

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Interakce viru klíšťové encefalitidy s cytoskeletem
hostitelských buněk**

Diplomová práce

Bc. Veronika Prančlová

Vedoucí práce: RNDr. Martin Palus, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Václav Hönig, Ph.D.

České Budějovice 2019

Prančlová V., 2019: Interakce viru klíšťové encefalitidy s cytoskeletem hostitelských buněk. [Interactions of the tick-borne encephalitis virus with the host cytoskeleton. Mgr. Thesis, in Czech] – 56 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

This thesis is focused on the role of host cytoskeleton, primarily microtubules and microfilaments, during tick-borne encephalitis virus infection in human neuroblastoma cell line SK-N-SH and tick cell line IRE/CTVM19. The importance of cytoskeletal integrity and dynamics to the viral replication cycle were examined using specific chemical inhibitors showing the virus utilizes studied structures in both cell lines. Immunofluorescence microscopy revealed structural changes in the actin cytoskeleton during late infection in SK-N-SH cells. Moreover, differences in expression of cytoskeleton-associated genes in both cell lines were compared. Several genes with up-regulated expression in SK-N-SH cells were identified during late infection.

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě 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, 17. 4. 2019

.....
Bc. Veronika Prančlová

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala svým školitelům RNDr. Martinu Palusovi, Ph.D. a Mgr. Václavu Hönigovi, Ph.D. za jejich cenné rady, trpělivost, veškerou ochotu a perfektní přístup, s jakým mi byli v průběhu vědecké práce vždy připraveni pomoci. Poděkování patří také doc. RNDr. Danielu Růžkovi, Ph.D. za poskytnutí zázemí a samotnou možnost pracovat v Laboratoři arbovirologie Parazitologického ústavu BC AV ČR. Mé poděkování samozřejmě míří i ke všem ostatním členům laboratoře za veškerou pomoc a úžasnou pracovní atmosféru. Nakonec bych také ráda poděkovala svým rodičům za jejich bezmeznou podporu, jež mi poskytovali po celou dobu mého studia, a mým nejdražším spolufakultníkům.

Obsah

1. Úvod	1
1.1. Virus klíšťové encefalitidy	1
1.2. Replikační cyklus VKE	1
1.3. Cytoskelet a jeho role ve flavivirové infekci	4
1.1.1. <i>Mikrotubuly</i>	6
1.1.2. <i>Mikrofilamenta</i>	7
1.1.3. <i>Intermediární filameta</i>	9
1.1.4. <i>Septiny</i>	10
2. Cíle práce	12
3. Materiál a metody	13
3.1. Buněčné linie	13
3.2. Virus	13
3.3. Plaková titrace	14
3.4. Dynamika replikace VKE in vitro	14
3.5. Testování cytotoxicity chemických inhibitorů	15
3.5.1. <i>MTT test</i>	16
3.6. Efekt chemických inhibitorů na morfologii a dělení buněk	16
3.7. Inhibiční testy	17
3.8. Imunocytochemie	18
3.8.1. <i>Kultivace buněk určených k imunofluorescenčnímu barvení</i>	18
3.8.2. <i>Imunofluorescenční barvení</i>	19
3.9. Real-time RT-PCR	20
3.9.1. <i>Kultivace buněk pro izolaci RNA</i>	20
3.9.2. <i>Izolace RNA</i>	20
3.9.3. <i>Reverzní transkripce (RT-PCR)</i>	20
3.9.4. <i>Real-time PCR</i>	21
3.10. Statistická analýza	23
4. Výsledky	24
4.1. Dynamika viru VKE in vitro	24
4.2. Testování cytotoxicity chemických inhibitorů	25
4.3. Efekt chemických inhibitorů na morfologii a dělení buněk	26
4.4. Inhibiční testy	29

4.5.	Strukturní změny cytoskeletu v průběhu infekce VKE	31
4.6.	Změny exprese na úrovni mRNA po infekci VKE u genů kódujících složky cytoskeletu	34
4.6.1.	<i>Tubulin</i>	35
4.6.2.	<i>Aktin</i>	35
4.6.3.	<i>Tropomyosin</i>	36
4.6.4.	<i>Spektrin</i>	37
4.6.5.	<i>Talin</i>	37
4.6.6.	<i>Vimentin</i>	38
5.	Diskuze	39
6.	Závěr	44
7.	Seznam zkratk	45
8.	Použitá literatura	47
9.	Příloha	55

1. Úvod

1.1. Virus klíšťové encefalitidy

Virus klíšťové encefalitidy (VKE) je původcem klíšťové encefalitidy (KE), závažné akutní neuroinfekce postihující obyvatele endemických oblastí Evropy a centrální a východní Asie. Na území Evropy je KE endemická celkem ve 27 zemích, přičemž Slovinsko, Estonsko, Lotyšsko, Litva a Česká republika patří na základě dat z let 2005–2009 k zemím s nejvyšší incidencí (Süss, 2011). K infekci člověka dochází nejčastěji při sání infikovaného klíštěte, přenos je však možný i konzumací nepasterizovaného mléka a mléčných výrobků. Většina případů klíšťové encefalitidy probíhá asymptomaticky. Symptomatická onemocnění však mohou mít závažné neurologické projevy, často s trvalými následky vedoucími ke snížení kvality života, a některé případy mohou skončit i smrtí pacienta. Přičteme-li k tomu rozšiřování rizikových oblastí, stále rostoucí incidenci a absenci specifické antivirové léčby, klíšťová encefalitida bezpochyby představuje nezanedbatelné zdravotní riziko pro širokou veřejnost (Gritsun *et al.*, 2003; Süss, 2011).

VKE je řazen do rodu *Flavivirus*, jenž spolu s dalšími třemi rody, *Pestivirus*, *Hepacivirus* a *Pegivirus*, náleží do čeledi *Flaviviridae* (Simmonds *et al.*, 2017). V rámci rodu *Flavivirus* jsou vymezeny tři hlavní skupiny: viry přenášené klíšťaty, viry přenášené komáry a viry bez známého vektoru. První jmenovaná skupina je dále rozdělena ještě na dvě podskupiny dle hostitelské preference, a to na flaviviry infikující savce a flaviviry infikující mořské ptáky. VKE spadá do savčí podskupiny a společně s dalšími zástupci, jako je například virus Powassan, virus vrtivky, virus Omské hemoragické horečky či virus Langat, představuje významného lidského patogena (Gritsun *et al.*, 2003).

1.2. Replikační cyklus VKE

Replikační cyklus VKE zahrnuje zcela stejné základní kroky, jež jsou společné všem virům: přichycení a vstup do buňky, uvolnění genomu, genová exprese, replikace a konečně sestavení nových virových částic a jejich uvolnění do vnějšího prostředí (Obr. 1.1). K tomuto virus využívá nejrůznějších buněčných mechanismů a pozměňuje jejich normální funkce

s jediným cílem – podpořit vlastní replikaci a produkci. Mezi virem a hostitelskou buňkou přitom dochází k celé řadě interakcí, které jsou značně komplexní a dosud ne zcela objasněny. Jednotlivé kroky a procesy replikačního cyklu byly sice relativně podrobně popsány pro některé flaviviry přenášené komáry, nicméně v případě VKE existuje informací podstatně méně. Většina studií byla navíc soustředěna výhradně na interakce VKE se savčími buňkami, a to i přesto, že klíšťata hrají ústřední roli ve výskytu a udržení viru v přírodě (Pulkkinen *et al.*, 2018).

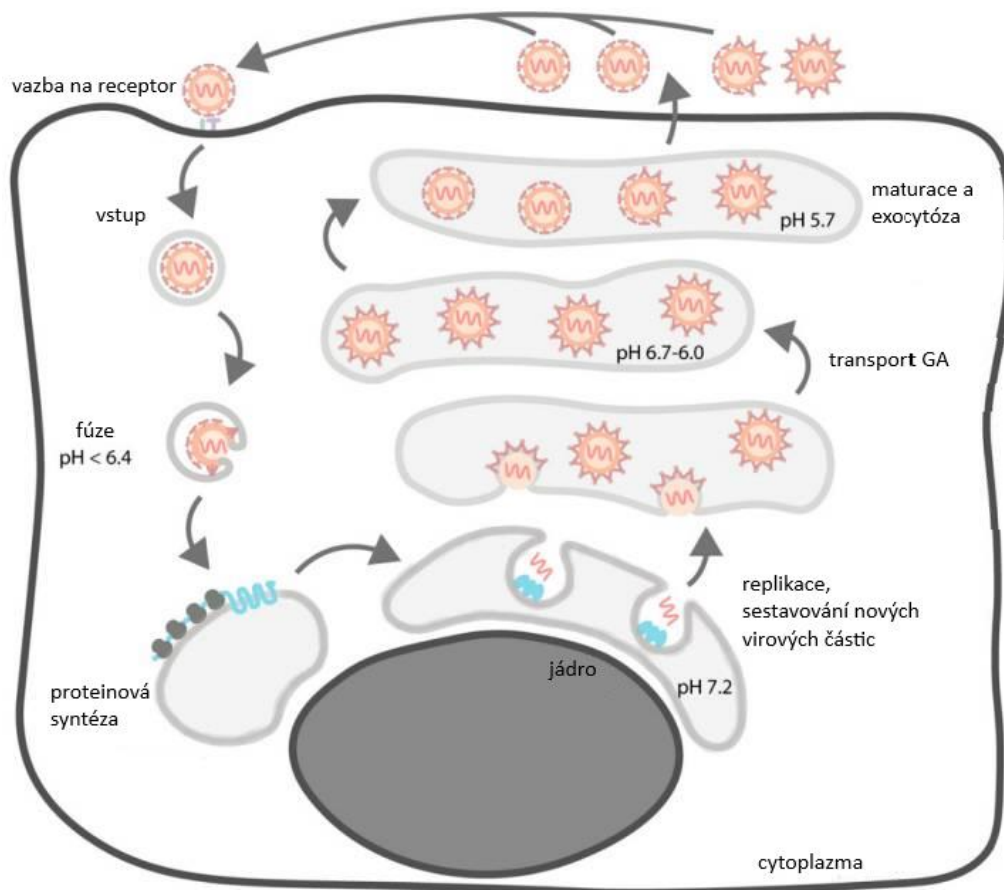
Pro vstup do hostitelských buněk mohou viry využívat různých endocytických drah a interagovat přitom s širokou škálou hostitelských molekul. U flavivirů se obecně hovoří o receptorem zprostředkované klathrin-dependentní endocytóze, ačkoliv výsledky některých studií navrhují i jiné cesty vstupu. Kupříkladu pro VKE byla jako možná alternativní cesta vstupu navržena makropinocytóza (Yu *et al.*, 2014).

Specifický receptor zapojený do tohoto děje prozatím nebyl jednoznačně identifikován. Vzhledem k tomu, že VKE dokáže infikovat buňky klíšťat i různých obratlovců, je možné, že je buďto schopen využívat různorodé receptory, nebo jako receptor využívá evolučně konzervovanou molekulu, jež by byla jeho hostitelským buňkám společná. Z dosud navrhovaných kandidátních receptorových molekul savčích buněk lze jmenovat laminin-vázající protein (Protopopova *et al.*, 1999; Zaitsev *et al.*, 2014). Za použití anti-idiotypových protilátek se podařilo zachytit také 35 kDa protein a 110 kDa glykoprotein jakožto možné receptory pro VKE. Tyto molekuly však nebyly dále blíže charakterizovány (Kopecký *et al.*, 1999; Maldov *et al.*, 1992). Mimoto se zdá, že ve vazbě VKE na hostitelskou buňku hraje důležitou roli i molekula heparansulfátu ze skupiny glykosaminoglykanů (Mandl *et al.*, 2001). U jiných zástupců flavivirů lze z molekul, jež mohou hrát roli potenciálního receptoru či koreceptoru, jmenovat například integrin $\alpha_v\beta_3$, protein teplotního šoku Hsp70 či C-lektinové receptory (Das *et al.*, 2009; Davis *et al.*, 2006; Fan *et al.*, 2016).

Po úspěšné internalizaci viru do hostitelské buňky je tento transportován ve formě vezikulu, přičemž je obecně známo, že intracelulární transport je závislý na cytoskeletu a s ním asociovaných proteinech (Cross, 2005). Postupně se utváří časný endozom a následnou acidifikací jeho vnitřního obsahu dochází ke konformační změně virového obalového proteinu E, jež vede k fúzi virového obalu s obalem endozomu a uvolnění virového genomu do cytoplazmy buňky (Allison *et al.*, 1995).

Genom VKE představuje jednovláknová RNA pozitivní polarity o velikosti přibližně 11 kb. Kóduje jediný otevřený čtecí rámeček (ORF, z angl. *open reading frame*), jenž je zakončen 5' a 3' netranslatovanými oblastmi (UTRs, z angl. *untranslated regions*). UTRs obsahují konzervované sekundární struktury důležité pro virovou replikaci. ORF je translatován v rozsáhlý polyprotein, který je posléze kotranslačně a posttranslačně zpracován a štěpen virovými i hostitelskými proteázami. Konečným výsledkem jsou tři strukturní (C, prM a E) a sedm nestrukturních (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) proteinů esenciálních pro replikační cyklus viru (Klema *et al.*, 2015; Lindenbach *et al.*, 2007). K uskutečnění replikace virového genomu pozměňují flaviviry strukturu buněčných membrán a utvářejí tzv. replikační komplex (RC, z angl. *replication complex*). Ten se nachází na vnější membráně endoplazmatického retikula (ER) a sestává z kombinace hostitelských a virových proteinů (Klema *et al.*, 2015). Za pomoci transmisní elektronové mikroskopie byly v průběhu infekce VKE u lidských buněk neurálního původu pozorovány ultrastrukturní změny zahrnující morfologické změny uvnitř cisteren drsného ER, zvětšení Golgiho aparátu (GA) a strukturní i velikostní nepravidelnosti u mitochondrií (Růžek *et al.*, 2009). Přestavba buněčných membrán byla zaznamenána i v případě klíštěcích buněk ISE6 infikovaných flavivirem Langat, nicméně změny nebyly v porovnání s infikovanými savčími buňkami Vero tak výrazné (Offerdahl *et al.*, 2012).

Po sestavení nových virových částic tyto procházejí procesem maturace. Obecně jsou u flavivirů rozlišovány dvě cesty maturace, které se označují jako *cis* a *trans*. U VKE byla v případě infekce obratlovčích buněk pozorována maturace typu *trans*, při níž se virové částice hromadí a sestavují v ER, načež postupně putují komplexem GA, maturují a nakonec opouštějí buňku exocytózou. ER takto infikovaných buněk je dilatované a hypertrofované. Oproti tomu v klíštěcích buňkách byla pozorována maturace typu *cis*, kdy se viriony sestavují v cytoplazmě, postupně maturují a putují směrem k buněčnému povrchu, kde posléze pučením přes membránu získávají svůj obal. U takto infikovaných klíštěcích buněk byla zaznamenána fragmentace drsného ER (Hase *et al.*, 1987; Šenigl *et al.*, 2006).

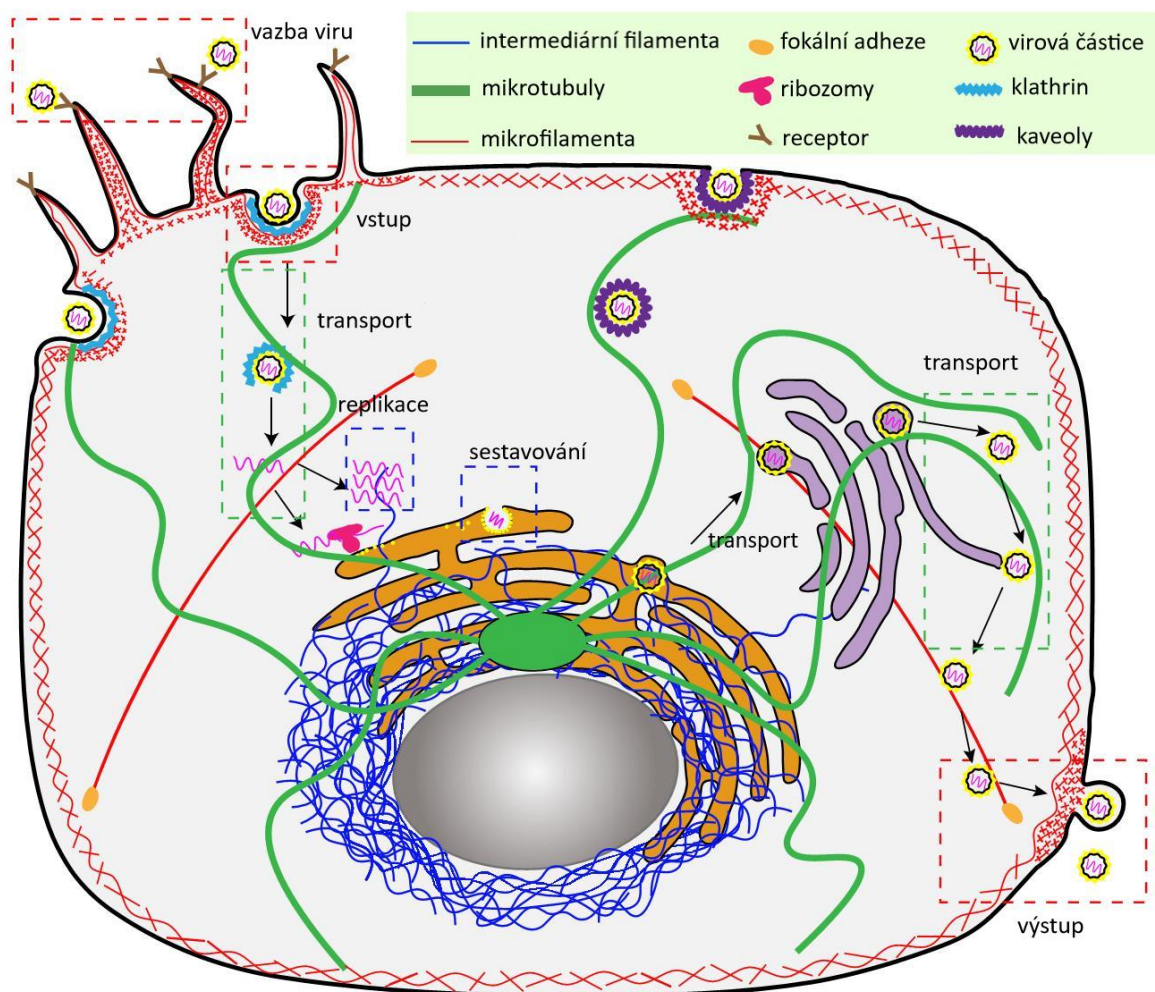


Obr. 1.1: Schéma replikačního cyklu VKE v hostitelské buňce, ukázka maturace typu *trans*. (Převzato a upraveno z Pulkkinen *et al.*, 2018).

1.3 Cytoskelet a jeho role ve flavivirové infekci

Cytoskelet představuje komplexní trojrozměrnou síť, jež se rozprostírá napříč buňkou. Základními stavebními kameny cytoskeletu jsou tři odlišné polymery: mikrotubuly, mikrofilamenta a intermediární filamenta. Mimo ně začaly být poměrně nedávno za další komponentu cytoskeletu považovány také septiny (Mostowy a Cossart, 2012). Kompletní cytoskeletální strukturu pak dotváří celá řada regulačních proteinů a molekulárních motorů. I přesto, že všechny tyto komponenty dohromady zajišťují mechanickou stabilitu buňky a její vnitřní organizaci, cytoskelet není pouhou rigidní kostrou. Naopak se jedná o velmi dynamickou strukturu, která je schopna reorganizace v závislosti na aktuálních potřebách buňky a která se podílí na celé řadě důležitých procesů včetně buněčného pohybu, cytokineze a intracelulárního transportu nejrůznějšího nákladu, od vezikul přes organely až po mRNA a chromozomy (Fletcher a Mullins, 2010).

Mimo jeho fyziologické funkce, cytoskelet bývá také opakovaně zmiňován v souvislosti s virovými infekcemi. Neustále rostoucí seznam případů jeho zapojení v aktivním transportu virových částic a důkazů o strukturních změnách, jimiž cytoskelet prochází v průběhu infekce, vyzdvihuje důležitost role, kterou cytoskeletální struktury sehrávají v průběhu replikačního cyklu viru (Döhner *et al.*, 2005; Taylor *et al.*, 2011). Schématické znázornění možných interakcí mezi cytoskeletem a flaviviry v průběhu infekce hostitelské buňky se nachází níže (Obr. 1.2). Tyto interakce představují zajímavý předmět výzkumu, jelikož bližší pochopení jejich přesných mechanismů na molekulární úrovni by mohlo otevřít další možnosti pro vývoj specifické antivirové léčby, a to nejen přímo působících antivirotik, ale i antivirotik cílených na hostitelské proteiny a dráhy využívané viry v průběhu jejich životního cyklu. Antivirová strategie cílená na hostitelské faktory totiž představuje atraktivní přístup k terapii za použití širokospektrých antivirotik (Baharuddin *et al.*, 2014; Bekerman a Einav, 2017).



