

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Porovnání promotorů pro využití v klíštěcím (*Ixodes*)
expressním systému**

Diplomová práce

Bc. Johana Mustacová

Vedoucí práce: RNDr. Ján Štěrba, Ph.D.

Školitel specialista: Mgr. Kateryna Kotsarenko, Ph.D.

České Budějovice 2021

Mustacová, J., 2021: Porovnání promotorů pro využití v klíštěcím (*Ixodes*) expresním systému. [Comparison of promoters for usage in *Ixodes* tick expression system. Mgr. Thesis, in Czech] – 64 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

Gene manipulation can be a convenient tool for tick control, however functional procedure for gene manipulation of ticks was not determined yet. The creation of plasmid vectors with high ability of gene expression driven by functional promoters is crucial for genetically modified ticks. To investigate effective tools for tick genes manipulation within the scope of this master thesis, transfection procedures for various types of *Ixodes* tick cell lines were optimized. As well as expression vectors for use in tick cells were tested. For this purpose, expression plasmid vectors containing luciferase reporter genes driven by eukaryotic and viral promoters were used.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích, 14. 4. 2021

.....

Bc. Johana Mustacová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce Mgr. Kateryně Kotsarenko, Ph.D. za veškerý čas, který mi věnovala při vypracovávání mé práce. Především pak za její odborné vedení a ochotu zodpovídat mé otázky. Rovněž děkuji vedoucímu mé práce RNDr. Jánů Štěrbovi, Ph.D. za možnost vypracovat diplomovou práci pod jeho vedením a možnost být součástí Laboratoře aplikované biochemie.

Dále bych ráda poděkovala všem ostatním členům laboratoře za příjemné pracovní prostředí, zejména pak RNDr. Pavlíně Věchtové, Ph.D. za poskytnuté cenné rady a pomoc ohledně mé práce.

Velký dík patří také mé rodině za jejich podporu během celého mého studia.

Obsah

1	ÚVOD	1
1.1	Klíšťata rodu <i>Ixodes</i>	2
1.1.1	<i>Ixodes ricinus</i>	2
1.1.2	<i>Ixodes scapularis</i>	4
1.2	Klíštěcí genom	4
1.3	Genetická manipulace s klíšťaty	6
1.4	Klíštěcí buněčné linie	7
1.5	Promotory využitelné v klíštěcích buňkách	8
1.5.1	Promotory získané na základě genomové DNA klíšťat	9
1.5.2	Promotory původem z jiných organismů a virové promotory	10
1.6	Expresní vektory a metody transfekce využitelné v klíštěcích buňkách	11
2	CÍL PRÁCE	14
3	MATERIÁL A METODY	15
3.1	Mikroskopování klíštěcích buněk	15
3.2	Použité plazmidy	15
3.3	Transformace bakterií	17
3.4	Izolace plazmidů	17
3.5	Kultivace klíštěcích buněk	18
3.6	Transfekce	18
3.6.1	Transfekce klíštěcích buněk	18
3.6.2	Transfekce lidských buněk DAOY	20
3.7	Měření fluorescence a luminiscence	21
3.8	Izolace RNA pro PCR a RT-PCR	21
3.9	Syntéza cDNA	22
3.10	Navržení primerů	22
3.11	PCR	23

3.12	qRT-PCR.....	23
4	VÝSLEDKY.....	25
4.1	Optimalizace transfekce pro eukaryotické buňky	25
4.2	Transfekce ISE6 pomocí různých transfekčních činidel.....	26
4.3	Transfekce buněk s plazmidy pRSET a phMGFP	29
4.4	Transfekce různých IRE buněčných linií s různými transfekčními činidly	30
4.5	Transfekce různých IRE buněčných linií pomocí elektroporace	32
4.6	Transfekce různých buněčných linií s různým poměrem transfekčního činidla	33
4.7	Transfekce IRE buněčných linií plazmidem pRm-DualLuc	37
4.8	Transfekce klíčecích buněk plazmidem SP-dCas9-VPR-hPGK	38
4.9	Morfologie klíčecích buněk.....	39
5	DISKUSE	40
6	ZÁVĚR	47
7	SEZNAM ZKRATEK.....	48
8	REFERENCE	49

