

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Interakce *Borrelia burgdorferi* s. s. a *Borrelia afzelii*  
s buněčnými liniemi klíšťat *Ixodes ricinus* a  
*Ixodes scapularis***

Bakalářská práce

**Karolína Dostálová**

Školitel: Ryan O. M. Rego, PhD.

České Budějovice 2017

Bakalářská diplomová práce

Dostálová, K., 2017: Interakce *Borrelia burgdorferi* s. s. a *Borrelia afzelii* s buněčnými liniemi klíšťat *Ixodes ricinus* a *Ixodes scapularis* [Interaction of *Borrelia burgdorferi* s. s. and *Borrelia afzelii* with tick cell lines of *Ixodes ricinus* and *Ixodes scapularis*] Bc. Thesis, in Czech, 36p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

*Borrelia burgdorferi* sensu lato is a complex of pathogenic spirochetes causing a serious, multi-organ infection, Lyme disease. Lyme disease is mainly transmitted to humans by infected ticks of the genus *Ixodes*. Currently, there are more than 20 *Borrelia* species known. *Borrelia* is an extracellular pathogen and expresses a high number of immunogenic outer membrane proteins necessary for infection and maintenance within the tick and the host. The thesis deals with methods used for investigating the interaction of *Borrelia* with tick cell lines.

Prohlašuji, že svoji 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 jejich 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 19. 4. 2017

.....

Karolína Dostálová

#### Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli – Ryan O. M. Rego, Ph.D. za jeho pomoc, trpělivost a odborné vedení v průběhu celé mé bakalářské práce. Dále děkuji vedoucímu laboratoře Molekulární biologie vektorů a patogenů Prof. RNDr. Liborovi Grubhofferovi, CSc. za umožnění pracovat v této laboratoři a také všem členům laboratoře za nastolení příjemné atmosféry. Dále děkuji Mgr. Zuzaně Vavruškové a Mgr. Martinovi Strnadovi za ochotu, trpělivost a pomoc při řešení problémů. Ráda bych také poděkovala Dr. Lesley Bell-Sakyi (The Pirbright Institute, UK) za poskytnutí klíčících buněčných linií, Evě Výletové za přípravu médií pro tyto buněčné linie a Dmitry Loginov, Ph.D. za vyhodnocení vzorků.

## OBSAH

1. ÚVOD .....	2
1. 1. Lymeská nemoc .....	2
1. 2. Klíšťata .....	2
1. 3. Borrelie .....	4
1. 3. 1. Životní cyklus borrelií.....	5
1. 4. Klíštěcí buněčné linie .....	6
1. 5. Shrnutí souvisejících výzkumů.....	7
2. CÍLE PRÁCE .....	10
3. METODY .....	11
3. 1. Kultivace borrelií .....	11
3. 2. Příprava tekutého média BSK II pro kultivaci borrelií .....	11
3. 3. Pasážování klíštěcích buněčných linií.....	12
3. 4. Příprava vzorků s borreliemi .....	12
3. 5. Počítání borrelií v Petroff-Hausserově komůrce.....	13
3. 6. Příprava lyzátu z buněčné kultury.....	13
3. 7. SDS-PAGE.....	13
3. 7. 1. Příprava gelu pro SDS-PAGE .....	14
3. 7. 2. Průběh elektroforézy.....	15
3. 7. 3. Barvení gelu pomocí Coomassie Brilliant Blue.....	15
3. 8. MS analýza .....	15
4. VÝSLEDKY .....	16
4. 1. Výsledky série 1 .....	16
4. 2. Výsledky série 2 .....	17
4. 3. Výsledky série 3.....	20
4. 4. Výsledky série 4 .....	21
4. 5. Klíštěcí buněčné linie .....	23
5. DISKUZE .....	24
6. ZÁVĚR .....	27
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	28

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

APS – Ammonium persulfate (peroxodisíran amonný)

B31 – kmen *Borrelia burgdorferi*

BOFES – Bovine Fetal Serum (bovinní = hovězí fetální sérum)

BSA – Bovine Serum Albumin (bovinní sérový albumin)

BSK II médium – modifikace BSK média

BSK médium – Barbour-Stoenner-Kelly médium

BSK-H médium – modifikace BSK média

CB43 – kmen *Borrelia afzelii*

CMRL – Connaught Medical Research Laboratories

cp – cirkulární plazmid

HEPES – N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethan sulfonová kyselina

HN pufr – pufr skládající se z HEPES a NaCl

Ig G – imunoglobulin G

IRE19 – buněčná linie z klíštěte *Ixodes ricinus*

ISE18 – buněčná linie z klíštěte *Ixodes scapularis*

kbp – kilobase pair, 1000 párů bází (jednotka velikosti genomu)

KCl – chlorid draselný

kDa – kilodalton (jednotka velikosti proteinu)

L15 – Leibovitz's médium

lp – lineární plazmid

LT – laboratorní teplota

MS – Mass spectrometry (hmotnostní spektrometrie)

NaCl – chlorid sodný

Osp – outer surface protein (vnější povrchový protein)

PIPES - piperazine-N,N-bis-2-ethansulfonová kyselina

rpm – revolutions per minute (otáčky za minutu)

s. l. – sensu lato (v širším slova smyslu)

s. s. – sensu stricto (v přesném slova smyslu)

SDS – PAGE – Sodium dodecyl sulfate (dodecylsírán sodný) – polyacrylamide gel electrophoresis  
(polyakrylamidová gelová elektroforéza)

SFV - Semliki Forest virus

spp. – species (druhy)

TEMED – tetramethylethylenediamin

TPB – Tryptose phosphate broth (tryptózo-fosfátový bujón)

Tris-Base – tris(hydroxymethyl)aminomethan

# 1. ÚVOD

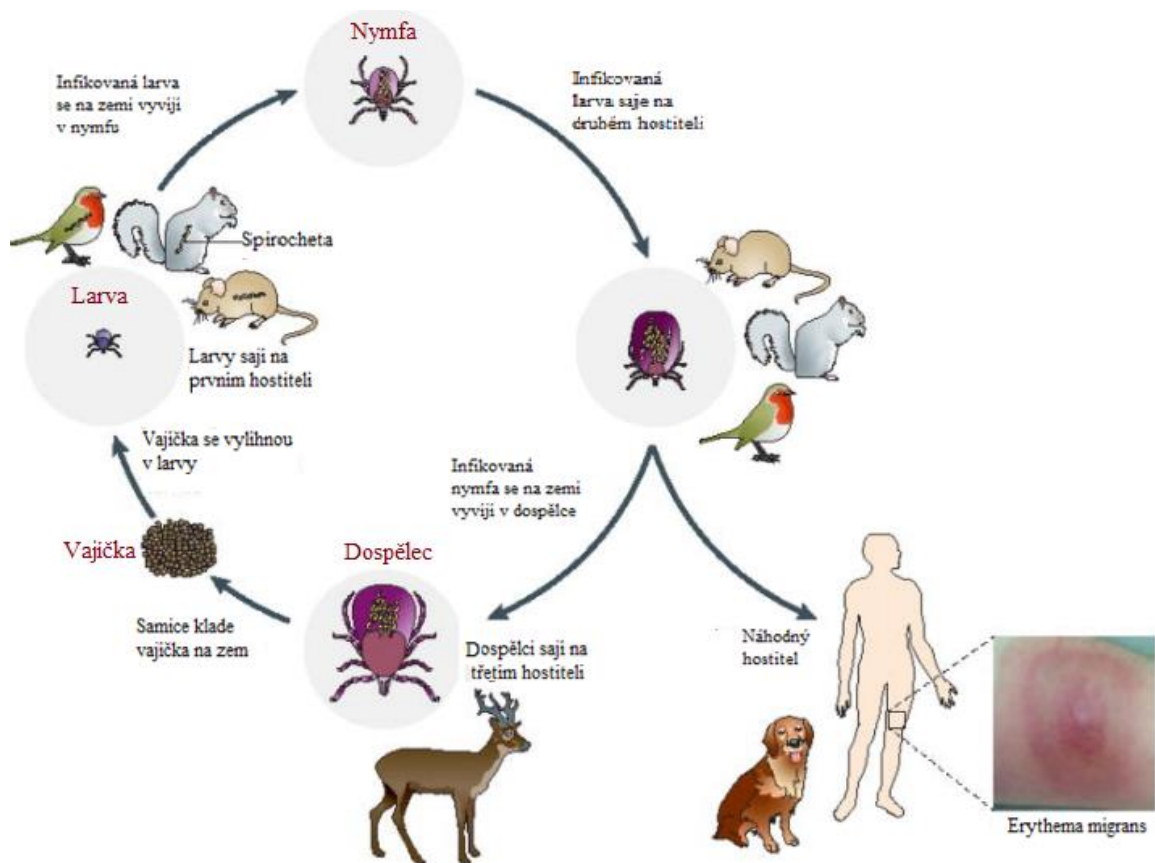
## 1. 1. Lymeská nemoc

Lymeská nemoc (neboli lymeská borrelióza) je chronické infekční onemocnění postihující více orgánů. Je to jedno z nejčastějších infekčních onemocnění v Evropě a USA, které je přenášeno členovci. Počet hlášených případů ročně neustále roste. To může být způsobeno skutečně vyšším počtem nemocných, anebo zlepšením diagnostických metod (Barbour a Fish, 1993). Toto onemocnění je způsobeno spirochetami komplexu *Borrelia burgdorferi* s. l., které jsou na člověka přenášena převážně infikovanými klíšťaty rodu *Ixodes* (Halouzka *et al.*, 1998).

Klinickým příznakem je v 70 % případů rozšiřující se zarudnutí, tzv. erythema migrans, v místě přisání klíštěte. Akutní fáze má nespecifické příznaky podobné chřipce. Neléčená nemoc vede k artritidě nebo kožním, neurologickým, či srdečním komplikacím. Může se vyskytnout také kombinace těchto příznaků. Neurologické komplikace jsou často spojeny s infekcí způsobenou *B. garinii* a *B. burgdorferi* s. s. (Balmelli *et al.*, 1995). Ke kožním komplikacím patří acrodermatitis chronica atrophicans (chronické kožní onemocnění charakterizované ztenčením kůže), které je většinou způsobeno *B. afzelii* (Asbrink *et al.*, 1986). Lymeská nemoc byla také podle některých studií spojena s dalšími příznaky, např. chronická únava (Treib *et al.*, 2000) a neurologické poruchy (MacDonald, 2006). Lymeská nemoc nepostihuje jen člověka, ale i domácí zvířata jako jsou psi, koně, kočky a skot (Parker a White, 1992).

## 1. 2. Klíšťata

Klíšťata jsou členovci třídy – *Arachnida*, řádu – *Ixodida* (Chroust *et al.*, 2001). Klíšťata jsou krevsající paraziti savců, plazů a ptáků, která přenášejí řadu onemocnění, např. lymeskou nemoc a klíšťovou encefalitidu (Hoogstraal, 1985). Klíšťata mohou nést více než jeden patogen současně (Moniuszko *et al.*, 2014). Existují tři čeledě klíšťat: čeleď *Ixodidae* (tzv. tvrdá klíšťata), čeleď *Argasidae* (tzv. měkká klíšťata) a čeleď *Nuttalliella* (Alberto *et al.*, 2010). Klíště má tři stádia životního cyklu: larva, nymfa a dospělec (viz obrázek 1), v každém stádiu sají na hostiteli (Schwan *et al.*, 1995).



Obr. 1: Vývojová stádia klíštěte a životní cyklus *Borrelia burgdorferi* s. s. (Radolf *et al.*, 2012).

