evolutionary origin of lytocestiid

caryophyllideans (Mackiewicz 2003). The family Lytocestidae is paraphyletic and comprises 13 genera forming three or four separated clades (Olson et al. 2008; Oros et al. 2008). Ultrastructural spermatology studies have been carried out on five lytocestiid species of four genera only (see Yoneva et al. 2012b).

The mature spermatozoa of caryophyllideans have unconventional axonemal organisations of the trepaxonematan type 9 + "1" (Ehlers 1984). These atypical axonemes have a complex axonemal core instead of a central pair of singlets typical for the 9 + 2 pattern of the cilia and flagella of most eukaryotes (Thomas 1975). The complex axonemal core consisting of three regions, namely (1) a central electron-dense core, (2) an intermediate zone of low electron density and (3) a cortical sheath, has been a subject of numerous investigations utilizing various techniques, e.g. negative staining, shadowcasting, negative staining plus shadowcasting, replication, photographic integration and treatment with trypsin (Silveira 1969; Burton and Silveira 1971; Thomas 1975). Based on these observations, it was concluded that a central electron-dense core (zone) is formed by longitudinally oriented elements as suggested by Silveira (1969), and the tubular helical elements in question do not exist. Consequently, it was doubtful that possible homologies exist between the central regions of the 9 + 2 and 9 + "1" axonemes. In contrast, a helicoidal nature of the centre of the complex axonemal core has been discovered by recent electron tomography analysis of one-axoneme spermatozoa of the more derived tapeworm *Nippotaenia mogurndae* (Bruňanská et al. 2015). The latter finding has stimulated interest in applying similar electron tomography investigations to other cestode groups, e.g. basal caryophyllideans having also one-axoneme spermatozoa, for unravelling the basic sperm structure of the trepaxonematan type 9 + "1" in the Eucestoda.

The present study is on sperm/spermiogenesis in *Caryophyllaeides fennica*, a frequently found and widely distributed parasite throughout Europe and Russia, which has been reported from many cyprinid fish hosts (Protasova et al. 1990). Spermiogenesis

of this parasite has not been studied. Our focus is to (i) verify a new model of caryophyllidean type of spermiogenesis suggested by Bruňanská and Kostič (2012) which alters a traditional model of the caryophyllidean type of spermiogenesis (see Świdorski 1986; Bâ and Marchand 1995), (ii) elucidate the structure of central electron-dense core (rod, zone) of axial core using electron tomography and (iii) assess the occurrence of the phylogenetically interesting spermiogenesis/sperm characters within the evolutionary context of the Caryophyllidea.

MATERIALS AND METHODS

Adult specimens of the caryophyllidean cestode *Caryophyllaeides fennica* (Schneider, 1902) were collected from the roach, *Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758) (Cypriniformes, Cyprinidae, Leuciscinae), captured in the Tisa River, southeastern Slovakia, in June 2006. Live parasites were isolated from the intestines of freshly killed hosts, cooled in 0.9% NaCl solution and immediately processed for transmission electron microscopy, cytochemistry and electron tomography.

ELECTRON MICROSCOPY

The worms were divided into small pieces, fixed in icecold 2.5% glutaraldehyde in sodium cacodylate buffer (pH 7.4) for 40 days, washed sometimes in the same buffer and post fixed in 1% OsO₄ for 2 h at 4 °C. Specimens were dehydrated in a graded alcohol (acetone) series and embedded in Spurr. Ultrathin sections were cut using a Leica Ultracut UCT Ultramicrotome, placed on copper grids and double stained with uranyl acetate and lead citrate. The grids were examined in a JEOL 1010 transmission electron microscope operated at 80 kV.

CYTOCHEMISTRY

Specific cytochemical localisation of glycogen at the ultrastructural level was performed using the periodic acidthiosemicarbazide-silver proteinate (PA-TSC-SP) technique of Thiéry (1967). Gold grids were treated in periodic acid, thiocarbohydrazide and silver proteinate as follows: 25 min in 1% PA, distilled water rinse, 40 min in TCH, rinse in acetic

acid solution and distilled water, 30 min in 1% SP in the dark, then distilled water rinse.

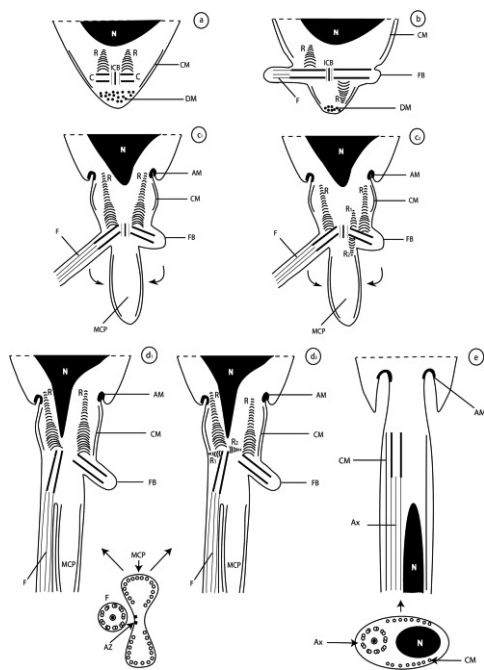


Fig. 2 Schematic reconstruction of the main consecutive stages of spermiogenesis in *C. fennica* (**a, b** early stages; **c1, c2, d1, d2** advanced stages; **e** final stage of spermiogenesis). AM arching membrane; Ax axoneme; AZ attachment zones; C centriole; CM cortical microtubules; DM apical electron-dense material; F flagellum; FB flagellar bud; ICB intercentriolar body; MCP median cytoplasmic protrusion; N nucleus; R typical striated root; R1, R2 additional striated roots.

ELECTRON TOMOGRAPHY

For electron tomography, 100-nm-thick ultrathin sections collected on 300-mesh copper grids (SPI) were stained using alcoholic uranyl acetate (15 min) and lead citrate (15 min). As fiducial markers, 10-nm gold nanoparticles conjugated with protein A (BBI) were placed on both side sections and subsequently covered by carbon. Dual-axis electron tomography was done from tilt series images collected in the range $\pm 70^\circ$ with a 1° step on the JEOL 2100F transmission electron microscope equipped with motorised tilt stage and camera Orius SC 1000

(Gatan). We aligned and reconstructed a stack of tilt series images in the IMOD software package (Mastronarde 2005). The reconstructed tomogram is stored in MRC file (Crowther et al. 1996) with the isotropic voxel size 1.1 nm. For ultrastructural analysis of electron-dense core, we applied the recursive Gauss filter on the tomogram using Amira software (Fisher Scientific). Manual and semiautomatic masking of the area of interest was used for generation of a three-dimensional model (Kremer et al. 1996).

RESULTS

Spermiogenesis

Spermiogenesis of *Caryophyllaeides fennica* is initiated by the formation of a zone of differentiation at the periphery of each spermatid. The zone of differentiation is a conical area containing electron-dense material in its apical region and the two centrioles associated with typical striated roots arranged in the same plane (Figs. 1a and 2a). The centrioles give rise to a free flagellum and a flagellar bud (Figs. 1b and 2b). At this very early stage of spermiogenesis, the striated roots are situated in opposite directions. In addition to the typical striated root, the two smaller additional striated roots occur which are occasionally associated with a centriole (Fig. 1c). The two centrioles are interconnected by an intercentriolar body which is composed of three electron-dense and two electron-lucent layers (Figs. 1b, d and 2a–c). The centrally located thick electron-dense layer is surrounded by two thinner electron-lucent components peripherally limited with thin electron-dense plate (Fig. 1d, inset). The growing free flagellum rotates synchronously with a flagellar bud towards the emerging median cytoplasmic process (MCP) (Figs. 1d, e and 2c). Additional two striated roots associated with a centriole are situated in opposite direction (Figs. 1d and 2c₂). Flagellar rotation is accompanied with changes of the nucleus, which becomes elongated and moves towards the MCP (Fig. 1e). In advanced stages of spermiogenesis, after flagellar rotation at 90° , the free flagellum and flagellar bud are arranged parallel to the elongated MCP (Figs. 1f–h and 2d).

Now, the two additional striated roots are situated perpendicular to the typical striated root (Figs. 1g, h and 2d). Typical striated root is oriented parallel with the long axis of the nucleus (Figs. 1e–g and 2d). Cross sections reveal the presence of the attachment zones in the form of one or two pairs of very small islands of electron-dense material on the inner surface of the plasma membrane of the MCP (Figs. 1i, j and 2d). The free flagellum exhibiting a typical 9 + “1” structure merges in the MCP during proximodistal fusion (Fig. 1k, m). After that, the nucleus migrates into the MCP (Fig. 1l, n). Immediately before the migration of the nucleus into the MCP has finished, spermatids are pinched off from the residual cytoplasm (Fig. 2e).

MATURE SPERMATOOZON

The mature spermatozoon of *C. fennica* is a filiform cell tapered at both proximal (anterior) and distal (posterior) ends. It exhibits one axoneme of the 9 + “1” trepaxonematan type, parallel cortical microtubules, glycogen granules and nucleus which is parallel to the axoneme. Observation of numerous longitudinal cross sections of the mature spermatozoon of *C. fennica* revealed five regions (I–V) with different ultrastructural organisations.

Region I (Figs. 3a and 4(I)) corresponds to the anterior extremity of the spermatozoon. This region contains a single axoneme, surrounded by a semi-arc of six cortical microtubules situated beneath the plasma membrane. The diameter of the spermatozoon in this region measures 200 nm.

Region II (Figs. 3b–d and 4(II)) is characterised by the presence of one axoneme and a slightly increased number (6–8) of cortical microtubules. The diameter of the spermatozoon increases to 475 nm. The cytoplasm contains electron-dense granules of glycogen detected using the Thiéry method (Fig. 3c, d). Cross sections show one pair of attachment zones corresponding to the points of fusion of the free flagellum with the median cytoplasmic process during spermiogenesis (Fig. 3b, c). Cortical microtubules progressively increase in number (up to 11) at the end of region II.

Region III (Figs. 3e–i and 4(III)) represents the nucleated part of the spermatozoon. The nucleus is parallel to the axoneme. In cross sections, the initial very small diameter of the nucleus increases gradually up to 690 nm (Fig. 3f, g) and reaches its maximum about 810 nm in the middle part of this region (Figs. 3h and 4(III)). The number of cortical microtubules ranges between 11 and 19. The size of the nucleus is gradually reduced posteriorly. Region III contains numerous glycogen granules in the cytoplasm (Fig. 3h, i).

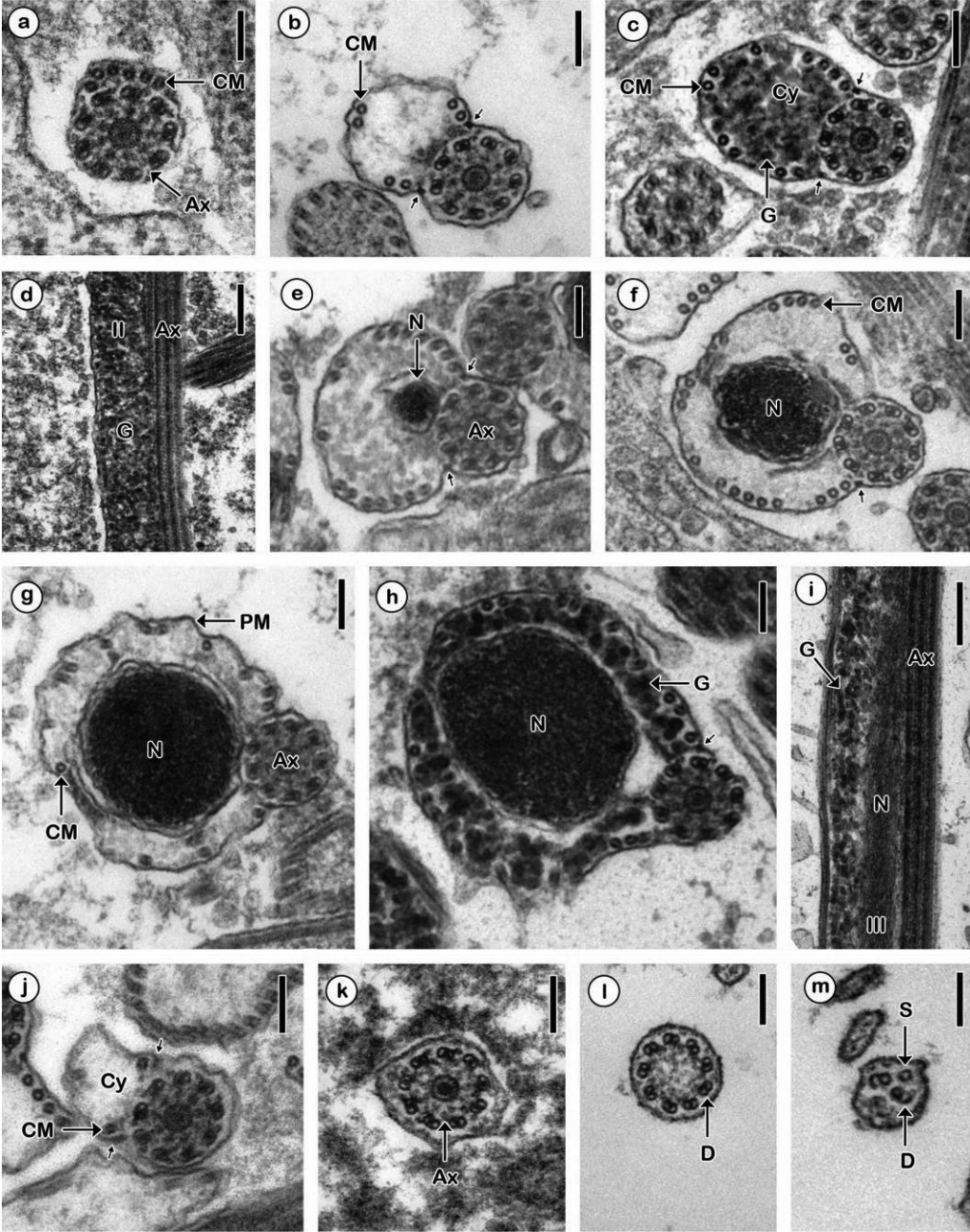
Region IV (Figs. 3j and 4(IV)) is characterised by a decreasing diameter of the spermatozoon. It contains one axoneme and only a few cortical microtubules.

Region V (Figs. 3k–m and 4(V)) corresponds to the posterior extremity of the spermatozoon. It includes only one axoneme surrounded by plasma membrane (Fig. 3k). Disorganisation of the axoneme starts with the absence of its central structure (Fig. 3l) and continues with the transformation of the peripheral doublets in singlets (Fig. 3m).

The 9 + “1” trepaxonematan structure of one-axoneme mature spermatozoon of *C. fennica* is visualised in tomogram virtual slices with increasing Z-position (Fig. 5a–d). Peripheral nine-doublet microtubules are interconnected with the complex core unit (CU) by regularly spaced spokes. The CU is composed of the central electron-dense core (EC), an electron-lucent intermediate area (IA) and an electron-dense cortical sheath (CS). Each tomogram virtual slice illustrates the EC as a high-electron-dense elliptical object, which changes its own orientation with different Z-positions. The EC rotates counterclockwise with the different Z-positions of the tomogram virtual slice from the bottom to the top. This finding indicates the spiral shape of the EC resembling a screw conveyor, which is depicted in Fig. 6 (red colour). The outer diameter of EC is 39.2 ± 2.6 and ~ 50.6 nm in the Z-axis direction, representing a one-half period of screw (Fig. 5a–d). Helical appearance of the CS is documented in the three-dimensional model showing a circulation of electron-density throughout

this structure (Fig. 6). The application of the twodimensional recursive Gauss filter using Amira software (Fisher Scientific) on original tomogram slices has revealed the presence of the two tubular structures in the EC

of both the free flagellum (Fig. 7) and the mature spermatozoon. Resolution of electron tomography on plastic sections indicates that these two round hollow structures in the EC are a part of a double helix.