Obr. 1.2: Zapojení cytoskeletálních struktur hostitelské buňky v replikačním cyklu flavivirů. (Převzato a upraveno z Zhang *et al.*, 2019).

1.1.1 Mikrotubuly

Mikrotubuly představují robustní, dutá polymerní vlákna o průměru přibližně 25 nm a délce od 1 do 100 μm . Základním stavebním prvkem jsou souhlasně orientované heterodimery tvořené α - a β -tubulinem, kdy 13 souhlasně orientovaných protofilament tvoří jedno mikrotubulární vlákno. Mikrotubuly mají díky své struktuře polární charakter, přičemž jejich plus- a mínus-konce se vyznačují rozdílnou dynamičností, kdy vyšší tendenci k polymerizaci a růstu má plus-konec s odhaleným β -tubulinem. Zatímco plus-konce obvykle směřují k plazmatické membráně buňky, mínus-konce bývají povětšinou ukotveny v organizačních centrech mikrotubul (MTOCs, z angl. *microtubule-organizing centres*) (Muroyama a Lechler, 2017). U mnoha typů buněk představuje nejvýznamnější organizační centrum mikrotubul centrozom, nicméně existují i non-centrozomální MTOCs. Mikrotubuly tak tedy mohou narůstat i z dalších struktur, kupříkladu z kinetochor, GA či z plazmatické membrány (Petry a Vale, 2015).

Mikrotubuly zastávají celou řadu důležitých funkcí. Pomáhají udržovat tvar buňky, organizovat její vnitřní prostředí a jsou hlavním strukturním elementem flagel a cilií. Během mitózy dochází k přestavbě mikrotubulární sítě do podoby tzv. mitotického vřeténka, komplexní, chromozomy segregující struktury, jež mimo mikrotubul zahrnuje i řadu motorů a proteinů s mikrotubuly asociovaných (Glotzer, 2009). V neposlední řadě jsou mikrotubuly také zapojeny do intracelulárního transportu nejrůznějšího nákladu intra- i extracelulárního původu. Transport je umožněn existencí specifických proteinů, molekulárních motorů z kinesinové a dyneinové rodiny. Ty k dopravě nákladu využívají mikrotubuly v podstatě jako kolejnice, přičemž obecně platí, že zatímco většina kinesinových motorů zajišťuje transport směrem k plus-konci mikrotubulů, cytoplazmatický dynein zajišťuje transport směrem k jejich mínus-konci (Sweeney and Holzbaur, 2018).

S použitím různých vizualizačních technik byly odhaleny některé změny ve struktuře mikrotubulární sítě v průběhu flavivirové infekce. Výrazná reorganizace mikrotubul byla kupříkladu zaznamenána u lidských hepatomových buněk Huh7 v průběhu infekce virem Zika (africký kmen MR766), kdy bylo u infikovaných buněk pozorováno utváření abnormálních klecových struktur obklopujících virový replikační komplex. Formování těchto struktur bylo pozorovatelné již zhruba 20 hodin po infekci. Stabilizace mikrotubul pomocí paclitaxelu navíc vedla k signifikantnímu poklesu titru viru, naznačujíc, že zachování dynamiky mikrotubulární

sítě je nezbytné pro efektivní replikaci viru Zika (Cortese *et al.*, 2017). Naproti tomu však nebylo u buněk lidského alveolárního karcinomu A549 infikovaných virem Zika (asijský kmen PLCal) zaznamenáno žádné viditelné rozrušení mikrotubul ani 48 hodin po infekci (Hou *et al.*, 2017).

U viru dengue, dalšího zástupce komáry přenášených flavivirů, byla testována role mikrotubul v infekci za použití specifických inhibitorů nocodazolu a kolchicinu. Rozrušení mikrotubulární sítě vedlo u buněk Vero infikovaných sérotypem 2 (DENV2) k potlačení internalizace virových částic a výraznému snížení titru produkovaného viru (Acosta *et al.*, 2008). V případě infekce epitelových placentárních buněk ECV304 totožným sérotypem byla sice zaznamenána pozměněná morfologie mikrotubul, nicméně alterace mikrotubulární sítě za pomoci nocodazolu, demekolcinu a paclitaxelu se na hladinách titru viru nijak významně neodrazila. Výsledky tedy, na rozdíl od výsledků výše zmíněné studie, naznačují, že ačkoliv mikrotubuly mohou být do infekčního procesu zapojeny, pro vstup viru dengue do hostitelských buněk pravděpodobně nezbytné nejsou (Chen *et al.*, 2008).

Potenciální role mikrotubul v infekčním procesu byla studována i v případě VKE. Zatímco u lidských neurálních buněk byly po 48 hodinách od infekce kmenem Hypr patrné morfologické změny naznačující rozrušení a částečnou degradaci mikrotubulární sítě (Růžek *et al.*, 2009), u krysích astrocytů nebyly u mikrotubulů v průběhu infekce kmenem Ljubljana 1 pozorovány žádné změny, a to ani v pozdních fázích infekce (Potokar *et al.*, 2014). Depolymerizace mikrotubul pomocí nocodazolu signifikantně snížila u lidských intestinálních epitelálních buněk Caco-2 vstup viru VKE (kmen K23) do buněk (Yu *et al.*, 2014).

1.1.2 Mikrofilamenta

V porovnání s mikrotubuly jsou mikrofilamenta neboli aktinová filamenta tenčí a pružnější. Vznikají spontánní polymerizací globulárních aktinových monomerů (G-aktinu), přičemž dva polymerizované řetězce společně vytvářejí helikální strukturu, filamenta o průměru přibližně 7 nm známá také jako F-aktin. Mikrofilamenta mají stejně jako mikrotubuly polární charakter, který se odvíjí od orientace monomerů v řetězci, přičemž monomery G-aktinu přednostně a výrazně rychleji polymerizují na jejich plus-konci, zatímco depolymerizace převažuje na jejich minus-konci (Pollard, 2016). Za přítomnosti aktin vázajících, tzv. *cross-linking*, proteinů jsou mikrofilamenta schopna vytvářet vysoce organizované pevné struktury, jako jsou svazky a sítě (Matsudaira, 1994). Příkladem takových struktur může být buněčný

kortex či stresová vlákna. Kortex představuje tenkou komplexní síť aktinových filament a více než stovky aktin-vazebných proteinů, jež se nachází těsně pod plazmatickou membránou. Hraje klíčovou roli v buněčné morfogenezi a podílí se také na buněčné migraci a dělení (Chugh a Paluch, 2018). Stresová vlákna jsou pak svazky 10–30 aktinových filament navzájem propojených *cross-linking* proteiny, zejména α -aktininem, a asociovaných s myosinem II. Ve většině případů jsou stresová vlákna na jednom či obou koncích ukotvena do fokálních adhezí (Cramer *et al.*, 1997; Burridge a Wittchen, 2013). Fokální adheze jsou složité komplexy tvořené integriny, talinem, vinkulinem a dalšími proteiny. Zatímco na vnější straně buňky interagují fokální adheze s extracelulární matrix, na vnitřní straně interagují s mikrofilamenty. Kromě toho, že zajišťují silnou adhezi buňky k matrix, hrají také roli v signální transdukci (Burridge a Chrzanowska-Wodnicka, 1996). Mimo tyto struktury, mikrofilamenta tvoří také silně dynamické výběžky plazmatické membrány, jmenovitě filopodia, lamelipodia či podozomy (Taylor *et al.*, 2011).

Z funkčního hlediska jsou mikrofilamenta zodpovědná za udržování buněčného tvaru, buněčnou migraci stejně jako přesuny jednotlivých subcelulárních komponent, cytokinezi a na úrovni tkáně také za svalovou kontrakci (Pollard, 2016). Podobně jako mikrotubuly, i mikrofilamenta se podílejí na intracelulárním transportu. To je umožněno jejich asociací s proteinovými motory z myozinové rodiny, přičemž s výjimkou myosinu VI zajišťují všechny ostatní popsané myosiny transport směrem k plus-konci mikrofilament (Wells *et al.*, 1999).

I v případě mikrofilament existuje celá řada studií dokazujících jejich zapojení do procesu virové infekce. Jelikož buněčný kortex představuje bariéru, kterou je nutno překonat, je aktin velmi často spojován s počáteční fází infekce zahrnující vazbu viru na povrch hostitelské buňky a jeho internalizaci. Existují ovšem i důkazy o jeho účasti v dalších fázích replikačního cyklu (Taylor *et al.*, 2011). Za použití RNAi screeningu (z angl. *RNA interference*), konfokální mikroskopie a specifických chemických inhibitorů byl blíže charakterizován proces vstupu viru japonské encefalitidy (JEV) do lidských neuroblastových buněk SK-N-SH. Na kaveolinu-1 a dynaminu-2 závislý vstup viru do buňky byl doprovázen přestavbou aktinového cytoskeletu, konkrétně tvorbou protruzí a stresových vláken. Narušení struktury mikrofilament latrunculinem A a jasplakinolidem vedlo k redukci internalizace viru do buněk (Xu *et al.*, 2016). Obdobně ošetření lidských neuroblastových buněk IMR32 aktin depolymerizující látkou cytochalasinem D v časných fázích infekce JEV vedlo ke snížení produkce infekčních virových částic i množství virového antigenu. Tyto výsledky naznačují, že aktin sehrává důležitou roli v navození efektivní replikace JEV (Henry Sum, 2015).

Obdobný efekt mělo rozrušení normální struktury mikrofilament lidských endoteliálních buněk EAhy926 také v případě DENV2. Vstup viru byl po ošetření cytochalasinem D a jasplakinolidem signifikantně snížen o 22 % a 30 % a inhibice byla zaznamenána i v případě intracelulárního titru viru a exprese virového proteinu E. Navíc, s použitím imunofluorescenční mikroskopie byla v časně fázi infekce pozorována také nápadná přestavba aktinového cytoskeletu (Wang *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2016). V kontrastu s těmito výsledky, ošetření Vero buněk cytochalasinem D nemělo na internalizaci DENV2 a jeho následnou produkci žádný efekt (Acosta *et al.*, 2009).

Pozměněná morfologie mikrofilament byla pozorována i v případě infekce VKE. Zatímco však byly u buněčné linie Caco-2 pozorovány změny v podobě utváření kondenzovanějších svazků aktinových filament již 24 hodin po infekci (p.i.) (Yu *et al.*, 2014), u krysích astrocytů nebyly změny zachyceny dříve než 2. den p.i., přičemž významná reorganizace byla zaznamenána až 3. den p.i. (Potokar *et al.*, 2014)

1.1.3 Intermediární filamenta

Intermediární filamenta představují celou skupinu různorodých polymerů. Proteiny, které intermediární filamenta tvoří, jsou kódovány celou řadou genů, jejichž exprese je buněčně i tkáňově specifická. Proteiny intermediárních filament jsou na základě své struktury a sekvenční homologie rozděleny do 6 základních tříd, z nichž třídy I–IV zahrnují proteiny vyskytující se v cytoplazmě, jmenovitě keratiny, vimentin, desmin, gliální fibrilární acidický protein, periferin, neurofilamentární proteiny, α -internexin a nestin. Třída V zahrnuje laminy nacházející se v buněčném jádře a třída VI obsahuje dvojici proteinů, filensin a phakinin, které jsou tkáňově specifické pro čočku zrakového aparátu (Herrmann *et al.*, 2009). Základní tripartitní struktura intermediárních filament je tvořena centrální α -helikální doménou lemovanou dvěma nehelikálními doménami. Monomery se paralelně spojují v dimery, ty dále v nepolární tetrametry a dalším spojováním většího počtu tetrametrů vznikají tzv. ULFs (z angl. *unit-length filaments*). ULFs představují jednotky o délce přibližně 60 nm, které dávají podélným spojováním vzniknout filamentům o průměru přibližně 10 nm, vyznačujícím se nejenom tuhostí, ale také značnou elasticitou (Kirmse *et al.*, 2007).

Na rozdíl od výše zmíněných mikrotubul a mikrofilament, intermediární filamenta vzhledem ke své struktuře postrádají polární charakter a nejsou tak využívána molekulárními motory jako dráhy pro intracelulární transport. Podílejí se však na udržování mechanické

stability buněk, tvaru, struktury a aktivity buněčného jádra, buněčné motility a transdukci signálů (Lowery *et al.*, 2015).

Ačkoliv nebyla role intermediárních filament ve flavivirové infekci studována tak extenzivně jako v případě mikrotubul a mikrofilament, existují záznamy o interakcích flavivirů i s touto složkou cytoskeletu. Za účelem přiblížení úlohy vimentinu ve virové infekci je často používán akrylamid, jenž rozrušuje jeho strukturu. Po ošetření ECV304 buněk infikovaných DENV2 akrylamidem byl zaznamenán signifikantní pokles titru viru v buněčné frakci. S použitím fluorescenční mikroskopie byla navíc u infikovaných buněk pozorována kolokalizace antigenu DENV2 s vimentinem a zároveň i reorganizace vimentinu (Chen *et al.*, 2008). Výsledky jiné studie pak přiblížily roli vimentinu v infekci o něco více, naznačující, že vimentin je nezbytný pro organizaci a ukotvení virových RCs v perinukleární oblasti, čímž podporuje efektivní replikaci DENV2. V průběhu infekce DENV2 byla popsána přímá interakce mezi vimentinem buněk Huh-7 a nestrukturním proteinem NS4A, jenž se podílí na utváření RCs. Infekce byla doprovázena výraznou reorganizací vimentinu, který kolokalizoval nejen s NS4A, ale i dvouřetězcovou RNA viru. Umlčení genu pro vimentin za použití siRNA (z angl. *small interfering RNA*) navíc vedlo k redistribuci virových replikačních komplexů a jejich rozptýlení napříč cytoplazmou směrem k buněčné periferii (Teo a Chu, 2014). Reorganizace intermediárních filament společně s mikrotubuly byla sledována u buněk Huh-7 i v případě infekce virem Zika, kdy došlo k utvoření abnormálních klecových struktur obklopujících virový RC (Cortese *et al.*, 2017).

1.1.4 Septiny

Vedle mikrotubul, mikrofilament a intermediárních filament jsou do skupiny cytoskeletálních proteinů začleňovány i septiny. Tyto GTP-vazebné proteiny o velikosti 30–65 kDa polymerizují v hetero-oligomerní komplexy, které jsou schopné vytvářet vysoce organizované struktury, a to nejenom filamenta, ale na rozdíl od výše zmíněných složek cytoskeletu také prstence. Podobně jako intermediární filamenta, i septiny mají nepolární charakter (Mostowy a Cossart, 2012). Množství genů kódujících septiny se liší napříč různými organismy. Například *Saccharomyces cerevisiae* má sedm a *Drosophila melanogaster* pět septinových genů. U lidí bylo detekováno celkem 13 genů, SEPT1–SEPT12 a SEPT14. SEPT13 byl identifikován pouze jako pseudogen, nyní známý pod označením SEPT7P2. U

klíštěte *Ixodes scapularis* bylo prozatím identifikováno 6 genů, z nichž čtyři (SEPT1, SEPT3, SEPT7A a SEPT7B) se podařilo klasifikovat jednoznačně (Mostowy a Cossart, 2012; Cabezas-Cruz *et al.*, 2017).

Septiny jsou asociovány s buněčnými membránami, mikrotubuly, myosinem II nesvalových buněk a mikrofilamenty (Joo *et al.*, 2007; Surka *et al.*, 2002). Z funkčního hlediska se podílejí na celé řadě buněčných procesů, jako je cytokineze, dynamika aktinových a regulace mikrotubulárních vláken, axonální růst a utváření dendritů (Mostowy a Cossart, 2012).

Role septinů ve virové infekci byla v rámci čeledi *Flaviviridae* studována prozatím jen ve spojení s virem hepatitidy typu C (HCV, z angl. *hepatitis C virus*). Po infekci HCV byla pozorována interakce septinu 6 s NS5b a RNA-vazebným proteinem hnRNP A1, přičemž umlčení genu pro septin 6 za užití specifických siRNAs vedlo k inhibici virové replikace stejně jako exprese N-terminálně zkrácené varianty septinu 6 (Kim *et al.*, 2007). Později pak bylo odhaleno, že v průběhu infekce HCV dochází k signifikantnímu zvýšení exprese septinu 9, jenž navíc vytváří vláknité struktury obklopující shluky virového proteinu C. Tyto struktury byly navíc asociovány s mikrotubuly a septinem 2. Podobně jako v předchozí práci, i zde umlčení genu pro septin 9 vedlo k výraznému snížení produkce virové RNA (Akil *et al.*, 2016). Ačkoliv výsledky těchto studií naznačují, že septiny by mohly výrazně usnadňovat efektivní replikaci HCV, k upřesnění jejich role v infekci je zapotřebí dalšího výzkumu.

Množství studií popisujících zapojení cytoskeletálních struktur hostitelských buněk do procesu flavivirové infekce stále narůstá, nicméně převážná většina z nich je věnována flavivirům přenášených komáry. Obdobně také převažují studie zaměřené na interakce flavivirů s buňkami savčích hostitelů. Tato práce si tedy klade za cíl přiblížit roli cytoskeletu v infekci VKE s primárním zaměřením na mikrotubuly a mikrofilamenta a porovnat případné rozdíly mezi infikovanými buňkami savčího a klíštěcího původu.

2. Cíle práce

1. Vypracovat literární rešerši týkající se interakcí virů s cytoskeletem hostitelských buněk se zaměřením na flaviviry.
2. Charakterizovat roli cytoskeletu ve vybraných buněčných liniích, a to lidské neuroblastové linii SK-N-SH a klíštěcí linii IRE/CTVM 19 v průběhu infekce VKE za použití cytoskeletálních chemických inhibitorů a imunocytochemie.
3. Sledovat změny exprese genů asociovaných s cytoskeletem v odpovědi na infekci VKE.

3. Materiál a metody

3.1 Buněčné linie

Lidská neuroblastová buněčná linie SK-N-SH vznikla v roce 1970 z metastatických buněk aspirátu kostní dřeně čtyřleté pacientky (Biedler *et al.*, 1973). Buňky byly zakoupeny od *PHE-Culturecollections* (www.PHE-Culturecollections.org.uk) a kultivovány v médiu D-MEM (*Biosera*) s přidavkem 10 % fetálního bovinního séra (BOFES) (*Biosera*), 1 % glutaminu (*Biosera*) a 1 % antibiotik a antimykotik (*Biosera*; penicilin, streptomycin, amphotericin B) při 37 °C a atmosféře 5 % CO₂. Pasáž byla prováděna metodou suché trypsinizace.

Klíštěcí buněčná linie IRE/CTVM 19 (dále jen IRE 19) získaná z embryonálních buněk klíštěte *Ixodes ricinus* byla kultivována v médiu L-15 (Leibovitz, 1963) (*Biosera*) s přidavkem 20 % BOFES (*Biosera*), 10 % tryptózo-fosfátového bujónu (TBP) (*Sigma-Aldrich*) a 1 % antibiotik a antimykotik (*Biosera*; penicilin, streptomycin, amphotericin B) při 28 °C (Bell-Sakyi *et al.*, 2007). Buňky byly laskavě poskytnuty Dr. Lesley Bell-Sakyi (The Pirbright Institute, UK). Během pasáží byly buňky vždy resuspendovány pipetou v kultivační zkumavce v plném objemu kultivačního média, načež byla polovina buněčné suspenze odebrána a ke zbylému obsahu zkumavky bylo doplněno čerstvé kultivační médium na původní objem.

Pro účely plakové titrace byla použita buněčná linie PS, jež byla kultivována v médiu L-15 (*Biosera*) s přidavkem 3 % prekolostrálního telecího séra (PTS) (*Biosera*), 1 % glutaminu (*Biosera*) a 1 % antibiotik a antimykotik (*Biosera*; penicilin, streptomycin, amphotericin B) při 37 °C. Pasáž byla prováděna suchou trypsinizací.

3.2 Virus

K infekci lidských neuroblastových i klíštěcích buněk byl zvolen prototypový kmen evropského subtypu VKE, Neudoerfl, jenž byl izolován v Rakousku v roce 1971 z klíštěte *I. ricinus* (Mandl *et al.*, 1988). Pro experimenty byla použita 5. mozková suspenze získána pasážováním v mozcích sajících myšek. Zásobní virová suspenze (20% mozková suspenze) byla uchovávána při teplotě -80 °C.