Klíšťata čeledi *Ixodidae* mají shora dolů zploštělé tělo, které se skládá z hlavohruďi rostlé se zadečkem. Larvální stádium má tři páry končetin, nymfa a dospělec čtyři. Na koncích prvního páru končetin jsou Hallerovy orgány, které svou citlivostí na mechanické, tepelné a chemické podněty pomáhají klíštěti vyhledat hostitele. Po přichycení na hostitele je klíště schopno pomocí tohoto orgánu najít nejvhodnější místo k přísátí – s tenkou a hodně prokrvenou kůží. Hlavová část je tvořena hypostomem (hlavní sací orgán), chelicerami (klepítka) a pedipalpami (makadla). Hypostom je posázený zpětnými háčky, díky tomu umožňuje klíštěti pevné zakotvení v kůži a sání. V průběhu sání klíště produkuje sliny, které obsahují složky se znečistlivujícím a protisrážlivým účinkem. Spolu se slinami se do těla hostitele dostávají viry nebo bakterie (Radolf *et al.*, 2012).

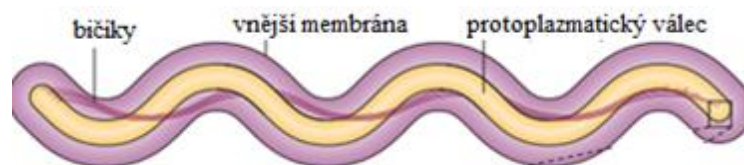
Způsoby přenosu patogenů jsou možné ze stádia na stádium – transstadiálně nebo z matky na potomstvo – transovariálně (van Duijvendijk *et al.*, 2016). Jedna dospělá samička je schopna vyprodukovat 2500–4000 vajíček. Celý vývoj většinou trvá tři roky, ale může se i o několik let prodloužit. Larvální stádium klíštěte sají krev volně žijících

savců, kteří mohou být infikováni borreliemi. Toto sání probíhá 3–5 dní (viz obrázek 1). Borrelie se množí a přetrvávají ve střední části trávicí soustavy infikované klíštěcí larvy, která se následně vyvíjí měsíc až jeden rok v nymfu. Nymfální stádia sají opět 3–5 dní na dalším hostiteli a v průběhu sání borrelie migrují do slinných žláz klíštěte a mohou infikovat hostitele. Nymfa se poté vyvíjí v dospělce, který saje na velkých savcích (Rosa *et al.*, 2005).

### 1.3. Borrelie

Komplex *Borrelia burgdorferi* sensu lato je soubor bakterií taxonomicky zařazený do třídy *Spirochaetes*, řádu *Spirochaetales*, čeledě *Spirochaetaceae*. Tento komplex zahrnuje asi 20 druhů (Becker *et al.*, 2016). Neustále vznikají popisy nových druhů, a tak toto číslo pravděpodobně není konečné (Krupka *et al.*, 2007). Borrelie způsobující lymeskou nemoc (Hyde, 2017) jsou přenášeny klíšťaty rodu *Ixodes ricinus* v Evropě, *Ixodes scapularis* a *Ixodes pacificus* v Severní Americe a *Ixodes persulcatus* v Asii (Baranton *et al.*, 1992; Sun a Xu, 2003). Do komplexu *B. burgdorferi* s. l. patří *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. bavariensis*, *B. japonica* a další. Druh *B. burgdorferi* s. s. se nachází v Americe i Evropě, zatímco *B. afzelii*, *B. bavariensis*, *B. garinii* a *B. japonica* v Eurasii (Rudenko *et al.*, 2011).

Borrelie jsou 0,2–0,5  $\mu\text{m}$  tenké a 10–30  $\mu\text{m}$  dlouhé (viz obrázek 2), mají spirálovitý tvar se 4–15 závitů a 7–11 bičíků, které zodpovídají za pohyb bakterií (Aguero-Rosenfeld *et al.*, 2005). Buňka se skládá z vnější membrány, periplazmy a cytoplazmatické membrány, která tvoří tzv. protoplazmatický válec. Vnější membrána borrelií na rozdíl od ostatních gramnegativních bakterií neobsahuje liposacharidy, ale jsou zde hojně zastoupeny lipoproteiny (Talayama *et al.*, 1987; Fraser *et al.*, 1997).

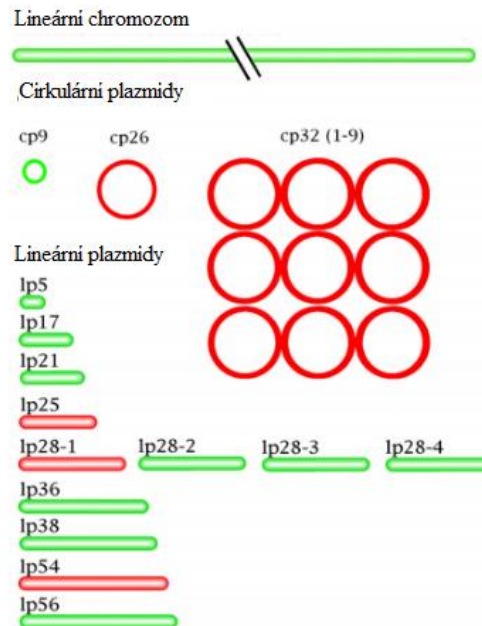


Obr. 2: Morfologie *Borrelia burgdorferi* s. s. (Rosa *et al.*, 2005).

Borrelie obsahují svoji genetickou informaci zakódovanou v jednom chromozomu a několika plazmidech (viz obrázek 3). Mezi jednotlivými druhy borrelií je rozdíl v počtu a velikosti plazmidů. Na obrázku 3 je znázorněn genom *B. burgdorferi* s. s. kmene B31. Její lineární chromozom o velikosti asi 910 kbp je relativně malý v porovnání s ostatními spirochetami. Plazmidy borrelií jsou lineární a cirkulární o velikosti 5–220 kbp (Piesman



a Schwan, 2010). Plazmidy znázorněné červeně (viz obrázek 3) jsou potřebné pro schopnost nakazit hostitele a přežít v klíšťatech a hostitelích.



Obr. 3: Znázornění genomu *B. burgdorferi* s. s. kmene B31. – lineární chromozom, cirkulární a lineární plazmidy, cp – cirkulární plazmid, lp – lineární plazmid. (Stewart *et al.*, 2005).

### 1. 3. 1. Životní cyklus borrelií

Borrelie komplexu *Borrelia burgdorferi* s. l. infikuje širokou škálu obratlovců včetně malých savců, ještěrek a ptáků (Anderson a Magnarelli, 1984). Klíšťata rodu *Ixodes* přenášejí borrelie mezi hostiteli a jsou zatím jedinými prokázanými přenašeči, kteří infikují člověka (Steere, 2001). Klíšťata nejčastěji získávají borrelie v průběhu sání infikovaných hostitelů, především hlodavců (Donahue *et al.*, 1987). Poté borrelie zůstávají transstadiálně v těle klíštěte během vývoje (Piesman a Schwan, 2010). Každé stádium klíštěte saje na jiných hostitelích. Drobní savci (např. hlodavci) jsou kompetentními hostiteli borrelií, zatímco velcí savci (např. jelen) jsou nekompetentní, a tím nejsou dobrým zdrojem pro nakažení klíštěte (Tälleklint a Jaenson, 1994).

Borrelie mohou být přenášeny transstadiálně. Bylo prokázáno, že *Borrelia afzelii* a *Borrelia miyamotoi* mohou být u klíšťat přenášeny transovariálně, což vyvrací dogma, že larvální kousnutí nemůže vyvolat lymeskou nemoc (van Duijvendijk *et al.*, 2016). Všechna tři vývojová stádia mohou sát na člověku a převážně nymfy jsou zodpovědné za přenos borrelií na člověka (Piesman a Schwan, 2010). Malá velikost nymf znesnadňuje

jejich detekci, což zajišťuje delší dobu sání a zvyšuje pravděpodobnost přenosu borrelií, a to vede k šíření lymeské nemoci (Tilly *et al.*, 2008).

Klíště a jeho hostitelé poskytují rozdílné životní podmínky pro růst borrelií. Savci regulují svou tělesnou teplotu od 37 °C do 39 °C, zatímco teplota klíšťat je závislá na okolní teplotě. Také pH tkání a krve savců je neutrální, oproti tomu trávicí ústrojí klíšťat je více zásadité (Balashov, 1972). Borrelie dokáží měnit svou genovou expresi, což vede k tvorbě různých vnějších povrchových proteinů v závislosti na odlišných podmínkách v těle klíštěte a savců (Rosa *et al.*, 2005).

#### 1. 4. Klíštěcí buněčné linie

Klíšťata mají velký medicínský a veterinární význam jako přenašeči patogenních virů, bakterií a protozoí (Jongejan a Uilenberg, 2004). Klíštěcí buněčné linie jsou čím dál více důležité pro výzkum klíšťaty přenášených onemocnění a jsou užitečným nástrojem pro definování komplexního vztahu hostitel – přenašeč – patogen. Mimo studií klíšťaty přenášených patogenů jsou klíštěcí buněčné linie využívány dále na studie klíštěcí biologie, genomiky, proteomiky a genetické manipulace (Varma *et al.*, 1975).

Pokusy kultivovat klíštěcí buňky začaly již v roce 1933, tehdejší studie důkladně zkoumaly využití těchto buněk pro množení virů a bakterií. Dvacetileté zlepšování metodiky vedlo k založení první kontinuální klíštěcí buněčné linie z čeledi *Ixodidae* z druhu *Rhipicephalus appendiculatus* (Kurtti *et al.*, 1988). V roce 1995 bylo k dispozici 20 buněčných linií z osmi druhů klíšťat. Tyto buněčné linie byly používány pro množení borrelií, rickettsií a různých arbovirů (Munderloh a Kurtti, 1995). V současné době existuje 40 buněčných linií z 13 druhů čeledi *Ixodidae* a poprvé jedna linie z čeledi *Argasidae* z druhu *Carios capensis* (Bell-Sakyi *et al.*, 2007).

Z některých druhů klíšťat, jako *Rhipicephalus appendiculatus* a *Boophilus microplus*, bylo kultivováno několik buněčných linií v různých laboratořích. Buňky jiných druhů se obtížně množily kontinuálně i přes standardizované protokoly pro vytvoření primárních kultur (Varma, 1989). Právě proto, že čeledi *Argasidae* bylo věnováno mnohem méně pozornosti než čeledi *Ixodidae*, trvalo 30 let, než byla objevena první buněčná linie měkkých klíšťat (Kurtti *et al.*, 2005).

Většina současně dostupných klíštěcích buněčných linií byla vytvořena z embryonálních buněk bez výběru konkrétních typů tkání (Kurtti *et al.*, 1988, Munderloh *et al.*, 1994). Primární buněčné kultury se kultivují z nymf po odstranění tkání trávicího a vylučovacího systému, anebo z celých larválních explantátů – čerstvě vyňatá tkáň z těla

(Varma *et al.*, 1975; Bell-Sakyi, 2004). Klíštěcí buněčné linie obvykle obsahují dva a více buněčných typů, které mohou být přítomné v různých poměrech, a to jak v rámci jedné kultury, tak v různých úrovních pasáží (Yunker, 1987). Tato směs buněk je zřejmě nezbytná pro přežití kultury (Munderloh *et al.*, 1994). Jednotlivé buňky v klíštěcích buněčných liniích mají tendenci získávat nebo ztrácet chromozomy bez efektu na jejich přežití (Kurtti *et al.*, 1988).

Buňky klíšťat rostou v médiu doplněném o savčí sérum BOFES (bovinní fetální sérum) a inkubují se při teplotě mezi 28 °C a 34 °C, některé linie rostou i při 37 °C (*Dermacentor andersoni*). Některým klíštěcím buněčným liniím vyhovuje kyselé prostředí (pH 6,5–6,8) simulující podmínky množících se buněk v larvách, nymfách a dospělých (Munderloh a Kurtti, 1995). Oproti tomu ostatní buňky rostou v neutrálním nebo alkalickém pH, což umožňuje růst patogenů citlivých na kyselé pH (Munderloh *et al.*, 1996).