Its electron-density appears mostly consistent on other tomogram slices.

Fig. 3 Ultrastructure of the mature spermatozoa of *C. fennica*. **a** Cross section of region I with one axoneme and six cortical microtubules. Bar = 100 nm. **b** Cross section of region II. Note the increasing volume of cytoplasm and the attachment zones (small arrows). Bar = 125 nm. **c** Granules of glycogen detected in the cytoplasm of the spermatozoon of region II by the Thiéry method. Small arrows indicate attachment zones. Bar = 125 nm. **d** Visualisation of glycogen using the Thiéry method in the longitudinal section of the region II. Bar = 330 nm. **e** Cross section of region III shows the anterior part of the nucleus. Small arrows indicate attachment zones. Bar = 200 nm. **f** Cross section of region III with enlarged profile of nucleus. Note the increased number of cortical microtubules. Small arrows indicate attachment zones. Bar = 200 nm. **g** Cross section of the central part of region III with large profile of the nucleus and a few cortical microtubules scattered under the plasma membrane (PM). Bar = 125 nm. **h** Visualisation of glycogen using the Thiéry method in the cross section of region III with prominent central nucleus. Bar = 125 nm. **i** Glycogen in the longitudinal section of the region III after application of the Thiéry method. Bar = 250 nm. **j** Cross section of region IV with one axoneme, significantly reduced volume of cytoplasm and only a few cortical microtubules. Small arrows indicate attachment zones. Bar = 125 nm. **k** Cross section of region V. Bar = 135 nm. **l** Doublets of the disorganised axoneme in the cross section of a more posterior part of region V. Bar = 125 nm. **m** Doublets and singlets of the disorganised axoneme in the cross section of the posterior extremity of the spermatozoon. Bar = 100 nm. Ax axoneme, CM cortical microtubules, Cy cytoplasm, D doublets, G glycogen, N nucleus, S singlets.

DISCUSSION

Results of the present study illustrate phylogenetically important characters not described previously in traditional models of sperm formation in the Caryophyllidea (Świdorski 1986; Bâ and

Marchand 1995), namely apical electron-dense material in the zone of differentiation in early spermatids, and rotation of both the free flagellum and the flagellar bud. Moreover, our ultrastructural studies of *Caryophyllaeides fennica* corroborate the occurrence of typical and additional striated roots during spermiogenesis in caryophyllidean tapeworms, the localisation of glycogen in mature spermatozoa and the 9 + "1" trepaxonematan structure in the Eucestoda.

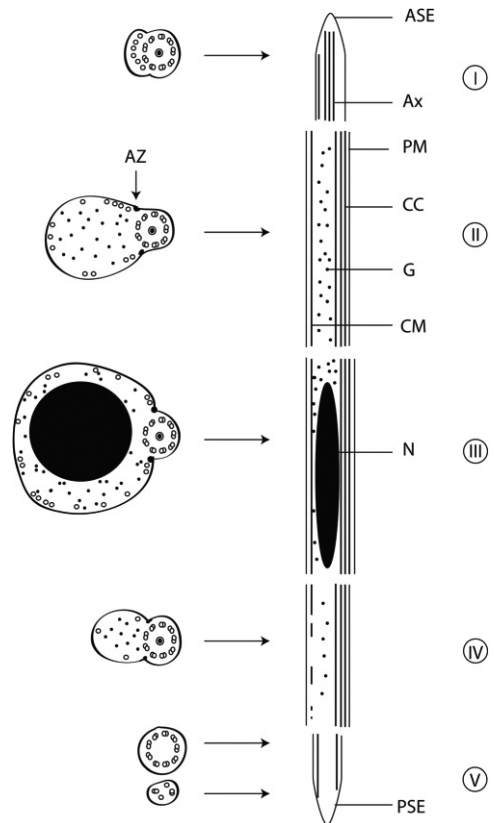


Fig. 4 Schematic reconstruction of the mature spermatozoon of *C. fennica*. ASE anterior spermatozoon extremity, Ax axoneme, AZ attachment zones, CC central core, CM cortical microtubules, G glycogen, N nucleus, PM plasma membrane, PSE posterior spermatozoon extremity.

Apical electron-dense material has been observed exclusively during spermiogenesis in the Cestoda, most commonly in basal groups, but never in other Neodermata nor in Platyhelminthes.

In addition to being in early stages of spermiogenesis in caryophyllidean tapeworms that have a one-axoneme spermatozoon (Bruňanská and Poddubnaya 2006; Gamil 2008; Miquel et al. 2008; Bruňanská 2009, 2010; Yoneva et al. 2011, 2012a, b; Bruňanská and Kostič 2012; present study), apical electron-dense material is also in some cestodes with a two-axoneme spermatozoon, e.g. amphiliiniids (Bruňanská et al. 2013), bothriocephalideans (Bruňanská et al. 2001; Levron et al. 2005, 2006a; Šípková et al. 2010, 2011; Marigo et al. 2012a), diphyllbothriideans (Levron et al. 2006b, 2009, 2013; Yoneva et al. 2013), spathebothriideans (Bruňanská et al. 2006; Bruňanská and Poddubnaya 2010) and the proteocephalidean *Barsonella lafoni* (Marigo et al. 2012b).

Rotation of both the free flagellum and the flagellar bud, another evolutionary significant characteristic, has been described during spermiogenesis in basal caryophyllideans as well as the higher phyllobothriid tetraphyllideans, tetrabothriideans or nipotaeniids (Mokhtar-Maamouri 1979; Stoitsova et al. 1995; Bruňanská and Poddubnaya 2006; Miquel et al. 2008; Bruňanská 2009, 2010; Yoneva et al. 2011, 2012a,b; Bruňanská and Kostič 2012; Bruňanská et al. 2015; present study). Based on these findings, it is suggested that rotation of free flagellum + flagellar bud may indicate a derived stage of spermiogenesis of some non-caryophyllidean cestodes having a single-axoneme spermatozoon (Bruňanská et al. 2015).

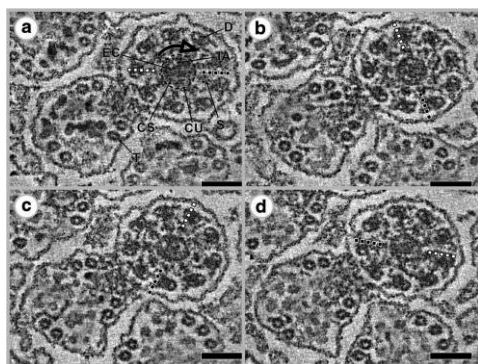


Fig. 5 The 9 + “1” trepaxonematan structure of a single axoneme in the mature spermatozoon

of *C. fennica* with elliptical shape of the central electron-dense core (EC). **a–d** Tomogram virtual slices represent reconstructed volume ordered (**a** first, **b** 16th, **c** 31st, **d** 46th from the bottom). Lateral pixel size and thickness of each virtual slice are identical (1.1 nm). Tilt series images were collected in the range $\pm 70^\circ$ with 1° increments. CS cortical sheath, D doublet microtubules, IA intermediate area, S spike, T cortical microtubules. Orientation of EC is indicated by dotted line, and arrow shows the direction of rotation of EC with increased placing in the order of slices that represents the Z-axis (height) in section volume. Bar in **a–d** = 50 nm.

A typical striated root surmounted by each centriole is an important component directly participated in flagellar rotation (Stoitsova et al. 1995). Typically, both striated roots are oriented in the same direction during spermiogenesis (Justine 1998; Bruňanská 2010; Levron et al. 2010). However, the two typical striated roots situated in opposite directions have been reported exclusively during early stages of spermiogenesis in *Caryophyllaeus laticeps* and *C. fennica* (see Bruňanská and Kostič 2012; present study). It remains to be seen if this feature is only found in spermiogenesis of the Caryophyllidea. Its functional significance is not clear. On the other hand, rather than having a functional significance, perhaps it is more indicative of an evolutionary one: that the caryophyllidean spermatozoon does not reflect a plesiomorphic condition, e.g. two axonemes (Justine 1998), but reinforces a derived one, with all of its implications. One of these implications being that the Caryophyllidea, with their monopleuroid body plan, is not ancestral to other tapeworms but may have evolved from a polypleuroid or strobilate ancestral tapeworm with a two-axoneme spermatozoon.

The occurrence of one additional striated root has been reported during spermiogenesis in two caryophyllideans (Bruňanská and Poddubnaya 2006; Bruňanská and Kostič 2012) and one diphyllbothriidean (Levron et al. 2006b). The two additional striated roots opposite each other,

with different orientations to typical striated root in early stages of spermiogenesis (parallel) (Figs. 1d and 2c2) and advanced stages of the process (perpendicular) (Figs. 1g and 2d2), are described in *C. fennica* for the first time within the Eucestoda. This different orientation of additional striated roots might indicate their rotation, a process never described before in cestodes.

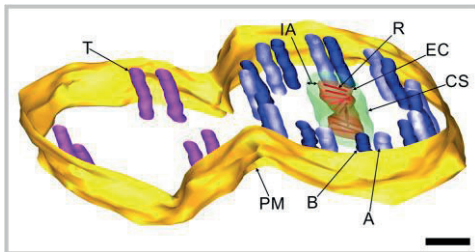


Fig. 6 Three-dimensional model of the 9 + “1” trepaxonematan structure in the mature spermatozoon of *C. fennica* with helical screw conveyor shape of the central electron-dense core (EC). The rod (R) depicts the orientation of elliptical shape of EC represented at each fifth virtual slice. Tilt series images were collected in the range $\pm 70^\circ$ with 1° increments. A, B, A and B tubules of each axonemal doublet; CS, cortical sheet; IA, intermediate area; PM, plasma membrane; T, cortical microtubules. Bar = 50 nm.

In contrast to *Khawia armeniaca* having an additional root associated mostly with a centriole/basal body of the flagellar bud, the two additional roots in *C. fennica* were observed in conjunction with both the flagellar bud and the free flagellum. The presence of additional striated root(s) in caryophyllidean cestodes was detected occasionally, and their significance still remains to be ascertained.

Glycogen is found abundant in most tissues of flatworms, including their sperm cells (Silveira 1973). The localisation of glycogen in the spermatozoa of caryophyllidean tapeworms has been described on the basis of either TEM observations (Świdorski and Mackiewicz 2002; Gamil 2008) or cytochemical staining by the Thiéry method (1967) (Bruňanská 2009; Yoneva et al. 2011; Bruňanská and Kostič 2012; present study).

In contrast to some other flatworms having male gametes with the 9 + “1” trepaxonematan structure, intraaxonemal glycogen was not observed in the mature spermatozoa of caryophyllidean tapeworms.

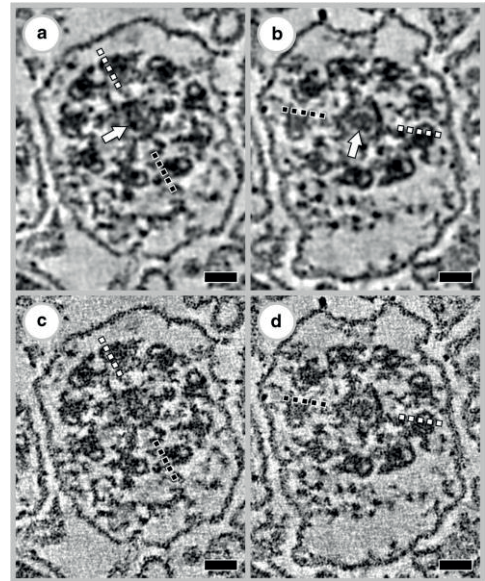


Fig. 7 The 9 + “1” trepaxonematan structure of a free flagellum of *C. fennica* with the two central tubular structures. **a–d** Tomogram virtual slices represent reconstructed volume ordered (**a, c** 21st; **b, d** 50th from the bottom). **c, d** Original tomogram slices and slices **a, b** after application of two-dimensional recursive Gauss filter using Amira software (Fisher Scientific). White arrows point out the central tubular doublet. These tubular structures are mostly consistent in electron density on other slices. Similar patterns were observed in other tomograms of the free flagellum and mature spermatozoon of *C. fennica*.

Electron tomography analysis of the free flagellum and one-axoneme mature spermatozoon of *C. fennica* provides clear evidence that two tubular structures are present in the central axonemal electron-dense core. For the first time, such structures are reported here in the Platyhelminthes having male gametes with the 9 + “1” trepaxonematan structure. Previously, some authors have speculated

that tubular helical elements might exist in the centre of the axonemal core, but these have not been detected in transverse ultrathin sections due to the pitch of the helices and the hypothetical extremely thin sections required for ultrastructural investigations (Henley et al. 1969). Based on treatment with trypsin, Thomas (1975) concluded that the tubular helical elements in question do not exist in the central core of the 9 + "1" axoneme of spermatozoa in Platyhelminthes. The presence of the two tubular structures in the central axonemal electron-dense core in *C. fennica* might suggest a hypothesis that such tubular elements might represent homologues of the central singlets of the 9 + 2 axoneme (Thomas 1975). On the other hand, any structural homology is not supported by the evidence that the central region of the 9 + 2 axoneme contains only two microtubules and is not surrounded by a sheath (Iomini et al. 1995).

The central axonemal electron-dense core with doublet tubular structures in the caryophyllidean cestode *C. fennica* resembles remarkably the central cylinder of the 9 + "1" axonemal pattern with a central singlet microtubule in the acoelan *Childia* and members of the Mecynostomidae having a 9 + "1" axonemal pattern (Tekle et al. 2007). Contrary to a helicoidal nature of the tubular doublet in *C. fennica* as revealed by electron tomography, a singlet microtubule in a 9 + "1" axoneme is presumed to be straight based on conventional transmission electron microscopy. Clearly, the substructure of the central singlet (in 9 + "1" axoneme) or doublet (in 9 + 2 axoneme) in the Acoela should be studied in more detail using electron tomography. Ultrastructural immunocytochemistry supports the hypothesis that the acoelan 9 + "1" axoneme pattern is not homologous to the trepaxonematan 9 + "1" pattern (Justine et al. 1998; Tekle et al. 2007) because in contrast to the 9 + "1" axonemal pattern in acoels (Tekle et al. 2007), the central cylinder of the 9 + "1" axoneme of cestodes (Miquel and Marchand 2001) and digeneans (Iomini et al. 1995; Iomini and Justine 1997; Ndiaye et al. 2003) is not immunoreactive to tubulin. It should be noted, however, that electron microscope immunocytochemistry data on the 9 + 2

axonemes in Platyhelminthes, which might reveal the chemical nature of their central axonemal doublet microtubules, are still lacking. Thus, we need a more detailed picture of the basic structure of the Platyhelminthes spermatozoa based on various techniques (conventional electron microscopy, electron tomography, cryo-electron tomography and immunocytochemistry) before a hypothesis on the interrelationships of the 9 + "1" and 9 + 2 axoneme structures can be definitively accepted or rejected.

Using electron tomography, we have shown that the helicoidal nature of the tubular doublet in *C. fennica* resembles the spiral shape of the central electron-dense core in the oneaxoneme spermatozoa of the more derived cestode *Nippotaenia mogurndae* (Bruňanská et al. 2015). These findings are in sharp contrast with the interpretations of Burton (1967) of the longitudinally oriented elements of the central electron-dense core of the 9 + "1" flagellum of Digenea or that of Tricladida (Silveira 1969), detected with negative staining. Burton and Silveira (1971) have pointed out that the helical substructure is a more fundamental configuration than the derived protofibrillar one. Thus, the spiral shape of the central electron-dense core in cestodes, as detected by electron tomography, might enable higher stability of sperm cells in comparison with a presumed bundle of longitudinally oriented elements. Higher stability of the central core can be related to a reduced or even absent motility of spermatozoa with unconventional axonemal organisations (Ciolfi et al. 2016).