3.3 Plaková titrace

Pro účely stanovení titru viru byla zvolena metoda plakové titrace (De Madrid a Porterfield, 1969). Titr viru je vyjádřen v tzv. plakotvorných jednotkách (PFU, z angl. „*plaque-forming units*“; počet virových částic na buňku). Plaková titrace byla prováděna v 96-jamkových panelech. Testované vzorky byly naředěny desítkovou řadou v kultivačním médiu, načež bylo do jamek přidáno po 130 μl buněčné suspenze (buňky PS) v množství 5×10^4 buněk na jamku. Buňky byly posléze inkubovány při 37 °C v atmosféře 0,5 % CO_2 a po 4 hodinách inkubace převrstveny přelivem (roztok 3% karboxymethylcelulózy a 2x koncentrovaného kultivačního média v poměru 1:1) v množství 100 μl na jamku. Následná inkubace probíhala po dobu 5 dní při 37 °C v atmosféře 0,5 % CO_2 . K vizualizaci utvořených plaků byly panely nejprve promyty fyziologickým roztokem (9 g NaCl v 1 l destilované vody) a poté obarveny roztokem naftalenové černě (1 g naftalenové černě, 60 ml ledové kyseliny octové a 13,6 g octanu sodného doplněné do 1 l destilovanou vodou). Po obarvení pak byly panely promyty proudem vody a usušeny.

3.4. Dynamika replikace VKE in vitro

Za účelem zjištění dynamiky replikace VKE v lidské neuroblastové linii SK-N-SH byly buňky nasazeny na 96-jamkový panel v objemu 200 μl a množství 1×10^5 buněk na jamku. Buňky byly inkubovány přes noc při 37 °C v atmosféře 5 % CO_2 a následující den infikovány suspenzí VKE naředěnou v příslušném množství kultivačního média. Zvolená infekční dávka pro SK-N-SH byla 0,01 MOI (z angl. *multiplicity of infection*). Vzorky byly pro každý časový interval připraveny v triplikátech.

U klíštěcí linie IRE 19 byla zvolena infekce s následným odmytím reziduálního viru. Buňky byly v množství 1×10^6 nasety do zkumavky a infikovány suspenzí VKE. Zvolená infekční dávka pro IRE 19 byla 1 MOI. Buňky byly následně inkubovány při 28 °C. Po 1 hodině byly buňky centrifugovány (5 min, $200 \times g$), bylo odebráno médium a buňky byly dvakrát promyty v PBS (fosfátem pufovaný fyziologický roztok; z angl. *phosphate buffer saline*). Poté byly resuspendovány v čerstvém kultivačním médiu a nakonec nasazeny na 96-jamkový panel v konečném objemu 200 μl a množství 5×10^4 buněk na jamku. Vzorky byly pro každý časový interval připraveny v triplikátech.

Pro zjištění hladin reziduálního viru byl ve shodném objemu, ředění a triplikátech přidán virus i do jamek bez buněk obsahujících pouze kultivační médium.

Supernatant byl poté odebírán denně, od 0. do 4. dne po infekci včetně, přičemž 0. interval byl odebrán 2 h po infekci. Titr infekčního viru v odebraných vzorcích supernatantu byl stanoven metodou plakové titrace, do samotného stanovení byly vzorky uchovány při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.5. Testování cytotoxicity chemických inhibitorů

Za účelem objasnění role cytoskeletu v infekci VKE byly použity chemické inhibitory specifické pro dané cytoskeletální struktury. Tyto inhibitory byly nejprve podrobeny testům cytotoxicity s cílem zvolit vhodné koncentrace pro námi použité buněčné linie. Rozpětí testovaných koncentrací bylo zvoleno na základě dostupné literatury. Výčet všech použitých inhibitorů i koncentrací je uveden v Tabulce I.

Vzhledem k tomu, že všechny inhibitory byly pro naše experimenty ředěny v dimethylsulfoxidu (DMSO), byly zároveň testům cytotoxicity podrobeny i roztoky DMSO v kultivačním médiu. Pro aplikaci inhibitoru na buněčnou kulturu pak byla vždy použita koncentrace DMSO, která nebyla cytotoxická, ale která stále umožnila rozpuštění koncentrovaného inhibitoru.

Obě buněčné linie byly nasazeny na 96-jamkové panely. SK-N-SH v objemu $200\text{ }\mu\text{l}$ a množství 1×10^5 buněk na jamku, IRE 19 v objemu $200\text{ }\mu\text{l}$ a množství 5×10^4 buněk na jamku. Buňky byly inkubovány dle výše uvedených kultivačních podmínek po dobu 24 hodin, načež bylo kultivační médium z jamek nahrazeno roztoky příslušných inhibitorů a DMSO v kultivačním médiu o požadovaných koncentracích. V případě kontrol bylo kultivační médium nahrazeno čerstvým. Pro každou koncentraci byly vzorky provedeny v duplikátech. Po dalších 24 hodinách inkubace, čili 48 hodin od nasazení, pak byly provedeny samotné testy cytotoxicity. Pro tento účel byla zvolena široce používaná metoda pro hodnocení cytotoxicity a viability buněk – MTT test, který je postaven na redukci tetrazoliové soli MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid).

Jelikož inhibitory používané v našich experimentech vykazují inhibici buněčného dělení a výsledek MTT testu je závislý na množství metabolizujících buněk, byly současně s buňkami v roztocích s příslušnými inhibitory nasazeny stejným způsobem i buňky bez přítomnosti inhibitorů v médiu. U těchto buněk byly provedeny MTT testy již 24 hodin po nasazení za účelem zjištění viability buněk těsně před aplikací inhibitorů, čili před inhibicí buněčného

dělení. Hodnoty nacházející se pod touto hranicí poukazují na toxický vliv použitých inhibitorů bez ohledu na inhibici buněčného dělení.

Tab. I: Použité cytoskeletální inhibitory, jejich efekt a koncentrace podrobené testům cytotoxicity prostřednictvím MTT-testu.

Inhibitor	Označení	Efekt inhibitoru	Testované koncentrace [μM]	Citace
Nocodazole	Noco	rozrušení mikrotubul	0,01; 5; 10; 20; 50	Acosta <i>et al.</i> (2009)
Paclitaxel	PX	stabilizace mikrotubul	1; 5; 10; 20; 30	Zan <i>et al.</i> (2017)
Ciliobrevin D	Cilio D	inhibice dyneinu	1; 10; 20; 100	Eyre <i>et al.</i> (2014)
Cytochalasin D	Cyto D	rozrušení mikrofilament	0,1; 2,5; 5; 10; 30	Acosta <i>et al.</i> (2009)
Jasplakinolide	Jaspla	stabilizace mikrofilament	0,01; 0,1; 1; 3	Acosta <i>et al.</i> (2009)
Blebbistatin	Blebbi	inhibice myosinu II	1; 25; 50	Laliberte a Moss (2009)

3.5.1. MTT test

Zásobní roztok MTT (*Sigma-Aldrich*) o koncentraci 5 mg/ml byl připraven rozpuštěním MTT ve sterilním PBS a uchováván ve tmě při -20 °C.

Z jamek 96-jamkových panelů bylo po uplynutí doby kultivace odstraněny roztoky inhibitorů, v případě kontrol kultivační médium, a nahrazeno čerstvým médiem s roztokem MTT v množství 100 μl na jamku. Finální koncentrace MTT v médiu byla 0,5 mg/ml. Poté byly buňky inkubovány 2 hodiny v podmínkách příslušných pro danou buněčnou linii. Po 2 hodinách bylo médium odebráno a utvořené krystaly formazanu rozpuštěny v DMSO v množství 100 μl na jamku. Panely byly bezprostředně po přidání DMSO ponechány na třepačce ve tmě po dobu 15 minut, načež byla změřena absorbance při vlnové délce 570 nm. Absorbance byla měřena na přístroji Infinite M200 Pro (*Tecan*).

3.6. Efekt chemických inhibitorů na morfologii a dělení buněk

Pro ověření, zda inhibitory ve finálně zvolených koncentracích postavených na výsledcích MTT testu skutečně vykazují efekt, byly obě buněčné linie nasazeny na 96-jamkové panely a kultivovány stejným způsobem, jako je zmíněno výše. Po 24 hodinách pak bylo kultivační médium nahrazeno příslušnými roztoky inhibitorů. Pro každý inhibitor byla jako

kontrola zvolena taková koncentrace DMSO v kultivačním médiu, jež odpovídala jeho koncentraci v nejvíce koncentrovaném roztoku příslušného inhibitoru. Po uplynutí 24 hodin byla kondice kultivovaných buněk vyhodnocena mikroskopicky při celkovém zvětšení 200x, s primárním zaměřením na viditelné změny v morfologii buněk. K pozorování byl použit světelný invertovaný mikroskop Motic AE31E Elite (*Ted Pella, Inc.*)

Kondice klíčících buněk ošetřených mikrotubulárními inhibitory nocodazolem, paclitaxelem a ciliobrevinem D byla z důvodu nikterak patrných morfologických změn zkontrolována i po 72 hodinách od aplikace inhibitorů a DMSO, tentokrát se zaměřením na četnost buněk.

3.7. Inhibiční testy

Pro objasnění role cytoskeletu v infekci VKE byly vybrány chemické inhibitory, jež specificky ovlivňují cytoskeletální struktury. Použité koncentrace byly zvoleny na základě výsledků testu cytotoxicity s ohledem na rozdílný charakter obou testovaných linií. Kontrolní jamky obsahovaly nejvyšší koncentraci DMSO, která byla pro daný typ inhibitoru a buněk použita. Doba ošetření buněk inhibitory předcházející infekci byla pro každý inhibitor zvolena individuálně na základě informací dostupných z literatury. Přehled experimentálních podmínek se nachází v níže uvedené tabulce (Tab. II).

SK-N-SH byly nasazeny na 96-jamkové panely v objemu 200 μ l a množství 1×10^5 buněk na jamku. Po 24 hodinách inkubace bylo médium nahrazeno čerstvě připravenými roztoky inhibitorů či DMSO v kultivačním médiu. Takto ošetřené buňky byly po příslušné době (Tab. II) infikovány VKE v infekční dávce 0,01 MOI a až do odběru vzorků nadále inkubovány v přítomnosti inhibitorů.

IRE 19 byly v množství 5×10^5 umístěny do zkumavek a po centrifugaci (5 min; $200 \times g$) bylo médium nahrazeno 500 μ l čerstvě připravených roztoků inhibitorů či DMSO v kultivačním médiu. Po uplynutí časových intervalů (Tab. II) byly buňky infikovány VKE v infekční dávce 1 MOI. Infikované buňky byly inkubovány po dobu 1 hodiny, načež bylo inokulum odebráno, buňky dvakrát promyty v PBS, resuspendovány v 1 ml čerstvého média s inhibitory, rozpipetovány po 100 μ l do jamek 96-jamkových panelů a doplněny shodnými roztoky na objem 200 μ l. Buňky tedy byly na panely nasazeny v konečném objemu 200 μ l a množství 5×10^4 buněk na jamku a nadále inkubovány v přítomnosti inhibitorů až do samotného odebrání vzorků.

Vzorky supernatantu pro stanovení titru viru byly odebrány v intervalech 1, 2 a 3 DPI (dnů po infekci) pro SK-N-SH a 2, 3 a 4 DPI pro IRE 19 a uchovány v -80 °C.

Celý experiment byl zopakován dvakrát, v triplikaci pro každou zvolenou koncentraci příslušného inhibitoru.

Tab. II: Použité koncentrace chemických inhibitorů a doba ošetření buněk před infekcí VKE.

Inhibitor	Testované koncentrace [μM]		Doba ošetření před infekcí [h]	Citace
	SK-N-SH	IRE 19		
Noco	0,1; 1; 10	10; 25; 50	4	Acosta <i>et al.</i> (2009)
PX	0,01; 0,1; 1	1; 10; 30	1	Chen <i>et al.</i> (2008)
Cilio D	20; 50; 100	20; 50; 100	1	Lukic <i>et al.</i> (2014)
Cyto D	0,01; 0,1; 2,5	2,5; 10; 30	2	Acosta <i>et al.</i> (2009)
Jaspla	0,01; 0,1; 1	0,1; 1; 3	0,5	Acosta <i>et al.</i> (2009)
Blebbs	0,1; 1; 10	1; 10; 30	0,5	Laliberte a Moss (2009)

3.8. Imunocytochemie

Pro zachycení případných změn v cytoskeletální struktuře hostitelských buněk v průběhu infekce VKE byla zvolena metoda nepřímé imunofluorescence.

3.8.1. Kultivace buněk určených k imunofluorescenčnímu barvení

Buňky obou buněčných linií byly nasazeny na mikroskopická sklička s odnímatelnými komůrkami (*Thermo Fisher Scientific, Inc.*). SK-N-SH byly nasazeny v množství 2×10^4 buněk a celkovém objemu 200 μl na jamku, IRE 19 pak v množství 1×10^4 buněk a objemu 200 μl na jamku. V případě IRE 19 byla ještě před nasazením z důvodu jejich slabší adherence aplikována na dno komůrek vrstva želatiny, konkrétně 0,2% Gelatin Solution (*ScienCell Research Laboratories, Inc.*). Nasazené buňky byly posléze infikovány 0,01 MOI pro SK-N-SH a 1 MOI pro IRE 19. Infikované buňky a kontroly byly nadále kultivovány po dobu 2 a 7 dnů pro SK-N-SH a 4 a 14 dnů pro IRE 19. Buňkám s intervaly 7 a 14 DPI bylo v polovině doby kultivace vyměněno kultivační médium za čerstvé.

3.8.2. *Imunofluorescenční barvení*

Buňky byly fixovány roztokem 4% paraformaldehydu po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě a posléze třikrát promyty v roztoku 0,05% Tween 20 v PBS (PBS-Tween), jenž byl kromě promývání taktéž použit pro přípravu všech dále zmíněných roztoků. Po promytí byly membrány permeabilizovány 0,3% Tritonem X-100, který byl po 30 minutách nahrazen 0,01% dodecylsíránem sodným (SDS) na dalších 10 minut, po nichž byly buňky opět třikrát promyty. K blokování nespecifických vazebných míst byl použit roztok PBS obsahující 10 % bovinního fetálního a 5 % kozího séra. Blokace probíhala 1 hodinu při laboratorní teplotě.

Za účelem vizualizace cytoskeletálních vláken a VKE byl blokační roztok nahrazen roztokem primárních protilátek. Pro mikrotubuly byla zvolena monoklonální králičí protilátka proti β -tubulinu (1:100; *Cell Signaling*) spolu s myší protilátkou proti flavivirové antigenní skupině (1:250; *Sigma-Aldrich*). V případě vizualizace aktinových vláken byl v tomto kroku blokační roztok nahrazen pouze myší protilátkou proti flavivirové antigenní skupině (1:250; *Sigma-Aldrich*). Buňky byly s primárními protilátkami inkubovány přes noc při teplotě 4 °C.

Po přibližně 12 hodinách pak byly buňky třikrát promyty a značeny sekundárními protilátkami. Pro vizualizaci mikrotubul proběhlo značení pomocí kozí protilátky proti králičímu antigenu Alexa Fluor 594, pro detekci virového antigenu pak kozí protilátky proti myššímu antigenu Alexa Fluor 488 (1:500; *Thermo Fisher Scientific, Inc.*). Pro vizualizaci aktinu a virového antigenu byl použit konjugát phalloidinu CF594 (1:40; *Biotium*) a Alexa Fluor 488. Takto značené buňky byly inkubovány po dobu 1 hodiny ve tmě při laboratorní teplotě, posléze třikrát promyty v PBS-Tween. Pro obarvení buněčných jader a konzervaci preparátu bylo použito montovací médium s DAPI Fluoroshield (*Sigma-Aldrich*).

3.9. Real-time RT-PCR

Pro stanovení změn genové exprese vybraných genů u buněčných linií SK-N-SH a IRE 19 v průběhu infekce VKE byla zvolena metoda kvantitativní real-time RT-PCR.

3.9.1. Kultivace buněk pro izolaci RNA

Obě buněčné linie byly nasazeny na 96-jamkové panely v objemu 200 μ l a množství 5×10^4 buněk na jamku a s výjimkou kontrol byly infikovány roztokem virové suspenze VKE v kultivačním médiu. Infekční dávka byla 0,01 MOI pro SK-N-SH a 1 MOI pro IRE 19. Vzorky pro každý časový interval (2 a 7 DPI pro SK-N-SH; 4 a 14 DPI pro IRE 19) a jim odpovídající negativní kontroly byly provedeny v triplicátech. Buňkám s intervaly 7 a 14 DPI a příslušným kontrolám bylo v polovině doby kultivace vyměněno kultivační médium za čerstvé.

3.9.2. Izolace RNA

Po uplynutí výše uvedených intervalů byla ze vzorků izolována a purifikována celková RNA (totRNA). SK-N-SH byly promyty v PBS, sklizeny a resuspendovány v roztoku PBS a lyzačního pufu. IRE 19 byly z důvodu menšího množství v případě intervalu 4 DPI sklizeny a resuspendovány v původním kultivačním médiu a posléze přeneseny do -80 °C, kde prošly jedním cyklem zamražení a rozmražení. Takto sklizené buňky pak byly použity pro izolaci totRNA za použití High Pure RNA Isolation Kit (*Roche*) dle pokynů výrobce. Pro zajištění maximálního výtěžku byla totRNA v závěru eluována dvakrát, nejprve s pomocí 50 μ l elučního pufu, podruhé za použití prvního eluátu.

Koncentrace purifikované RNA byla posléze změřena pomocí spektrofotometru Nanodrop ND-1000 (*Thermo Scientific*). Vzorky byly skladovány při -80 °C.

3.9.3. Reverzní transkripce (RT-PCR)

Přepis izolované RNA do cDNA byl proveden s použitím Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (*Roche*), dle pokynů výrobce. Reverzní transkripce probíhala s použitím oligo(dT)₁₈ primeru. Získané vzorky cDNA byly uchovávány při -20 °C.

3.9.4. Real-time PCR

Vzorky cDNA, biologické triplikáty, byly následně podrobeny real-time PCR s cílem stanovení změn exprese vybraných genů asociovaných s cytoskeletem hostitelských buněk v průběhu infekce VKE. Amplifikace byla provedena na přístroji Rotor Gene-3000 (*Corbett Research*) a k přípravě reakční směsi byl použit qPCR 2x SYTO-9 Master Mix (*Top-Bio s.r.o.*). V níže uvedených tabulkách je uvedeno zastoupení jednotlivých složek v reakci (Tab. III) a podmínky amplifikace (Tab. IV). Přehled všech sledovaných lidských a klišťecích genů včetně sekvencí z literatury převzatých primerů je pak uveden v následujících tabulkách (Tab. V a Tab. VI).

Tab. III: Složení reakční směsi pro real-time PCR.

Reagens	Objem	Výsledná koncentrace
qPCR 2x SYTO-9 Master Mix	12,5 µl	75 mM Tris-HCl, pH 8,8, 20 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,01% Tween 20, 2,5 mM MgCl ₂ , 200 µM každý dNTP, 25 U/ml Taq DNA polymeráza, monoklonální protilátka anti-Taq, DNA barvivo SYTO-9, stabilizátory a aditiva
5' primer	0,75 µl	0,1–1 µM
3' primer	0,75 µl	0,1–1 µM
templátová cDNA	4 µl	0,02 ng/µl–0,02 µg/µl
PCR H ₂ O	7 µl	do finálního objemu 25 µl
celkem	25 µl	

Tab. IV: Optimalizované podmínky amplifikace.

Fáze	Teplota	Čas	
Denaturace	95 °C	10 min	
40 cyklů	denaturace	95 °C 15 s	
	Cykly	nasedání primerů	60 °C 30 s
		elongace	72 °C 30 s
Analýza tání	72–95 °C	45 s (1. krok) 5 s (ostatní kroky)	

Tab. V: Přehled lidských cílových genů a sekvence jejich primerů.

Symbol	Cíl	Sekvence (5' → 3')	Citace
TUBB3	β-tubulin III	F: AGTGATGAGCATGGCATCGA R: AGGCAGTCGCAGTTTTTCACA	Hermann <i>et al.</i> (2006)
ACTB	β-aktin	F: GGAATTCGAGCAAGAGATGG R: AGCACTGTGTTGGCGTACAG	Guo <i>et al.</i> (2018)
TPM4	tropomyosin 4	F: TGAAAAGGAGGACAAATATGAAGA R: CTTTGGCCTGGGCAAGTT	Häbig <i>et al.</i> (2013)
SPTB	β-spectrin	F: TCAAACCTACCAAAACTACAAAACCTTT R: GTAGTGAAGTTCACAGTCCAGACCAT	Taylor-Harris <i>et al.</i> (2005)
TLN1	talin 1	F: AGAACCAATACGGCAACCTG R: AGGTCCGACATGAAGTCGTC	Fang <i>et al.</i> (2016)
TLN2	talin 2	F: CTGAGGCTCTTTTCACAGCA R: CTCATCTCATCTGCCAAGCA	Fang <i>et al.</i> (2016)
VIM	vimentin	F: TGGCCGACGCCATCAACACC R: CACCTCGACGCGGGCTTTGT	Hao <i>et al.</i> (2014)

Tab. VI: Přehled klíčevých cílových genů a sekvence jejich primerů.