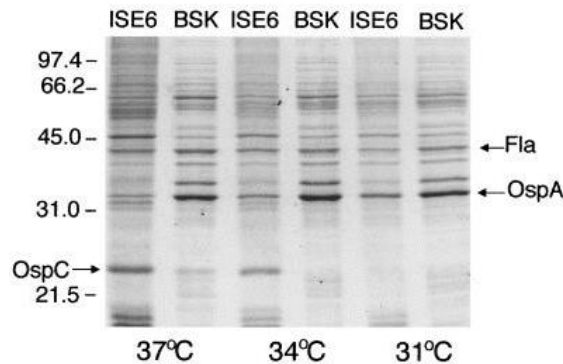
Klíštěcí buňky nepřiléhají k povrchu, rostou jako kombinace monovrstvy a suspenze. Dělí se poměrně pomalu a mohou být udržovány ve vysokých buněčných koncentracích ( $10^6$ – $10^7$  buněk/ml). Jednotlivé kultury některých klíštěcích buněčných linií mohou být velmi odolné, přežívají mnoho let s pravidelnou výměnou média (tzv. pasážování), což odráží schopnost klíšťat přežít v extrémně dlouhých periodách mezi sáním v přírodě (Bell-Sakyi *et al.*, 2007). Klíštěcí buněčné linie jsou užitečné pro množení patogenů (např. *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, Virus klíšťové meningoencefalitidy, Západonilský virus), které nemohou růst *in vitro* v žádné jiné kultuře. (Kurtti, *et al.*, 1988; Alberdi *et al.*, 2016; Ferrolho *et al.* 2016, Lawrie *et al.*, 2004).

Použité buněčné linie v této práci jsou z klíšťat *Ixodes scapularis* a z *Ixodes ricinus*, které jsou kultivovány z embryonálních buněk. Buněčná linie z klíštěte *Ixodes ricinus* je kultivována při 28 °C a z *Ixodes scapularis* při 32 °C (Bell Sakyi *et at.*, 2007).

## 1. 5. Shrnutí souvisejících výzkumů

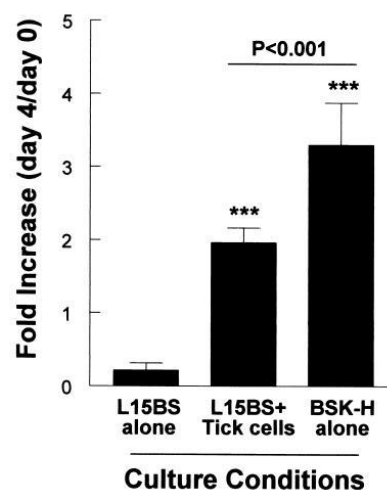
Obonyo *et al.* v roce 1999 zkoumali borrelie kultivované s klíštěcími buněčnými liniemi a změny exprese vnějších povrchových proteinů OspA a OspC v závislosti na teplotě. V tomto pokusu byly inkubovány *B. burgdorferi* s. s. kmen N40 a JMNT a buněčná linie z *Ixodes scapularis* ISE6 v L15BS médiu (L15 médium + 5% BOFES, 0.1% koncentrát bovinního lipoproteinu, 10% TPB, 25 mM N-acetyl glukosamin, 25 mM PIPES), nebo borrelie v samotném BSK-H médiu. Změny se sledovaly při 31 °C, 34 °C

a 37 °C po 5–7 dnech. Množství vnějšího povrchového proteinu OspA bylo nejvyšší při 31 °C a snižovalo se s narůstající teplotou. Množství proteinu OspC bylo nejvyšší při 37 °C (viz obrázek 4). Borrelie rostoucí v BSK-H médiu produkují více OspC při 37 °C a obsah OspA není významně ovlivněn teplotou. Toto zjištění ukazuje, že teplota spolu s inkubací s klíštěcími buněčnými liniemi hraje roli v rozdílné expresi vnějšího povrchového proteinu OspA a OspC (Obonyo *et al.*, 1999).



Obr. 4: Analýza *B. burgdorferi* s. s. kmene JMNT pomocí metody SDS-PAGE a následné barvení Coomassie Brilliant Blue (Obonyo *et al.*, 1999).

Burgrysheva *et al.* se v roce 2002 zabývali množením *B. burgdorferi* s. s. kmene N40 inkubovaného s klíštěcími buňkami *I. scapularis* IDE8 a ISE6 v L15BS médiu, nebo v samotném L15 médiu. Tato kultivace trvala čtyři dny. Médium L15BS samo o sobě nepodporuje růst borrelií, zatímco BSK-H médium ano (Burgrysheva *et al.*, 2002).



Obr. 5: Rozdíl růstu *Borrelia burgdorferi* kmen N40 v L15BS médiu, v L15BS médiu s klíštěcími buňkami a v BSK-H médiu (Bugrysheva *et al.*, 2002).

Moniuszko *et al.* v roce 2014 inkubovali buněčné linie z *Ixodes scapularis* nebo *Ixodes ricinus* vždy zároveň se dvěma patogeny – *Borrelia burgdorferi* s. s., *Ehrlichia ruminantium* a Semliki Forest virem (SFV). Byl měřen vliv koinfekcí na replikaci těchto patogenů. Např. infikování klíštěcích buněčných kultur *B. burgdorferi* s. s. zlepšilo následnou replikaci *E. ruminantium*, zatímco přidání borrelií ke klíštěcím buňkám infikovaných *E. ruminantium* neměla žádný vliv na růst *E. ruminantium*. Přidání *B. burgdorferi* s. s. k virem nakažené kultuře mělo také pozitivní vliv na replikaci viru a v opačném sledu infekcí byl také pozorován pozitivní vliv na replikaci viru. Přítomnost *E. ruminantium* nebo SFV v klíštěcí buněčné kultuře nemělo žádný měřitelný vliv na růst *B. burgdorferi* s. s. Přidání *E. ruminantium* ke klíštěcím buněčným liniím a následující přidání SFV významně zvýšilo replikaci viru ve všech časových bodech (24, 48, 72 hodin po infekci), zatímco přítomnost viru v klíštěcí buněčné kultuře nemá žádný měřitelný účinek na růst bakterie *E. ruminantium* (Moniuszko *et al.*, 2014).

Teixeira *et al.* v roce 2016 zkoumali klíštěcí buněčné linie s *B. burgdorferi* s. s. pomocí průtokové cytometrie, fluorescenční a konfokální mikroskopie. Borrelie byly obarveny fluorescenčním membránovým markerem (PKH67 nebo PKH26) a byly inkubovány s 8 různými klíštěcími buněčnými liniemi při teplotě 30 °C po dobu 24 hodin. Marker PKH účinně obarví borrelie bez vlivu na jejich životaschopnost a pohyblivost. Mezi testovanými buněčnými liniemi nejlépe prospívala buněčná linie RA243 z klíštěte *Rhipicephalus appendiculatus*, jak s vysokou (90 %), tak s nízkou (10 %) koncentrací BSK-H média v klíštěcím kultivačním médiu. Přidání cytochalasinu D způsobilo dramatické morfologické změny borrelií a jejich umírání v interakci s klíštěcími buňkami. Téměř všechny mrtvé fluorescenčně značené borrelie byly fagocytovány klíštěcími buňkami. Označování borrelií PKH se ukázalo jako spolehlivý nástroj pro analýzu interakcí borrelií a klíštěcích buněk pomocí průtokové cytometrie, konfokální a fluorescenční mikroskopie (Teixeira *et al.*, 2016).

## 2. CÍLE PRÁCE

1. Stanovit vhodné experimentální podmínky pro práci s klíštěcími buněčnými liniemi a různými druhy borrelií
2. Identifikace specifických proteinů expresovaných nebo neexpresovaných v borreliích za přítomnosti klíštěcích buněčných linií a také v supernatantu z klíštěcích buněčných linií
3. Sledovat rozdíly v expresi proteinu evropských druhů borrelií za přítomnosti klíštěcích buněk amerických druhů rodu *Ixodes* a amerických druhů borrelií za přítomnosti evropských druhů rodu *Ixodes*

### 3. METODY

#### 3.1. Kultivace borrelií

Byl použit kmen *Borrelia burgdorferi* s. s. B31 – A3 od doktorky Patricia Rosa, Ph.D. (Rocky Mountain Laboratories, NIH, NIAID) a *Borrelia afzelii* CB43 – 6 od doktora Ryan Rego, Ph.D. (Parazitologický Ústav, AV ČR). Médium BSK II bylo zahřáto po dobu 10 minut při 50 °C ve vodní lázni SUB Agua 2s (Grant). Další práce proběhla za sterilních podmínek v laminárním boxu Bio II Advance (Telstar). Pro zamezení kontaminací byla nádoba s BSK II médiem před otevřením očištěna 70% ethanolem. Médium byly naplněny 8ml zkumavky po okraj. Ze zásobního roztoku, který byl uskladněn při -80 °C (-86 °C Freezer, Cryogenics Limited), bylo pomocí laboratorní špičky přidáno malé množství kultury borrelií kmene CB43 nebo B31. Poté proběhla inkubace při 34 °C do dosažení koncentrace  $5 \times 10^7$  buněk borrelií/ml.

#### 3.2. Příprava tekutého média BSK II pro kultivaci borrelií

Všechny složky, nástroje a nádoby pro přípravu musely být sterilizovány. Pro přípravu 2 l BSK II média bylo potřeba nejprve rozmíchat první tři složky (viz tabulka I) v 1,5 l Milli-Q vody. Rozmíchání roztoku probíhalo přibližně dvě hodiny pomocí magnetické míchačky MR Hei-Mix S (Heidolph). Dále bylo přidáno zbylých sedm složek (viz tabulka I) a opět vše mícháno až do úplného rozpuštění. Poté bylo upraveno pH na hodnotu 7,6 sterilním 10 M roztokem NaOH pomocí pH metru Eutech Instruments pH 510 (Chromservis). Na závěr byl roztok doplněn do finálního objemu Milli-Q vodou, vše bylo promícháno a přefiltrováno přes 0,2 mm filtr do 500 ml sterilních lahví. Poté bylo přidáno 30 ml králíčího séra do každé lahve a uskladněno při -20 °C.

Tab. I: Chemikálie pro přípravu BSK II média.

složky	[g/l]
BSA	50
Neopepton	5
10× CMRL	9,7
Yeastolate	2
HEPES	6
glukóza	5
citronan sodný	0,7
pyruvát sodný	0,8
N-acetyl glukosamin	0,4
hydrogenuhličitan sodný	10

### 3. 3. Pasážování klíštěcích buněčných linií

Během pasážování dochází k odebrání části narostlé kultury a k výměně části živného média za čerstvé. Klíštěcí buňky (od Dr. Lesley Bell-Sakyi, The Pirbright Institute, UK) dlouhodobě kultivovány při 28 °C v médiu pro klíštěcí buněčné linie) byly pasážovány po dvou týdnech, a to výhradně v laminárním boxu Bio II Advance (Telstar) za sterilních podmínek. Před pasážováním bylo médium pro klíštěcí buňky temperováno minimálně 30 minut při laboratorní teplotě (LT). Složení média pro klíštěcí buňky bez antibiotik bylo následující: L15 (Leibovitz's médium) + 20% BOFES (bovinní fetální sérum) + 10% TPB (tryptózo-fosfátový bujón) + L-glutamin. Médium pro klíštěcí buňky s antibiotiky navíc obsahovalo 100 jednotek/ml penicilinu a 100 µg/ml streptomycinu. Během pasážování nedochází k doplňování antibiotika, a tak dochází k postupnému snižování jeho koncentrace v médiu. Pasážování probíhalo následovně: Médium a zkumavky s buněčnou kulturou byly sterilně otevřeny a opáleny nad plamenem. Pomocí 5ml pipety byl obsah zkumavky rozsuspendován. Poté byly asi ¾ objemu suspenze buněk pomocí pipety vypuštěny do odpadu s roztokem 0,5% kyseliny peroctové. Do každé zkumavky bylo doplněno nové temperované médium pro klíštěcí buněčné kultury po rysku, což odpovídalo asi 4 ml média. Nakonec byly lahve s médiem a zkumavky s buněčnou kulturou sterilně uzavřeny opálením nad plamenem. Zkumavky byly inkubovány dva týdny při 24 °C.