The present study supports the validity of a revised model of the caryophyllidean type of spermatogenesis presented by Bruňanská and Kostič (2012). Furthermore, it introduces new spermatology data that should be enriched by further ultrastructural investigations of other cestodes for a better understanding of the biology, reproduction and interrelationships among the Eucestoda.

Acknowledgements We would like to thank our colleagues Marta Špakulová and Mikuláš Oros (Slovakia) for providing invaluable help with collecting parasites. We acknowledge

the core facility of the Institute of Parasitology, BC ASCR in České Budějovice, Czech Republic, supported by the MEYS CR (LM2015062 Czech-BioImaging). This research was undertaken within the framework of joint research projects (nos. AV ČR-16-08 and SAV-18-21) supported by a bilateral agreement on scientific exchange and cooperation signed by the Czech and Slovak Academies of Sciences. The work was realised within a frame of the Centre of Excellence for Parasitology (Code ITMS: 26220120022) based on the support of the Operational Programme “Research & Development” funded from the European Regional Development Fund (rate 0.4).

Funding information This study was supported by the Grant Agency of the Slovak Republic VEGA (project no. 2/0104/16 to MB).

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Bâ CT, Marchand B (1995) Spermiogenesis, spermatozoa and phyletic affinities in the Cestoda. In: Jamieson, BGM, Ausie J, Justine JL (eds) *Advances in spermatozoal phylogeny and taxonomy*. *Mém Mus natn Hist nat* 166:87–95
- Bruňanská M (2009) Spermatological characters of the caryophyllidean cestode *Khawia sinensis* Hsü, 1935, a carp parasite. *Parasitol Res* 105:1603–1610
- Bruňanská M (2010) Recent insights into spermatozoa development and ultrastructure in the Eucestoda. In: Lejeune T, Delvaux P (eds) *Human spermatozoa: maturation, capacitation and abnormalities*. Nova Science Publishers, Inc., New York, pp 327–354
- Bruňanská M, Kostič B (2012) Revisiting caryophyllidean type of spermiogenesis in the Eucestoda based on spermatozoon differentiation and ultrastructure of *Caryophyllaeus laticeps* (Pallas, 1781). *Parasitol Res* 110:141–149
- Bruňanská M, Bílý T, Nebesářová J (2015) *Nippotaenia mogurndae* Yamaguti et Myiata, 1940 (Cestoda, Nippotaeniidea): first data on spermiogenesis and sperm ultrastructure. *Parasitol Res* 114:1443–1453
- Bruňanská M, Nebesářová J, Scholz T, Fagerholm H-P (2001) Spermiogenesis in the pseudophyllid cestode *Eubothrium crissum* (Bloch, 1779). *Parasitol Res* 87:579–588
- Bruňanská M, Poddubnaya LG (2006) Spermiogenesis in the caryophyllidean cestode *Khawia armeniaca* (Cholodkovski, 1915). *Parasitol Res* 99:449–454
- Bruňanská M, Poddubnaya LG (2010) Spermatological characters of the spathebothriidean tapeworm *Didymobothrium rudolphii* (Monticelli, 1890). *Parasitol Res* 106:1435–1442
- Bruňanská M, Poddubnaya LG, Xylander WER (2013) A reinvestigation of spermiogenesis in *Amphilina foliacea* (Platyhelminthes, Amphilinidea). *Folia Parasitol* 60:43–50
- Bruňanská M, Scholz T, Dezfali B, Poddubnaya LG (2006) Spermiogenesis and sperm ultrastructure of *Cyathocephalus truncatus* (Pallas, 1781) Kessler, 1868 (Cestoda: Spathebothriidea). *J Parasitol* 92:884–892
- Burton PR (1967) Fine structure of the unique central region of the axial unit of lung-fluke spermatozoa. *J Ultrastruct Res* 19:166–172
- Burton PR, Silveira M (1971) Electron microscopic and optical diffraction studies of negatively stained axial units of certain platyhelminth sperm. *J Ultrastruct Res* 36:757–767
- Caira JN, Littlewood DTJ (2013) Worms, Platyhelminthes. In: Levin SA (ed) *Encyclopedia of biodiversity*, vol 7. Academic, Waltham, pp 437–469

- Ciolfi S, Mencarelli C, Dallai R (2016) The evolution of sperm axoneme structure and the dynein heavy chain complement in cecidomid insects. *Cytoskeleton* 73:209–218
- Crowther RA, Henderson R, Smith JM (1996) MRC image processing programs. *J Struct Biol* 116:9–16
- Ehlers U (1984) Phylogenetisches System der Platyhelminthes. In: *Verhandl Naturwissensch Vereins Hamburg* 27:291–294
- Gamil IS (2008) Ultrastructural studies of the spermatogenesis and spermiogenesis of the caryophyllidean cestode *Wenyonia virilise* (Woodland, 1923). *Parasitol Res* 103:777–785
- Henley C, Costello DP, Thomas MB, Newton WD (1969) The B9 + “1” pattern of microtubules in spermatozoa of *Mesostoma* (Platyhelminthes, Turbellaria). *Proceed Nat Acad Sci USA* 64:849–856
- Hoberg EP, Mariaux J, Brooks DR (2001) Phylogeny among the orders of the Eucestoda (Cercaromorphae): integrating morphology, molecules and total evidence. In: Littlewood DTJ, Bray RA (eds) *Interrelationships of the Platyhelminthes*. Taylor and Francis, London, pp 112–126
- Iomini C, Justine J-L (1997) Spermiogenesis and spermatozoon of *Echinostoma caproni* (Platyhelminthes, Digenea): transmission and scanning electron microscopy, and tubulin immunocytochemistry. *Tissue Cell* 29:107–118
- Iomini C, Raikova O, Noury-Sraïri N, Justine J-L (1995) Immunocytochemistry of tubulin in spermatozoa of Platyhelminthes. In: Jamieson BGM, Ausio J, Justine J-L (eds) *Advances in spermatozoal phylogeny and taxonomy*. *Mém Mus natn Hist nat* 166:97–104
- Justine J-L (1998) Spermatozoa as phylogenetic characters for the Eucestoda. *J Parasitol* 84:385–408
- Justine J-L (2001) Spermatozoa as phylogenetic characters for the Platyhelminthes. In: Littlewood DTJ, Bray RA (eds) *Interrelationships of the Platyhelminthes*. Taylor and Francis, London, pp 231–238
- Justine J-L (2003) Ultrastructure des spermatozoïdes et phylogénie des Neodermata. In: C. Combes C, Jourdan J (eds) *Taxonomy, ecology and evolution of metazoan parasites*. PUP, Perpignan, pp 359–380
- Justine J-L, Iomini C, Raikova O, Mollaret I (1998) The homology of cortical microtubules in platyhelminth spermatozoa: a comparative immunocytochemical study of acetylated tubulin. *Acta Zool* 79: 235–241
- Kazacos K, Mackiewicz JS (1972) Spermatogenesis in *Huntirella nodulosa* Mackiewicz and McCrae, 1962 (Cestoidea: Caryophyllidea). *Z Parasitenkd* 38:21–31
- Kremer JR, Mastrorade DN, McIntosh JR (1996) Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. *J Struct Biol* 116:71–76
- Levron C, Bruňanská M, Marchand B (2005) Spermiogenesis and sperm ultrastructure of the pseudophyllidean cestode *Triaenophorus nodulosus* (Pallas, 1781). *Parasitol Res* 98:26–33
- Levron C, Bruňanská M, Poddubnaya LG (2006a) Spermatological characters of the pseudophyllidean cestode *Bothriocephalus scorpii* (Müller, 1776). *Parasitol Int* 55:113–120
- Levron C, Bruňanská M, Poddubnaya LG (2006b) Spermatological characters in *Diphyllobothrium latum* (Cestoda, Pseudophyllidea). *J Morphol* 267:1110–1119
- Levron C, Miquel J, Oros M, Scholz T (2010) Spermatozoa of tapeworms (Platyhelminthes, Eucestoda): advances in ultrastructural and phylogenetic studies. *Biol Rev* 85:523–543
- Levron C, Sitko J, Scholz T (2009) Spermiogenesis and spermatozoon of the tapeworm *Ligula intestinalis* (Diphyllobothriidae): phylogenetic implications. *J Parasitol* 95:1–9

- Levron C, Yoneva A, Kalbe M (2013) Spermatological characters in the diphyllbothriidean *Schistocephalus solidus* (Cestoda). *Acta Zool (Stockholm)* 94:240–247
- Mackiewicz JS (2003) Caryophyllidea (Cestoidea): molecules, morphology and evolution. *Acta Parasitol* 48:143–154
- Mariaux J (1998) Amolecular phylogeny of the Eucestoda. *J Parasitol* 84: 114–124
- Marigo AM, Delgado E, Torres J, Bâ CT, Miquel J (2012a) Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of the bothriocephalidean cestode *Clestobothrium crassiceps* (Rudolphi, 1819), a parasite of the teleost fish *Merluccius merluccius* (Gadiformes: Merlucciidae). *Parasitol Res* 110:19–30
- Marigo AM, Levron C, Bâ CT, Miquel J (2012b) Ultrastructural study of spermiogenesis and the spermatozoon of the proteocephalidean cestode *Barsonella lafoni* de Chambrier et al., 2009, a parasite of the catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) (Siluriformes, Clariidae). *Zool Anz* 251:147–159
- Mastrorade DN (2005) Automated electron microscope tomography using robust prediction of specimen movements. *J Struct Biol* 152: 36–51
- Miquel J, Marchand B (2001) Tubulin immunocytochemistry of the spermatozoa in the cestode *Mesocestoides litteratus* (Mesocestoididae). *Acta Parasitol* 46:130–134
- Miquel J, Świdorski Z, Mackiewicz JS, Ibraheem MH (2008) Ultrastructure of spermiogenesis in the caryophyllidean cestode *Wenyonia virilis* Woodland, 1923, with re-assessment of flagellar rotation in *Glariidacris catostomi* Cooper, 1920. *Acta Parasitol* 53:19–29
- Mokhtar-Maamouri F (1979) Étude en microscopie électronique de la spermatogénèse et du spermatozoïde de *Phyllobothrium gracile* Wedl, 1855 (Cestoda, Tetrphyllidea, Phyllobothriidae). *Z Parasitenkd* 59:245–258
- Ndiaye PI, Miquel J, Fons R, Marchand B (2003) Spermiogenesis and sperm ultrastructure of the liver fluke *Fasciola hepatica* L., 1758 (Digenea, Fasciolidae): transmission and scanning electron microscopy, and tubulin immunocytochemistry. *Acta Parasitol* 48:182–194
- Olson PD, Littlewood DTJ, Bray RA, Mariaux J (2001) Interrelationships and evolution of the tapeworms (Platyhelminthes: Cestoda). *Mol Phylogen Evol* 19:443–467
- Olson PD, Poddubnaya LG, Littlewood DTJ, Scholz T (2008) On the position of *Archigetes* and its bearing on the early evolution of the tapeworms. *J Parasitol* 94:898–904
- Oros M, Hanzelová V, Scholz T, Mackiewicz JS (2008) Phylogenetic relationships of the monozoic tapeworms (Eucestoda: Caryophyllidea) inferred from morphological characters. *Syst Parasitol* 70:1–14
- Protasova EP, Kuperman BI, Roitman VA, Poddubnaya LG (1990) The caryophyllidean fauna of the USSR. *Nauka, Moscow*, p 240
- Silveira M (1969) Ultrastructural studies on a “nine plus one” flagellum 1. *J Ultrastruct Res* 26:274–288
- Silveira M (1973) Intraaxonemal glycogen in “9 + 1” flagella of flatworms. *J Ultrastruct Res* 44:253–264
- Stoitsova SR, Georgiev BB, Dacheva RB (1995) Ultrastructure of spermiogenesis and the mature spermatozoon of *Tetrabothrius erostris* Loennberg, 1896 (Cestoda, Tetrabothriidae). *Int J Parasitol* 25: 1427–1436
- Šípková L, Levron C, Oros M, Justine J-L (2011) Spermatological characters of bothriocephalideans (Cestoda) inferred from an ultrastructural study on *Oncodiscus sauridae* and *Senga* sp. *Parasitol Res* 109:9–18
- Šípková L, Levron C, Freeman M, Scholz T (2010) Spermiogenesis and spermatozoon of the tapeworm

- Parabothriocephalus gracilis* (Bothriocephalidea): ultrastructural and cytochemical studies. *Acta Parasitol* 55:58–65
- Świdorski Z (1986) Three types of spermiogenesis in cestodes. In: Imura T, Maruse S, Suzuki T (eds) *Proc 11th Int Congr Electr Microsc, Kyoto*, pp 2959–2960
- Świdorski Z, Mackiewicz JS (1976) Fine structure of the spermatozoon of *Glaridacris catostomi* (Cestoidea, Caryophyllidea). In: Feldman-Muhsam B (ed) *Proc 6th Eur Congr Electr Microsc, Jerusalem*, pp 307–308
- Świdorski Z, Mackiewicz JS (2002) Ultrastructure of spermatogenesis and spermatozoa of the caryophyllidean cestode *Glaridacris catostomi* Cooper, 1920. *Acta Parasitol* 47:83–104
- Tekle YI, Raikova OI, Justine J-L, Hendelberg J, Jondelius U (2007) Ultrastructural and immunocytochemical investigation of acoel sperms with 9 + 1 axoneme structure: new sperm characters for unraveling phylogeny in Acoela. *Zoomorphology* 126:1–16
- Thiéry J-P (1967) Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J Microsc* 6:987–1018
- Thomas MB (1975) The structure of the 9 + 1 axonemal core as revealed by treatment with trypsin. *J Ultrastruct Res* 52:409–422
- Waeschenbach A, Webster BL, Littlewood DTJ (2012) Adding resolution to ordinal level relationships of tapeworms (Platyhelminthes: Cestoda) with large fragments of mtDNA. *Mol Phylogen Evol* 63: 834–847
- Yoneva A, Kuchta R, Scholz T (2013) Spermiogenesis and sperm ultrastructure of two species of *Duthiersia*, parasites of monitors, with a review of spermatological characters in the Diphyllbothriidea (Cestoda). *Zool Anz* 252:486–494
- Yoneva A, Levron C, Ash A, Scholz T (2012a) Spermatological characters of monozoic tapeworms (Cestoda: Caryophyllidea), including first data on a species from the Indomalayan catfish. *J Parasitol* 98: 423–430
- Yoneva A, Levron C, Oros M, Orosová M, Scholz T (2011) Ultrastructure of spermiogenesis and mature spermatozoon of *Breviscolex orientalis* (Cestoda: Caryophyllidea). *Parasitol Res* 108:997–1005
- Yoneva A, Levron C, Oros M, Orosová M, Scholz T (2012b) Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of *Hunterella nodulosa* (Cestoda: Caryophyllidea), a monozoic parasite of suckers (Catostomidae) in North America. *Folia Parasitol* 59:179–188

Kapitola 7. ČLÁNEK 4

OCCURRENCE, PATHOLOGY, AND ULTRASTRUCTURE OF IRIDOVIRUS AND CYTOPLASMIC POLYHEDROSIS VIRUSES IN DAPHNIDS FROM THE CZECH REPUBLIC

Jiří Vávra, Tomáš Bílý, Jana Nebesářová, Brian A. Federici

Journal of Invertebrate Pathology, Volume 140, Pages 35–38, 2016

DOI 10.1016/j.jip.2016.07.008

Occurrence, pathology, and ultrastructure of iridovirus and cytoplasmic polyhedrosis viruses in daphnids from the Czech Republic

Jiří Vávra^{a,b,c}, Tomáš Bílý^{a,b}, Jana Nebesářová^{a,c}, Brian A. Federici^{d,*}

^aInstitute of Parasitology, Biology Centre of the Czech Academy of Sciences, Branišovská 31, CZ-37005 České Budějovice, Czech Republic

^bFaculty of Science, University of South Bohemia, Branišovská 1760, CZ-37005 České Budějovice, Czech Republic

^cFaculty of Science, Charles University in Prague, Viničná 7, CZ-12843 Praha, Czech Republic

^dDepartment of Entomology and Institute for Integrative Genome Biology, University of California, Riverside, Riverside, CA, USA

Iridescent (IVs, family *Iridoviridae*, genus *Iridovirus*) and cytoplasmic polyhedrosis viruses (CPVs; family *Reoviridae*, genus *Cypovirus*) are well known in insects, with thirteen IV species recognized from various orders, and sixteen CPV species known from lepidopterans. In 1975, an IV and CPV were reported in the daphnid, *Simocephalus expinosus*, in Florida, but other reported daphnid virus infections seem to be rare. Here we report infected daphnids from woodland and carp ponds in the Czech Republic, *Daphnia curvirostris* with an IV, and *D. pulex* and *D. ambigua*, with CPVs. This suggests these viruses are more common in daphnids, the rarity of reports due to few surveys.