Symbol	Cíl	Sekvence (5' → 3')	Citace
TUBA	α-tubulin	F: AGGAGATTGTGGACCTGGTG R: GCTTGGACTTCTTGCCGTAG	Ayllón <i>et al.</i> (2013)
TUBB	β-tubulin	F: CGACTGTCTTCAGGGCTTTC R: AGACAGGGTGGCATTGTAGG	Ayllón <i>et al.</i> (2013)
ACT*	actin	F: GGTATCGTGCTCGACTC R: GGCGACGTAGCAG	Neelakanta <i>et al.</i> (2007)
TPM	tropomyosin	F: GAGCCGAGTTTGCCGAGAG R: ACTTGGTAGCGGTAGAAACGG	Cabezas-Cruz <i>et al.</i> (2017)
SPTA	α-spectrin	F: AGAACCAATACGGCAACCTG R: AGGTCCGACATGAAGTCGTC	Ayllón <i>et al.</i> (2013)
TLN	talin	F: AACAAAGGAGCCAAACTGG R: CGTTGGAGTCGGAGAAGAAG	Ayllón <i>et al.</i> (2013)

* Výsledky RT-PCR analýzy pro ACT nebyly do této práce zahrnuty.

Výsledky amplifikace byly zpracovány pomocí programu Rotor Gene 6.0.19, přičemž ze zpracovaných dat pak byla pro další výpočty použita tzv. C_T hodnota. Křivky tání produktů získané během analýzy tání PCR produktů byly využity ke kontrole specifiity reakce a zjištění přítomnosti případných nespecifických produktů.

Míra změny exprese sledovaných genů byla stanovena komparativní C_T metodou. Kvantifikace byla normalizována použitím tzv. referenčních genů, k jejichž expresi byla vztažena exprese genů cílových. V případě buněk SK-N-SH byla jako referenční geny použita dvojice genů pro glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázu (GAPDH) a ribozomální protein S13 (RPS13). Pro klišťecí buňky IRE 19 byla zvolena dvojice ribozomálních proteinů L13A (RPL13A) a S4 (RPS4). Sekvence těchto referenčních genů jsou vypsány v Tabulce VII. Změna exprese normalizovaných cílových genů byla vyjádřena jako $2^{-\Delta\Delta C_T}$, pro jejíž výpočet byl použit vzorec $2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{-(\Delta C_T(\text{sledovaný gen}) - \Delta C_T(\text{kontrola}))}$ (Schmittgen a Livak, 2008).

Tab. VII: Přehled použitých referenčních genů a jejich sekvence.

Symbol	Cíl	Sekvence (5' → 3')	Cítace
GAPDH	glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenáza	F: TCTCCTCTGACTTCAACAGCGAC	Zhang <i>et al.</i> (2017)
		R: CCCTGTTGCTGTAGCCAAATTC	
RPS13	ribozomální protein S13	F: CGAAAGCATCTTGAGAGGAACA	Zhang <i>et al.</i> (2017)
		R: TCGAGCCAAACGGTGAATC	
RPL13A	ribozomální protein L13A	F: GTGGGCTGGAAGTACCAGAA	Weisheit <i>et al.</i> (2015)
		R: CTAGCTGAACCTTGGCTTCG	
RPS4	ribozomální protein S4	F: GGTGAAGAAGATTGTCAAGCAGAG	Koči <i>et al.</i> (2013)
		R: TGAAGCCAGCAGGGTAGT	

3.10. Statistická analýza

Statistická významnost výsledků byla vyhodnocována za použití programu GraphPad Prism 7 (*GraphPad Software, Inc.*). Pro vyhodnocení změn v hladinách titru viru u inhibičních testů byla jako statistická metoda zvolena dvoucestná ANOVA (Dunnettův test). V případě výsledků týkajících se exprese genů u lidské neuroblastové linie SK-N-SH byla zvolena dvoucestná ANOVA (Šidákův test), u klišťecí linie IRE 19 byl zvolen Studentův t-test. Výsledky, jejichž hladina významnosti **p** byla menší než 5 % ($p < 0,05$), byly považovány za statisticky signifikantní a v grafech jsou označeny hvězdičkou. Všechny výsledky jsou v grafech prezentovány jako průměr ± střední chyba průměru (SEM).

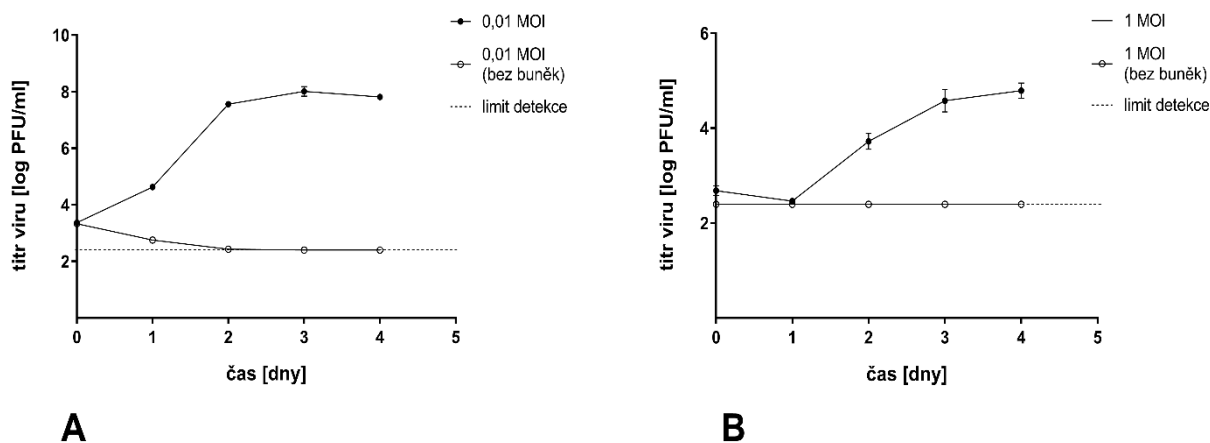
4. Výsledky

4.1. Dynamika viru VKE *in vitro*

Dynamika replikace viru *in vitro* byla sledována pomocí metody plakové titrace v intervalech 0, 1, 2, 3 a 4 dny po infekci, přičemž vzorky supernatantu pro 0. interval byly odebrány 2 hodiny po infekci.

Lidské neuroblastové buňky se ukázaly být výrazně citlivé k infekci VKE, virus se v nich množil efektivně. K významnému nárůstu titru viru došlo již první den po infekci, od druhého dne pak virus přetrvával v supernatantu ve vysokých titrech. Vrchol produkce nastal v intervalu 3 DPI, kdy hladina titru detekovaného viru v supernatantu buněčné kultury dosáhla hodnot až 10^8 PFU/ml (Obr 4.1 A).

Oproti neuroblastové linii se produkce VKE v klíččích buňkách IRE 19 ukázala být pozvolnější a virus dosahoval v maximu nižších titrů. První den po infekci došlo k poklesu titru viru v supernatantu těsně nad hranici meze detekce. K nárůstu titru došlo až druhý den po infekci, s vrcholem produkce 3–4 DPI a hladinami pohybujícími se mezi 10^4 – 10^5 PFU/ml (Obr. 4.1 B).

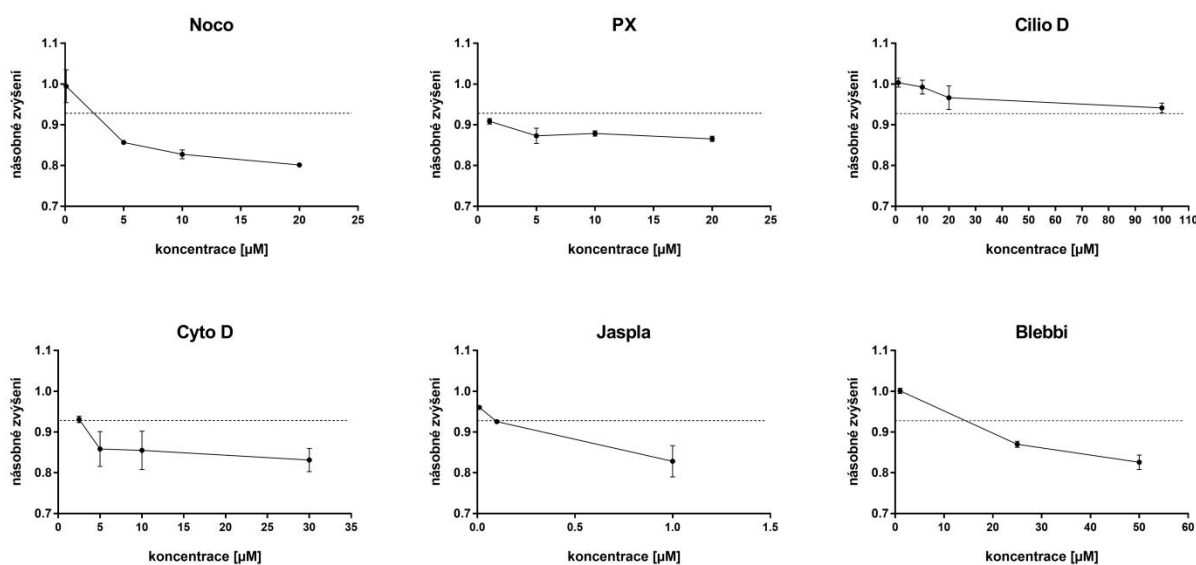


Obr. 4.1: Dynamika replikace VKE kmene Neudoerfl v lidské neuroblastové linii SK-N-SH (A) a klíččící linii IRE/CTVM 19 (B). Data reprezentují průměr \pm SEM ze tří nezávislých experimentů, v triplicáttech. Přerušovaná čára značí detekční limit.

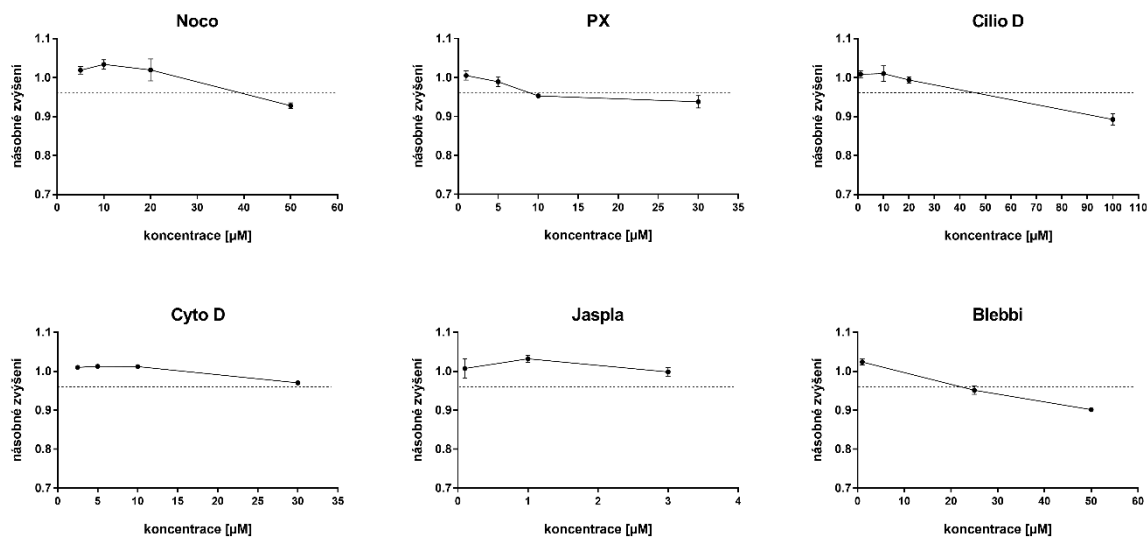
4.2. Testování cytotoxicity chemických inhibitorů

Po 24hodinové inkubaci buněk s roztoky chemických inhibitorů o různých koncentracích byla vyhodnocena viabilita buněk MTT testem. Viabilita byla stanovena relativně na základě porovnání s kontrolou představující 100 % viability, přičemž v potaz byl brán i potenciál námi testovaných látek inhibovat buněčné dělení.

Celkově nebyl zaznamenán pokles buněčné viability dramatický, a to ani po ošetření nejvyššími koncentracemi. Buněčná viabilita ani v jednom z případů nepoklesla pod 80 % v porovnání s negativní kontrolou, a v některých případech (ciliobrevin D u SK-N-SH, cytochalasin D a jasplakinolide u IRE 19) nepoklesla ani pod úroveň viability buněk před samotnou aplikací inhibitorů, čili před inhibicí buněčného dělení (Obr. 4.2, Obr. 4.3).



Obr. 4.2: Viabilita lidských neuroblastových buněk SK-N-SH po 24hodinové inkubaci s chemickými inhibitory. Přerušovaná čára značí hodnotu viability buněk bezprostředně před aplikací inhibitorů. Data reprezentují průměr \pm SEM z duplikátu měření.

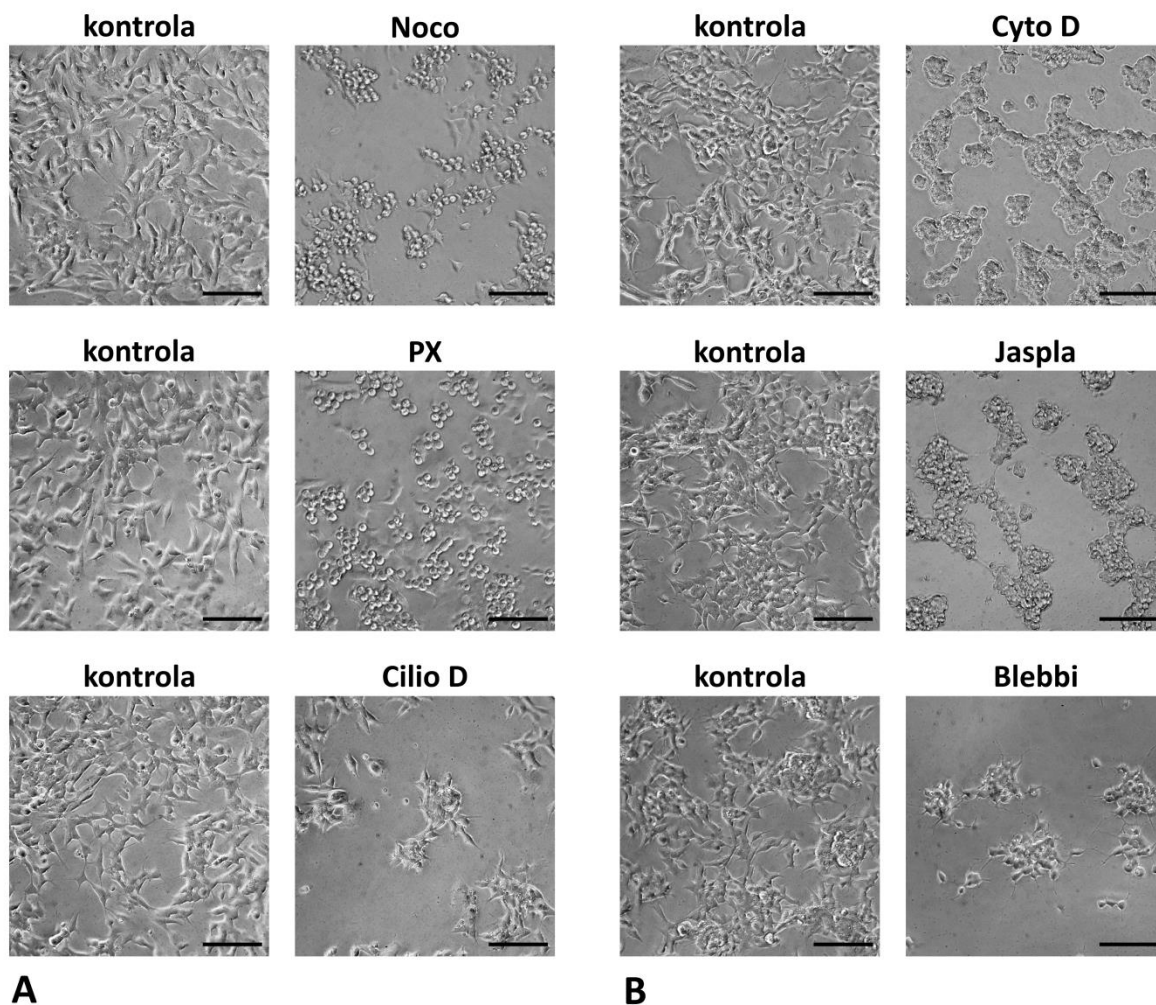


Obr. 4.3: Viabilita klíčících buněk IRE 19 po 24hodinové inkubaci s chemickými inhibitory. Přerušovaná čára značí hodnotu viability buněk bezprostředně před aplikací inhibitorů. Data reprezentují průměr \pm SEM z duplikátu měření.

Na základě výsledků MTT testu byly zvoleny koncentrace jednotlivých inhibitorů pro další experimenty. Vybrány byly takové koncentrace, při nichž nepoklesla hodnota buněčné viability pod 80 % v porovnání s negativní kontrolou, přičemž byl brán ohled na rozdílnou citlivost buněčných linií. Pro každý inhibitor byla zvolena vždy trojice koncentrací za účelem pozorovat, zda jsou případné změny v titru viru u ošetřených buněk závislé na vzrůstající koncentraci použitého inhibitoru. Přehled finálních zvolených koncentrací se nachází ve výše uvedené tabulce (Tab. II).

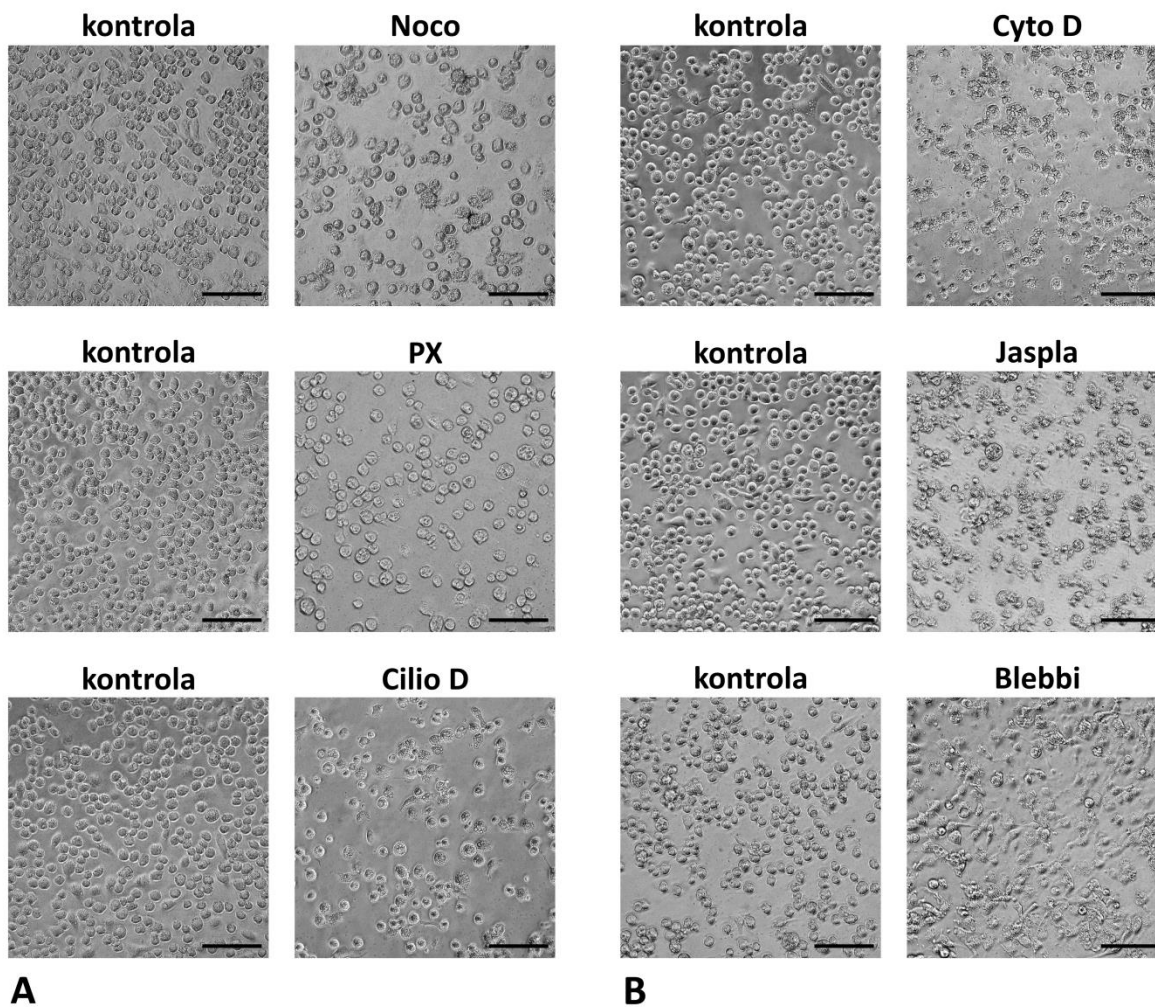
4.3. Efekt chemických inhibitorů na morfologii a dělení buněk

Neinfikované lidské neuroblastové buňky SK-N-SH vykazovaly po ošetření chemickými inhibitory v netoxických koncentracích výrazné morfologické změny naznačující účinné ovlivnění cytoskeletu (Obr. 4. 4). Ošetřené buňky se vyznačovaly ztrátou typického tvaru, redukcí až úplnou absencí výběžků a agregací, přičemž tyto změny byly ve všech případech dobře patrné již u druhé nejvyšší použité koncentrace.