V této práci byly použity buněčné kultury z *Ixodes ricinus* (IRE19) a z *Ixodes scapularis* (ISE18) kultivované s médiem s antibiotiky nebo bez nich. Pro získání většího množství buněčné kultury nebyla buněčná suspenze vypuštěna do odpadu, ale do nových zkumavek a médium bylo doplněno stejně jako během pasážování.

### 3. 4. Příprava vzorků s borreliemi

Bylo připraveno několik druhů vzorků různého složení, pokaždé po třech zkumavkách. Ve vzorcích byla vždy přítomna kultura borrelií s různými objemy BSK II média spolu se suspenzí klíštěcích buněčných linií, nebo supernatantem z klíštěcích buněčných linií (vznikl centrifugací při 2000 rpm nebo při 8000 rpm po dobu 15 minut v centrifuze Centrifuge 5430 R, eppendorf), nebo médiem pro klíštěcí buněčné linie. Médium BSK II bylo před použitím inkubováno ve vodní lázni SUB Agua 2s (Grant) při 50 °C 15 minut. Všechna média byla použita vždy bez antibiotik. Kulturu borrelií bylo nutno promíchat opakovaným vertikálním otočením. Borrelie ve vzorcích měly koncentraci 10<sup>5</sup> borrelií/ml. Ve všech sériích vzorků byla použita *Borrelia afzelii*



nebo *Borrelia burgdorferi* s. s. (chybí v sérii 3) a *Ixodes ricinus* nebo *Ixodes scapularis*. Ke každé sérii vzorků byla vytvořena pozitivní kontrola. Vzorky byly inkubovány při 34 °C nebo 28 °C až do dosažení koncentrace  $5 \times 10^7$  borrelií/ml, která byla zjištěna pomocí počítání v Petroff-Haussově komůrce.

### **3. 5. Počítání borrelií v Petroff-Haussově komůrce**

Na počítací komůrku Petroff Hausseur (Electron Microscopy Services) bylo naneseno 6  $\mu$ l kultury borrelií, kultura byla předem zředěna v poměru 1 : 10. Podložní sklo po položení krycího sklíčka bylo vloženo do mikroskopu, prohlíženo v temném poli (Leica DM1000 LED) a byly počítány borrelie na 5 čtvercích (v případě, že se borrelie vyskytovaly na hraně čtverce, buňky se počítaly pouze ze dvou hran). Daná hodnota byla vynásobena číslem  $1,25 \times 10^7$  (index pro počítací komůrku) a vyšel počet borrelií v 1 ml média.

### **3. 6. Příprava lyzátu z buněčné kultury**

Buněčný lyzát byl připraven z buněčné kultury borrelií nebo klíštěcích buněk. Centrifugace vzorků probíhala 10 minut rychlostí 8 000 rpm při 20 °C v centrifuze Centrifuge 5430 R (Eppendorf). Dále byl odebrán supernatant a pelet byl rozsuspendován v 1 ml HN-puftru (složení pro 1 litr HN puftru: 50 mM HEPES a 50mM NaCl) kvůli pročištění buněk od média a pelet byl přenesen do čisté 1,5 ml zkumavky. Poté byla zkumavka centrifugována při stejných podmínkách jako v prvním kroku. Supernatant byl znovu odstraněn a přidán 1 ml HN-puftru. V dalším kroku byl pelet rozsuspendován a centrifugován opět za stejných podmínek jako na začátku. Supernatant byl naposledy odstraněn a pelet rozsuspendován v 200  $\mu$ l lyzačního puftru B-per (Bacteria Protein Extraction Reagent, Thermo Scientific) a byl inkubován 10 minut při LT a poté byl lyzát promíchán. Dále bylo přidáno do každého lyzátu 200  $\mu$ l Laemmli puftru (2 $\times$  Laemmli vzorkovacího puftru a 2-Merkaptoethanolu v poměru 19 : 1). Lyzáty byly použity pro metodu SDS-PAGE nebo uchovány při teplotě -20 °C.

### **3. 7. SDS-PAGE**

SDS-PAGE (polyakrylamidová gelová elektroforéza s využitím (dodecylsírany sodného) je chemická metoda používaná k separaci proteinů, která využívá polyakrylamidového gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS). Látka SDS

svým vysokým nábojem vyrovnává náboj proteinů a ty se pohybují v gelu na základě svojí velikosti.

### 3. 7. 1. Příprava gelu pro SDS-PAGE

Pro přípravu gelu byla použita skla 0,75 mm Bio-Rad s hřebínkem 0,75 mm pro deset jamek. Skla byla umístěna do stojanu pro přípravu gelu, pomocí vody byla ověřena těsnost umístění skel v držáku. Gel je možné připravit buď z jednotlivých složek, nebo pomocí soupravy.

Pro přípravu gelu z jednotlivých složek byly nejprve smíchány složky separační části (viz tabulka II) a směs důkladně promíchána. Získaný roztok byl ihned pomocí pipety nanesen mezi skla až pod úroveň hřebínku. Pro zarovnání hladiny separační části gelu byla nanesena vrstva destilované vody, která byla po polymerizaci gelu odsáta pomocí ubrousku (cca 30 minutách). Poté byl připraven roztok pro zaostřující část gelu (viz tabulka II) stejným způsobem jako separační část. Roztok byl opět nanesen mezi skla a ihned vložen hřebínek. Po polymerizaci (cca 20 minut) bylo možné vyjmout hřebínek a gel byl připraven pro další postup.

Tab. II: Složení pro jeden 12% SDS-PAGE gel.

složky	separační část	zaostřující část
30% akrylamid	2 ml	170 $\mu$ l
separační/zaostřující pufr	1,25 ml	250 $\mu$ l
destilovaná voda	1,7 ml	570 $\mu$ l
10% APS	50 $\mu$ l	10 $\mu$ l
TEMED	2 $\mu$ l	1 $\mu$ l

Pro přípravu gelu pomocí soupravy TGX FastCast (Bio-Rad) byly podle návodu výrobce smíchány složky pro zaostřující a separační část gelu (viz tabulka III). Po důkladném promíchání byl nanesen separační roztok mezi skla a poté ihned zaostřující a následně vložen hřebínek. Po polymerizaci gelu (cca 30 minut) bylo možné hřebínek vyjmout a gel byl připraven pro další postup.

Tab. III: Složení pro jeden 12% SDS-PAGE gel ( TGX Stain-Free FastCast, Bio-Rad).

složky	separační část	zaostřující část
Resolver A	2 ml	-
Resolver B	2 ml	-
Stacker A	-	1 ml
Stacker B	-	1 ml
TEMED	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l
10% APS	20 $\mu$ l	10 $\mu$ l

### 3. 7. 2. Průběh elektroforézy

Byla sestavena aparatura Mini-PROTEAN Tetra System (Bio-Rad) pro SDS-PAGE elektroforézu. Do vnitřní i vnější části byl nalit 1× pufr pro SDS-PAGE (složení viz tabulka IV). U každého vzorku byla zjištěna koncentrace pomocí přístroje NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) a podle ní byl odvozen objem nanášeného vzorku tak, aby ve všech jamkách byla stejná koncentrace vzorků. Dále byly buněčné lyzáty z borrelií nebo klíštěcích buněk inkubovány 10 minut při teplotě 100 °C. Na připravené gely byly nanášeny vzorky, tzn. buněčné lyzáty z borrelií nebo klíštěcích buněk. Do první jamky bylo nanášeno 8 µl markeru (Protien Marker VI 10-245, AppliChem) a do zbylých jamek vzorky. Samotná elektroforéza probíhala 90–120 minut při napětí 120 V. Takto získané gely jsou použity pro barvení roztokem Coomassie Brilliant Blue.

Tab. IV: Složení 1 litru pufru pro SDS-PAGE.

složky	[g/l]
Tris-base	30,3
Glycin	144
SDS	10

### 3. 7. 3. Barvení gelu pomocí Coomassie Brilliant Blue

Po skončení elektroforézy byl gel opatrně vyjmut ze skel a 3× promyt v Milli-Q vodě vždy 15 minut. Poté proběhlo barvení roztokem Coomassie Brilliant Blue 3 hodiny. Na jeden gel bylo potřeba 25 ml tohoto roztoku, který lze použít opakovaně. Následně byl gel promyt 3× v destilované vodě vždy po 30 minut. Poté byl uskladněn do druhého dne, kdy byl zdokumentován výsledek pomocí ChemiDocTMMP Imaging Systému (Bio-Rad).

### 3. 8. MS analýza

MS analýza, neboli hmotnostní spektrometrická analýza, se používá ke stanovení základního složení vzorku (např. peptidu).

Za sterilních podmínek byly pomocí skalpelu vyřezány jednotlivé proužky s proteiny z gelu, které byly rozřezány na asi 2mm části. Tyto části byly vloženy do 1,5ml zkumavky. Takto připravené vzorky byly předány na analýzu MS. Poté byly výsledky zpracovány pomocí programu Protein BLAST a výsledkem byla peptidová sekvence proteinu borrelií.

## 4. VÝSLEDKY

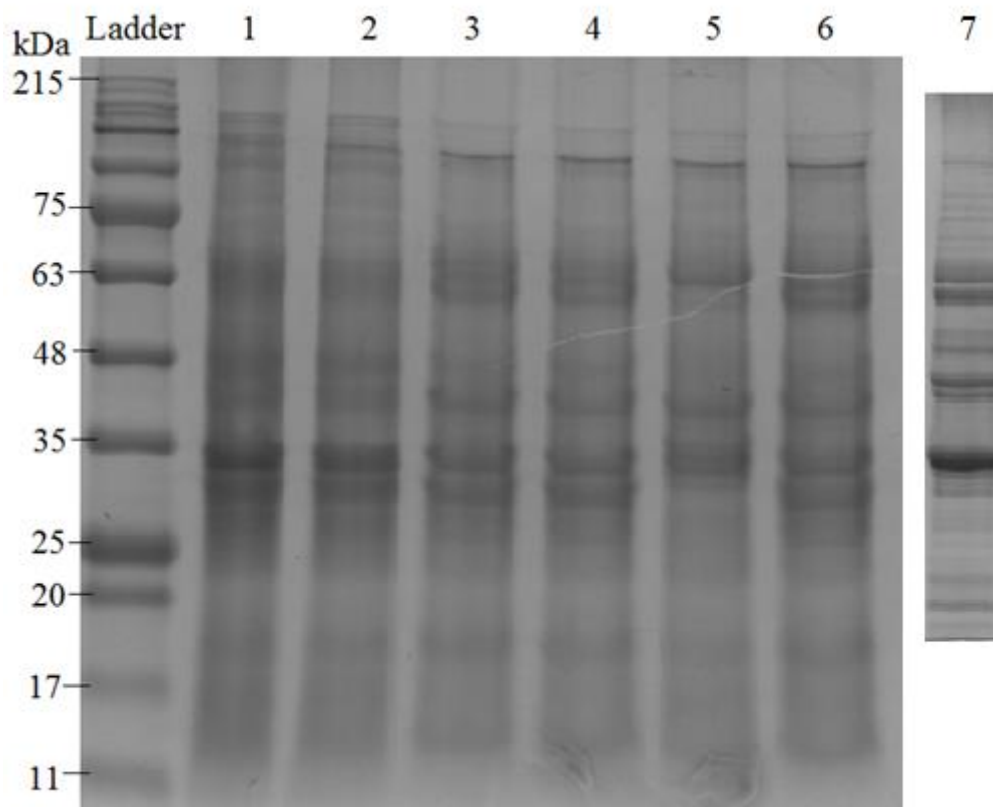
### 4.1. Výsledky série 1

U vzorků III–VI série 1 (viz tab. V) bylo použito BSK II médium, borrelie (kmen CB43 nebo B31) a médium s klíštěcími buňkami (linie ISE 18 nebo IRE 19 po 5. pasážování). Vzorky se inkubovaly při 28 °C. U těchto vzorků došlo ke kontaminaci. Vzorky VII–X se skládaly z BSK II média, borrelií a média bez klíštěcích buněk (supernatant klíštěcích buněčných linií, který vznikl centrifugací při 8000 rpm po dobu 15 minut). Tyto vzorky byly inkubovány jeden týden při teplotě 34 °C. Z těchto vzorků byl vytvořen buněčný lyzát a následně provedena metoda SDS-PAGE. Na obrázku 6 není sledován žádný rozdíl mezi jednotlivými buněčnými lyzáty a jejich kontrolou. U vzorků s *Borrelia afzelii* je pozorován OspB o velikosti 34 kDa.