* Corresponding author.

E-mail address: brian.federici@ucr.edu (B.A. Federici).

1. INTRODUCTION

Iridoviruses (IVs; family *Iridoviridae*, genera *Iridovirus* and *Chloriridovirus*) and cytoplasmic polyhedrosis viruses (CPVs; family *Reoviridae*, genus *Cypovirus*) are well known virus types that cause diseases in insects, and in a few cases in other invertebrates. Iridoviruses derive their name from the iridescent blue/green color imparted to infected larvae by the accumulation of paracrystalline arrays of virions in infected tissues (Xeros, 1954). The IVs have been reported from larvae of many species belonging to the Lepidoptera, Coleoptera, and Diptera, as well as Orthoptera and Hymenoptera (Chinchar et al., 2005). Reports from crustaceans are rare, but IVs have been reported from terrestrial

isopods (Isopoda), a few daphnids (Crustacea, Branchiopoda) and other non-insect invertebrates (Federici and Hazard, 1975; Federici, 1980; Williams et al., 2005). IVs typically have a broad tissue tropism that includes the epidermis, fat body, muscles, nerves, and reproductive tissues, but not the midgut epithelium, which most insect viruses infect. Following their discovery in insects, it was later realized that certain viruses that cause diseases in vertebrates, (certain frogs and fish), also are members of the family *Iridoviridae* (Williams et al., 2005). In contrast, CPVs are almost exclusively known from the midgut epithelium of lepidopteran larvae. There are no accepted CPV species other than those that attack lepidopteran larvae, for which sixteen species are recognized (Mertens et al., 2005), even though this type of virus

is known to occur in chironomids (Federici et al., 1973), twenty species of mosquito larvae representing nine genera (Shapiro et al., 2005; Becnel and White, 2007), black fly larvae (Green et al., 2007), as well as the freshwater daphnid, *Simocephalus expinosus* (Federici and Hazard, 1975).

The IV infections are easily recognized in infected larvae by their typically blue/green iridescent color. CPVs on the other hand generally require dissection of infected larvae and examination of midgut epithelial cells by bright-field or phase microscopy, which reveals numerous polyhedral occlusion bodies in the cytoplasm (Payne, 1981). Virus presence in IV infections is confirmed by the presence of large (125–160 nm) icosahedral virions in the cytoplasm of infected cells, whereas in the case of CPVs, the virions are also icosahedral, but only ~60 nm in diameter, and typically occur free or occluded within a matrix of polyhedral protein coded for by the viral genome. Of interest is that mosquito larvae and daphnids typically breed in similar habitats, but there is no evidence that the same IV or CPV can infect both hosts.

During a survey of crustaceans for microsporidian infections in woodland and carp ponds in the Czech Republic, we used the above signs of disease and techniques and detected IV and CPV infections in three species of daphnids. Because reports of these two virus diseases in daphnids are extremely rare, we describe our findings here, along with virion structural properties, revealed by conventional and advanced microscopy techniques.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Site, collection of infected specimens, microscopy methods

2.1.1. Daphnids with an iridovirus infection

The IV-infected daphnids were found in *Daphnia curvirostris* Eylmann 1878, inhabiting a permanent forest pool fed by groundwater near the town Přerov nad Labem, Central Bohemia Region, Czech Republic (50°167' N, 14°810' E) (Fig. 1A).

Specimens that appeared by eye to slightly opaque or were opalescent were investigated.

2.1.2. Daphnids infected with cytoplasmic polyhedrosis virus (CPV)

Two species of daphnids were found infected with CPVs (referred to here as CPV-I and CPV-II). CPV-I was found in *Daphnia pulex* Leydig 1860, collected in October–November, 2013 in a semipermanent forest marsh (drying rarely in some years), near Běleč, Central Bohemia region, Czech Republic (50°3'12.240''N, 14°1'4.221''E; Fig. 2A). CPV-II was found in *Daphnia ambigua* Scourfield 1947, collected in the carp-breeding pond Dvorský, near Kařez, Central Bohemia, Czech Republic (49°49'0''N, 13°47' 0''E) in October 2015.

2.2. Transmission electron microscopy (TEM), tomography (ET) and Atomic force microscopy (AFM)

Live daphnids were examined under 100–200× power of the light microscope (LM) for the presence of viral crystals in the gut or fat body. TEM, ET and AFM observations were done using sections of materials fixed in 2.5% glutaraldehyde in 2% cacodylate buffer, post-fixed with osmium, and embedded in Epon-Araldite blocks. Additional information is given in Supplementary Files (SF) 1–4.

3. RESULTS

3.1. Tissue infection, prevalence and host reaction

Iridovirus. Infected specimens were slightly opaque with a bluish tint, but their behavior was normal. Such specimens represented an estimated 1% of the population based on macroscopic appearance of specimens in a dense population of daphnids sampled in June 2014. Enlarged fat cells were the site of infection in *D. curvirostris*.

CPV-I and CPV-II. These two isolates infected the gut epithelial cells of their hosts, and polyhedra could be seen at low magnification in cells of the first

third to half of the gut in live hosts (Fig. 2B, SF2-Fig. 3A). CPV-I patent infections occurred in about 1% of adult *D. pulex* sampled (nearly 500 inspected). The CPV-II infection was very rare and only two *D. ambigua* specimens were found infected among hundreds examined. The behavior of CPV-infected specimens was the same as that of healthy daphnids.

3.2. Virus description and identity

3.2.1. Iridovirus infections

Ultrathin sections of fat cells of *D. curvirostris* revealed the presence of stages of iridovirus virogenesis, including the presence of virogenic stromae in which icosahedral virions were present. In more advanced stages of infection large virions, measuring 243.5 ± 6.0 nm ($n = 50$) in diameter, were present in paracrystalline arrays (Fig. 1B and C). Developing and mature virions were characteristic of those belonging to the genus *Iridovirus*, being icosahedral with a dense core, and a putative lipid membrane

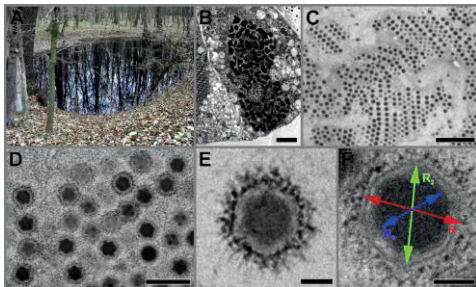


Fig. 1. Habitat, pathology, and ultrastructure of an iridovirus found in populations of the daphnid, *Daphnia curvirostris*, in a woodland pond in the Czech Republic. (A) Woodland pond from which iridovirus-infected daphnids were collected; (B–F) electron micrographs illustrating characteristic pathology and ultrastructure of the virions: (B) virogenic stroma in an adipose cell (note the small cluster of assembled virions within the stroma); (C) clusters of virions in paracrystalline arrays, which impart a bluish tint to infected daphnids; (D–F) illustration of the icosahedral ultrastructure of virions that characterize this virus type. (R1 = diameter

of capsid – 243.5 ± 6.0 nm; R2 = diameter of the membrane envelope – 208.6 ± 5.9 ; R3 = central core – 183.6 ± 7.4 ; $n = 50$). Bar Fig. B = 2 μ m, C = 2 μ m, D = 500 nm, E and F = 100 nm.

beneath the capsid (Fig. 1D–F, SF3). The extensions from the capsid surface indicate these may be similar fibrils found in some iridoviruses, and may account for the large diameter of the virions (Fig. 1E).

3.2.2. Cytoplasmic polyhedrosis virus infections

Crystalline inclusions in the gut epithelium of *D. pulex* and *D. ambigua* were easily recognized with LM. As they appeared in spherical clusters (Fig. 2B and C, SF2-Fig. 3A), it was possible these might also be polyhedra of a baculovirus in the nucleus, or even a densovirus. TEM examination of ultrathin sections, however, revealed both daphnid species were infected by cytoplasmic polyhedrosis viruses (Fig. 2D–F, SF2-Fig. 3B–D). The virogenic stroma of CPV-I (in *D. pulex*) was a large circular mass with nascent virions as they developed surrounding the polyhedra (Fig. 2D and F). The virogenic stroma of CPV-II (in *D. ambigua*) formed an irregular cluster of branches that surrounded the individual polyhedral (SF2-Fig. 3B). Aside from the development of polyhedra in the cytoplasm, the structure – capsid and dense core – and average diameter of 60 nm for the virions of both viruses (Fig. 2E–H; SF2-Fig. 3C and D), was characteristic for members of the genus *Cypovirus* (family Reoviridae). The ET showed that CPV-I matured outside the polyhedral (Fig. 2H) are larger (67.4 ± 2.1 nm; $n = 15$), and have the capsid thicker, compared to matured virions inside the polyhedra (Fig. 2G) (58.7 ± 1.3 nm; $n = 15$). The viral particles matured in (or in proximity) of the polyhedra have also different appearance (different contrast), apparently due to different retention of metals used for contrasting Epon-Araldite sections (SF4–5).

The ET demonstrated that the proximity of the individual virion to the plane of the section (or if the virion is actually sectioned) is important for visualization of virion substructure (SF5). The AFM demonstrated that the sections surface

is not smooth, with occlusion bodies sticking out of the plane of sections (~20 nm) and with individual viral particles disclosed as “bumps

and holes” depending on the section plane (Fig. 2I and J and the corresponding slice).

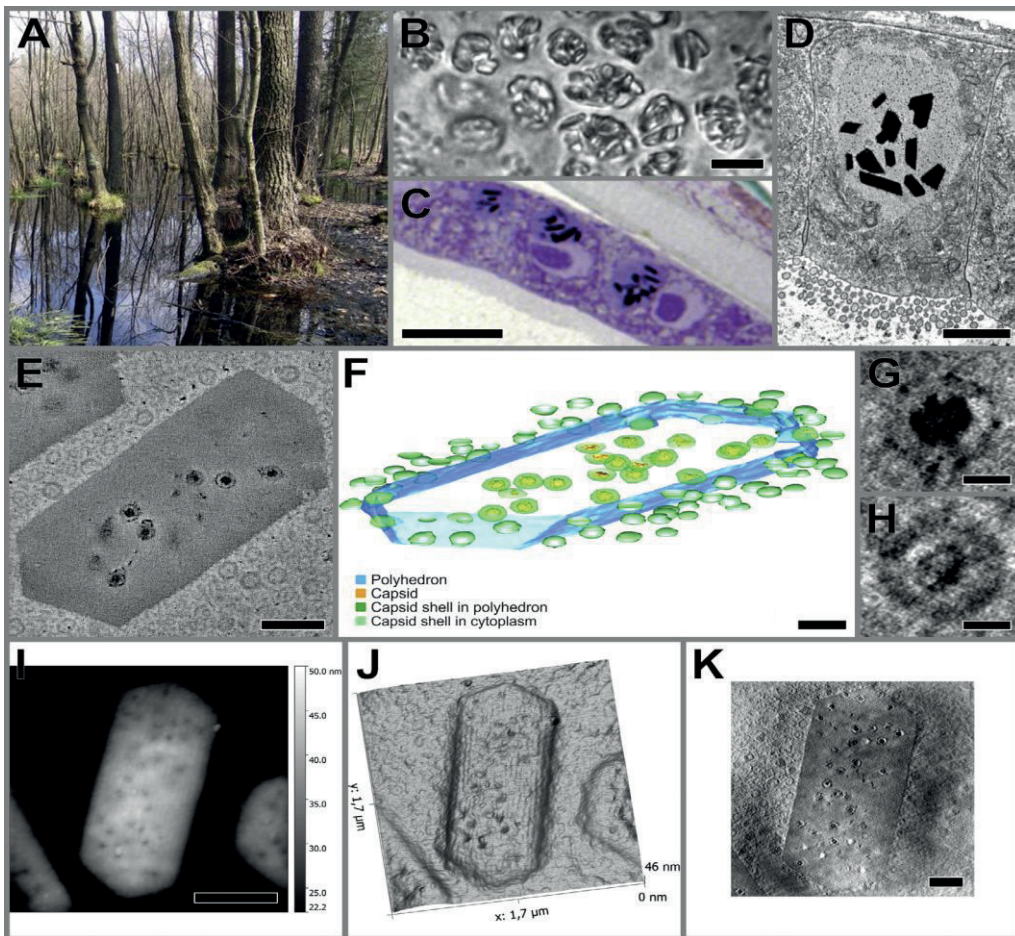


Fig. 2. Habitat, pathology, and ultrastructure of cytoplasmic polyhedrosis virus (CPV-I) in *Daphnia pulex* population in a forest wetland marsh in the Czech Republic. (A) Marsh where infected specimens of *D. pulex* were collected. (B) and (C) respectively, light micrographs of in vivo CPV-I polyhedral clusters in gut epithelial cells, and a toluidine blue-stained plastic section through the gut epithelium showing the virogenic virions through which the plane of section passed that were not fully occluded in a polyhedron seemed better visualized, probably because more contrasting metals accumulated on them (SF5).

stromae and angular polyhedrons. (D) Electron micrograph of CPV-I infected cell. (E) and (F) are single tomogram (dual axis tomogram from range $\pm 70^\circ$ with step 0.3° , resolution in X, Y and slice thickness is 0.55 nm) pictures of polyhedron with incorporated virions. (I–K) Single polyhedron visualized by AFM and ET (J = 3D image made from AFM height map (Fig. 1) using Amira software, K = tomogram slice – single axis tomogram from range $\pm 75^\circ$ with step 0.75° , resolution in X, Y and slice thickness is 0.81 nm). (G) Virion matured inside a polyhedron in Fig. (K). (H) Virion maturing outside of polyhedron in Fig. (K). Bar Fig. B = 10 μm, C = 10 μm, D = 2.5 μm, E = 200 nm, F = 100 nm, G and H = 25 nm, I = 500 nm,

K = 200 nm. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

DISCUSSION

Daphnids are the principal grazers in freshwater habitats (Sarnelle, 2005). Their filtration-feeding makes them hosts of multiple potential pathogens (Ebert, 2005) and virions of several viruses have been shown to accumulate during feeding in daphnids (Abbas et al., 2012; Meixell et al., 2013). Of greater relevance is that sequencing has revealed an abundance of viral sequences in daphnid genomes (Ballinger et al., 2013; Metegnier et al., 2015; Hewson et al., 2013).