1 ÚVOD

Klíšťata jsou řazena mezi hematofágní parazity. Jsou známa především jako vektory mnoha patogenů, kterými jsou v České republice například některé druhy borrelií či virus klíšťové encefalitidy [1]. Infekční onemocnění způsobená těmito agens představují zdravotní hrozby nejen pro člověka, ale i pro zvířata. Zároveň mají i nepříznivé ekonomické dopady z hlediska ztrát v živočišné výrobě [2].

V současnosti je k dispozici mnoho metod, kterými se dá regulovat množství a výskyt klíšťat [3]. Mezi ně patří například různé repelenty či tzv. akaricidy. Problémem akaricidů je nejen znečištění životního prostředí, vznik kontaminace, ale především nárůst rezistence u klíšťat vůči nim [4]. Proto se nabízí další, šetrnější východisko v boji s tímto parazitem, a tím jsou metody z oblasti molekulární biologie jako například genetická manipulace s klíšťaty. Ta zároveň pomůže porozumět procesu přenosu parazitárních onemocnění klíšťaty či funkci různých klíštěcích genů.

Genetická modifikace členovců se již osvědčila jako úspěšný nástroj například k regulaci množství komárů *Aedes aegypti*. Výsledkem byl pokles populací komárů ve studované oblasti, a tudíž i předpoklad, že by využití genetických modifikací mohlo sloužit jako prevence před nemocemi přenášených komáry [5; 6]. Vytvoření transgenních klíšťat je proto považováno za potenciální funkční nástroj ke kontrole klíšťat a jimi přenášených nemocí. Zároveň možnost využití metod genetického inženýrství na klíšťatech může posloužit jako nástroj pro výrobu klíštěcích rekombinantních proteinů přímo v klíštěcích buňkách, čímž proteiny získají nativní pottranslační modifikace [7].

Doposud byla nejvíce používanou metodou ke genetické manipulaci klíšťat RNA interference. Ta byla uplatněna při charakteristice specifických antigenů, pro zjištění funkcí vybraných genů klíšťat či fungování interakce klíště-hostitel. RNAi však nebyla použita jako hlavní metoda přímo k ovládnutí klíštěcího genomu [8]. Jako důvod se dá považovat to, že pomocí RNAi nelze docílit stoprocentního snížení exprese genu. Často s sebou nese vedlejší účinky v podobě off-targetové aktivity a tím pádem její účinnost společně s výsledky nejsou předvídatelné. Zároveň RNAi způsobí pouze přechodné potlačení genové exprese [9]. Pokud bychom chtěli docílit trvalé změny DNA, vložení cizího genu do klíštěcího genomu či se věnovat podrobnějšímu výzkumu genomu a chromozomálních struktur u klíšťat, jeví se jako vhodnější metoda CRISPR/Cas9.

K použití CRISPR/Cas9 systému, zde konkrétně k vytvoření geneticky modifikovaných klíšťat, je za potřebí efektivních promotorů, získaných nejlépe z klíšťat samotných. Na základě dostupné literatury zabývající se problematikou klíšťecích promotorů [10; 11] byly vyhledány potencionální funkční promotory a vektory a použity v experimentální části této práce.