Tab. V: Přehled složení vzorků série 1.

číslo vzorků	složení		množství média		
	borrelie	klíštěcí buněčné linie	BSK II	médium s k. b. l.*	supernatant k. b. l.*
I, PK	CB43		8 ml		
II,	B31				
III	CB43	IRE 19	6 ml	2 ml	
IV		ISE 18			
V	B31	IRE 19			
VI		ISE 18			
VII	CB43	IRE 19	7 ml		1 ml
VIII		ISE 18			
IX	B31	IRE 19			
X		ISE 18			

\* klíštěcí buněčné linie; PK – pozitivní kontrola



Obr. 6: Metoda SDS-PAGE vzorků série 1, jamka č. 1, 2 – vzorek VII; č. 3, 4 – vzorek VIII; č. 5 – vzorek X; č. 6 – vzorek I; č. 7 – pozitivní kontrola kmene B31.

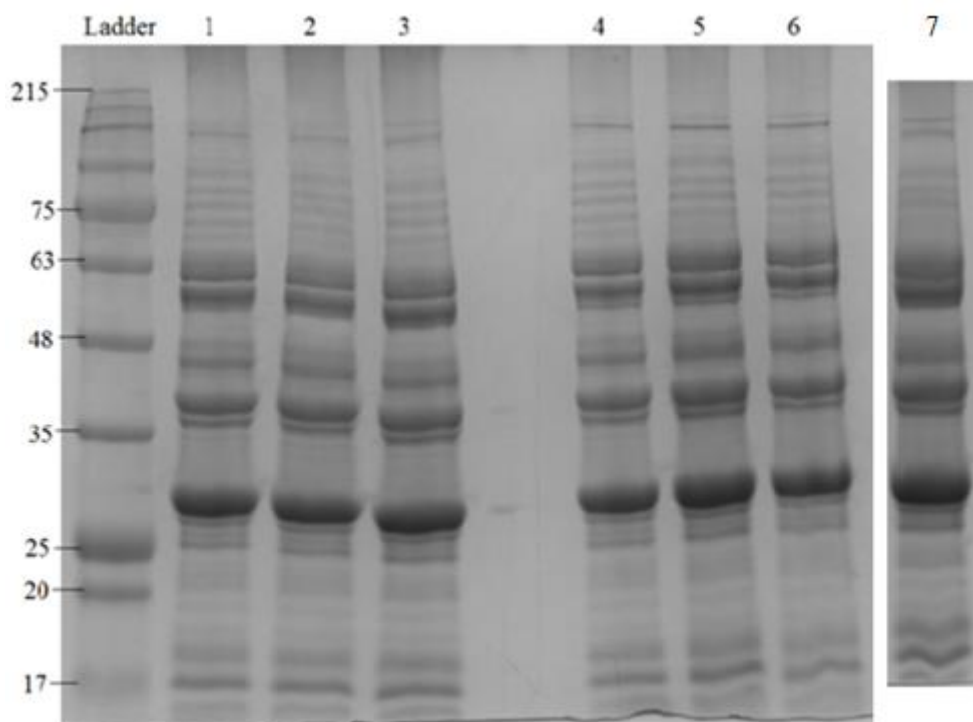
#### 4. 2. Výsledky série 2

V sérii 2 (viz tab. VI) byly vzorky složeny z BSK II média, borrelií (kmen CB43 nebo B31) a supernatantu z klíštěcích buněk (linie ISE18 nebo IRE19 po 5. pasážování), který vznikl centrifugací při 8000 rpm po dobu 15 minut, nebo média pro klíštěcí buněčné linie bez antibiotik. Tyto vzorky se inkubovaly jeden týden při teplotě 34 °C. Na obrázcích 7, 8 a 9 není sledován žádný rozdíl mezi jednotlivými buněčnými lyzáty. Na obrázku 9 je označen protein OspB *Borrelia afzelii* o velikosti 34 kDa. Na obrázku 10 je zobrazen peptidové sekvence OspB získané pomocí MS analýzy, která pomohla identifikovat povrchový protein OspB.

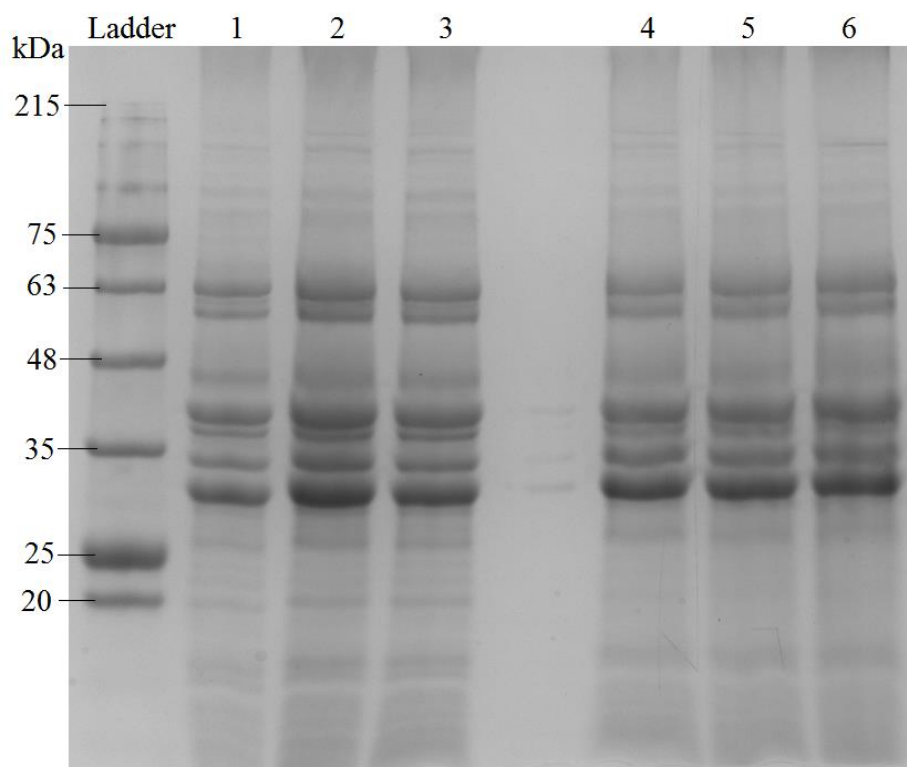
Tab. VI: Přehled složení vzorků série 2.

číslo vzorků	složení		množství média		
	borrelie	klíčecí buněčné linie	BSK II	supernatant k. b. l.*	médium pro k. b. l.*
I, PK	B31		7 ml		
II		ISE 18	5 ml	2 ml	
III		IRE 19			
IV		ISE 18	6 ml	1 ml	
V					5 ml
VI				2 ml	
VII, PK	CB43		7 ml		
VIII		ISE 18	5 ml	2 ml	
IX		IRE 19			
X		IRE 19	6 ml	1 ml	
XI					5 ml
XII				2 ml	

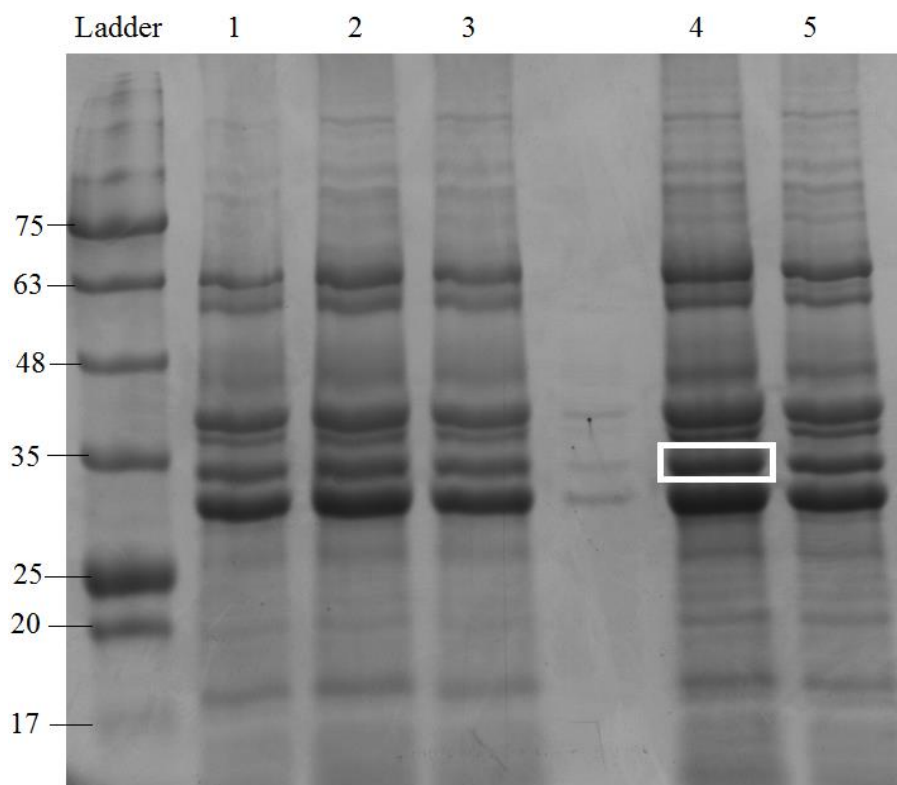
\* klíčecí buněčné linie; PK – pozitivní kontrola



Obr. 7: Metoda SDS-PAGE vzorků série 2, jamka č. 1, 2, 3 – vzorek III; č. 4, 5, 6 – vzorek IV; č. 7 – pozitivní kontrola kmene B31.



Obr. 8: Metoda SDS-PAGE vzorků série 2, jamka č. 1, 2, 3 – vzorek VII; č. 4, 5, 6 – vzorek VIII.



Obr. 9: Metoda SDS-PAGE vzorků série 2, jamka č. 1, 2, 3 – vzorek IX; č. 4, 5 – vzorek X.

MKQYLLVFALVLALIACSQKGTEPKSTSQDHNDQEIINSNDNTPKDSK**KDLTVLAE**  
**ENSVPLFNGNKI**FVSKEKNSAGKYELRATVDTVELKGVSDKNNGSGKLEGTKAD  
**KTKVAMTIADDLN**TITVETYDASN**KK**TGSEVVKKQGSVIKESYKANKLDSKKITR  
 ENETTLEYSEM TDSSNATKAVETLKNGIKLEGLVGGKTTV**KLTEGTITLRE**IEQ  
 DGKVKIYLNDDTSGSTKKTATWNETTNTLTISADSKKTKDFVFLTDGTITVQAYD  
 TAGT**KLEGN**SSEIKDLA**ALKA**ALK

Obr. 10: Peptidová sekvence OspB *Borrelia afzelii* kmene PKo. Výsledek MS analýzy, červeně označené části sekvence je OspB.