Surprisingly, the structural evidence demonstrating the presence of viruses in daphnids is extremely limited, being represented by only three brief reports over the past four decades. Federici and Hazard (1975) demonstrated the presence of an iridovirus and a cytoplasmic polyhedrosis virus in the daphnid, *Simocephalus expinosus*. Bergoin et al. (1984) observed an infection by an iridovirus (genus *Chloriridovirus* with virion size greater than 160 nm) in the fat body of *Daphnia magna* in brackish pools in France, and Hewson et al. (2013) reported the presence of unidentified viral particles in tissues of *Daphnia mendotae*. What is particularly interesting about finding both and iridovirus and CPV(s) in different woodland pools and a carp pond in the Czech Republic is that these viruses appear to be similar, especially the CPVs, to the viruses found together in *S. expinosus* in Florida (Federici and Hazard, 1975). This implies that while these and other virus types may not be common in daphnids, they are probably not as rare as the literature suggests (Ebert, 2005). We suggest that the lack of more reports of virus infections in daphnids, and from a much broader geographical range than our current knowledge, is due to a lack of surveys undertaken by investigators experienced in recognizing such infections. It may well be that viral diseases are present in many daphnid populations around the world and it is hoped that this report may stimulate their discovery. More specifically, we do not think

that the occurrence of IV and CPV infections in daphnids in habitats as different as a semitropical Florida swamp versus ponds and forest pools in the Czech Republic, separated in time by fifty years, is simply a rare coincidence. Rather, more informative reports of prevalence require more detailed surveys by appropriately trained personnel.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Technology Agency of the Czech Republic (TE01020118) and from the program for large research infrastructures of the Ministry of Education, Youth and Sports within the project “National Infrastructure for Biological and Medicinal Imaging (Czech-BioImaging LM2015062).” We also thank D. Kaftan, Faculty of Science, University of South Bohemia, for his support and fruitful discussion of the AFM technique.

APPENDIX A. SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2016.07.008>.

REFERENCES

- Abbas, M.D., Nazir, J., Stumpf, P., Marschang, R.E., 2012. Role of water fleas (*Daphnia magna*) in the accumulation of avian influenza viruses from the surrounding water. *Intervirology* 55, 365–371.
- Ballinger, M.J., Bruenn, J.A., Kotov, A.A., Taylor, D.J., 2013. Selectively maintained paleoviruses in Holarctic water fleas reveal an ancient origin for phleboviruses. *Virology* 446, 276–282.
- Becnel, J.J., White, S.E., 2007. Mosquito pathogenic viruses – the last 20 years. In: Floore, T.G. (Ed.), *Biorational Control of Mosquitoes*, Bull. #7, Am. Mosq. Contr. Assn, vol. 23, pp. 36–49.
- Bergoin, M., Mialhe, E., Quiot, J.M., Van Rosieren, P., 1984. Infection a Chloriridovirus (Iridoviridae) dans les populations du Crustacé planctonique

- Daphnia magna* (Straus) (Cladocera) d' étangs saumâtres. C. R. Acad. Sci. Paris Ser. III 298, 139–142.
- Chinchar, V.G., Essbauer, S., He, J.G., Hyatt, A., Miyazaki, T., Seligly, V., Williams, T., 2005. Family Iridoviridae. In: Fauguet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, , Ball, B.A. (Eds.), Virus Taxonomy: Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier/Academic Press, London, UK, pp. 145–162.
- Ebert, D., 2005. Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in *Daphnia* [Internet]. National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda (MD). Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2043/>> (Chapter 3, Some Parasites of *Daphnia*).
- Federici, B.A., Hazard, E.I., Anthony, D.E., 1973. A new cytoplasmic polyhedrosis virus from chironomids collected in Florida. J. Invertebr. Pathol. 22, 136–138.
- Federici, B.A., Hazard, E.I., 1975. Iridovirus and cytoplasmic polyhedrosis virus in the freshwater daphnid *Simocephalus expinosus*. Nature 254, 327–328.
- Federici, B.A., 1980. Isolation of an iridovirus from two terrestrial isopods, the pill bug, *Armadillidium vulgare*, and the sow bug, *Porcellio dilatatus*. J. Invertebr. Pathol. 36, 373–381.
- Green, T.B., White, S., Rao, S., Mertens, P.P.C., Adler, P.H., Becnel, J.J., 2007. Cypovirus from the black fly, *Simulium ubiquitum* (Diptera: Simuliidae). J. Invertebr. Pathol. 95, 26–32.
- Hewson, I., Ng, G., Li, W., LaBarre, B.A., Aguirre, I., Barbosa, J.G., Breitbart, M., Greco, A.W., Kearns, C.M., Looi, A., Schaffner, L.R., Thompson, P.D., Hairston Jr., N.G., 2013. Metagenomic identification, seasonal dynamics, and potential transmission mechanisms of a *Daphnia*-associated single-stranded DNA virus in two temperate lakes. Limnol. Oceanogr. 58, 1605–1620.
- Meixell, B.W., Borchardt, M.A., Spencer, S.K., 2013. Accumulation and inactivation of avian influenza virus by the filter-feeding invertebrate *Daphnia magna*. Appl. Environ. Microbiol. 79, 7249–7255.
- Mertens, P.P.C., Rao, S., Zhou, H., 2005. Family Reoviridae, Genus Cypovirus. In: Fauguet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, Ball, B.A. (Eds.), Virus Taxonomy: Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier/Academic Press, London, UK, pp. 522–533.
- Metegnier, G., Becking, T., Chebbi, M.A., Giraud, I., Moumen, B., Schaack, S., Cordaux, R., Gilbert, C., 2015. Comparative paleovirological analysis of crustaceans identifies multiple widespread viral groups. Mobile DNA 6. <http://dx.doi.org/10.1186/s13100-015-0047-3> art.no.16.
- Payne, C.C., 1981. Cytoplasmic polyhedrosis viruses. In: Davidson, E.W. (Ed.), Pathogenesis of Invertebrate Microbial Diseases. Allanheld, Osmun & Co., Totowa, New Jersey, pp. 61–100.
- Sarnelle, O., 2005. *Daphnia* as keystone predators: effects on phytoplankton diversity and grazing resistance. J. Plankt. Res. 27, 1229–1238.
- Shapiro, A., Green, T., Rao, S., White, S., Garner, G., Mertens, P.P.C., Becnel, J.J., 2005. Morphological and molecular characterization of a cypovirus (Reoviridae) from the mosquito *Uranotaenia sapphirina* (Diptera; Culicidae). J. Virol. 79, 9430–9438.
- Williams, T., Barbosa-Solomieu, V., Chinchar, V.G., 2005. A decade of advances in iridovirus research. Adv. Virus Res. 65, 173–248.
- Xeros, N., 1954. A second virus disease of the leatherjacket *Tipula palidosa*. Nature 174, 562

Kapitola 8.DISKUZE A ZÁVĚR

Dvouosá tomografie

Ke zhoršení rozlišení dvouosé tomografie a ke vzniku artefaktů dochází s nepřesným pootočením síťky o 90° . Neboť skládání dvouosých tomogramů se děje buď sloučením jejich zrekonstruovaných objemů, které se vzájemně zarovnají [72], anebo sloučením snímků z obou os před zpětnou rekonstrukcí [202]. Nepřesnost ve vzájemném mechanickém pootočení tomogramů o 90° je řešena v rámci počítačového zarovnání (posunutí a rotace), což neřeší reálné pootočení os rotací vůči sobě, a tedy v ideálním případě rozložení dat ve Fourierově prostoru o 90° . Existuje řešení tohoto problému pomocí držáku vzorků s motorizovanou nebo ručně prováděnou rotací síťky okolo osy Z [73, 203, 76] v kombinaci s detekcí přesného natočení přímo v programu, který řídí snímání tomogramu v TEM [117, 118]. Vyvinul jsem vlastní nízkonákladové řešení vedoucí k minimalizaci nepřesného pootočení síťky o 90° během ručního vkládání do držáku, kdy porovnávám video obrazu vkládané sítky se snímkem sítky před otočením o 90° . To jsem dělal pomocí světelného mikroskopu (binolupa) vybaveného CCD kamerou a vlastním programem, který porovnává obrazy vzájemně otočené o 90° . Snímky snímání v režimu videa jsem v principu zachytával pomocí programu naprogramovaného v jazyce C#. Program otáčí aktuální snímek ze světelného mikroskopu zpět o 90° a konvertuje ho do stupňů šedi. Následně je snímek konvertován na stupně modré barvy a sčítá ho se snímkem získaným před otočením, který byl podobně konvertován do stupňů červené barvy. Pootočení obrazů je možné okamžitě vyhodnotit na základě složení barev obou snímků, které reflektuje jejich vzájemné překrytí. V porovnání s komerčním řešením má program nižší přesnost. Naopak hlavní výhodou je, že nevyžaduje speciální držák, který není dostupný v mnoha laboratořích, a je lepší než vkládání sítky bez asistence.

Tvorba modelů

Při tvorbě modelů jsem využíval poloautomatické moduly, pomocí kterých lze např. interaktivně sledovat a modelovat membránu objektů na základě jejich barvy a hledání hran s využitím filtrů obrazu. K tomuto účelu byl vyvinut modul livewire jako součást programu 3dmod. Dále dva podobné moduly, které adaptivně označují oblasti s podobným vzhledem. K tomu v principu využívají algoritmus označující oblasti pomocí zalévání, kdy reliéf povrchu vychází ze stupňů šedi a takto vzniklá údolí jsou pomyslně zalévána. Jeden modul je součástí programu 3dmod, naopak druhý modul je součástí programu Amira.

Tyto algoritmy selhávají u objektů, které obsahují výrazné tmavší skvrny tvořené precipitáty kontrastujícího činidla. Tento efekt jsem se snažil minimalizovat změnou doby vystavení řezů kontrastujícím činidlem na bázi uranu a olova vedoucí ke zlepšení. Nejlepší výsledky jsem dosáhl u vzorků fixovaných oxidem osmičelým, který zároveň zvyšuje kontrast biologického vzorku, ale nedostatečný kontrast vedl k prodloužení expoziční doby snímání, a tím došlo k ovlivnění snímků driftem vzorku. V části zkoumající interakci viru klíšťové encefalidity (rodina *Flavivirů*) s nervovými buňkami [kapitola 4 a kapitola 5] jsem preferoval vyšší kontrast dosahovaný působením 30 minut alkoholového roztoku uranyl acetátu a 20 minut roztoku citrátu olova. V porovnání s prací Welsh et al. [207], kde využívali pouze řezy kontrastované fixačním činidlem (OsO_4) a dosáhli zobrazení objektů, a především membrán bez tmavých skvrn. Snímání tomogramu prováděli na TEM s 300 kV urychlovacím napětím a pomocí kvalitnější kamery Eagle 4k (fyzická velikost pixelu 15 μm a konverzní účinnost 57 výčtů na primární e^-). Ke své práci jsem používal TEM s 200 kV urychlovacím napětím a kamerou Orius SC 1000 (fyzická velikost pixelu 9 μm a konverzní účinnost 2 – 8 výčtů na primární e^-), která má díky nižší konverzní účinnosti a menší fyzické velikosti pixelu nižší citlivost na signál. Z toho vyplývá fakt, že výsledný snímek je více zatížen šumem. Velikost urychlovacího napětí V_0 má dopad na řadu parametrů TEM. V rámci této práce je nejpodstatnější jeho vliv na amplitudový kontrast C a tloušťku vzorku t , kdy platí, že $C \sim \frac{t}{V_0}$ [67, 212, 213]. Teoreticky vypočítaný rozdíl kontrastu pro stejný vzorek pozorovaný při 200 kV a 300 kV urychlovacího napětí činí jednotky procent [212, 213], a to má minimální dopad na kontrast snímaného obrazu. Nejpodstatnější rozdíl je v možnosti snímání náklonné série pro vzorky s větší tloušťkou – pro 300 kV Welsh et al. použili řezy tloušťky 250 – 300 nm [207] ve srovnání s používanou tloušťkou řezu 40 – 120 nm [kapitola 4, kapitola 5].

Dalšího zlepšení dosáhli Gaussovým 3D filtrem s aplikací na matici $3 \times 3 \times 3$, který dobře vyfiltruje šum, ale už méně ovlivní tmavé skvrny s průměrem > 9 px. Obecně filtrace obrazu potlačující šum jako je Gaussův filtr nebo filtry využívající medián či průměr aplikovaný na centrální pixel matice o určité velikosti se mi osvědčily. S výjimkou filtrace šumu, kdy je zrekonstruovaná membrána tvořena z nespojitě rozmístěných bodů. Poté zmíněné filtry jsou schopny při vhodně zvolené velikosti matice spojit tyto body do jedné čáry. Tímto způsobem jsem využíval filtry pouze pro zjednodušení tvorby modelu.

Prezentovaný tomogram jsem používal nefiltrovaný nebo s minimální velikostí filtru, který potlačí šum. Další možný způsob řešení problému je použít binování obrazu neboli zmenšit rozlišení obrazu spojením pixelu např. průměrováním na matici 2×2, 3×3, apod.. Nevýhodou je, že výsledný snímek bude menší a tím se sníží jeho rozlišení. Zároveň přináší výhodu v podobě potlačení šumu. Tento způsob využili např. I. Romero-Brey et al. v článku zabývajícím se replikací viru Hepatitidy C, dalšího z rodiny *Flavivirů* [208].

V části věnované zobrazení 3D struktury centrální elektrondenzní oblasti bičíku typu 9 + „1“ [kapitola 6] jsem preferoval snížený kontrast vzorku vykazující menší kontrast skvrn. Používal jsem sníženou dobu kontrastování řezů roztokem uranyl acetátu ze standardně používaných 30 minut na 15 minut a citrátu olova z 20 minut na 15 minut. Na finální tomogram jsem aplikoval rekurzivní Gaussův filtr, díky kterému došlo ke spojení bodů představujících membránu do celistvé čáry.

V části věnované korelaci dat mezi ET a AFM mikroskopií [kapitola 7] jsem vystavil řezy pouze 15 minutové expozici uranyl acetátu. Důvodem byla minimalizace tvorby precipitátů a minimalizace ovlivnění povrchů řezů následně snímaných pomocí AFM.

Interakce viru klíšťové encefalitidy s nervovými buňkami

ET mi umožnila pozorovat membrány endoplazmatického retikula a jeho organizaci v buňce oproti TEM projekčním snímkům. Díky množství objektů překrývajících se přes sebe zaniká kontrast struktur, a to především jednotlivých membrán, které nejsou umístěny v prostoru kolmo vůči svazku primárních elektronů. Pro dosažení kvazi-izotropního rozlišení v laterální rovině je nutná minimálně dvouosá tomografie, případně víceosá. Z pohledu snímání způsobující další ozáření pozorované oblasti vzorku, které zapříčiní jeho další ztenčení. V mém případě nutnost manipulace sítky pro otočení o 90°, je dvouosá tomografie riziko, při kterém může dojít až ke ztrátě řezu. Mastronarde [72] diskutoval především rozlišení dvouosé tomografie i přes riziko poškození vzorku. V obou člancích jsem s úspěchem využil pouze jednoosé tomogramy, kde bylo možné trasovat střed membrán i v místech, kde nebyly ostře zobrazeny (nebyly umístěny v prostoru kolmo vůči svazku primárních elektronů) a bylo tedy

v těchto konkrétních částech snížené rozlišení tomogramu. Z částí, kde bylo možné zobrazit membrány ostře (byly umístěny v prostoru kolmo vůči svazku primárních elektronů) jsem zjistil, zda se jedná o jednoduchou nebo dvojitou membránu. Především se jednalo o zobrazení membrán endoplazmatického retikula, membrán fagozomů a membrán mitochondrií. Membrány větších objektů, typicky jádro buňky, byly většinou zobrazeny správně i na jednoosé tomografii, protože uvnitř jednoho řezu při tloušťce 50 – 160 nm nedochází ke změnám sklonu ohraničujících membrán u objektů větších než je tloušťka řezu.

Pro zobrazení tenkého napojení viru klíšťové encefalitidy na struktury podobajících se tubulům jsem použil dvouosou tomografii, která mi umožnila zobrazit napojení s patřičným rozlišením. Dále jsem použil dvouosou tomografii k zobrazení vakuol, které obsahovaly virovou částici (virion) a nacházely se v blízkosti mikrotubulu. Prokázáním jejich spojení ukázalo, že vir pravděpodobně využívá sekreční systém buňky. Je třeba dodat, že tento důkaz je nutné dále potvrdit kryo elektronovou tomografií, která není zatížena artefakty způsobenými kontrastováním.