Obr. 4.4: Efekt inhibitorů na neuroblastové buňky SK-N-SH. Kondice buněk 24 hodin po ošetření mikrotubulárními inhibitory Noco, PX a inhibitem dyneinu Cilio D v koncentracích 10, 1 a 100 μM (A) a mikrofilamentárními inhibitory Cyto D, Jaspla a inhibitem myosinu II Blebbi v koncentracích 2,5, 1 a 10 μM (B). Celkové zvětšení 200x, měřítko odpovídá 100 μm .

Klíštěcí buňky IRE 19 vykazovaly po ošetření výraznější morfologické změny zejména v případě mikrofilamentárních inhibitorů (Obr. 4.5 B), kdy byla u buněk pozorovatelná ztráta typického tvaru a vakuolizace. V případě použití mikrotubulárních inhibitorů nebyly změny v morfologii příliš patrné (Obr. 4.5 A), proto byla kondice buněk znovu zkontrolována po 72 hodinách od aplikace inhibitorů, kdy byl oproti kontrole pozorován menší počet buněk naznačující účinnou inhibici buněčného dělení.



Obr. 4.5: Efekt inhibitorů na klišťecí buňky IRE 19. Kondice buněk 72 hodin po ošetření mikrotubulárními inhibitory Noco, PX a inhibitoru dyneinu Cilio D v koncentracích 50, 30 a 100 μM (A) a mikrofilamentárními inhibitory Cyto D, Jaspla a inhibitem myosinu II Blebbi v koncentracích 30, 3 a 50 μM (B). Celkové zvětšení 200x, měřítko odpovídá 100 μm .

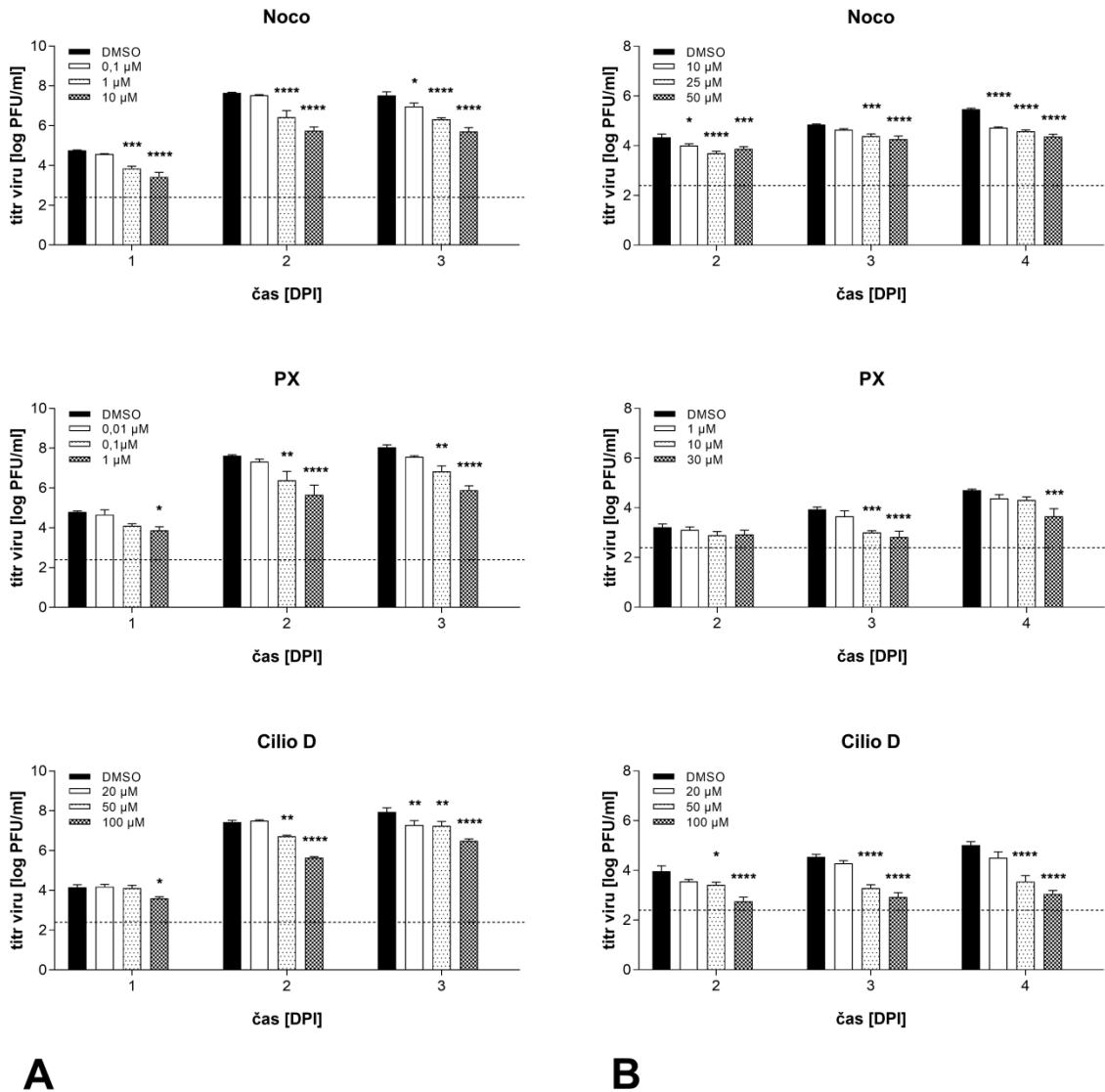
4.4. Inhibiční testy

Za účelem přiblížení role cytoskeletu v infekci VKE byly zvoleny inhibiční testy využívající látek depolymerizujících či stabilizujících mikrotubuly (Noco, PX) a mikrofilamenta (Cyto D, Jaspla). Dále byly aplikovány i látky specificky inhibující proteinové motory dynein a myosin II (Cilio D, Blebbi).

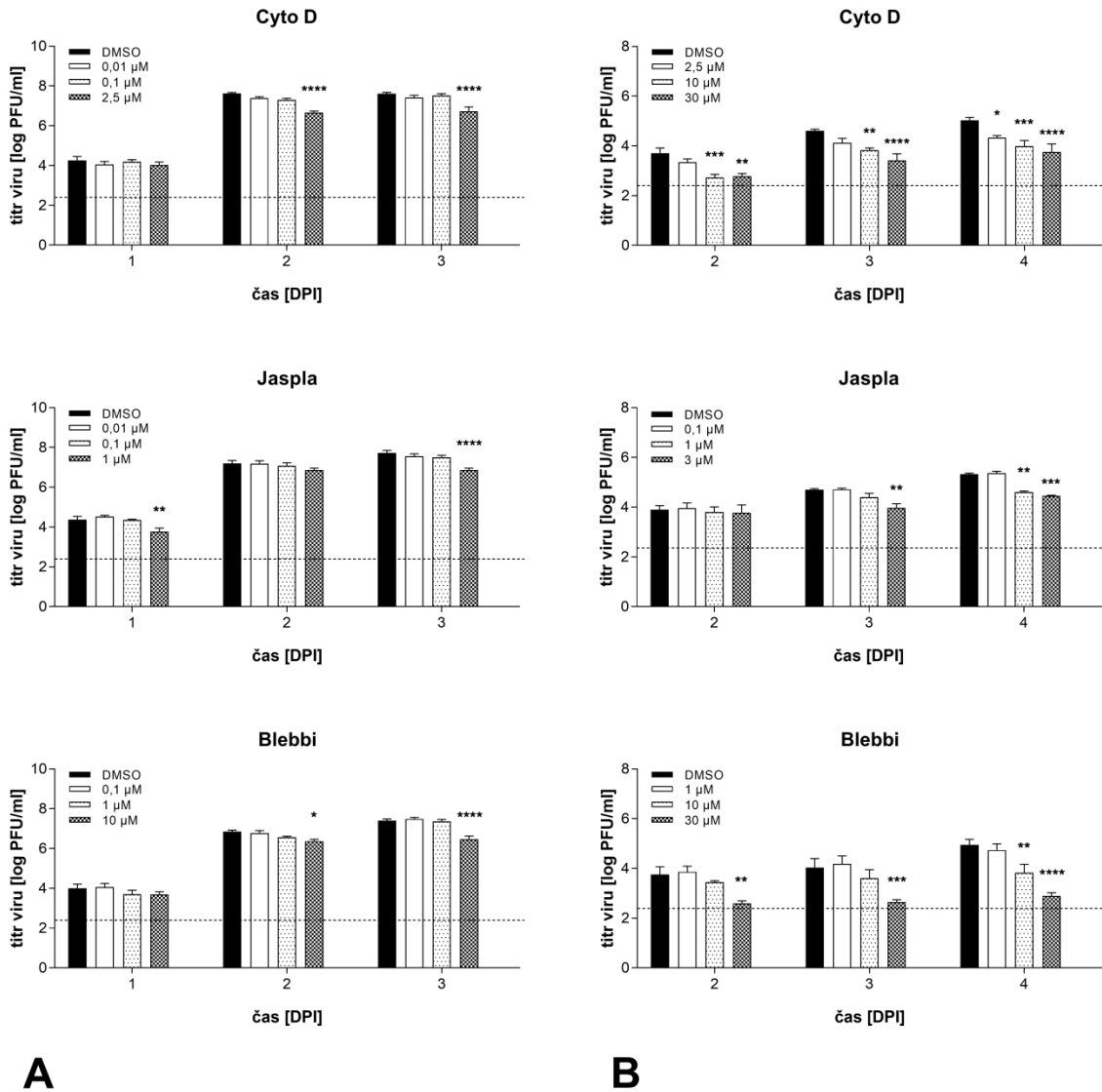
Obě buněčné linie byly nejprve ošetřeny vybranými koncentracemi jednotlivých inhibitorů, po uplynutí inkubační doby byly infikovány VKE a dále inkubovány v přítomnosti inhibitorů až do samotného odebrání supernatantu. Shrnutí použitých koncentrací a podmínek inkubace je uvedeno výše (Tab. II). Efekt inhibice cytoskeletálních struktur na replikaci VKE byl posléze vyhodnocen kvantifikací virových částic v supernatantu pomocí metody plakové titrace 1, 2 a 3 DPI u SK-N-SH a 2, 3 a 4 DPI u IRE 19.

Obecně lze říci, že inhibice mikrotubulů i mikrofilament vedla u obou buněčných linií ke statisticky signifikantnímu poklesu titru viru, přičemž míra poklesu vykazovala závislost na koncentraci použitých inhibitorů. Pro zjednodušení se následující popis výsledků vztahuje vždy k nejvyšším použitým koncentracím a těm výsledkům, které se ukázaly být statisticky průkazné.

Po inhibici mikrotubul a dyneinu u SK-N-SH byl 2. i 3. DPI zaznamenán pokles titru viru o přibližně dva řády. Depolymerizace mikrotubul za použití Noco přitom způsobila pokles viru o více než jeden řád již 1. DPI (Obr. 4.6 A). U IRE 19 byl rozdíl oproti kontrole méně výrazný než v případě neuroblastových buněk. K nejdramatičtějšimu poklesu došlo po inhibici dyneinu, kdy byl pozorován pokles titru viru až o dva řády (Obr. 4.6 B). V případě inhibice mikrofilament a myosinu II u SK-N-SH poklesl titr viru 3. DPI o přibližně jeden řád (Obr. 4.7 A). U IRE 19 vedla inhibice mikrofilament k poklesu titru viru 3. i 4. DPI o 1 řád, přičemž po depolymerizaci mikrotubul pomocí Cyto D byl pokles patrný již 2. DPI. Inhibice myosinu II vedla k poklesu titru viru o jeden řád 2. a 3. DPI, 4. DPI byl zaznamenán pokles až o 2 řády (Obr. 4.7 B).



Obr. 4.6: Efekt depolymerizace (Noco) a stabilizace (PX) mikrotubulů a inhibice proteinového motoru dyneinu (Cilio D) na produkci infekčního VKE u neuroblastových buněk SK-N-SH (A) a klišťecích buněk IRE 19 (B). Data jsou prezentována jako průměr ± SEM ze dvou nezávislých experimentů, v triplikátech. Přerušovaná čára značí limit detekce. Statisticky významné výsledky jsou označeny hvězdičkou: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$.

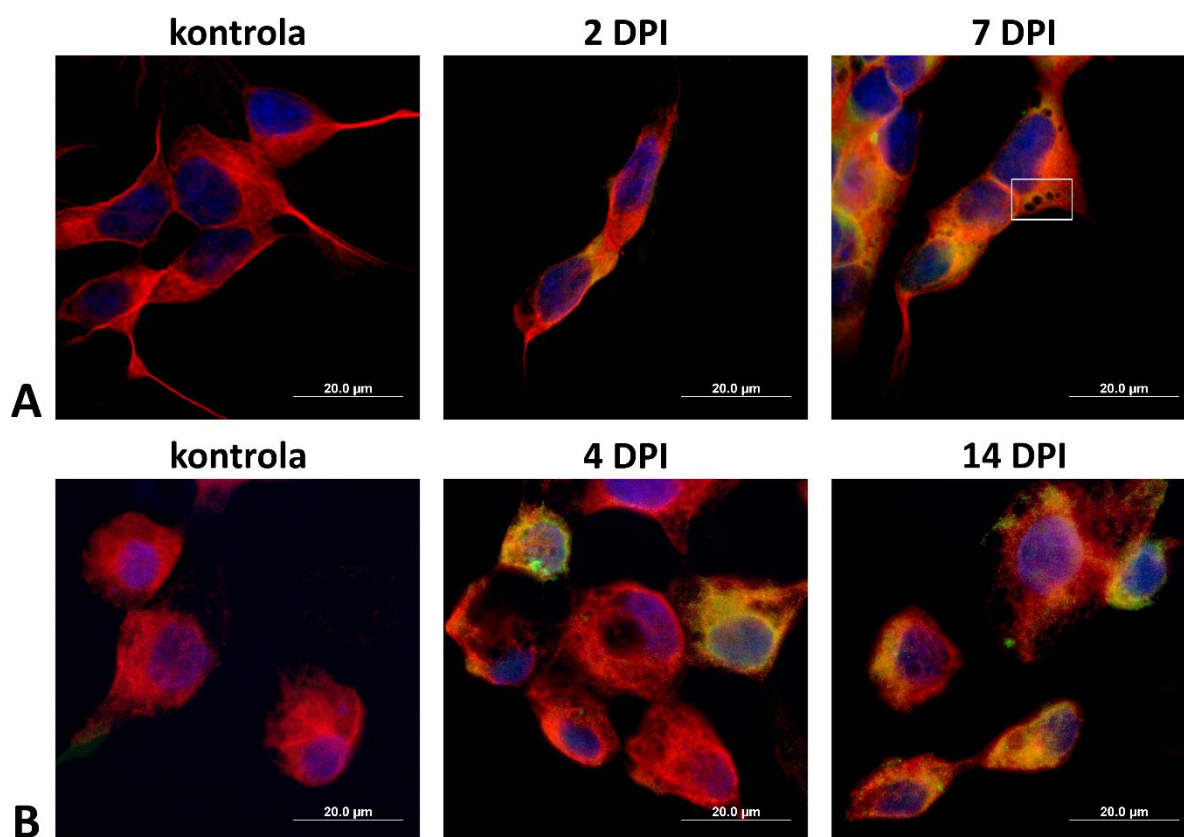


Obr. 4.7: Efekt depolymerizace (Cyto D) a stabilizace (Jaspla) mikrofilament a inhibice proteinového motoru myosinu II (Blebbi) na produkci infekčního VKE u neuroblastových buněk SK-N-SH (A) a klišťecích buněk IRE 19 (B). Data jsou prezentována jako průměr ± SEM ze dvou nezávislých experimentů, v triplicátech. Přerušovaná čára značí limit detekce. Statisticky významné výsledky jsou označeny hvězdičkou: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$.

4.5. Strukturální změny cytoskeletu v průběhu infekce VKE

Imunofluorescenční barvení infikovaných buněk (nešetřených inhibitory) neodhalilo ani u jedné z buněčných linií žádné viditelné změny ve struktuře mikrotubulární sítě, a to ani

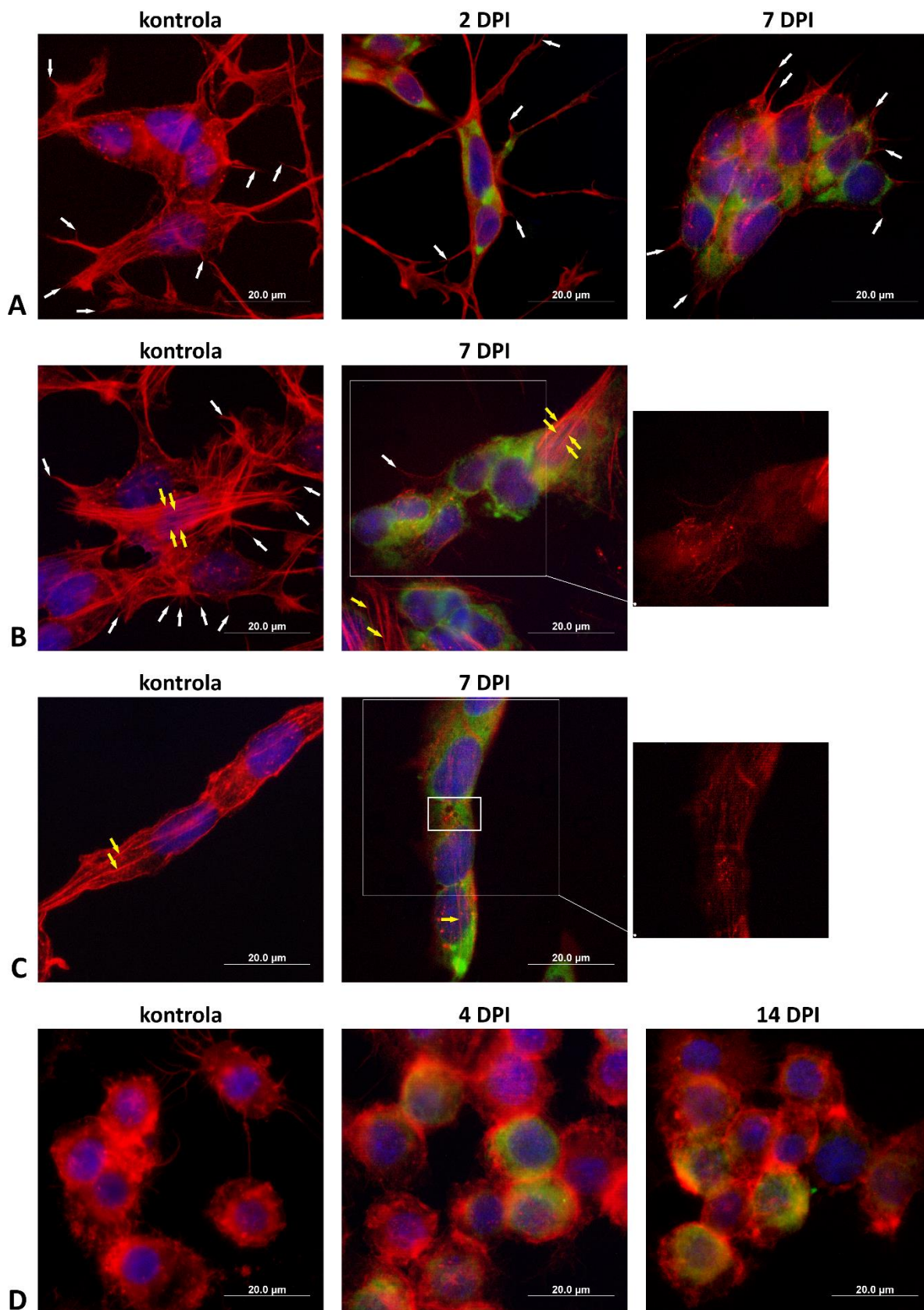
v pozdní fázi infekce. V rámci dalších morfologických změn byla u lidských neuroblastových buněk 7. DPI často pozorována nápadná vakuolizace v cytoplazmě a redukce neuritů (Obr. 4.8).