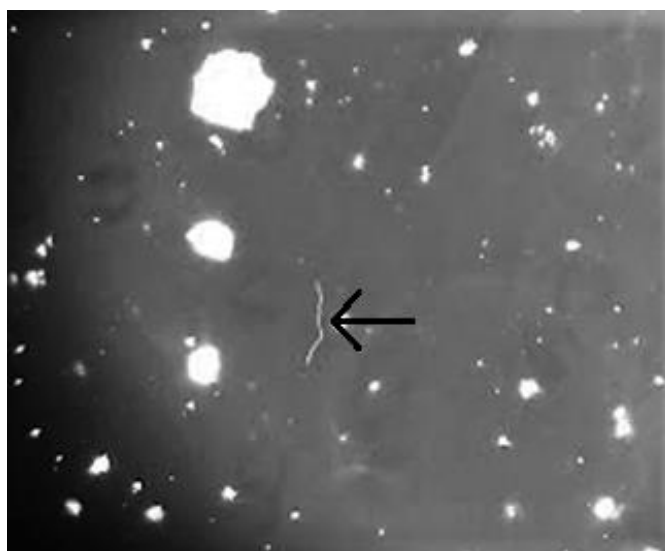
### 4.3. Výsledky série 3

Vzorky třetí série (viz tab. VII) byly složeny z čistého média pro klíčecí buněčné linie (bez antibiotik), borrelií (pouze kmen CB43) a média s klíčecími buňkami (linie ISE18 a IRE19 po 7. pasážování). Vzorky byly inkubovány při teplotě 28 °C po dobu 2 měsíců. Z této série vzorků nebyly vytvořeny žádné lyzáty. Ze vzorku III byl získán snímek *Borrelia afzelii* pomocí mikroskopie v temném poli (Leica DM1000 LED) při zvětšení 400× (viz obrázek 11).

Tab. VII: Přehled složení vzorků série 3.

číslo vzorků	složení		množství média	
	borrelie	klíčecí buněčné linie	médium s k. b. l.*	médium pro k. b. l. *
I, PK		ISE18	4 ml	4 ml
II, PK		IRE19		
III	CB43	ISE18		
IV		IRE19		

\* klíčecí buněčné linie; PK – pozitivní kontrola



Obr. 11: Snímek *Borrelia afzelii* (znázorněna šipkou) s klíčecími buňkami při zvětšení 400×.



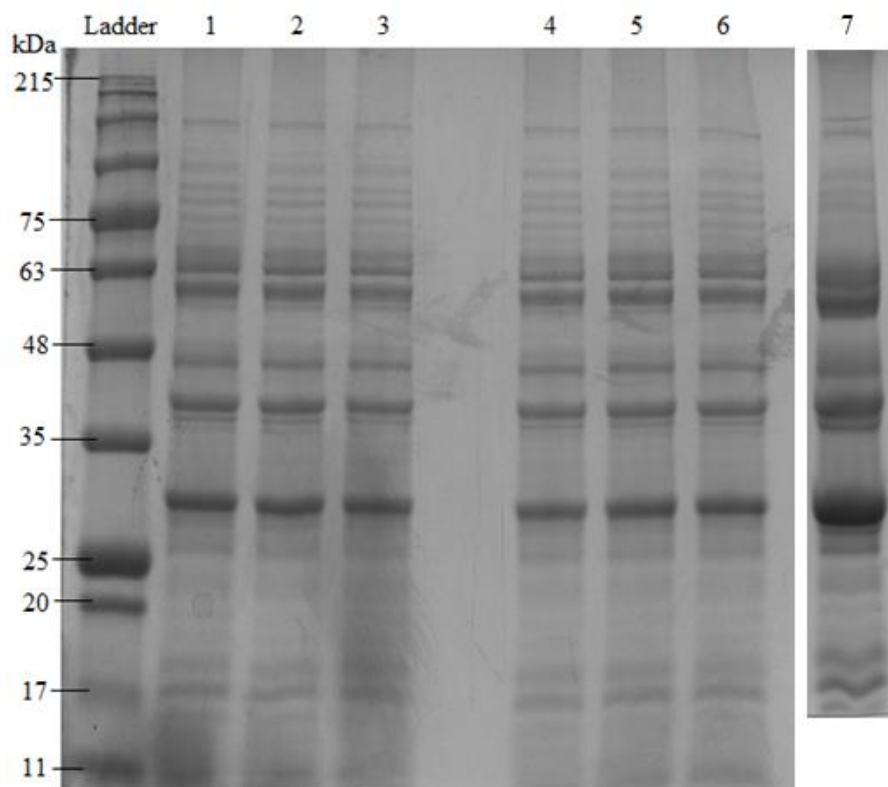
#### 4. 4. Výsledky série 4

V sérii 4 (viz tab. VIII) byly vzorky složeny z BSK II média, borrelií (kmen CB43 nebo B31) a supernatantu z klíštěcích buněčných linií (linie ISE18 nebo IRE19 po 14. pasážování), který vznikl centrifugací při 2000 rpm po dobu 15 minut. Na obrázcích 12 a 13 není sledován žádný rozdíl mezi jednotlivými buněčnými lyzáty a jejich pozitivní kontrolou. U vzorků s *Borrelia afzelii* je pozorován OspB o velikosti 34 kDa.

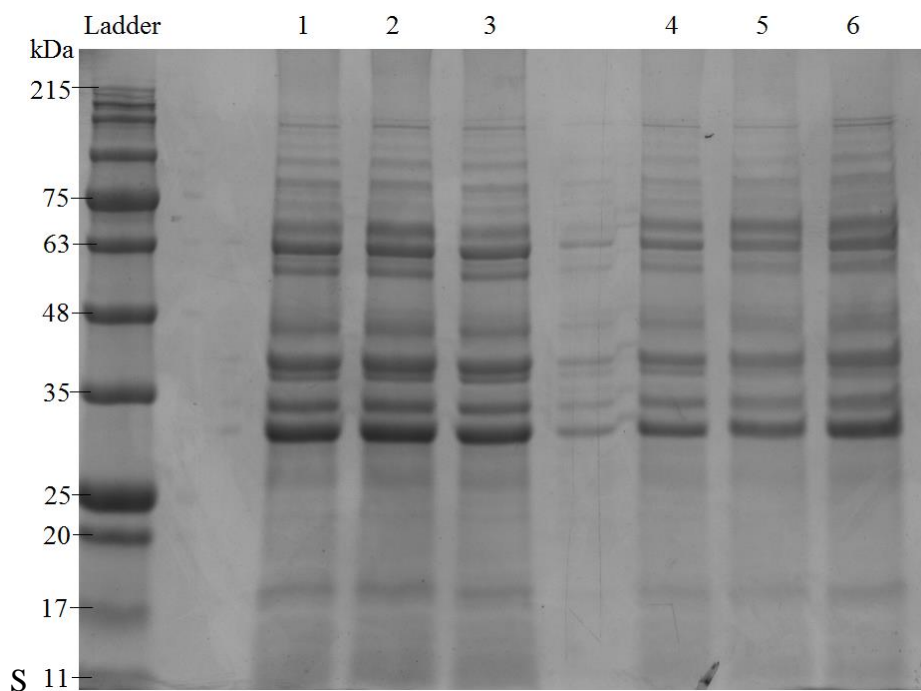
Tab. VIII: Přehled složení vzorků série 4.

číslo vzorků	složení		množství média		
	borrelie	klíštěcí buněčné linie	BSK II	bez k. b. l.*	médium pro k. b. l.*
I, PK	B31		7 ml		
II		ISE 18	5 ml	2 ml	
III		IRE 19			
IV		ISE 18	6 ml	1 ml	
V					
VI			5 ml		1 ml
VII, PK	CB43		7 ml		
VIII		ISE 18	5 ml	2 ml	
IX		IRE 19			
X		IRE 19	6 ml	1 ml	
XI					
XII			5 ml		1 ml

\* klíštěcí buněčné linie; PK – pozitivní kontrola



Obr. 12: Metoda SDS-PAGE vzorků série 4, jamka č. 1, 2, 3 – vzorek II; č. 4, 5, 6 – vzorek III; č. 7 – pozitivní kontrola kmene B31.



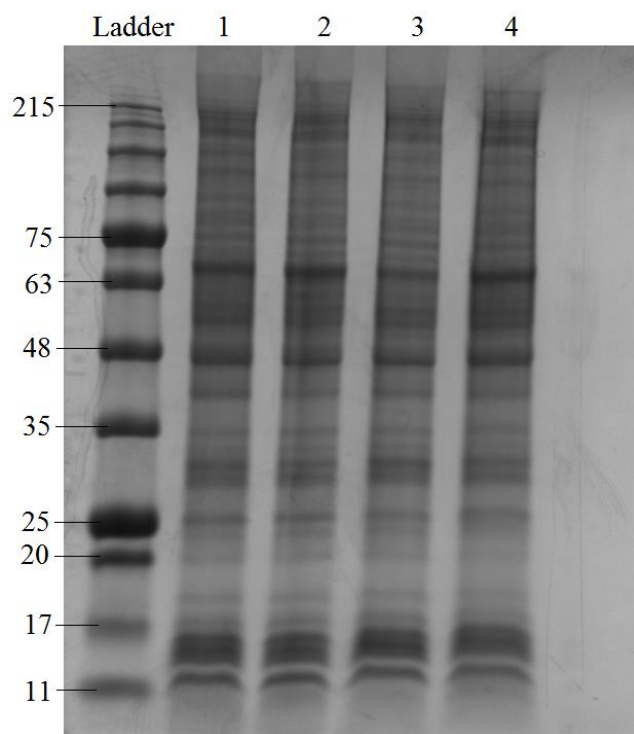
Obr. 13: Metoda SDS-PAGE vzorků série 4, jamka č. 1, 2, 3 – vzorek VII, č. 4, 5 – vzorek VIII.

#### 4. 5. Klíštěcí buněčné linie

Byly použity klíštěcí buněčné linie z *Ixodes ricinus* a *Ixodes scapularis* s médiem pro klíštěcí buněčné linie s antibiotiky i bez nich. Nebyly sledované žádné rozdíly v expresi proteinů mezi těmito buněčnými lyzáty (viz obrázek 14).

Tab. IX: Přehled vzorků klíštěcích buněk.

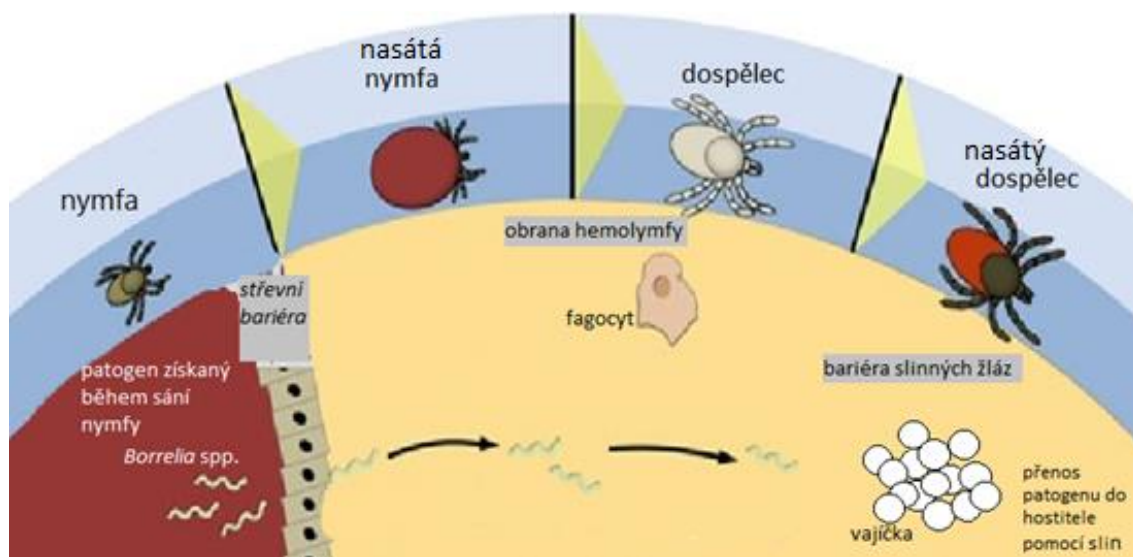
č. vzorku = č. sloupce	klíštěcí buněčné linie	médium
1	ISE18	s antibiotiky
2		bez antibiotik
3	IRE 19	s antibiotiky
4		bez antibiotik



Obr. 14: Metoda SDS-PAGE gel lyzátů klíštěcích buněčných linií, číslo vzorku = číslo sloupce (viz tabulka IX).