Při snímání projekčních snímků náklonné série se řezy ztenčují vlivem radiačního poškození. Dochází především k formování volných radikálů, iontů a molekulárních fragmentů, které mohou dále difundovat a také způsobovat řetězové štěpení nebo další síťování uvnitř vzorku [204]. Ztenčení řezů vlivem radiačního poškození může dosáhnout hranice 60-50 %. Z měření Luthera et al. vyplývá, že při dávce $50 \text{ e} \cdot \text{nm}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ dochází během pěti minut k rychlému ztenčení řezu ($\sim 20 \%$ v daném případě) a poté k výraznému zpomalení [205]. Pro tomografii se doporučuje řez stabilizovat napařením vrstvy uhlíku o tloušťce několika nanometrů a před samotným snímáním dané místo ozářit dávkou $\sim 10^4 \text{ e} \cdot \text{nm}^{-1}$ [204]. Pro tomografii jsem používal pouhlikování povrchu řezu, především ze strany, ze které svazek elektronů vstupoval do vzorku. V některých případech jsem použil i oboustranné pouhlikování řezu, které dále zvyšuje jejich stabilitu. Jedná se pouze o empirické zjištění. Vyhodnocení a kvantifikování vlivu radiačního poškození je obtížné z důvodu různé reakce vzorku na ozáření svazkem elektronů. Pozoroval jsem, že řezy krájené a připravované najednou vykazovaly odlišné chování. Například u jednoho řezu ze série bylo při vyhledávání místa zájmu po několika sekundovém ozáření patrné radiační poškození ve formě kráteru s hloubkou $\sim 20 \text{ nm}$ (měřeno na výsledném tomogramu). Dále tloušťka nastavená

na ultramikrotomu nebo stanovená na základě interferenčních barev je pouze orientační a nelze ji kvantitativně porovnat s tloušťkou výsledného tomogramu. Obvykle kulatý váček sloužící k replikaci viru byl u některých tomogramů shora a zdola zploštělý. Z toho vyplývá, že radiační poškození překonalo prodloužení v ose Z. Tvar váčků je ovlivněn i kvalitou chemické přípravy a tlakem vyvolaným zesíťovaným zalévacím médiem, jak zmiňuje Matsko et al. [200, 201]. Nicméně rozsah jejich průměrů je podobný 60–90 nm [kapitola 4] nebo 70–90 nm [kapitola 5] a v různých tomogramech se liší pouze zmíněnou výškou. Průměr virem vyvolaných replikačních váčků se shoduje s dalšími měřeními využívající ET pro pozorování interakce buňky s virem klíšťové encefalitidy [206] a virem Dengue patřícím také do rodiny *Flavivirů* [207].

Průběh replikace a maturace virů uvnitř buňky a zobrazení změn v buňce napadené virem klíšťové encefalitidy bylo zdokumentováno viz. kapitola 4 a kapitola 5. Nově jsme pozorovali struktury podobné tubulům, které byly elektrondenzní v celém objemu. Viry klíšťové encefalitidy byly napojeny na tyto struktury, stejně jako replikační váčky. Struktury podobné tubulům jsme pozorovali jako svazek několika stejně orientovaných vláken v 3D prostoru. Tyto struktury pozorovali také Růžek et al. na TEM 2D projekčních snímcích a mylně je označili za mikrotubuly [197], protože struktury podobné tubulům byly na projekčním snímku uspořádány paralelně v těsném kontaktu s virem klíšťové encefalitidy. Pro naše pozorování jsme využili metodu přípravy infikovaných nervových buněk virem klíšťové encefalitidy pomocí HPF s následným zalitím do pryskyřice, při kterém bylo zachováno více biologických detailů oproti chemické přípravě viz. Růžek et al. [197]. Struktury podobné tubulům se vždy nacházely uvnitř endoplazmatického retikula. Průměr struktur podobných tubulům byl $17.9 \text{ nm} \pm 0.2 \text{ nm}$ [kapitola 4] a $22 \pm 1.3 \text{ nm}$ [kapitola 5]. Jejich napojení na viry klíšťové encefalitidy a replikační váčky jsou důkazem toho, že se jedná o struktury vzniklé na základě působení viru klíšťové encefalitidy. Uvnitř endoplazmatického retikula jsme pozorovali také duté tubulární struktury s průměrem $43.8 \pm 4.3 \text{ nm}$. V předchozích studiích byly tyto struktury pozorovány, ale jejich průměr se pohyboval v rozsahu 50 až 100 nm s délkou až 3,5 μm . Jejich možný původ byl přikládán chybnému procesu replikace [207–211].

Uvnitř infikovaného neuronu jsme pozorovali váčky obsahující virové částice, které byly v kontaktu s mikrotubulem, což potvrzuje domnělé využití

intracelulárního transportu. S vysokou pravděpodobností způsob přípravy do pryskyřice zalitého preparátu a pozorování za pokojové teploty neumožnilo zachytit v tomogramu molekulární motory navázané na váčky a mikrotubuly.

Zobrazení 3D struktury centrální elektrondenzní části bičíku typu 9 + „1“

3D ultrastruktura centrální elektrondenzní části zkoumaného bičíku připomíná svým tvarem šroubový dopravník. V projekcích náklonné série je v širokém rozsahu náklonů zobrazen pouze jako válec s elektron denznějším středem reprezentující plnou část. Na povrchu válce se nachází oblast závitů zasahující do určité hloubky, která se jeví v projekčním snímku jako méně denzní. Rekonstrukce tvaru šroubového dopravníku s průměrem ~ 40 nm vyžaduje minimalizaci prodloužení v ose Z pomocí vysokého úhlu náklonu $\sim 70^\circ$ a využití dvouosé tomografie. Pro zobrazování elektrondenzní části bičíku jsem použil dvouosou tomografii s maximálním úhlem náklonu až do 78° , dále dvouosou tomografii s extrémně malým krokem $0,3^\circ$ při maximálním úhlu náklonu 75° a také jednoosou tomografii v STEM režimu. Tyto způsoby nevedly k uspokojivému výsledku, neboť optimalizace parametrů pro snímání tomogramu nemusí vždy vést k úspěšné rekonstrukci tvaru centrální části bičíku.

3D rekonstrukce bičíku je závislá na dostatečném zachování jeho ultrastruktury a na kvalitě kontrastování, dále na parametrech šroubového závitů – jeho stoupání, hloubce, šířce a tvaru drážky a na jeho orientaci v prostoru. Optimalizoval jsem pouze kvalitu kontrastování řezů. Ostatní parametry jsem nemohl příliš ovlivnit. K dispozici byly pouze hotové bločky se zalitým materiálem. Za účelem nalezení správné kombinace všech proměnných vedoucích k zobrazení 3D struktury centrální části bičíku 9 + „1“ jsem zanalyzoval velké množství zrekonstruovaných bičíků. Zobrazení 3D struktury centrální elektrondenzní části bičíku typu 9 + „1“ bylo zdokumentováno viz. kapitola 6.

Předchozí studie ultrastruktury bičíku 9 + „1“ byly založeny pouze na 2D TEM projekčních snímcích [viz. kapitola 6], z nichž nejdetailejší byla práce Silveira využívající k přípravě vzorků krájení ultratenkých řezů, dále negativního kontrastování, stínování, replik a v neposlední řadě průměrování obrazu. S dostupnou technikou a metodami Silveira nedokázal rozlišit 3D tvar a ultrastrukturu elektrondenzní části bičíku [214]. Pomocí elektronové tomografie jsem byl schopen rozlišit vnější tvar centrální elektrondenzní části bičíku. Na několika virtuálních řezech tomogramu bylo možné rozlišit zřetelnou strukturu

dvou dutých trubek umístěných vedle sebe. Celé složení (doublet) se nacházelo symetricky ve středu centrální elektrondenzní části. S různou hloubkou virtuálního řezu tato struktura rotovala spolu s vnějším tvarem šroubového dopravníku. Nemožnost pozorovat tuto strukturu ve všech hloubkách řezu vychází pravděpodobně ze způsobu přípravy zahrnující zachování a kvalitu zafixované biologické struktury. Dle mých pozorování se liší kvalita přípravy vzorku, i pro jednotlivé bičíky uvnitř stejného bločku.

Korelace dat mezi ET a AFM mikroskopií

Z důvodu různého kontrastu a ultrastruktury cytoplazmatických polyhedrozních virů nacházejících se mimo krystal jsem použil AFM s následným porovnáním dat z ET. Stejně pozorování publikovali Federici a Hazard, kteří tuto rozdílnost přikládali schopnosti viru dozrávat pouze v okolí krystalu (polyhedronu) [215]. Pro pozorování řezů umístěných na síťce jsem upravil držák vzorků pro AFM, který jsem vybavil upínacím systémem EM sítěk. Dále jsem optimalizoval přípravu vzorku tak, že jsem použil podložní formvarovou membránu, kterou jsem z obou stran pouhlikoval. Povrchy řezů jsem nemohl stabilizovat pokrytím uhlíkovou vrstvou, aby je bylo možné použít pro pozorování pomocí AFM. V práci popisuji rozdílný kontrast virů, které jsou v kontaktu s krystalem a také u virů, které byly proříznuty při krájení. Pravděpodobně je to způsobeno odlišnou schopností kontrastovacího činidla pronikat do virů vyskytujících se volně v cytosolu buňky. Některé viry byly zachovány celé (neproříznuté) a přesto vystupovaly alespoň částečně z povrchu řezů. To odpovídá teorii Matska et al., kteří popisují, že krátce po krájení dochází k relaxaci krájeného biologického materiálu, který byl stlačován uvnitř zalévacího media [200, 201]. V některých případech se může jednat také o pružnost biologického materiálu, která umožnila kompresí odolat tlaku působícího nože. S využitím AFM jsem zobrazil topografii povrchu krystalu, ale zobrazení krystalových rovin se nepodařilo. Je otázkou, zda to bylo způsobeno zalévacím médiem s možným výskytem na povrchu krystalu nebo s větší pravděpodobností podmínkami zobrazování. V reálných rozměrech jsem využíval hrotu AFM s rádiem ~ 10 nm k zobrazení povrchu řezů s tloušťkou v rozsahu 80 – 160 nm ležících na síťkách s MESH 300, tedy s velikostí vnitřní hrany oka ~ 58 μm . Poměr velikosti rádia hrotu vůči velikosti oka síťky a také tloušťce řezu spolu

s rozdílnou tvrdostí obou materiálů (tvrdost hrotu z nitridu křemičitého v řádu desítek GPa [216], tvrdost pryskyřic v řádu stovek MPa [217]) reprezentuje situaci membrány z relativně měkčího materiálu o více jak tři řády větší plochou než je plocha povrchu hrotu AFM. Dané podmínky neumožňovaly působit na krystal silou, která by dovolila dosáhnout vyššího rozlišení AFM v kontaktním módu. Poklepový mód nebyl pro dané podmínky realizovatelný díky vibračním řezu.

Korelace dat mezi ET a AFM jsem dosáhl opakovaně na stejných řezech v obou technikách viz.kapitola 7. Jako první jsem použil spojení elektronové tomografie pomocí náklonné série a AFM mikroskopie na ultratenkých řezech. Do té doby bylo AFM použito na ultratenkých řezech:

a) K pozorování povrchů ultratenkých řezů umístěných na sklíčku [218], případně na sítkách [220].

b) Ke korelaci sériových řezů, z nichž jedny byly zkoumány v TEM a další v AFM [219].

c) Ke korelaci odkrojených řezů s povrchem bločku, který je jeho protikusem [221].

d) K pozorování kráterů na řezech ozářených určitou dávkou v TEM. V článku je pouze popsáno, že řezy umístěné na měděné síťce byly po ozáření v TEM vloženy na sklíčko k vykonání analýzy pomocí AFM. Není zcela jasné, zda byly řezy sejmuty z povrchu síťky nebo položeny na sklíčko i se sítkou [222].

Kapitola 9.LITERATURA

1. Transmission Electron Microscopy, A Textbook for Material Science, New York and London, Plenum Press 1996
2. www.nobelprize.org
3. Nanoscience and the Environment, J. R. Lead, E. Valsami-Jones, Elsevier, 2014
4. Electron tomography of rabbit cardiomyocyte three-dimensional ultrastructure, E. A Rog-Zielinska et al., Progress in Biophysics and Molecular Biology, Vol. 121, Issue 2, 77–84, 2016
5. Sectioning technique for electron microscopy using conventional microtome, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 67, 470-474, 1948
6. Albert Claude and E. F. Fullam, Exp. Med., 88, 499, 1946
7. A study in microtomy in electron microscopy, K. R. Porter and J. Blum, Anat. Record 117, 685–710, 1953
8. Serial sections for electron microscopy, H. Gay and T. F. Anderson, Science 120, 1071–1073, 1954
9. Ultrastructure of retinal rod synapses of the Guinea pig eye as revealed by three-dimensional reconstructions from serial sections, F. S. Sjøstrandem, J. Ultrastruct. Res. 2, 122-170, 1958
10. Computer graphics in three dimensions for perspective reconstruction of brain ultrastructure, T. J. Willey et al., IEEE Trans. Bio-Med, Eng. 20, 288, 1973
11. A model for logarithmic image processing LIP, M. Jourlin and J. C. Pinoli, J. Microsc. 149, 21-35, 1988
12. Three-dimensional electron microscopy of entire cells, C. Bron et al., Journal of Microscopy, Vol. 157, Pt 1, January 1990, pp. 115-126, 1990
13. An Algorithm for the Machine Calculation of Complex Fourier Series, J. W. Cooley and J. W. Tukey, Mathematics of Computation, Vol. 19, No 90, pp. 297-301, 1965
14. Digital image processing: The semper system, W. O. Saxton, et al., Ultramicroscopy 4, 343–354, 1979
15. Image reconstruction from projections, G. T. Herman, Academic press, New York, 1980

16. MRC image processing programs, R. A. Crowther, et al., *J. of Struct. Biol.*, 116, 9–16, 1996
17. The correlation averaging of a regularly arranged bacterial cell envelope protein, W. O. Saxton and W. Baumeister, *J. of Microscopy*, Vol. 127, Pt 2, 127–138, 1982
18. MRC image processing programs, R. A. Crowther, et al., *J. Struct. Biol.* 116 (1), 9–16, 1996
19. Reconstruction of three-dimensional images from electron micrographs of structures with helical symmetry D. J. DeRosier and P.B. Moore, *J. Mol. Biol.* 52 (2), 355–362, 1970
20. The EM program system, R. Hegerl and A. Altbauer, *Ultramicroscopy* 9 (1-2), 109-115, 1982
21. Imagic: A fast, flexible and and friendly image analysis software system, M. van Heel and W. Keegstra, *Ultramicroscopy* 7 (2), 113–129, 1981
22. Spider – a modular software system for electron image processing, J. Frank et al., *Ultramicroscopy* 6 (4), 343–357, 1981
23. 3D reconstruction and processing of volumetric data in cryo-electron tomography, H. Winkler, *J. of Struct. Biol.* 157, 126–137, 2007
24. Computer visualisation of three-dimensional image data using IMOD, J.R. Kremer et al., *J. Struct. Biol.* 116:71–76, 1996
25. Super-thin sectioning for high-resolution 3-D reconstruction of cellular structures, D. N. Mastrorade et al., *Proc. Microsc. Microanal.* 3:221–222, 1997
26. Minimal compression of ultrathin sections with use of an oscillating diamond knife, D. Studer and H. Gnaegi, *J. of Microscopy*, Vol. 197, 94–100, 2000
27. The Cutting of Ultrathin Sections With the Thickness Less Than 20 nm From Biological Specimens Embedded in Resin Block, J. Nebesarova et al., *Microscopy research and technique* 79, 512–517, 2016