1.1 Klíšťata rodu *Ixodes*

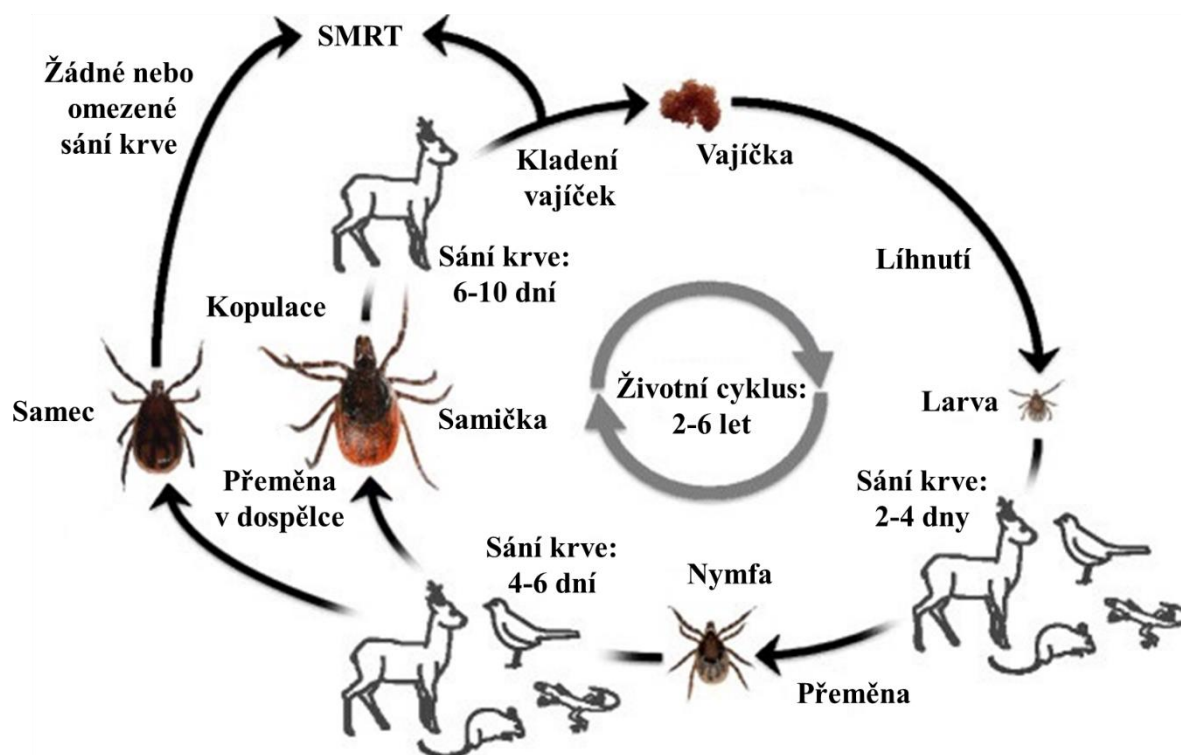
Klíšťata jsou krevsající členovci, jejichž rozšíření je téměř celosvětové [12]. Taxonomické zařazení klíšťat dle Nava a kol. (2009) je následovné: kmen členovci (Arthropoda), třída pavoukovci (Arachnida), podtřída roztoči (Acari), řád Parasitiformes, podřád klíšťatovci (Ixodida) [13]. Podřád Ixodida se dělí především do dvou čeledí, „tvrdá“ klíšťata Ixodidae a klíšťáci Argasidae, mnohdy nesprávně uváděni jako „měkká“ klíšťata. Třetí čeleď je ne moc známá Nuttalliellidae, která je zastoupena jen jedním druhem. Dohromady bylo doposud popsáno téměř 900 druhů klíšťat [14].

1.1.1 *Ixodes ricinus*

Rod *Ixodes* obsahuje celkem 243 druhů [14], přičemž v Evropě je nejrozšířenějším druhem *Ixodes ricinus* [15]. Jeho poměrně velká geografická distribuce napříč Evropou znamená, že tento druh je schopný přežít v různém prostředí. Nejčastějším stanovištěm *I. ricinus* jsou listnaté, jehličnaté a smíšené lesy, pastviny nebo městské parky. Zároveň se jedná o druh citlivý na klimatické podmínky. Jeho výskyt závisí na vlhkém mikroklimatu, a proto je omezen na oblasti se středními až vysokými srážkami a vegetací, která je schopna udržovat vlhkost [16; 17]. V rámci životního cyklu vystřídá *I. ricinus* čtyři vývojová stádia: vajíčko, larva, nymfa a dospělec. Zároveň u *I. ricinus* probíhá tzv. tříhostitelský životní cyklus, který se vyznačuje tím, že každé vývojové stadium má svého specifického hostitele. Larvy a nymfy mohou mít hostitele různých velikostí, ale zejména parazitují na malých savcích, ptácích nebo ještěrech, zatímco dospělci preferují větší savce, například velkou zvěř či dobytek; člověk je pouze náhodným hostitelem. Životní cyklus trvá zhruba dva až tři roky, záleží však na klimatických podmínkách [16; 17].