Obr. 4.8: Morfologie mikrotubulů v průběhu infekce VKE. Lidské neuroblastové buňky SK-N-SH byly zafixovány a obarveny v intervalech 2 a 7 DPI (A), klíštěcí buňky IRE 19 pak 4 a 14 DPI (B). Jako kontrola sloužily neinfikované buňky. Použity byly protilátky specifické pro flavivirový protein E (zelená) a β -tubulin (červená). Jádra vizualizována DAPI (modrá). Bílý rámeček označuje oblast cytoplazmy neuroblastové buňky s utvořenými vakuolami. Celkové zvětšení 1000x.

Ačkoliv byla při sledování struktury aktinového cytoskeletu klíštěcích buněk IRE 19 pozorována kolokalizace aktinu a virového proteinu E, aktinová síť nevykazovala žádné viditelné strukturní změny (Obr. 4.9 D). Obdobně jako v předchozím případě u mikrotubulů, byly některé morfologické změny pozorovány u SK-N-SH 7. DPI. Oproti kontrolním buňkám a buňkám zafixovaným 2 DPI byla pozorována nápadná redukce neuritů. U infikovaných buněk byly dlouhé a větvené neurity pozorovány spíše výjimečně, případné membránové protruze vykazovaly charakter filopodií (Obr. 4.9 A, B). Také zde byla často pozorována tvorba vakuol

v cytoplasmě infikovaných buněk (Obr. 4.9 C). Stresová vlákna se vyskytovala jak v případě infikovaných buněk, tak i v případě kontrol (Obr. 4.9 B, C).



Obr. 4.9: Morfologie mikrofilament v průběhu infekce VKE. Lidské neuroblastové buňky SK-N-SH byly zafixovány a obarveny v intervalech 2 (A) a 7 DPI (A, B, C), klíštěcí buňky IRE 19 4 a 14 dnů DPI (D). Jako kontrola sloužily neinfikované buňky. Použita byla protilátka specifická pro flavivirový protein E (zelená), pro vizualizaci aktinu pak phalloidin (červená). Jádra vizualizována DAPI (modrá). Malý bílý rámeček ohraničuje oblast cytoplazmy s utvořenými vakuolami, bílé šipky poukazují na filopodia, žluté šipky na stresová vlákna. Celkové zvětšení 1000x.

4.6. Změny exprese na úrovni mRNA po infekci VKE u genů kódujících složky cytoskeletu

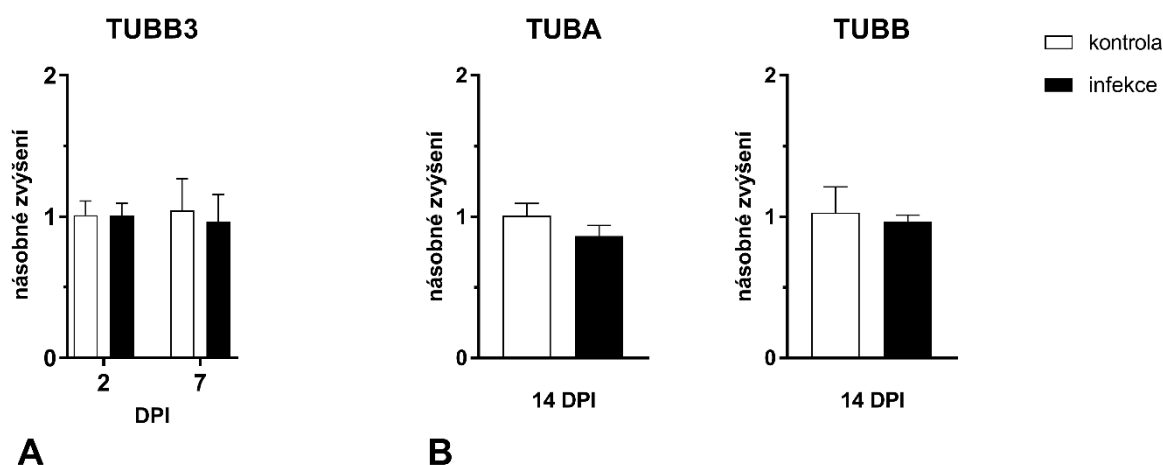
Změna exprese genů byla pozorována pro obě buněčné linie vždy ve dvou různých intervalech po infekci, a to 2 a 7 DPI pro SK-N-SH a 4 a 14 DPI pro IRE 19.

Sledování změn exprese genů na úrovni mRNA bylo zaměřeno na geny kódující základní komponenty cytoskeletu, čili tubulin a aktin. V případě neuroblastových buněk byl dodatečně přidán i vimentin jakožto zástupce proteinů intermediárních filament. Dále byla sledována exprese genů kódujících některé další proteiny s cytoskeletem asociované, jmenovitě tropomyosin, talin a spektrin.

U klíštěcích buněk byla reverzní transkripce pro interval 4 DPI provedena i přesto, že ve výchozích vzorcích byla naměřena velmi nízká koncentrace izolované RNA odpovídající malému množství sklizených buněk. Výsledky real-time PCR pak následně svědčily pro nízkou koncentraci specifického templátu ve vzorcích pro cílové i referenční geny, a to i v případě kontrolních neinfikovaných buněk. Z těchto důvodů byly nakonec výsledky pro interval 4 DPI z práce kompletně vyřazeny.

4.6.1. Tubulin

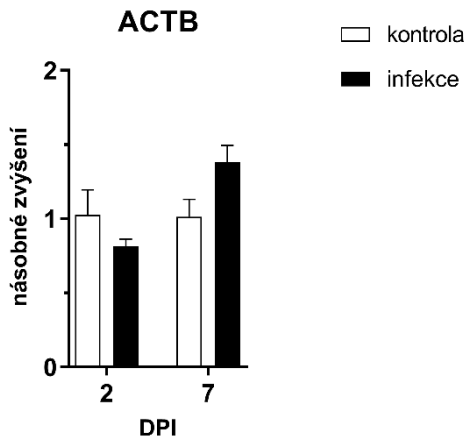
V případě exprese genu pro β -tubulin nebyla na úrovni mRNA u SK-N-SH zaznamenána žádná změna v průběhu infekce VKE, a to ani v pozdní fázi infekce 7 DPI (Obr. 4.10 A). V případě IRE 19 byly sledovány exprese genu pro obě podjednotky tubulinu, α - i β -tubulin, přičemž obdobně jako u SK-N-SH, ani zde nebyla v intervalu 14 DPI pozorována žádná změna (Obr. 4.10 B).



Obr. 4.10: Násobné zvýšení exprese genu pro tubulin na úrovni mRNA po infekci VKE. Genová exprese TUBB3 v intervalech 2 a 7 DPI u lidských neuroblastových buněk SK-N-SH (A) a exprese TUBA a TUBB 14. den DPI u klíččících buněk IRE 19 (B). Výsledky jsou v grafu prezentovány jako průměr \pm SEM z triplikátu vzorku.

4.6.2. Aktin

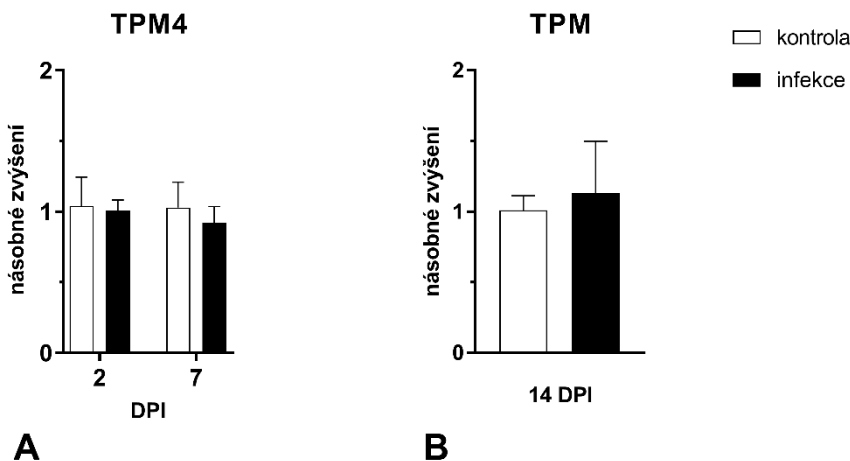
Při sledování změn exprese genu pro aktin na úrovni mRNA nebyla v průběhu infekce VKE u SK-N-SH nalezena žádná statisticky významná odlišnost ani u jednoho z intervalů (Obr. 4.11). Expresse genu pro aktin byla sledována i u IRE 19, výsledky však nakonec nebyly do práce zařazeny, neboť podle křivek tání během RT-PCR analýzy opakovaně nevznikal požadovaný specifický produkt, a to dokonce ani u vzorků pro interval 14 DPI (viz Příloha).



Obr. 4.11: Násobné zvýšení exprese genu pro aktin na úrovni mRNA po infekci VKE. Genová exprese ACTB v intervalech 2 a 7 DPI u lidských neuroblastových buněk SK-N-SH. Výsledky jsou v grafu prezentovány jako průměr ± SEM z triplikátu vzorku.

4.6.3. Tropomyosin

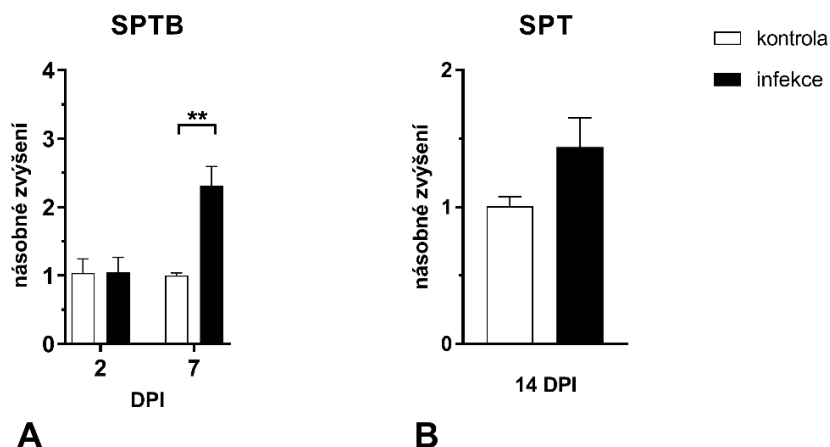
V případě exprese genu pro tropomyosin, protein asociovaný s mikrofilamenty, nebyla ani u jedné z buněčných linií zaznamenána žádná statisticky významná rozdílnost (Obr. 4.13).



Obr. 4.13: Násobné zvýšení exprese genu pro tropomyosin na úrovni mRNA po infekci VKE. Genová exprese TPM4 v intervalech 2 a 7 DPI u lidských neuroblastových buněk SK-N-SH (A) a exprese TPM 14. DPI u klíččících buněk IRE 19 (B). Výsledky jsou v grafu prezentovány jako průměr ± SEM z triplikátu vzorku.

4.6.4. Spektrin

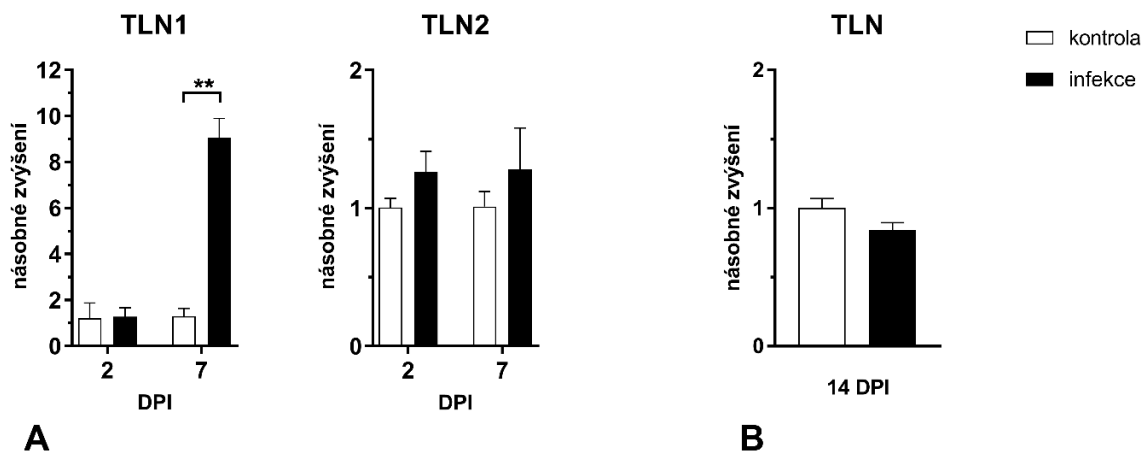
U SK-N-SH se rozdíly v expresi genu pro spektrin, protein asociovaný s aktinem, projeví 7. DPI, kdy došlo k významnému zvýšení exprese ($p < 0,01$; Obr. 4.16 A). Oproti tomu u linie IRE 19 nebyla 14. DPI zaznamenána žádná statisticky významná odlišnost (Obr. 4.15 B).



Obr. 4.15: Násobné zvýšení exprese genu pro spektrin na úrovni mRNA po infekci VKE. Genová exprese SPTB v intervalech 2 a 7 DPI u lidských neuroblastových buněk SK-N-SH (A) a exprese SPT 14. DPI u klišťecích buněk IRE 19 (B). Výsledky jsou v grafu prezentovány jako průměr \pm SEM z triplikátu vzorku. ** = $p < 0,01$.

4.6.5. Talin

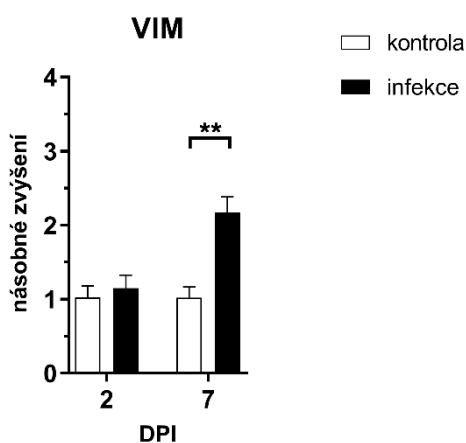
Při sledování změn exprese genu pro talin, protein vázající se k mikrofilamentům a s potenciálem vázat se také na integrin a podílet se tak na utváření a mechanické stabilizaci fokálních adhezí, bylo zaznamenáno výrazné zvýšení exprese genu pro talin 1 u SK-N-SH v intervalu 7 DPI ($p < 0,01$; Obr. 4.15 A). V případě exprese genu pro talin 2 nebyla pozorována žádná statisticky významná změna (Obr. 4.14 A) a podobně tomu tak bylo i v případě exprese TLN u IRE 19 (Obr. 4.14 B).



Obr. 4.14: Násobné zvýšení exprese genu pro talin na úrovni mRNA po infekci VKE. Genová exprese TLN1 a TLN2 v intervalech 2 a 7 DPI u lidských neuroblastových buněk SK-N-SH (A) a exprese TLN 14. DPI u klišťecích buněk IRE 19 (B). Výsledky jsou v grafu prezentovány jako průměr ± SEM z triplikátu vzorku. ** = $p < 0,01$.

4.6.6. Vimentin

Při sledování změn exprese genu pro vimentin, protein spadající do třídy III intermediárních filament, byla po infekci VKE u SK-N-SH zaznamenána jeho prokazatelně zvýšená exprese 7. DPI ($p < 0,01$; Obr. 4.12).



Obr. 4.12: Násobné zvýšení exprese genu pro vimentin na úrovni mRNA po infekci VKE. Genová exprese VIM v intervalech 2 a 7 DPI u lidských neuroblastových buněk SK-N-SH. Výsledky jsou v grafu prezentovány jako průměr ± SEM z triplikátu vzorku. ** = $p < 0,01$.

5. Diskuze

Jakožto obligátní intracelulární parazité, jejichž genom kóduje pouhých deset proteinů, jsou flaviviry pro své přežití odkázány na hostitelské buňky. Mají proto potenciál využívat nejrůznější hostitelské dráhy a faktory za účelem zajištění vlastní úspěšné replikace a využívají jich prakticky v každém bodě replikačního cyklu. Mezi virem a buňkou přitom dochází k nesčetnému množství interakcí (Bekerman a Einav, 2015). Navzdory dlouholetému výzkumu a neustále přibývajícím poznatkům zůstává stále nezodpovězena celá řada otázek týkajících se interakcí VKE s hostitelskými buňkami obratlovců. Ještě mnohem méně je pak známo o těchto interakcích a hostitelských proteinech zapojených do infekce u samotných klíšťat. Přitom bližší pochopení molekulárních interakcí VKE a hostitelských faktorů podílejících se na replikaci VKE by bylo vzhledem k velmi omezeným terapeutickým možnostem významným přínosem i z hlediska vývoje účinné antivirové léčby (Baharuddin *et al.*, 2014). V rámci těchto interakcí, a to i z hlediska vývoje antivirových, představují velmi zajímavý předmět studia interakce viru s cytoskeletem hostitelských buněk, o čemž svědčí i stále přibývajícím množství publikací na toto téma. V případě flavivirů jsou však studie věnující se této problematice zaměřené převážně na flaviviry přenášené komáry a interakce VKE s cytoskeletem hostitelských buněk tak zatím zůstává poměrně neprobádaným tématem (Zhang *et al.*, 2019). Cílem této práce tedy bylo přiblížit roli cytoskeletu v infekci VKE, a to nejenom v lidských neuroblastových buňkách, ale i v buňkách jeho přirozeného vektora, klíštěte *I. ricinus*.

VKE je přirozeně schopen infikovat a množit se v klíštěcích i savčích buňkách. I v našem případě se obě zvolené linie, klíštěcí linie IRE/CTVM 19 a lidská neuroblastová linie SK-N-SH, ukázaly být citlivé k infekci VKE, kmenem Neudoerfl. Jak již bylo pozorováno dříve (Růžek *et al.*, 2009), virus se v neuroblastových buňkách replikoval velmi efektivně, přičemž titr viru dosahoval hodnot až 10^8 PFU/ml. V případě klíštěcích buněk byl pak průběh virové replikace pozvolnější, stejně tak byla nižší i virová produkce, kdy se titr viru pohyboval o tři řády níže než v případě neuroblastových buněk. Obdobný rozdíl ve virové produkci mezi klíštěcími a savčími buňkami byl pozorován již dříve (Šenigl *et al.*, 2006).

Pro studium interakcí mezi virem a cytoskeletem hostitelských buněk se velmi často používají chemické látky, jež mají potenciál specificky inhibovat určité cytoskeletální struktury. Pro naše účely byly zvoleny inhibitory mikrotubul a mikrofilament a s nimi asociovaných

proteinových motorů, čili těch složek cytoskeletu, které se mimo jiné účastní endocytických drah a jsou aktivně zapojeny do intracelulárního transportu. Vzhledem k tomu, že cílové struktury byly v našem případě inhibovány po celou dobu experimentu, byla studována jejich role v replikačním cyklu VKE jako celku, nikoliv v rámci jeho jednotlivých kroků.

Mikrotubulární síť je významná z hlediska intracelulárního transportu. Obecně jsou mikrotubuly spojovány s transportem v rámci buňky na delší vzdálenosti a zdá se, že celá řada virů tohoto transportu využívá ve svůj prospěch. Po inhibici mikrotubulů i cytoplazmatického dyneinu bylo u obou buněčných linií zaznamenáno statisticky významné snížení titru viru, při použití nejvyšších koncentrací až o celé dva řády. Tento výsledek je přitom v souladu s výsledkem dřívější studie, v níž rozrušení mikrotubulů lidských neuroblastových buněk pomocí Noco vyústilo v obdobný pokles ve virové produkci VKE (Bílý *et al.*, 2015). Naše výsledky poukazují na důležitou roli funkční mikrotubulární sítě v replikačním cyklu VKE. Potenciální roli mikrotubul v transportu virových částic přitom podporuje zejména námi zaznamenaný negativní účinek inhibice dyneinu na produkci viru. Dynein je totiž proteinovým motorem, který zajišťuje transport nákladu k mínus-konci mikrotubulů, čili ve většině případů směrem k MTOC, které se nachází v blízkosti buněčného jádra a tedy i poblíž místa virové replikace.