## 5. DISKUZE

Komplex *Borrelia burgdorferi* s. l. způsobuje lymeskou nemoc a jejími nejčastějšími přenašeči jsou klíšťata rodu *Ixodes*. Klíšťata jsou přenašeči patogenů, jako jsou viry, bakterie a protozoa. Pro tyto patogeny je důležitá schopnost vyhnout se obranným mechanismům imunitního systému klíštěte a hostitele. V případě klíšťat procházejí patogeny střední částí trávicího ústrojí, hemolymfou, slinnými žlázami nebo vaječníky (Hajdušek *et al.*, 2013). Borrelie se množí a přetrvávají ve střední části trávicí soustavy např. infikované larvy klíštěte, ta se následně vyvíjí v nymfu (viz obrázek 15). Nymfální stádia sají na dalším hostiteli a v průběhu sání borrelie migrují do slinných žláz klíštěte a mohou infikovat hostitele (Rosa *et al.*, 2005).



Obr. 15: Znárodnění přenosu *Borrelia burgdorferi* s. l. v klíšťeti *Ixodes scapularis* (Gulia-Nuss, 2016).

Dosavadní pokusy zkoumaly převážně borrelie vyskytující se v USA, např. genom *Borrelia burgdorferi* s. s. kmene B31 byl objeven už v roce 1997 (Fraser *et al.*, 1997). Evropské druhy borrelií jsou méně prozkoumány, např. genom *Borrelia afzelii* byl prozkoumán až v roce 2011 (Casjens *et al.* 2011).

Poslední výzkumy se zabývaly interakcemi klíšťecích buněčných linií převážně s intracelulárními patogeny (viry, anaplasma nebo rickettsia). Mattila *et al.* v roce 2007 zkoumali *Borrelia burgdorferi* s. s. (kmen B31) s buněčnou linií z klíštěte *Ixodes scapularis* (ISE6 a IDE12) a z klíštěte *Dermacentor andersoni* (DAE15). Dále zkoumali *Rickettsia peacockii*, což je intracelulární symbiont klíštěte *Dermacentor andersoni*. Buňky linií IDE12 a DAE15 infikované nebo neinfikované *Rickettsia peacockii* byly

schopny z 70–80 % fagocytovat teplem usmrcené borrelie. Buňky linií klíštěte IDE12 a DAE15 byly schopny z 80–90 % fagocytovat životaschopné borrelie. To znamená, že tento intracelulární symbiont nemá velký vliv na schopnost klíštěcích buněčných linií IDE12 a DAE15 fagocytovat (Mattila et al., 2007).

Borrelie je extracelulární patogen, proto v této práci byla sledována exprese vnějších povrchových proteinů především v médiu bez klíštěcích buněk (= supernatant z klíštěcích buněčných linií). Toto médium může obsahovat metabolity, které vytvářejí klíštěcí buňky.

Genom borrelií se skládá z lineárního chromozomu a z cirkulárních a lineárních plazmidů. Plazmidy nesou geny pro tvorbu proteinů vnější membrány, díky kterým jsou borrelie schopné přizpůsobovat se vnějšímu prostředí, např. změnám teploty při přechodu z přenašeče do hostitele. Mezi tyto proteiny patří např. OspA (vnější povrchový protein A), OspB a OspC. Borrelie expresují vnější povrchový protein C v těle člověka. Proteiny OspA a OspB borrelie expresují ve střední části střeva nekrmených klíšťat a jsou „downregulované“ (snížená regulace) po sání klíštěte. *Borrelia burgdorferi* s. s. a *Borrelia afzelii* expresují OspB v klíšťatech při teplotě 28 °C (Melisha et al., 2012). V této práci nebyla prokázána exprese OspB u *Borrelia burgdorferi* s. s. kmene B31 kultivované *in vitro* při 34 °C, zatímco *Borrelia afzelii* kmene CB43 expresovala OspB (prokázáno v sérii 1, 2 a 4). Nejsme si jistí, zda je tento rozdíl jen mezi kmeny B31 a CB43 nebo mezi *Borrelia burgdorferi* s. s. a *Borrelia afzelii*.

Pro růst borrelií je nejvhodnější BSK II médium, zatímco pro růst klíštěcích buněčných linií je nejvhodnější L15 médium (Obonyo et al., 1999). V této práci jsem při přípravě vzorků s borreliemi použila média pro klíštěcí buněčné linie vždy bez antibiotik. Použití antibiotik v médiu by způsobilo odumření borrelií. Při práci s těmito médii je vysoké riziko kontaminace, protože jsou velmi bohatá na živiny. V sérii 1, 2 a 4 bylo potvrzeno, že pro borrelie je vhodné BSK II médium. Poměr médií v těchto sériích neměl vliv na růst borrelií. V sérii 3 byl potvrzen fakt, že médium s klíštěcími buňkami a L15 médiem je pro borrelie méně vhodný. V této sérii borrelie žily 2 měsíce, ale nemnožily se.

Klíštěcí buněčné linie z *Ixodes ricinus* se kultivují při 28 °C a z *Ixodes scapularis* při 32 °C (Bell Sakyi et al., 2007). V této práci jsem inkubovala obě tyto buněčné linie při teplotě 28 °C a oběma těmito liniím tyto podmínky vyhovovaly, zatímco borrelie nejlépe rostou při 34 °C (Obonyo et al., 1999). Tento fakt byl potvrzen u série 1, 2 a 4, kde se borreliím kultivovaným se supernatantem z klíštěcích buněčných linií dařilo při inkubaci při 34 °C a množily se. Borrelie kultivované s médiem s klíštěcími

buňkami byly inkubovány při 28 °C (série 1 a 3) a měly by růst pomaleji. V sérii 1 jsem nebyla schopná potvrdit tento fakt, protože vzorky borrelií kultivované s klíštěcími buněčnými liniemi byly kontaminované. Borrelie s klíštěcími buněčnými liniemi v sérii 3 žily i po dvou měsících, ale jejich koncentrace se nezvyšovala. Z toho vyplývá, že borrelie kultivované bez BSK II média a při teplotě 28 °C se nemnoží, ale jsou schopny přežít až dva měsíce.

V dosavadních projektech borrelie kultivované s klíštěcími buněčnými liniemi rostly 1–7 dní. V práci Obonyo *et al.*, 1999 rostly 5–7 dnů (v médiu L15BS nebo BSK-H); Burgrysheva *et al.*, 2002 – 4 dny (v médiu BSK-H nebo L15BS); Moniuszko *et al.*, 2014 – 1, 2 nebo 3 dny (v médiu BSK-H a L15BS300); Teixeira *et al.*, 2016 – 1 den (v médiu BSK-H a L15). V této práci borrelie kultivované se supernatantem z klíštěcích buněčných linií (vzorky série 1, 2 a 4) rostly 7 dní. Vzorky série 3 rostly dva měsíce, protože byly kultivovány za nevyhovujících podmínek pro borrelie (*Borrelia afzelii* kultivovaná s médiem s klíštěcími buněčnými liniemi a médiem pro klíštěcí buněčné linie při teplotě 28 °C).

Buněčné lyzáty borrelií kultivovaných s klíštěcími buněčnými liniemi jsem zkoušela centrifugovat při 2000 rpm (série 4), nebo při 8000 rpm (série 1 a 2) po dobu 15 minut. Mezi těmito lyzáty nebyly sledovány rozdíly v expresi proteinů.

Připravila jsem buněčné lyzáty z klíštěcích buněčných linií z *Ixodes scapularis* a *Ixodes ricinus* spolu s médiem pro tyto linie s antibiotiky nebo bez nich. Nebyly sledovány žádné rozdíly v expresi proteinů mezi těmito lyzáty z klíštěcích buněčných linií.

Všechny použité metody jsou časově náročné, např. kultivace borrelií do dosažení koncentrace  $5 \times 10^7$  borrelií/ml trvá 5–7 dní, pasážování klíštěcích buněčných linií se provádí každé dva týdny a připravené vzorky rostou asi 7 dní, opět do dosažení koncentrace  $5 \times 10^7$  borrelií/ml.

V této práci jsem využívala metody pro interakce borrelií s klíštěcími buněčnými liniemi. Dalším možným krokem je separovat borrelie od klíštěcích buněčných linií (podle Obonyo *et al.*, 1999) po jejich vzájemné kultivaci a poté sledovat expresované proteiny. Strnad *et al* v roce 2015 sledovali interakce borrelií s lidskými buňkami pomocí cryo-fluorescenční a skenovací elektronové mikroskopie a touto metodou je možné sledovat interakce borrelií s klíštěcími buněčnými liniemi. Další možností je centrifugovat supernatant z klíštěcích buněčných linií s borreliemi na nižší otáčky. Dále je možné pokračovat metodou RNA sekvenování kultur borrelií klíštěcími buněčnými liniemi v

různých časových secích jejich růstu (exponenciální a stacionární fáze a fáze odumírání). Další možností je izolovat DNA borrelií a provést metodu kvantitativní polymerázové řetězové reakce (tzv. Real-time PCR), která umožňuje kvantifikaci sledovaného úseku DNA v reálném čase.

## 6. ZÁVĚR

Metoda SDS-PAGE a následné barvení pomocí Coomassie Brilliant Blue neprokázala žádné rozdíly v expresi proteinů mezi buněčnými lyzáty borrelií kultivovaných s buněčnými liniemi klíšťat. Borrelie kultivované v médiu L15 bez BSK II média se při teplotě 28 °C nemnoží. Pro kultivaci borrelií s klíštěcími buněčnými liniemi je nutno použít média BKSII a L15, která vytvářejí vyhovující podmínky pro borrelie i klíštěcí buněčné linie. *Borrelia afzelii* kmene CB43 kultivovaná s klíštěcími buněčnými liniemi z *Ixodes scapularis* a *Ixodes ricinus in vivo* při 34 °C i její pozitivní kontrola expresovala vnější povrchový protein B, zatímco *Borrelia burgdorferi* s. s. kmene B31 kultivovaná s těmito klíštěcími buněčnými liniemi za stejných podmínek tento protein neexpresovala.