28. Volume electron microscopy for neuronal circuit reconstruction, K. L. Briggman and D. D. Bock, *Current Opinion in Neurobiology* 22:154–161, 2012
29. Three-dimensional electron microscopy and its application to mitosis research., B. F. Mc Ewen and M. Marko, *Methods Cell Biol* 61:81-111, 1999
30. Certain Topics in Telegraph Transmission Theory, H. Nyquist, A.I.E.E, Transaction, p 617, 1928
31. Communication in the Presence of Noise, C.E. Shannon, *Proceedings of the Institute of Radio Engineers* 37 (1):10–21, 1949
32. Detection of Single Atoms and Buried Defects in Three Dimensions by Abberation-Corrected Electron Microscope with 0.5-Å information Limit, C. Kisielowski et al., *Microsc. Microanal.* 14, 469–477, 2008
33. Electron ptychography of 2D materials to deep sub-ångström resolution, Y. Jiang et al., *Nature*, 559, 343–349, 2018
34. Materials Advances through Aberration-Corrected Electron Microscopy, S. J. Pennycook et al., *MRS bulletin*, vol 31, 2006
35. Electron tomography in life science, M. Bárcena and A. J. Koster, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, vol 20, issue 8, 920–930, 2009
36. Snap-freezing under high pressure: A new fixation technique for freeze etching. In “Electron Microscopy 1968, Pre-Congress Abstract of Papers Presented at the Fourth European Regional Conference, September 1–7”, H. Moore and U. Riehle, pp. 33–34, *Tipografia Poliglotta Vaticana*, Rome, 1968
37. Theory and practice of high pressure freezing. In “Cryotechniques in Biological Electron Microscopy”, H. Moore, pp. 175–191, Springer, Berlin, Heidelberg, 1987
38. Three-Dimensional Reconstruction Methods for *Caenorhabditis elegans* Ultrastructure, T. Müller-Reichert et al., *Methods in cell biology*, Elsevier Inc., vol. 96, 331–361, 2010
39. LVSEM for high resolution topographic and density contrast, J. B. Pawley, *Adv. Electron. Phys.* 83, 203–274, 1992

40. Image formation in Low-Voltage Scanning Electron Microscopy, L. Reimer, SIPE Optical Engineering Press, Bellingham, WA., 1993
41. Low voltage scanning electron microscopy, D. C. Joy and C. S. Joy, *Micron* 27, 247–263, 1996
42. *Advances Scanning Electron Microscopy*, D. E. Newbury et al., 3rd edn. Plenum Press, New York, 2003
43. Scanning low–energy electron microscopy, I. Mullerova and L. Frank, *Adv. Imaging Electron Phys.* 128, 309–443, 2003
44. Cathode Lens Mode of SEM in Material Science Applications, L. Frank et al., *Materials Transactions*, Vol. 48, No. 5, 944–948, 2007
45. Electron optics of low–voltage electron beam testing and inspection, E. Plies, *Adv. Inopt. Electron Microsc.* 218, 77–85, 1994
46. Real image resolution of SEM and LVSEM and its optimisation, L. Frank, *Ultramicroscopy* 62, 261–269, 1996
47. Imaging of specimens at optimized low and very low energies in scanning electron microscopes, I. Mullerova, *Scanning* 23, 379–394, 2001
48. Low voltage scanning electron microscopy, D. C. Joy and D. Nwebury, *Microsc. Today*, 10(2), 2002
49. Serial block–face scanning electron microscopy to reconstruct three-dimensional tissue nanostructure, W. Denk and H. Horstmann, *PLoS Biol.* 2, e329, 2004
50. Serial section scanning electron microscopy of adult brain tissue focused ion beam milling, G. Knott et al., *J. Neurosci.* 28, 2959–2964, 2008
51. Volume scanning electron microscopy for imaging biological ultrastructure, *Biol Cell* 108, 307–323, 2016
52. High-performance serial block-face SEM of nonconductive biological samples enabled by focal gas injection-based charge compensation, T. J. Deering et al., *Journal of Microscopy*, Vol. 00, I. 0, 1–8, 2017
53. SEM Imaging Method, F. Boughorbel et al., Patent US 8,232,523 B2, 31 July 2012

54. MED-SEM: 3D nedestruktivní elektronvoá mikroskopie, M. Hovorka et al., Mikroskopie 2013, CSMS, MyHotel, Lednice, 2013
55. Fine structure of desmosomes, hemidesmosomes, and an adepidermal globular layer in developing newt epidermis, D. E. Kelly, J cell Biol 28: 51-72, 1966
56. A stereoscope observation of tracheal epithelium of mouse by means of the high voltage electron microscope, K. Hama and F. A. Nagata, J Cell Biol 45:654–9, 1970
57. Reconstruction of Three Dimensional Structures from Electron Micrographs, D. J. De Rosier and A. Klug, Nature, Vol. 217:130–134, 1968
58. www.int.kit.edu/1731.php
59. The reconstruction of a three–dimensional structure from projections and its application to electron microscopy, R. A. Crowther et al., Proc. Roy. Soc. Lond. A. 317, 319–340, 1970
60. Algebraic Reconstruction Techniques (ART) for Three-dimensional Electron Microscopy and X-ray Photography, R. Gordon et al., J. theor. Biol. 29
61. Iterative Methods for Three-dimensional Reconstruction of an Object from Projections, P. Gilbert, J. theor. Biol. 36, 105–117, 1972
62. Simultaneous algebraic reconstruction technique (SART): a superior implementation of the art algorithm, A. H. Andersen and A. C. Kak, Ultrasonic imaging 6, 81–94, 1984
63. Influence of Electron Noise on Three-dimensional Image Reconstruction, R. Hegerl and W. Hoppe, Z. Naturforsch.31 a, 1717–1721, 1976
64. Weighted back-projection methods, M. Radermacher, In J. Frank (Ed.) Electron Tomography, Plenum, pp. 91–115, 1992
65. Scanning Transmission Electron Microscopy, P. A. Midgley and M. Weyland, In: S. Pennycook, P. Nellist (eds), Springer, New York, 2011
66. Electron tomography of viruses, S. Subramainiam et al., Current Opinion in Structural Biology 17:596–602, 2007
67. Transmission Electron Microscopy, L. Reimer and H. Kohl, Springer, 5th edition, Springer Series in Optical Sciences, 2008

68. Properties of 3D reconstruction from projections by conical tilt compared to single axis tilting, M. Radermacher and W. Hoppe, In Proceedings of the 7th European Congress on Electron Microscopy, Den Haag, Vol I. pp 132-133, 1980
69. Nanoscale scanning transmission electron tomography, P. A. Midgley et al., Journal of Microscopy, Vol. 223, Pt 3, pp. 185–190, 2006
70. A practical method to determine the effective resolution in incoherent experimental electron tomography, H. H. Mezerji et al., Ultramicroscopy 111, 330–336, 2011
71. Double-tilt electron tomography, P. Penczek, et al., Ultramicroscopy 60, 393–410, 1995
72. Dual-axis Tomography: An Approach with alignment Methods That Preserve Resolution, D. N. Mastronarde, Journal of Struct. Biol. 120, 343–352, 1997
73. Reducing the missing wedge: High-resolution dual axis tomography of inorganic materials, I. Arslan et al., Ultramicroscopy 106, 994–1000, 2006
74. www.jeol.co.jp/en/
75. www.thermofisher.com/us/en/home/industrial/electron-microscopy.html,
www.fei.com
76. www.gatan.com
77. A novel dual-axis iterative algorithm for electron tomography, J. Tong et al., Journal of Struct. Biol. 153, 55–63, 2006
78. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis, C. A. Schneider et al., Nature methods 9(7): 671–675, 2012
79. J. Schindelin et al., Fiji: an open-source platform for biological-image analysis, Nature methods 9(7):676–682, 2012
80. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data, C. T. Rueden et al., BMC Bioinformatics 18:529, 2017
81. Multiple-axis tomography: applications to basal bodies from *Paramecium tetraurelia*, C. Messaoudi et al., Biol. Cell 98, 415–425, 2006
82. Advance recording schemes for electron tomography, T. Dahmen et al., MRS bulletin, Vol. 41, 537–541, 2016

83. Principles and Practice in Electron Tomography, B. F. McEwen et al., *Methods icebioo*, Vol. 89, 129–168, 2008
84. 3D reconstruction of biological structures: automated procedures for alignment and reconstruction of multiple tilt series in electron tomography, S. Phan et al., *Adv. Struct. Chem. Imag.* 2:8, 2016
85. Image Restoration by the Method of Convex Projections: Part 1–Theory, D. C. Youla and H. Webb, *IEEE transactions on medical imaging*, Vol. MI-1, No 2, 1982
86. Information recovery in missing angular data cases: an approach by the convex projections method in three dimensions, J. M. Carazo, J. L. Carrascosa, *Journal of Microscopy*, Vol. 145, Pt 1, pp. 23–43, 1986
87. The application of the maximum entropy method to electron microscopic tomography, M. C. Lawrence, *Ultramicroscopy* 31, 285–302, 1989
88. Compensation of Missing Wedge Effects with Sequential Statistical Resolution in Electron Microscopy, L. Paacolainen et al., *PLOS one*, Vol. 9, I. 10, e108978, 2014
89. A 360° single-axis tilt stage for the high-voltage electron microscope, D. P. Barnard, et al., *Journal of Microscopy*, Vol 167, Pt 1, pp. 39–48, 1992
90. Methods for specimen thickness determination in electron microscopy, J. Berriman et al., *Ultramicroscopy* 13, 351–364, 1984
91. Alignment of tomographic projections using an incomplete set of fiducial markers, Z. Jing and F. Sachs, *Ultramicroscopy* 35, 37–43, 1991
92. Least-squares method of alignment using markers. In: *Least-Squares Method of Alignment Using Markers*, M. C. Lawrence, ed. J. Frank, Plenum Press, New York, London, pp. 197–204, 1992
93. Reduction of anisotropic image resolution in transmission electron microtomography by use of quadrangular prism-shaped section, T. Kaneko et al., *Journal of Electron Microscopy* 54(5), 437–444, 2005
94. Transmission electron microtomography without the “missing wedge” for quantitative structural analysis, N. Kawase et al., *Ultramicroscopy* 107, 8–15, 2007

95. Maximum diameter of the rod-shaped specimen for transmission electron microtomography without the “missing wedge”, M. Kato et al., *Ultramicroscopy* 108, 221–229, 2008
96. MRT Letter: Full-Tilt Electron tomography With a Piezo-Actuated rotary Drive, X. J. Xu et al., *Microscopy research and technique* 71:773–777, 2008
97. Automated spatial drift correction for EFTEM image series, B. Schaffer et al., *Ultramicroscopy* 102, 27–36, 2004
98. A 3×3 Isotropic Gradient Operator for Image Processing, Pattern Classification and Scene Analysis, I. Sobel and G. Feldman, pp. 271–272, 1973
99. Automated coarse-alignment for TEM tilt series of rod-shaped specimens collected with a full angular range, M. Hayashida et al., *Micron* 41, 540–545, 2010
100. An autofocus method for a TEM, A. J. Koster et al., *Ultramicroscopy* 21, 209–222, 1987
101. Automated microscopy for electron tomography, A. J. Koster et al., *Ultramicroscopy* 46, 207–227, 1992
102. Towards automatic electron tomography, K. Dierksen et al., *Ultramicroscopy* 40, 71–87, 1992
103. Towards automatic electron tomography II. Implementation of autofocus and low-dose procedures, K. Dierksen et al., *Ultramicroscopy* 49, 109–120, 1993
104. Low-dose Automated Electron Tomography: A Recent Implementation, B. K. Rath et al., *Journal of Struct. Biol.* 120, 210–218, 1997
105. Computational methods for electron tomography, J. J. Fernandez, *Micron*, 43, 1010–1030, 2012
106. Procedures for three-dimensional reconstruction of spherical viruses by Fourier synthesis from electron micrographs, R. A. Crowther, *Phil. Trans. Roy. Soc. London, Ser. B* 261, 221–230, 1971
107. Toward Fully Automated High-Resolution Electron Tomography, J. C. Fung et al., *Journal of Struct. Biol.* 116, 181–189, 1996

108. Automated high-throughput electron tomography by pre-calibration of image shift, U. Ziese et al., *Journal of Microscopy*, Vol. 205, Pt 2, 187–200, 2002
109. Correction of autofocusing errors due to specimen tilt for automated electron tomography, U. Ziese et al., *Journal of Microscopy*, Vol. 211, Pt. 2, 179–185, 2003
110. Supermontaging: Reconstructing Large Cellular Volumes by Stitching together Laterally Adjacent Tomograms, D. N. Mastronarde et al., *Microsc. Microanal.* 14(Suppl 2), 106–107, 2008
111. Automated electron microscope tomography using robust prediction of specimen movement, D. N. Mastronarde, *Journal of Struct. Biol.* 152, 36–51, 2005
112. Correction for non-perpendicularity of beam and tilt axis in tomographic reconstructions with the IMOD package, D. N. Mastronarde, *Journal of Microscopy*, Vol. 230, Pt 2, 212–217, 2008
113. Tilt-series and electron microscope alignment for the correction of the non-perpendicularity of beam and tilt-axis, D. C. Díez et al., *Journal of Struct. Biol.* 154, 195–205, 2006
114. Alignment of fiducial marks in a tomographic tilt series with an unknown rotation axis, Z. H. Levine et al., *Comput. Phys. Commun.* 176, 694–700, 2007
115. Automated tilt series alignment and tomographic reconstruction in IMOD, D. N. Mastronarde and S. R. Held, *Journal of Struct. Biol.*, Vol. 197, I. 2, 102–113, 2017
116. bio3d.colorado.edu/imod
117. bio3d.colorado.edu/SerialEM
118. TxBR montage reconstruction for large field electron tomography, S. Phan et al., *Journal of Struct. Biol.* 180, 154–164, 2012
119. Supermontaging: Reconstructing Large Cellular Volumes by Stitching together Laterally Adjacent Tomograms, D. N. Mastronarde et al., *Microsc. Microanal* 14(Suppl 2), 2008

120. Golgi Structure in Three Dimensions: Functional Insights from the Normal Rat Kidney Cell, M. S. Ladinsky et al., *Journal of Cell Biology*, Vol. 144, 1135–1149, 1999
121. Expedited approaches to whole cell electron tomography and organelle mark-up in situ in high-pressure frozen pancreatic islets, A. B. Noske et al., *Journal of Struct. Biol.* 161, 298–313, 2008
122. Coalignment of plasma membrane channels and protrusions (fibripositors) specifies the parallelism of tendon, E. G. Canty et al., *The Journal of Cell Biology*, Vol. 165, No. 4, 553–563, 2004
123. Actin Filaments Are Required for Fibripositor-mediated Collagen Fibril Alignment in Tendon, E. G. Canty et al., *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 281, No. 50, pp. 38592–38598, 2006
124. Organization of Interphase Microtubules in Fission Yeast Analyzed by Electron Tomography, J. L. Höög et al., *Developmental Cell* 12, 349–361, Elsevier Inc., 2007
125. Automated Stitching of Microtubule Centrelines across Serial Electron Tomograms, B. Weber et al., *PLOS ONE*, 2014
126. <https://www.bitplane.com>
127. Three-dimensional STEM for observing nanostructures, M. Koguchi et al., *Journal of Electron Microscopy* 50 (3), 235–241, 2001
128. 3D electron microscopy in the physical sciences: the development of Z-contrast and EFTEM tomography
129. STEM tomography in cell biology, Y. E. Yakushevskaya et al., *Journal of Struct. Biol.* 159, 381–391, 2007
130. A model based atomic resolution tomographic algorithm, W. Van den Broek et al., *Ultramicroscopy* 109, 1485–1490, 2009
131. Monte Carlo electron-trajectory simulations in bright-field and dark-field STEM: Implications for electron tomography of thick biological sections, A. A. Sousa et al., *Ultramicroscopy* 109, 213–221, 2009
132. Electron Tomography on Micrometer-thick Specimens with Nanometer Resolution, J. Loos et al., *Nano Letters*, Vol. 9, No. 4, 1704–1708, 2009