Význam aktinové sítě v infekci je spojován nejčastěji s vazbou viru na povrch buňky a jeho internalizací, ačkoliv některé studie navrhují jeho zapojení i v dalších krocích replikačního cyklu (Henry Sum, 2015; Wang *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2016). Aktin a myosin II mimo jiné sehrávají klíčovou roli i v procesu klatrin-dependentní endocytózy a makropinocytózy, čili obou endocytických drah potenciálně využívaných VKE pro vstup do hostitelské buňky (Araki *et al.*, 2003; Chandrasekar *et al.*, 2014). Poměrně překvapující jsou proto výsledky inhibice mikrofilamentárních struktur u SK-N-SH, kde depolymerizace mikrofilament a inhibice myosinu II vedla k poklesu titru viru až 2. den p.i. o necelý jeden řád, a to pouze při použití nejvyšší koncentrace. Jedním z pravděpodobných vysvětlení je, že námi použité koncentrace Cyto D a Blebbi nebyly dostatečně vysoké k tomu, aby zajistily kompletní inhibici buněčných procesů spojených s cílovými strukturami (Shu *et al.*, 2004). Toto vysvětlení podporuje i fakt, že pokles titru viru nebyl při použití shodných koncentrací obou inhibitorů pozorován ani v případě IRE 19, nicméně u vyšších koncentrací došlo k signifikantnímu poklesu viru o jeden řád již 2. den p.i. Inhibiční testy pro SK-N-SH by bylo proto vhodné v budoucnu zopakovat s použitím vyšších koncentrací mikrofilamentárních inhibitorů. Tato možnost by přitom nebyla možná v případě Jaspla, u něhož jsme se již s nejvyšší použitou koncentrací 1 μ M pohybovali

na hranici tolerované cytotoxicity. Výsledky nicméně naznačují, že neporušená aktinová síť společně s funkčním myosinem II by mohla sehrávat při vstupu a replikaci VKE důležitou roli.

Velmi často bývají v průběhu flavivirové infekce pozorovány četné morfologické změny zahrnující také reorganizaci či rozrušení cytoskeletu hostitelských buněk (Cortese *et al.*, 2017; Gil *et al.*, 2007; Kanlaya *et al.*, 2009). V našem případě byly u SK-N-SH zaznamenány změny až v pozdní fázi infekce, konkrétně 7 dnů p.i. Kromě toho, že byla pozorována tvorba vakuol v cytoplazmě infikovaných buněk, značení aktinu phalloidinem odhalilo známky reorganizace aktinové sítě. Nejvýraznější změnou přitom byla nápadná redukce neuritů a membránových protruzí. Filopodia jsou tenké membránové výběžky bohaté na F-aktin. Jejich tvorba je prvním krokem k tvorbě neuritů, které dále diferencují v dendrity a axony, a umožňují tak tvorbu plně funkční nervové sítě. Přičteme-li k tomu roli aktinu v intracelulárním transportu nejrůznějšího nákladu včetně prekurzorů pro synaptické vezikuly a neurotransmiterů, aktin představuje stavební i funkční prvek nezbytný pro správnou nervovou funkci (Dent *et al.*, 2007; Ferrari *et al.*, 2012). Modulace aktinového skeletu nervových buněk vlivem infekce VKE by tak mohla být jednou z možných příčin neurologických dysfunkcí doprovázejících klinické formy klíšťové encefalitidy. Na rozdíl od mikrofilament, u mikrotubulů nebyly pozorovány žádné viditelné změny v jejich struktuře ani v pozdní fázi infekce. To je v rozporu s dřívějšími výsledky, kdy bylo u lidských neuroblastových buněk UKF-NB-4 zaznamenáno rozrušení a částečná degradace mikrotubulární sítě již 48 hodin p.i. (Růžek *et al.*, 2009). Tento rozdíl je však pravděpodobně dán použitím kmene Hypr, jenž je více neurovirulentní než námi zvolený kmen Neudoerfl (Mandl *et al.*, 1997). V téže studii však mimo jiné zaznamenali nejen kolokalizaci virového proteinu E s α -tubulinem, ale i přímou asociaci obalených virových částic s mikrotubuly neuroblastových buněk 48 hodin p.i., což naznačuje možnou úlohu mikrotubul v maturaci VKE. Obdobně i v našem případě byla pozorována výrazná kolokalizace signálu virového proteinu E s β -tubulinem 2 i 7 dnů p.i. Výsledky našeho pozorování se navíc shodují s výsledky studie, v níž byla u krysích astrocytů infikovaných VKE (kmen Ljubljana 1) pozorována významná reorganizace aktinové sítě 3 a 6 dnů p.i., zatímco struktura mikrotubul zůstala po celou dobu infekce nezměněna (Potokar *et al.*, 2014). Strukturní změny mikrotubulární sítě nebyly pozorovány kupříkladu ani u buněčné linie A549 48 hodin po infekci virem Zika (Hou *et al.*, 2017).

V porovnání s lidskými neuroblastovými buňkami, u IRE 19 nebyly ve struktuře cytoskeletu pozorovány žádné změny ani 14 dnů p.i. Kolokalizace signálu virového proteinu E s cytoskeletem však byla výrazná zvláště v případě β -tubulinu, a to v obou námi zvolených

intervalech, 4 a 14 dnů p.i. Vzhledem k tomu, že první známky maturačního procesu VKE byly v případě klišťecích buněk pozorovány právě 4 dny p.i. (Šenigl *et al.*, 2006), výsledky našeho pozorování, obdobně jako v případě SK-N-SH, naznačují, že mikrotubuly by mohly sehrávat důležitou roli v maturačním procesu VKE a že virus by mohl mikrotubulární síť využívat k transportu maturujících virových částic napříč cytoplazmou hostitelských buněk.

V průběhu virové infekce bývají často pozorovány změny v genové expresi, ať už na úrovni mRNA či proteinů. U SK-N-SH došlo u některých námi sledovaných genů ke změnám v expresi na úrovni mRNA až 7. den p.i. Statisticky významné zvýšení exprese bylo zaznamenáno u genů pro spektrin, talin a vimentin.

Spektrin je jedním z aktinových cross-linking proteinů, nezbytný pro udržení struktury a stability buněčných membrán. Interaguje s GA, ovlivňuje sekretorické dráhy a podílí se na transportu proteinů z ER do GA. V neuronech se společně s aktinem a dalšími proteiny utváří vysoce organizované struktury v axonech i dendritech (Han *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2013). V našem experimentu vzrostla exprese genu pro spektrin u infikovaných neuroblastových buněk 7. den p.i. na dvojnásobek. Up-regulace spektrinu a některých dalších cytoskeletálních proteinů včetně vimentinu a myosinu byla pozorována v pozdní fázi infekce (5 dnů p.i.) také u viru západonilské horečky, jejich role v infekci však nebyla blíže určena (Fraisier *et al.*, 2013).

Ačkoliv je tato práce primárně zaměřena na roli mikrotubul a mikrofilament v infekci VKE, byl v případě SK-N-SH mezi sledované geny zařazen i gen pro vimentin, zástupce intermediárních filament. Zatímco výsledky některých studií naznačují, že vimentin by mohl sehrávat důležitou roli v pozdních fázích flavivirové infekce, zejména v samotné replikaci a uvolnění flavivirových částic z buňky (Fraisier *et al.*, 2010; Kanlaya *et al.*, 2010), u buněk Huh7 over-exprimujících vimentin byla překvapivě zaznamenána snížená virová produkce a zvýšená proteozomální degradace virového proteinu C, což poukazuje na potenciální roli vimentinu jakožto hostitelského faktoru působícího proti infekci HCV (Nitahara-Kasahara a Fukasawa, 2008). V našem případě byla zaznamenána zvýšená exprese genu pro vimentin, jež vzrostla 7. den p.i. na dvojnásobek. Zda se však jedná o důsledek strategie samotného viru, či obrannou odpověď buňky na infekci nelze v tomto bodě říci. Výsledek však naznačuje, že i intermediární filamenta by mohla sehrávat důležitou roli v infekci VKE, kterou by bylo vhodné v budoucnu blíže objasnit.

Posledním genem, u něhož byla pozorována zvýšená exprese, by gen pro talin 1. Role tohoto proteinu v souvislosti s flavivirovou infekcí nebyla dosud zkoumána, ačkoliv talin představuje v tomto ohledu zajímavý hostitelský faktor. Talin je úzce asociován s aktinem a

společně s integriny a dalšími proteiny utváří fokální adheze, které zprostředkovávají kontakt mezi extracelulární matrix a cytoskeletem, a podílí se tak na signální transdukcii (BurrIDGE a Chrzanowska-Wodnicka, 1996). Integrin $\alpha v \beta 3$ je přitom jednou z molekul navrhovaných jako možný receptor pro vstup flavivirů do hostitelské buňky a virus by potenciálně mohl ve svůj prospěch využívat i signální dráhy, které jsou s integrinem spojené (Chu a Ng, 2004). Neméně zajímavé jsou také výsledky některých studií, v nichž ovlivňováním exprese talinu pomocí transientní exprese a siRNA získaly výsledky svědčící pro potenciál talinu 1 efektivně potlačovat virovou infekci (Brown *et al.* 2011, Klundert *et al.*, 2016). Za zvýšenou expresí talinu 1 by tak mohla stát, podobně jako v případě vimentinu, obranná odpověď buňky na infekci.

U IRE 19 byla kvůli nutnosti vyřazení vzorků pro interval 4 dny p.i. sledována genová exprese cílových genů nakonec pouze v pozdní fázi infekce, čili 14 dnů p.i. Na rozdíl od SK-N-SH, změny v genové expresi na úrovni mRNA nebyly zaznamenány ani u jednoho ze sledovaných genů.

Výsledky inhibiční testů ukazují, že prakticky všechny námi studované složky cytoskeletu hrají důležitou roli v replikačním cyklu viru, a to u lidské neuroblastové i klíštěcí buněčné linie. K utlumení virové produkce došlo nejen při narušení normální struktury a dynamiky mikrotubulů i mikrofilament, ale i při inhibici s nimi asociovaných proteinových motorů, cytoplazmatického dyneinu a myosinu II. Význam těchto struktur a proteinů v infekci VKE by však každopádně bylo vhodné dále objasnit, kupříkladu upřesnit jejich role v rámci jednotlivých kroků replikačního cyklu. Strukturální změny cytoskeletu v průběhu infekce byly pozorovány jen v případě mikrofilament, a to pouze u SK-N-SH v pozdní fázi infekce. Reorganizace aktinové sítě, výrazná redukce neuritů a tvorba vakuol v cytoplazmě přitom poukazují spíše na buněčné poškození způsobené progredující infekcí VKE. Alterace aktinové sítě by tak mohla být jednou z možných příčin neurologických příznaků u pacientů s klinickou formou KE. Tyto morfologické změny přitom pravděpodobně nejsou spojeny se změnami v expresi samotného aktinu, minimálně tedy ne na úrovni mRNA. Sledování změn exprese genů však u SK-N-SH odhalilo zvýšenou expresi tří dalších cytoskeletálních složek, jmenovitě spektrinu, talinu 1 a vimentinu. Role těchto proteinů ve flavivirové infekci nebyla doposud jednoznačně určena. K zodpovězení otázky, zda je zvýšená exprese těchto genů důsledkem strategie samotného VKE, či obrannou odpovědí buňky na infekci, bude zapotřebí dalších experimentů. Zároveň by bylo vhodné ověřit expresi námi sledovaných genů i na úrovni proteinu.

6. Závěr

- Význam zachování integrity a dynamiky cytoskeletu v infekci VKE byl studován s pomocí specifických inhibitorů cytoskeletálních struktur. Stabilizace i depolymerizace mikrotubul a mikrofilament negativně ovlivnila virovou produkci u obou sledovaných buněčných linií, SK-N-SH i IRE 19. Tyto výsledky naznačují, že VKE v průběhu svého replikačního cyklu využívá obou studovaných složek cytoskeletu.
- Inhibiční testy dále poukázali také na interakci VKE s proteinovými motory. Inhibice cytoplazmatického dyneinu asociovaného s mikrotubuly a myosinu II asociovaného s mikrofilamenty vedla k významné inhibici virové produkce u obou buněčných linií.
- Strukturální změny cytoskeletu byly pozorovány pouze u SK-N-SH v pozdní fázi infekce (7 dnů p.i.). Tyto změny se týkaly aktinové sítě a vyznačovaly se zejména nápadnou redukcí neuritů a membránových protruzí. U infikovaných buněk byla v této fázi infekce pozorována také vakuolizace v cytoplazmě.
- U SK-N-SH bylo 7. den p.i. zaznamenáno významné zvýšení exprese na úrovni mRNA tří genů asociovaných s cytoskeletem, konkrétně spektrinu, talinu a vimentinu. V případě genu pro aktin nebyly v expresi zaznamenány prokazatelné změny. Pozorované strukturální změny aktinové sítě tak pravděpodobně nebyly způsobeny změnou genové exprese aktinu na úrovni mRNA.
- V kontrastu s buněčnou linií SK-N-SH, u IRE 19 nebyly v pozdní fázi infekce u žádného ze sledovaných genů zaznamenány změny v genové expresi na úrovni mRNA.

7. Seznam zkratek

ACT	aktin
ACTB	β -aktin
BOFES	fetální bovinní sérum
C _T	z angl. <i>threshold cycle</i>
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
DENV2	virus dengue sérotyp 2
DMSO	dimethylsulfoxid
DPI	den/dny po infekci
ER	endoplazmatické retikulum
GA	Golgiho aparát
GTP	guanosintrifosfát
HCV	virus hepatitidy C
hnRNP	z angl. <i>heterogeneous nuclear ribonucleoproteins</i>
JEV	virus japonské encefalitidy
KE	klíšťová encefalitida
MOI	z angl. <i>multiplicity of infection</i>
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MTOCs	z angl. <i>microtubule-organizing centers</i>
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid
ORF	z angl. <i>open reading frame</i>
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok
PFU	z angl. <i>plaque forming unit</i>
p.i.	z angl. <i>post infection</i>
PTS	prekolostrální telecí sérum
RC	z angl. <i>replication complex</i>
RNA	ribonukleová kyselina
RNAi	z angl. <i>RNA interference</i>
RT-PCR	z angl. <i>real-time polymerase reaction</i>
SDS	dodecylsírán sodný
SEM	z angl. <i>standard error of the mean</i>

siRNA	z angl. <i>small interfering RNA</i>
SPTA	α -spektrin
SPTB	β -spektrin
TBP	tryptózo-fosfátový bujón
TLN	talin
TLN1	talin 1
TLN2	talin 2
totRNA	totální RNA
TPM	tropomyosin
TPM4	tropomyosin 4
TUBA	α -tubulin
TUBB	β -tubulin
TUBB3	β -tubulin III
ULFs	z angl. <i>unit-length filaments</i>
UTRs	z angl. <i>untranslated regions</i>
VIM	vimentin
VKE	virus klíšťové encefalidity

8. Použitá literatura

- Acosta EG, Castilla V, Damonte EB.** Alternative infectious entry pathways for dengue virus serotypes into mammalian cells. *Cellular Microbiology*. 2009, **11**(10), 1533-1549.
- Akil A, Peng J, Omrane M, Gondeau C, Desterke C, Marin M, Tronchère H, Taveneau C, Sar S, Briolotti P, Benjelloun S, Benjouad A, Maurel P, Thiers V, Bressanelli S, Samuel D, Bréchet C, Gassama-Diagne A.** Septin 9 induces lipid droplets growth by a phosphatidylinositol-5-phosphate and microtubule-dependent mechanism hijacked by HCV. *Nature Communications*. 2016, **7**.
- Allison SL, Stadler K, Mandl CW, Kunz C, Heinz FX.** Synthesis and secretion of recombinant tick-borne encephalitis virus protein E in soluble and particulate form. *Journal of Virology*. 1995, **69**(9), 5816-20.
- Araki N, Hatae T, Furukawa A, Swanson JA.** Phosphoinositide-3-kinase-independent contractile activities associated with Fcγ-receptor-mediated phagocytosis and macropinocytosis in macrophages. *Journal of Cell Science*. 2003, **116**, 247-257.
- Ayllón N, Villar M, Busby AT, Kocan KM, Blouin EF, Bonzón-Kulichenko E, Galindo RC, Mangold AJ, Alberdi P, Pérez de la Lastra JM, Vázquez J, de la Fuente J.** Anaplasma phagocytophilum Inhibits Apoptosis and Promotes Cytoskeleton Rearrangement for Infection of Tick Cells. *Infection and Immunity*. 2013, **81**(7), 2415-2425.
- Baharuddin A, Hassan AA, Sheng GC, Nasir SB, Othman S, Yusof R, Othman R, Rahman NA.** Current Approaches in Antiviral Drug Discovery Against the Flaviviridae Family. *Current Pharmaceutical Design*. 2014, **20**(21), 3428-3444.
- Bekerman E, Einav S.** Combating emerging viral threats. *Science*. 2015, **348**(6232), 282-283.
- Bílý T, Palus M, Eyer L, Elsterová J, Vancová M, Růžek D.** Electron Tomography Analysis of Tick-Borne Encephalitis Virus Infection in Human Neurons. *Scientific Reports*. 2015, **5**.
- Brown C, Morham SG, Walsh D, Naghavi MH.** Focal Adhesion Proteins Talin-1 and Vinculin Negatively Affect Paxillin Phosphorylation and Limit Retroviral Infection. *Journal of Molecular Biology*. 2011, **410**(5), 761-777.
- Burridge K, Chrzanowska-Wodnicka M.** Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 1996, **12**(1), 463-519.
- Burridge K, Wittchen ES.** The tension mounts: Stress fibers as force-generating mechanotransducers. *The Journal of Cell Biology*. 2013, **200**(1), 9-19.

Cabezas-Cruz A, Alberdi P, Valdes JJ, Villar M, de la Fuente J. Remodeling of tick cytoskeleton in response to infection with *Anaplasma phagocytophilum*. *Frontiers In Bioscience*. 2017, **1**(22), 1830-1844.

Cortese M, Goellner S, Acosta EG, Neufeldt CJ, Oleksiuk O, Lampe M, Haselmann U, Funaya C, Schieber N, Ronchi P, Schorb M, Pruunsild P, Schwab Y, Chatel-Chaix L, Ruggieri A, Bartenschlager R. Ultrastructural Characterization of Zika Virus Replication Factories. *Cell Reports*. 2017, **18**(9), 2113-2123.

Cramer LP, Siebert M, Mitchison TM. Identification of Novel Graded Polarity Actin Filament Bundles in Locomoting Heart Fibroblasts: Implications for the Generation of Motile Force. *The Journal of Cell Biology*. 1997, **136**(6), 1287–1305.

Cross, RA. Intracellular Transport. *Encyclopedia of Life Sciences*. 2005.

Das S, Laxminarayana SV, Chandra N, Ravi V, Desai Anita. Heat shock protein 70 on Neuro2a cells is a putative receptor for Japanese encephalitis virus. *Virology*. 2009, **385**(1), 47-57.

Davis CW, Nguyen H-Y, Hanna SL, Sanchez MD, Doms RW, Pierson TC. West Nile Virus Discriminates between DC-SIGN and DC-SIGNR for Cellular Attachment and Infection. *Journal of Virology*. 2006, **80**(3), 1290-1301.

De Madrid AT, Porterfield JS. A simple micro-culture method for the study of group B arboviruses. *Bulletin of the World Health Organization*. 1969, **40**(1), 113-121.

Dent EW, Kwiatkowski AV, Mebane LM, Philippar U, Barzik M, Rubinson DA, Gupton S, Van Veen JE, Furman C, Zhang J, Alberts AS, Mori S, Gertler FB. Filopodia are required for cortical neurite initiation. *Nature Cell Biology*. 2007, **9**(12), 1347-1359.

Döhner K, Nagel C-H, Sodeik B. Viral stop-and-go along microtubules: taking a ride with dynein and kinesins. *Trends in Microbiology*. 2005, **13**(7), 320-327.

Fang K, Dai W, Ren Y-H, Xu Y-C, Zhang S, Qian Y-B. Both Talin-1 and Talin-2 correlate with malignancy potential of the human hepatocellular carcinoma MHCC-97 L cell. *BMC Cancer*. 2016, **16**.

Fan W, Qian P, Wang D, Zhi X, Wei Y, Chen H, Li X. Integrin $\alpha\beta 3$ promotes infection by Japanese encephalitis virus. *Research in Veterinary Science*. 2017, **111**, 67-74.

Ferrari I, Crespi A, Scita G, Pietrini G. LIN7-IRSp53: A novel pathway for filopodia and neurite formation?. *Communicative & Integrative Biology*. 2012, **5**(6), 631-633.

Fletcher DA, Mullins RD. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*. 2010, **463**(7280), 485-492.

Fraisier C, Camoin L, Lim S, Bakli M, Belghazi M, Fourquet P, Granjeaud S, Osterhaus ADME, Koraka P, Martina B, Almeras L. Altered Protein Networks and Cellular Pathways in Severe West Nile Disease in Mice. *PLoS ONE*. 2013, **8**(7).