## 7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Aguero-Rosenfeld, M. E., Wang, G., Schwartz, I., Wormser, G. P. (2005)** Diagnosis of Lyme borreliosis. *Clin. Microbiol. Rev* 18, 3, 484–509.
- Alberdi P., Mansfield K. L., Manzano-Roman R., et al. (2016)** Tissue-Specific Signatures in the Transcriptional Response to *Anaplasma phagocytophilum* Infection of *Ixodes scapularis* and *Ixodes ricinus* Tick Cell Lines. *Front Cell Infect Microbiol.* 10;6:20.
- Alberto A. Guglielmone, Richard G. Robbins, Dmitry A. Apanaskevich, Trevor N. Petney, Agustín Estrada-Peña, Ivan G. Horak, Renfu Shao, Stephen C. Barker (2010)** The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa.* 2528: 1–28.
- Anderson J. F., a Magnarelli L. A. (1984)** Avian and mammalian hosts for spirochete-infected ticks and insects in a Lyme disease focus in Connecticut. *Yale J Biol Med* 57(4):627–41.
- Asbrink E., Brehmer-Andersson E., Hovmark A. (1986)** Acrodermatitis chronica atrophicans--a spirochetosis. Clinical and histopathological picture based on 32 patients; course and relationship to erythema chronicum migrans Afzelius. *Am J Dermatopathol* 8:209–19.
- Balashov Y. S. (1972)** Bloodsucking ticks (*Ixodoidea*) d vectors of diseases of man and animals. *Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America* 8:161–376.
- Balmelli T., Piffaretti J. (1995)** Association between different clinical manifestations of Lyme disease and different species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Res Microbiol* 146:329–40.
- Baranton G., Postic D., Saint Girons I., Boerlin P., Piffaretti J. C., Assous M., Grimont P. A. (1992)** Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42, 378–383.
- Barbour A. G., Fish D. (1993)** The biological and social phenomenon of Lyme disease. *Science* 260:1610–1616.
- Barthold, S. W. (1998)** Spirochetes, ticks and DNA. *Parasitology Today.* 14, 11, p. 444.
- Becker N. S., Margos G., Blum H., Krebs S., Graf A., Lane R. S., Castillo-Ramírez S., Sing A., Fingerle V. (2016)** Recurrent evolution of host and vector association in



- bacteria of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato species complex. *BMC Genomics* Sep 15;17(1):734.
- Bell-Sakyi L. (2004)** Ehrlichia ruminantium grows in cell lines from four ixodid tick genera. *J. Comp. Pathol.* 130, 285–293
- Bell-Sakyi L., Zwegarth E., Blouin E. F., Gould E. A., Jongejan F. (2007)** Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research. *Trends Parasitol.* 2007 Sep;23(9):450-7.
- Bugrysheva J., Dobrikova E. Y., Godfrey H. P., Sartakova M. L., Cabello F.C. (2002)** Modulation of *Borrelia burgdorferi* stringent response and gene expression during extracellular growth with tick cells. *Infect Immun* Jun;70(6):3061-7.
- Casjens Sherwood R., Emmanuel F. Mongodin, Wei-Gang Qiu et al. (2011)** Whole-Genome Sequences of Two *Borrelia afzelii* and Two *Borrelia garinii* Lyme Disease Agent Isolates. *J Bacteriol.* 193(24): 6995–6996.
- Donahue J. G., Piesman J, Spielman A. (1987)** Reservoir competence of white-footed mice for Lyme disease spirochetes. *Am J Trop Med Hyg* 36:92–6.
- Ferrolho J., Simpson J., Hawes P., Zwegarth E., Bell-Sakyi L. (2016)** Growth of *Ehrlichia canis*, the causative agent of canine monocytic ehrlichiosis, in vector and non-vector ixodid tick cell lines. *Ticks Tick Borne Dis.* Jun;7(4):631-7.
- Fraser C. M., Casjens S., Huang WM et al. (1997)** Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 390:580–586.
- Gulia-Nuss M., Andrew B. Nuss, Jason M. Meyer (2016)** Genomic insights into the *Ixodes scapularis* tick vector of Lyme disease. *Nat Commun.* 2016; 7: 10507
- Hajdušek O., Šíma R., Ayllón N., Jalovecká M, Perner J., José de la Fuente, Kopáček P. (2013)** Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens. *Front Cell Infect Microbiol* 3: 26.
- Halouzka J., Postic D., Hubálek Z. (1998)** Isolation of the spirochaete *Borrelia afzelii* from the mosquito *Aedes vexans* in the Czech Republic. *Med Vet Entomol* 12:103–5.
- Hoogstraal H. (1985)** Argasid and nuttalliellid ticks as parasites and vectors. *Adv Parasitol* 24, 135-238.
- Hyde J. A. (2017)** *Borrelia burgdorferi* Keeps Moving and Carries on: A Review of Borrelial Dissemination and Invasion. *Front Immunol* Feb 21;8:114.
- Chroust, K., Svobodová, V., Modrý, D., Volf, J. (2001)** Veterinární arachnoentomologie. Brno: VFU Brno, 97 s.

- Jongejan F. a Uilenberg G. (2004)** The global importance of ticks. *Parasitology* 129, S3–S14.
- Krupka M., Raska M., Belakova J., Horynova M., Novotny R., Weigl E. (2007)** Biological aspects of Lyme disease spirochets: Unique bacteria of the *Borrelia burgdorferi* species group. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.*,151, 2, p. 175–186.
- Kurtti T. J., Simser J. A., Baldrige G. D., Palmer A. T., Munderloh U. G. (2005)** Factors influencing in vitro infectivity and growth of *Rickettsia peacockii* (*Rickettsiales: Rickettsiaceae*), an endosymbiont of the Rocky Mountain wood tick, *Dermacentor andersoni* (*Acari, Ixodidae*). *J. Invertebr. Pathol.* 90, 177–186.
- Kurtti, T. J. et al. (1988)** Tick tissue and cell culture in vector research. *Adv. Dis. Vector Res.* 5, 87–109.
- Lawrie C. H., Uzcátegui N. Y., Armesto M., Bell-Sakyi L., Gould E. A. (2004)** Susceptibility of mosquito and tick cell lines to infection with various flaviviruses. *Med. Vet. Entomol.* 18, 268–274.
- MacDonald A. B. (2006)** Spirochetal cyst forms in neurodegenerative disorders, hiding in plain sight. *Med Hypotheses* 67:819–32.
- Magnarelli L. A, Anderson J. F. (1988)** Ticks and biting insects infected with the etiologic agent of Lyme disease, *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol* 26:1482–6.
- Mattila J., Ulrike G. Munderloh, Timothy J. Kurtti (2007)** Phagocytosis of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, by cells from the ticks, *Ixodes scapularis* and *Dermacentor andersoni*, infected with an endosymbiont, *Rickettsia peacockii*. *J Insect Sci.* 7:58
- Melisha R. Kenedy, Tiffany R. Lenhart, Darrin R. Akins (2012)** The Role of *Borrelia burgdorferi* Outer Surface Proteins. *FEMS Immunol Med Microbiol.* Oct; 66(1): 1–19.
- Moniuszko A., Rückert C., Alberdi M. P., Barry G., Stevenson B., Fazakerley J. K., Kohl A., Bell-Sakyi L. (2014)**, Coinfection of tick cell lines has variable effects on replication of intracellular bacterial and viral pathogens. *Ticks and Tick-borne Diseases*, Volume 5, Issue 4, June, 415–422.
- Munderloh U. G. a Kurtti, T. J. (1995)** Cellular and molecular interrelationships between ticks and prokaryotic tick-borne pathogens. *Annu. Rev. Entomol.* 40, 221–243.

- Munderloh U. G., Blouin E. F., Kocan K. M., Ge N.L., Edwards W.L., Kurtti T.J. (1996)** Establishment of the tick (*Acari: Ixodidae*)- borne cattle pathogen *Anaplasma marginale* (*Rickettsiales: Anaplasmataceae*) in tick cell culture. *J. Med. Entomol.* 33, 656–664.
- Munderloh U. G., Liu Y., Wang M., Chen C., Kurtti T. J. (1994)** Establishment, maintenance and description of cell lines from the tick *Ixodes scapularis*. *J. Parasitol.* 80, 533–543.
- Obonyo M., Munderloh U. G., Fingerle V., Wilske B., Kurtti T. J. (1999)** *Borrelia burgdorferi* in tick cell culture modulates expression of outer surface proteins A and C in response to temperature. *J Clin Microbiol.* Jul;37(7):2137-41.
- Parker J. L. a White K. K. (1992)** Lyme borreliosis in cattle and horses: a review of the literature. *Cornell Vet* 82:253–74.
- Piesman J. a Schwan T. G. (2010)** *Borrelia*: Molecular Biology, Host Interaction, and Pathogenesis (eds Samuels, D. S. & Radolf, J. D.) 251–278 (Caister Academic, Norfolk, UK).
- Radolf Justin, Melissa J. Caimano, Brian Stevenson and Linden T. Hu. (2012)** Of ticks, mice and men: understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes, *Nat Rev Microbiol.* 9;10(2):87-99.
- Rosa Patricia A., Kit Tilly a Philip E. Stewart (2005)** The burgeoning molecular genetics of the lyme disease spirochaete, *Nat Rev Microbiol.* Feb; 3(2):129-43.
- Rudenko N., Golovchenko M., Grubhoffer L., Oliver JH Jr. (2011)** Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. *Ticks Tick Borne Dis* 2(3); 123- 128.
- Schwan T. G., Piesman J., Golde W. T., Dolan M. C., Rosa P. A. (1995)** Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. *Proc Natl Acad Sci* 92:2909–13.
- Steele A. C. (2001)** Lyme disease. *N Engl J Med* 345(2):115–25.
- Stewart Philip E., Rebecca Byram, Dorothee Grimm et al. (2005)** The plasmids of *Borrelia burgdorferi*: essential genetic elements of a pathogen. *Plasmid* 53 1–13.
- Strnad M., Elsterová J., Schrenková J., Vancová M., Rego R. O., Grubhoffer L., Nebesářová J. (2015)** Correlative cryo-fluorescence and cryo-scanning electron microscopy as a straightforward tool to study host-pathogen interactions. *Sci Rep.* Dec 10;5:18029.

- Sun Y., Xu R. (2003)** Ability of *Ixodes persulcatus*, *Haemaphysalis concinna* and *Dermacentor silvarum* ticks to acquire and transstadially transmit *Borrelia garinii*. *Exp. Appl. Acarol.* 31 (1-2): 151–60.
- Takayama K., Rothenberg R. J., Barbour A. G. (1987)** Absence of lipopolysaccharide in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 55:2311–3.
- Tälleklint L. a Jaenson T. G. (1994)** Transmission of *Borrelia burgdorferi* s. l. from mammal reservoirs to the primary vector of Lyme borreliosis, *Ixodes ricinus* (*Acari:Ixodidae*), in Sweden. *J. Med. Entomol.* 31:880-886.
- Teixeira R. C., Baêta B. A., Ferreira J.S., Medeiros R.C., Maya-Monteiro C.M., Lara F.A., Bell-Sakyi L., Fonseca A.H. (2016)** Fluorescent membrane markers elucidate the association of *Borrelia burgdorferi* with tick cell lines. *Braz J Med Biol Res.* Jun 20;49(7).
- Tilly Kit, Patricia A. Rosa, Philip E. Stewart (2008)** Biology of Infection with *Borrelia burgdorferi*. *Infect Dis Clin N Am* 22 217–234.
- Treib J., Grauer M. T., Haass A., Langenbach J., Holzer G., Woessner R. (2000)** Chronic fatigue syndrome in patients with Lyme borreliosis. *Eur Neurol* 43:107–9.
- van Duijvendijk G., Coipan C., Wagemakers A., Fonville M., Ersöz J., Oei A., Földvári G., Hovius J., Takken W., Sprong H. (2016)** Larvae of *Ixodes ricinus* transmit *Borrelia afzelii* and *B. miyamotoi* to vertebrate hosts. *Parasit Vectors* 9:97.
- Varma M. G. R. (1989)** Progress in the study of human and animal pathogens in primary and established tick cell lines. *In Invertebrate Cell System Applications* (Vol. 2) (Mitsubishi, M., ed.), In pp. 119–128.
- Varma M. G. R., Pudney M., Leake C. J. (1975)** The establishment of three cell lines from the tick *Rhipicephalus appendiculatus* (*Acari:Ixodidae*) and their infection with some arboviruses. *J. Med. Entomol.* 11, 698–706.
- Yunker, C. E. (1987)** Preparation and maintenance of arthropod cell cultures: Acari, with emphasis on ticks. *In Arboviruses in Arthropod Cells in Vitro* (Vol. 1) In pp. 35-51.