133. Dual-axis electron tomography of biological specimens: extending the limits of specimen thickness with bright-field STEM imaging, A. Alioscka et al., *J. Struct. Biol.* 174(1), 107–114, 2012
134. Compressed sensing for dose reduction in STEM tomography, L. Donati et al., *IEEE*, 978-1-5090-1172-8/17, 2017
135. Compressed sensing for STEM tomography, L. Donati et al., *Ultramicroscopy* 179, 47–56, 2017
136. Advanced recording schemes for electron tomography, T. Dahmen et al., *MRS Buletin*, Vol. 41, 537–541, 2016
137. Matched Backprojection Operator for Combined Scanning Transmission Electron Microscopy Tilt and Focal Series, T. Dahmed et al., *Microsc. Microanal.* 21, 725–138, 2015
138. The Ettention software package, T. Dahmen et al., *Ultramicroscopy* 161, 110–118, 2016
139. STEM electron tomography in the Scanning Electron Microscope, M. Ferroni et al., *Electron microscopy and Analysis Group Conference (EMAG 2015)*, *Journal of Physics: Conference Series* 644, 012012, 2015
140. Vitrification of pure water for electron microscopy, J. Dubochet and A. W. McDowall, *Journal of Microscopy*, Vol. 124, Pt. 3, RP3–RP4, 1981
141. Electron microscopy of frozen water and aqueous solutions, J. Dubochet et al., *Journal of Microscopy*, Vol. 128, Pt 3, 219–237, 1982
142. Cryoelectron microscopy of vitrified specimens, J. Dubochet et al., *Q. Rev. Biophys.* 21, 129–228, 1988
143. Vitrification of articular cartilage by high-pressure freezing, D. Studer et al., *J. Microsc.* 179, 321–332, 1995
144. A new approach for cryofixation by high-pressure freezing, D. Studer et al., *J. Microsc.* 203, 285–294, 2001
145. Electron Tomography of Single Ice-embedded Macromolecules: Three-dimensional Alignment and Classification, J. Walz, et al., *Journal of Struct. Biol.* 120, 387–395, 1997

146. Energy Filtered Electron Tomography of Ice-Embedded Actin and Vesicles, R. Grimm et al., *Biophysical Journal*, Vol. 72, 482–489, 1997
147. Electron Tomography of Ice-Embedded Prokaryotic Cells, R. Grimm et al., *Biophysical Journal*, Vol. 74, 1031–1042, 1998
148. Whole Cell Cryo-Electron Tomography Reveals Distinct Disassembly Intermediates of Vaccinia Virus, M. Cryrklaff et al., *Plos ONE* 2(5): e420, 2007
149. Electron tomographic analysis of frozen-hydrated tissue sections, Ch. E. Hsieh et al., *Journal of Struct. Biol.* 138, 63–73, 2002
150. Cutting artefacts and cutting process in vitreous sections for cryo-electron microscopy, A. Al- Almoudi et al., *J. Struct. Biol.* 150, 109–121, 2005
151. A technique for ultracryotomy of cell suspensions and tissues, K. T. Tokuyasu, *J. Cell Biol.* 57 (2), 551–565, 1973
152. Immunocytochemistry on ultrathin frozen sections, K. T. Tokuyasu, *Histochem. J.* 12 (4), 381–403, 1980
153. Application of cryoultramicrotomy to immunocytochemistry, K. T. Tokuyasu, *J. Microsc.* 143 (2), 139–149, 1986
154. Focused ion beam milling of vitreous water: prospects for an alternative to cryoultramicrotomy of frozen-hydrated biological samples. M. Marko et al., *J. Microsc.* 222, 42–47, 2006
155. Focused-ion-beam thinning of frozen-hydrated biological specimens for cryo-electron microscopy, *Nature Methods* 4, 215–217, 2007
156. An improved cryo-FIB method for fabrication of frozen hydrated lamella, J. Zhang et al., *Journal of Struct. Biol.* 194, 218–223, 2016
157. Charge coupled semiconductor device, W. S. Boyle, G. E. Smith, *The bell system technical journal*, 587–593, 1970
158. Electron tomography in life science, M. Bárcena and A. J. Koster, *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20, 920–230, 2009
159. Perspectives of Molecular and Cellular Electron Tomography, A. J. Koster et al., *Journal of Struct. Biol.* 120, 276–308, 1997

160. Structure and 3D Arrangement of Endoplasmic Reticulum Membrane-Associated Ribosomes, S. Pfeffer et al., *Structure*, Vol. 20, I. 9, 1508–1518, 2012
161. Automated Correlation and Averaging of Three-Dimensional Reconstruction Obtained by Electron Tomography, L. G. Öfverstedt et al., *Journal of Struct. Biol.* 120, 329–342, 1997
162. Methods for aligning and for averaging 3D volumes with missing data, M. F. Schmid and Ch. R. Booth, *Journal of Struct. Biol.* 161, 243–248, 2008
163. Computational separation of conformational heterogeneity using cryo-electron tomography and 3D sub-volume averaging, G. A. Frank et al., *J. Struct. Biol.* 178(2), 165–176, 2012
164. A brief look at imaging and contrast transfer, R. H. Wade, *Ultramicroscopy* 46, 145–156, 1992
165. CTF determination and correction for low dose tomographic tilt series, Q. Ciong et al., *Journal of Struct. Biol.* 168, 378–387, 2009
166. Efficient 3D-CTF correction for cryo-electron tomography using NovaCTF improves subtomogram averaging resolution to 3.4 Å, B. Turoňová et al., *Journal of Struct. Biol.* 199, 187–195, 2017
167. Direct imaging detectors for electron microscopy, A. R. Faruqi and G. McMullan, *Nuclear Inst. and Methods in Physics Research A* 878, 180–190, 2018
168. Reconstruction of glutamine synthetase using computer averaging, J. Frank et al., *Ultramicroscopy* 3, 283–290, 1978
169. Classification of macromolecular assemblies studied as ‘single particles’, J. Frank, *Quart. Rev. Biophys.* 23, 281–329, 1990
170. Three-dimensional electron microscopy of macromolecular assemblies, J. Frank, Academic Press, New York, 1996
171. Characteristic views of *E. Coli* and *B. stearothermophilus* 30S ribosomal subunits in the electron microscope, M. Van Heel and M. Stöffler-Meilicke, *EMBO J.* 4, 2389–2395, 1985a

172. Angular reconstitution: a posteriori assignment of projection direction for 3D reconstruction, M. Van Heel, *Ultramicroscopy* 21, 111–124, 1987
173. Three-dimensional reconstruction from random projections: orientational alignment via Radon transform, M. Radermacher, *Ultramicroscopy* 53, 121–136, 1994
174. Three-dimensional reconstruction of individual negatively stained yeast fatty acid synthetase molecules from tilt-series in the electron microscope, W. Hoppe et al., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 355, 1483–1487, 1974
175. Three-dimensional reconstruction and averaging of 50S ribosomal subunits of *Escherichia coli* from electron micrographs, H. Oetl et al., *J. Mol. Biol.* 163, 431–450, 1983
176. Angular reconstitution in three-dimensional electron microscopy: historical and theoretical aspects, M. Van Heel et al., *Scanning Microscopy Vol. 11*, 195–210, 1997
177. [People.csail.mit.edu/gdp/cryoem.html](http://people.csail.mit.edu/gdp/cryoem.html)
178. Three-dimensional structure determination by electron microscopy of two-dimensional crystals, L. A. Amos et al., *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 39, 183–231, 1982
179. Electron Microscopy of Chaperonins. In: G. H. Lorimer and T. O. Baldwin, S. Chan et al., *Methods in Enzymology Vol 290: Molecular Chaperones*, Academic Press, San Diego, 242–253, 1998
180. 3-D reconstructions from ice-embedded and negatively stained biomacromolecular assemblies: a critical comparison, A. Hoenger and U. Aebi, *J. Struct. Biol.* 117, 99–116
181. Cryo-Electron Tomography of Biological Specimens, A. P. Leis et al., *IEEE Processing Magazine*, 95–103, 2006
182. Principles of virus structure determination. In: Chiu, Burnett, Garcia (Eds.), T. S. Baker and J. E. Johnson, *Structural Biology of Viruses*, Oxford University Press, Oxford, 38–55, 1997
183. Measuring the optimal exposure for single particle cryo-EM using a 2.6 Å reconstruction of rotavirus VP6, T. Grant and N. Grigorieff, *eLIFE*, e06980, 2015

184. Advances in high-resolution cryo-EM of oligomeric enzymes, J. Vonck and D. J. Mills, *Current Opinion in Structural Biology* 46, 48–54, 2017
185. Native FMO-reaction center supercomplex in green sulphur bacteria: an electron microscopy study, D. Bina et al., *Photosynthesis Research*, Vol. 128, I. 1, 93–102, 2016
186. Towards an integrative structural biology approach: combining Cryo-TEM, X-ray crystallography, and NMR, J. Lengyel et al., *J. Struct. Funct. Genomics*, 15(3), 117–124, 2014
187. Electron Tomography Reveals Polyhedrin Binding and Existence of both Empty and Full Cytoplasmic Polyhedrosis Virus Particles inside Infectious Polyhedra, J. Ch. et al., *J. Virol.*, 85(12):6077–6081, 2011
188. *Advances in Insect Physiology*, P. D. Evans, Vol 26, Academic Press, San Diego-London-Boston-New York-Sydney-Tokyo-Toronto, 1996
189. Visualizing Live Dynamics and Ultrastructure of Intracellular Organelles with Preembedding Correlative Light-Electron Microscopy, R. S. Polishchuk et al., *Methods in cell biology*, Vol 111, 0091-679X, 21–35, 2012
190. A review of high-pressure freezing preparation techniques for correlative light and electron microscopy of the same cells and tissues, K. L. McDonald, *Journal of Microscopy*, Vol. 235, Pt. 3, 273–281, 2009
191. Electron microscopic visualization of fluorescent signals in cellular compartments and organelles by means of DAB-photoconversion, C. Meisslitzer-Ruppitsch et al., *Histochem. Cell Biol.* 130:407–419, 2008
192. A single Method for Cryofixation and Correlative Light, Electron Microscopy and Tomography of Zebrafish Embryos, S. J. Nixon et al., *Traffic* 10:131–136, 2009
193. From Dynamic Live Cell Imaging to 3D Ultrastructure: Novel Integrated Methods for High Pressure Freezing and Correlative Light-Electron Microscopy, C. Spiegelhalter et al., *PLOSone*, Vol. 5, I. 2, e9014, 2010
194. Correlative Light and Electron Microscopy: From Live Cell Dynamic to 3D Ultrastructure, C. Spiegelhalter et al., J. Kuo, *Electron Microscopy: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 1117, Springer Science+Business Media New York, 2014

195. Correlative Light- and Electron Microscopy with chemical tags, M. Perkovic et al., *Journal of Struct. Biol.*, 186(2), 205–213, 2014
196. Correlative microscopy: Bridging the gap between fluorescence light microscopy and cryo-electron tomography, *Journal of Struct. Biol.* 160, 135–145, 2007
197. Morphological changes in human neural cells following tick-borne encephalitis virus infection, D. Ružek et al., *J. Gen. Virol.* 90, 1649–1658, 2009b
198. Ultrastructural studies on a “nine plus one” flagellum 1., M. Silveira, *J. Ultrastruct. Res.* 26, 274–288, 1969
199. Analytic and Iterative Reconstruction Algorithms in SPECT, P. P. Bruyant, *J. Nucl. Med.* 43, 1343–1358, 2002
200. Correlative AFM and TEM of Soft Material., B. N, Matsko and W. Grogger, *G.I.T. Imaging & Microscopy* 1, 33–35, 2008
201. AFM of biological material embedded in epoxy resin, N. Matsko and M. Muller, *Struct. Biol.*, 146, 334–343, 2004
202. Marker-free dual-axis tilt series alignment, H. Winkler and K. A. Taylor, *Journal Struct. Biol.*, 182, 117–124, 2013
203. www.fischione.com
204. Electron Tomography, Methods of Three-Dimensional Visualization of Structures in the Cell, J. Frank, Chapter: Sample Shrinkage and Radiation Damage of Plastic Sections, P. K. Luther, 17–48
205. A method for monitoring the collapse of plastic section as a function of electron dose. P. K. Luther et al., *Ultramicroscopy* 24, 7–18, 1988
206. Three-Dimensional Architecture of Tick-Borne Encephalitis Virus Replication Sites and Trafficking of the Replicated RNA, L. Miorin et al., *Journal of Virology*, Vol. 87, No. 11, 1–13, 2013
207. Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites, S. Welsch et al., *Cell Host & Microbe* 5, 365–375, 2009

208. Three-Dimensional Architecture and Biogenesis of Membrane Structures Associated with Hepatitis C Virus replication, I. Romero-Brey et al., *PLOS Pathogens*, Vol. 8, I. 12, e1003056, 2012
209. A three-dimensional comparison of tick-borne flavivirus infection in mammalian and tick cell lines. D. K. Offerdhal et al., *PLOS ONE* 7, e47912, 2012
210. The endoplasmic reticulum provides the membrane platform for biogenesis of the flavivirus replication complex, L. K. Gillespie et al., *Cell Host Microbe* 5, 365–375, 2009
211. Intracellular assembly and secretion of recombinant subviral particles from tick-borne encephalitis virus, *Journal Virol.* 77, 4370–4382, 2003
212. Choice of operating voltage for a transmission electron microscope, R. F. Egerton, *Ultramicroscopy* 145, 85–93, 2014
213. Opportunities for Low-Voltage TEM/STEM, R. F. Egerton, *Microscopy and Microanalysis* 21, Suppl 3, 349–350, 2015
214. Ultrastructure studies on a “nine plus one” flagellum 1, M. Silveira, *J. Ultrastructure research* 26, 274–288, 1969
215. Iridovirus and cytoplasmatic polyhedrosis virus in the freshwater daphnid *Simocephalus expinosus*, B. A. Federici and E. I. Hazard, *Nature* 254, 327–328, 1975
216. Deformation and wear of pyramidal, silicon-nitride AFM tips scanning micrometre-size features in contact mode, M. L. Bloo et al., *Measurement* 25, 203–211, 1999
217. Rozptyl primárních elektronů na atomech zalévacího média biologického materiálu u nízkonapěťového transmisního elektronového mikroskopu LV EM 5, T. Bílý, 2011
218. Atomic Force Microscopy of Embedment-Free Sections of Cells and Tissue, T. Ushiki et al., *Arch. Histol. Cytol.*, Vol. 57, No. 4, 427–432, 1994
219. Correlated Atomic Force and Transmission Electron Microscopy of Nanotubular Structures in Pulmonary Surfactant, K. Nag et al., *Journal of Structural Biology* 126, 1–15, 1995

220. Visualization by an Atomic Force Microscope of the Surface of Ultra-thin Sections of Rat Kidney and Liver Cells Embedded in LR White, A. Yamamoto and Y. Tashiro, *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, Vol. 42, No. 11, 1463–1470, 1994
221. Correlative AFM and TEM of Soft Material, N. Matsko et al., *G.I.T. Imaging & Microscopy* 1, 33–35, 2008
222. Investigation of resins suitable for the preparation of biological sample for 3-D electron microscopy, C. Kizilyaprak et al., *Journal of Structural Biology* 189, 135–146, 2015

© for non-published parts Tomáš Bílý
thomass@paru.cas.cz

3D elektronová tomografie a korelativní mikroskopie
Ph.D. Thesis Series, 2019, No. 8

All rights reserved
For non-commercial use only

Printed in the Czech Republic by Typodesign
Edition of 20 copies

University of South Bohemia in České Budějovice
Faculty of Science
Braníšovská 1760
CZ-37005 České Budějovice, Czech Republic

Phone: +420 387 776 201
www.prf.jcu.cz, e-mail: sekret-fpr@prf.jcu.cz