Gil PI, Albrieu-Llinás G, Mlewski EC, Monetti M, Fozzatti L, Cuffini C, Fernández Romero J, Kunda P, Paglini MG. Pixuna virus modifies host cell cytoskeleton to secure infection. *Scientific Reports*. 2017, **7**.

Glotzer, M. The 3Ms of central spindle assembly: microtubules, motors and MAPs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2009, **10**(1), 9-20.

Gritsun TS, Nuttall PA, Gould EA. Tick-Borne Flaviviruses. *Advances in Virus Research*. 2003, (61), 317-371.

Guo X, Sriram S, Tran JA, Hutcheon AEK, Zieske JD. Inhibition of Human Corneal Myofibroblast Formation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2018, **59**(8), 3511-3520.

Häbig K, Gellhaar S, Heim B, Djuric V, Giesert F, Wurst W, Walter C, Hentrich T, Riess O, Bonin M. LRRK2 guides the actin cytoskeleton at growth cones together with ARHGEF7 and Tropomyosin 4. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013, **1832**(12), 2352-2367.

Han B, Zhou R, Xia C, Zhuang X. Structural organization of the actin-spectrin-based membrane skeleton in dendrites and soma of neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017, **114**(32), E6678-E6685.

Hao C, Zhu P-X, Yang X, Han Z-P, Jiang J-H, Zong C, Zhang X-G, Liu W-T, Zhao Q-D, Fan T-T, Zhang L, Wei L-X. Overexpression of SIRT1 promotes metastasis through epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*. 2014, **14**.

Hase T, Summers PL, Eekels KH, Baze WB. Maturation process of Japanese encephalitis virus in cultured mosquito cells in vitro and mouse brain cells in vivo. *Archives of Virology*. 1987, **96**, 135-151.

Henry Sum, MS. The Involvement of Microtubules and Actin during the Infection of Japanese Encephalitis Virus in Neuroblastoma Cell Line, IMR32. *BioMed Research International*. 2015, **2015**, 1-8.

Hermann A, Liebau S, Gastl R, Fickert S, Habisch H-J, Fiedler J, Schwarz J, Brenner R, Storch A. Comparative analysis of neuroectodermal differentiation capacity of human bone marrow stromal cells using various conversion protocols. *Journal of Neuroscience Research*. 2006, **83**(8), 1502-1514.

Herrmann H, Strelkov SV, Burkhard P, Aebi U. Intermediate filaments: primary determinants of cell architecture and plasticity. *Journal of Clinical Investigation*. 2009, **119**(7), 1772-1783.

Hou S, Kumar A, Xu Z, Airo AM, Stryapunina I, Wong CP, Branton W, Tchesnokov E, Götte M, Power C, Hobman TC. Zika Virus Hijacks Stress Granule Proteins and Modulates the Host Stress Response. *Journal of Virology*. 2017, **91**(16), e00474-17.

Chandrasekar I, Goeckeler ZM, Turney SG, Wang P, Wysolmerski RB, Adelstein RS, Bridgman PC. Nonmuscle Myosin II Is a Critical Regulator of Clathrin-Mediated Endocytosis. *Traffic*. 2014, **15**(4), 418-432.

Chen W, Gao N, Wang JL, Tian YP, Chen ZT, An J. Vimentin is required for dengue virus serotype 2 infection but microtubules are not necessary for this process. *Archives of Virology*. 2008, **153**(9), 1777-1781.

Chugh P, Paluch EK. The actin cortex at a glance. *Journal of Cell Science*. 2018, **131**(14).

Chu JJ, Ng M-L. Interaction of West Nile Virus with $\alpha\beta 3$ Integrin Mediates Virus Entry into Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2004, **279**(52), 54533-54541.

Joo E, Surka MC, Trimble WS. Mammalian SEPT2 Is Required for Scaffolding Nonmuscle Myosin II and Its Kinases. *Developmental Cell*. 2007, **13**(5), 677-690.

Kanlaya R, Pattanakitsakul S, Sinchaikul S, Chen S-T, Thongboonkerd V. Alterations in Actin Cytoskeletal Assembly and Junctional Protein Complexes in Human Endothelial Cells Induced by Dengue Virus Infection and Mimicry of Leukocyte Transendothelial Migration. *Journal of Proteome Research*. 2009, **8**(5), 2551-2562.

Kim CS, Seol SK, Song O-K, Park JH, Jang SK. An RNA-Binding Protein, hnRNP A1, and a Scaffold Protein, Septin 6, Facilitate Hepatitis C Virus Replication. *Journal of Virology*. 2007, **81**(8), 3852-3865.

Kirmse R, Portet S, Mücke N, Aebi U, Herrmann H, Langowski J. A Quantitative Kinetic Model for the in Vitro Assembly of Intermediate Filaments from Tetrameric Vimentin. *Journal of Biological Chemistry*. 2007, **282**(25), 18563-18572.

Klema V, Padmanabhan R, Choi K. Flaviviral Replication Complex: Coordination between RNA Synthesis and 5'-RNA Capping. *Viruses*. 2015, **7**(8), 4640-4656.

Koči J, Šimo L, Park Y. Validation of Internal Reference Genes for Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction Studies in the Tick, *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*. 2013, **50**(1), 79-84.

- Kopecký J, Grubhoffer L, Kovář V, Jindrák L, Vokurková D.** A Putative Host Cell Receptor for Tick-Borne Encephalitis Virus Identified by Anti-Idiotypic Antibodies and Virus Affinoblotting. *Intervirology*. 1999, **42**(1), 9-16.
- Laliberte JP, Moss B.** Appraising the apoptotic mimicry model and the role of phospholipids for poxvirus entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009, **106**(41), 17517-17521.
- Lindenbach BD, Thiel H-J, Rice CM, Knipe DM, H.** Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. *Fields Virology, 5th Edition*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 2007, 1101-1152.
- Lowery J, Kuczmarski ER, Herrmann H, Goldman RD.** Intermediate Filaments Play a Pivotal Role in Regulating Cell Architecture and Function. *Journal of Biological Chemistry*. 2015, **290**(28), 17145-17153.
- Lukic Z, Dharan A, Fricke T, Diaz-Griffero F, Campbell EM.** HIV-1 Uncoating Is Facilitated by Dynein and Kinesin 1. *Journal of Virology*. 2014, **88**(23), 13613-13625.
- Maldov DG, Karganova GG, Timofeev AV.** Tick-borne encephalitis virus interaction with the target cells. *Archives of Virology*. **127**(1-4), 321–325.
- Mandl CW, Ecker M, Holzmann H, Kunz C, Heinz FX.** Infectious cDNA clones of tick-borne encephalitis virus European subtype prototypic strain Neudoerfl and high virulence strain Hypr. *Journal of General Virology*. 1997, **78**, 1049–1057.
- Mandl CW, Heinz FX, Kunz C.** Sequence of the structural proteins of tick-borne encephalitis virus (western subtype) and comparative analysis with other flaviviruses. *Virology*. 1988, **166**(1), 197-205.
- Mandl CW, Kroschewski H, Allison SL, Kofler R, Holzmann H, Meixner T, Heinz FX.** Adaptation of Tick-Borne Encephalitis Virus to BHK-21 Cells Results in the Formation of Multiple Heparan Sulfate Binding Sites in the Envelope Protein and Attenuation In Vivo. *Journal of Virology*. 2001, **75**(12), 5627–5637.
- Matsudaira, P.** Actin crosslinking proteins at the leading edge. *Seminars in Cell Biology*. 1994, **5**(3), 165-174.
- Mostowy S, Cossart P.** Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2012, **13**, 183-194.
- Muroyama A, Lechler T.** Microtubule organization, dynamics and functions in differentiated cells. *Development*. 2017, **144**(17), 3012-3021.

- Neelakanta G, Li X, Pal U, Liu X, Beck DS, DePonte K, Fish D, Kantor FS, Fikrig E.** Outer Surface Protein B Is Critical for *Borrelia burgdorferi* Adherence and Survival within Ixodes Ticks. *PLoS Pathogens*. 2007, **3**(3).
- Nitahara-Kasahara Y, Fukasawa M, Shinkai-Ouchi F, Sato S, Suzuki T, Murakami K, Wakita T, Hanada K, Miyamura T.** Cellular vimentin content regulates the protein level of hepatitis C virus core protein and the hepatitis C virus production in cultured cells. *Virology*. 2009, **383**(2), 319-327.
- Offerdahl DK, Dorward DW, Hansen BT, Bloom ME, Ganta R.** A Three-Dimensional Comparison of Tick-Borne Flavivirus Infection in Mammalian and Tick Cell Lines. *PLoS ONE*. 2012, **7**(10), e47912.
- Petry S, Vale RD.** Microtubule nucleation at the centrosome and beyond. *Nature Cell Biology*. 2015, **17**(9), 1089-1093.
- Pollard, TD.** Actin and Actin-Binding Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2016, **8**(8).
- Potokar M, Korva M, Jorgačevski J, Avšič-Županc T, Zorec R.** Tick-Borne Encephalitis Virus Infects Rat Astrocytes but Does Not Affect Their Viability. *PLoS ONE*. 2014, **9**(1), e86219.
- Protopopova EV, Sorokin AV, Konovalova SN, Kachko AV, Netesov SV, Loktev VB.** Human Laminin Binding Protein as a Cell Receptor for the Tick-borne Encephalitis Virus. *Zentralblatt für Bakteriologie*. 1999, **289**(5-7), 632-638.
- Pulkkinen LIA, Butcher SJ, Anastasina M.** Tick-Borne Encephalitis Virus: A Structural View. *Viruses*. 2018, **10**(7).
- Růžek D, Vancová M, Tesařová M, Ahantarig A, Kopecký J, Grubhoffer L.** Morphological changes in human neural cells following tick-borne encephalitis virus infection. *Journal of General Virology*. 2009, **90**(7), 1649-1658.
- Shu S, Liu X, Korn ED.** Blebbistatin and blebbistatin-inactivated myosin II inhibit myosin II-independent processes in *Dictyostelium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005, **102**(5), 1472-1477.
- Schmittgen TD, Livak KJ.** Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature Protocols*. 2008, **3**(6), 1101-1108.
- Simmonds P, Becher P, Bukh J, Gould EA, Meyers G, Monath T, Muerhoff S, Pletnev A, Rico-Hesse R, Smith DB, Stapleton JT.** ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. *Journal of General Virology*. 2017, **98**, 2-3.

Surka MC, Tsang CW, Trimble WS. The Mammalian Septin MSF Localizes with Microtubules and Is Required for Completion of Cytokinesis. *Molecular Biology of the Cell*. 2002, **13**(10), 3532-3545.

Süss, J. Tick-borne encephalitis 2010: Epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia—An overview. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 2011, **2**(1), 2-15.

Sweeney HL, Holzbaur ELF. Motor Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2018, **10**(5).

Šenigl F, Grubhoffer L, Kopecký J. Differences in Maturation of Tick-Borne Encephalitis Virus in Mammalian and Tick Cell Line. *Intervirology*. 2006, **49**, 239-248.

Taylor-Harris PM, Felkin LE, Birks EJ, Franklin RC, Yacoub MH, Baines AJ, Barton PJ, Pinder JC. Expression of human membrane skeleton protein genes for protein 4.1 and betaIIISigma2-spectrin assayed by real-time RT-PCR. *Cellular & Molecular Biology Letters*. 2005, **10**(1), 135-149.

Taylor MP, Koyuncu OO, Enquist LW. Subversion of the actin cytoskeleton during viral infection. *Nature Reviews Microbiology*. 2011, **9**, 427-439.

Teo CSH, Chu JJH. Cellular Vimentin Regulates Construction of Dengue Virus Replication Complexes through Interaction with NS4A Protein. *Journal of Virology*. 2014, **88**(4), 1897-1913.

Van de Klundert M, van den Biggelaar M, Kootstra N, Zaaijer H. Hepatitis B Virus Protein X Induces Degradation of Talin-1. *Viruses*. 2016, **8**(10).

Wang J-L, Zhang J-L, Chen W, Xu X-F, Gao N, Fan D-Y, An J. Roles of Small GTPase Rac1 in the Regulation of Actin Cytoskeleton during Dengue Virus Infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2010, **4**(8).

Weisheit S, Villar M, Tykalová H, Popara M, Loecherbach J, Watson M, Růžek D, Grubhoffer L, de la Fuente J, Fazakerley JK, Bell-Sakyi L. Ixodes scapularis and Ixodes ricinus tick cell lines respond to infection with tick-borne encephalitis virus: transcriptomic and proteomic analysis. *Parasites & Vectors*. 2015, **8**.

Wells AL, Lin AW, Chen L-Q, Safer D, Cain SM, Hasson T, Carragher BO, Milligan RA, Sweeney HL. Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards. *Nature*. 1999, **401**(6752), 505-508.

Xu Q, Cao M, Song H, Chen S, Qian X, Zhao P, Ren H, Tang H, Wang Y, Wei Y, Zhu Y, Qi Z. Caveolin-1-mediated Japanese encephalitis virus entry requires a two-step regulation of actin reorganization. *Future Microbiology*. 2016, **11**(10), 1227-1248.

Yu C, Achazi K, Möller L, Schulzke JD, Niedrig M, Bücker R. Tick-Borne Encephalitis Virus Replication, Intracellular Trafficking, and Pathogenicity in Human Intestinal Caco-2 Cell Monolayers. *PLoS ONE*. 2014, **9**(5).

Zaitsev BN, Benedetti F, Mikhaylov AG, Korneev DV, Sekatskii SK, Karakouz T, Belavin PA, Netesova NA, Protopopova EV, Konovalova SN, Dietler G, Loktev VB. Force-induced globule-coil transition in laminin binding protein and its role for viral-cell membrane fusion. *Journal of Molecular Recognition*. 2014, **27**(12), 727-738.

Zhang C, Wang Y, Jin G, Wu S, Cui J, Wang R-F. Selection of reference genes for gene expression studies in human bladder cancer using SYBR-Green quantitative polymerase chain reaction. *Oncology Letters*. 2017, **14**(5), 6001–6011.

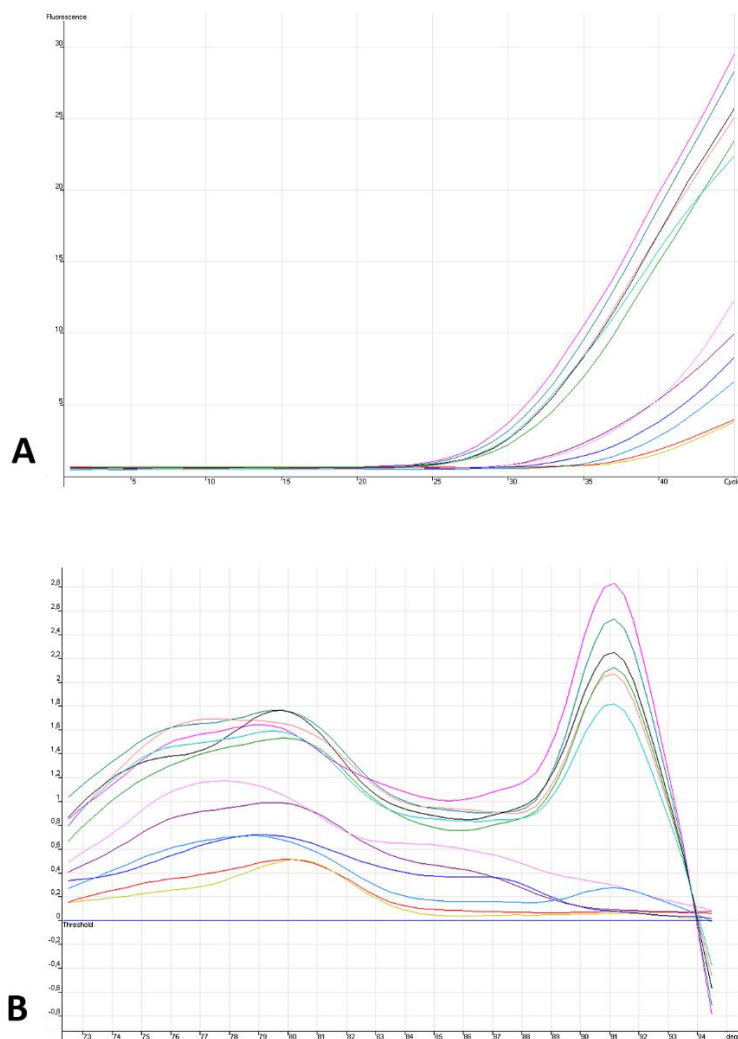
Zhang J, Wu N, Gao N, Yan W, Sheng Z, Fan D, An J. Small G Rac1 is involved in replication cycle of dengue serotype 2 virus in EAhy926 cells via the regulation of actin cytoskeleton. *Science China Life Sciences*. 2016, **59**(5), 487-494.

Zhang R, Zhang CY, Zhao Q, Li DH. Spectrin: Structure, function and disease. *Science China Life Sciences*. 2013, **56**(12), 1076-1085.

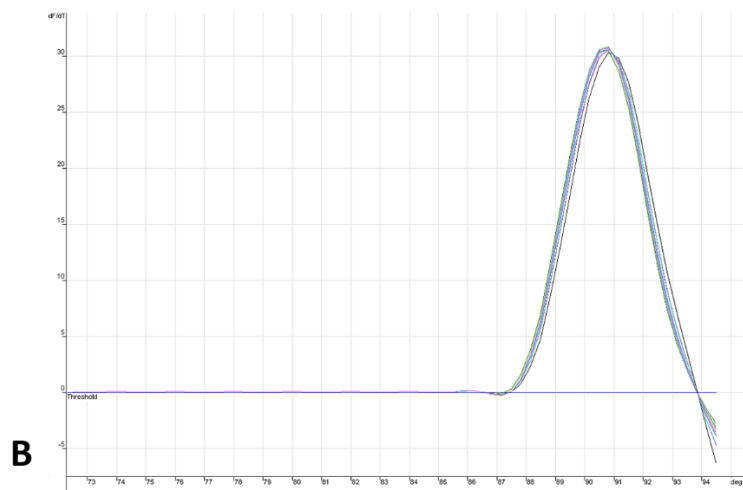
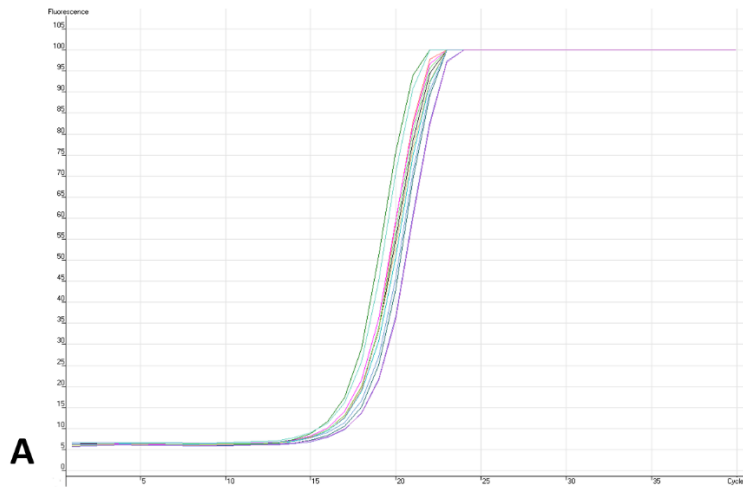
Zhang Y, Gao W, Li J, Wu W, Jiu Y. The Role of Host Cytoskeleton in Flavivirus Infection. *Virologica Sinica*. 2019, **34**(1), 30-41.

9. Příloha

Z přiloženého příkladu průběhu kvantitativní RT-PCR pro aktin u klišťecích buněk IRE 19 (Obr. 9.1 A) je patrná nízká koncentrace cDNA ve vzorcích. Zároveň lze také vidět rozdíl v množství cDNA mezi jednotlivými vzorky v rámci téhož genu, kdy C_T hodnoty pro interval 4 DPI jsou znatelně vyšší. Tento problém se se vzorky pro interval 4 DPI opakoval u všech sledovaných genů, proto byly příslušné výsledky z práce vyřazeny. V případě aktinu se však navíc objevil i problém s nedostatečnou specifitou amplifikace, který odhalila analýza tání (Obr. 9.1 B), a tak byly nakonec výsledky pro aktin u IRE 19 z práce kompletně vyřazeny. Pro srovnání jsou níže uvedeny také grafy z průběhu kvantitativní RT-PCR a analýzy tání pro gen aktinu u SK-N-SH, které byly shledány vyhovujícími (Obr. 9.2).



Obr. 9.1: Grafy znázorňující průběh kvantitativní RT-PCR (A) a výsledky analýzy tání (B) pro aktin u buněčné linie IRE 19.



Obr. 9.2: Grafy znázorňující průběh kvantitativní RT-PCR (A) a výsledky analýzy tání (B) pro aktin u buněčné linie SK-N-SH.