Mimo jiné jsou klíšťata druhu *I. ricinus* vektory pro člověka nebezpečných onemocnění, kterými jsou virus klíšťové encefalitidy a onemocnění bakteriálního původu lymeská borelióza [1]. Za rok 2019 bylo v České republice dle Státního zdravotního ústavu nahlášeno 774 případů nákazy virem klíšťové encefalitidy. V průběhu let 2015 až 2019 vzrostla nemocnost klíšťovou encefalitidou v přepočtu na 100 000 obyvatel téměř dvojnásobně [18].

Poslední data o epidemiologické situaci lymeské borreliózy na území České republiky jsou dostupná z roku 2018, a to 4724 nahlášených případů za rok [19].



Obr. 1: Grafické znázornění životního cyklu klíštěte *I. ricinus*, převzato a upraveno z Herrmann a Gern (2015) [20].

Rovněž byla u *I. ricinus* prokázána přítomnost jiných, méně známých patogenů, jako je například *Anaplasma phagocytophilum*, původce lidské granulocytární anaplazmózy a ehrlichiozy [17]. Dále je *I. ricinus* vektorem zoonotických onemocnění, například babesiozy [17], která má ve světovém měřítku především negativní dopad na produkci dobytka [12]. Právě z důvodu přenosu různých druhů patogenů je *I. ricinus* společně s ostatními klíšťaty objektem zájmu odborníků i veřejnosti.

V přenosu patogenů z klíšťat do hostitele hrají důležitou roli sliny a slinné žlázy klíšťat. Klíštěcí sliny obsahují soubor farmakologicky aktivních látek, zejména bioaktivních lipidů a množství různých proteinů, které napomáhají ke snadnějšímu sání krve z hostitele a zároveň regulují hemostázu, rozvoj zánětu a imunitní odpověď hostitele [21; 22]. Tyto vlastnosti umožňují nerušené sání klíšťat a zároveň usnadňují přenos patogenů, jejichž je klíště vektorem. Výzkum klíštěcích slin má potenciální využití v humánní medicíně jako součást vakcíny proti klíšťatům [23], či ve vývoji nových terapeutik [24].

1.1.2 *Ixodes scapularis*

Druh klíštěte *Ixodes scapularis* se vyskytuje zejména v oblasti severní Ameriky [25], konkrétně v severovýchodní části USA a jihovýchodní části Kanady. Zároveň je v průběhu let zaznamenáván neustálý nárůst rozšíření tohoto druhu [26]. *Ixodes scapularis* se vyskytuje především v lesních stanovištích a křovinách. Klimatické podmínky vyžaduje obdobné jako *I. ricinus*, a to především vlhké oblasti; právě z tohoto důvodu nebylo v USA zaznamenáno jeho rozšíření ve vyprahlých částech Skalnatých hor a Horských států [27]. Vývojová stádia během životního cyklu jsou: vajíčko, larva, nymfa a dospělec [25]. Stejně jako *I. ricinus* vystřídá *I. scapularis* během svého životního cyklu tři druhy hostitelů. Člověk je pro *I. scapularis* pouze náhodným hostitelem [28]. Larvy a nymfy parazitují především na malých a středně velkých savcích, příležitostně na ptácích, ještěrech či velkých savcích. Dospělci parazitují většinou na větších savcích, častým hostitelem je zejména jelenec běloocasý [28]. Životní cyklus může trvat 2 až 4 roky [29]. Klíšťata druhu *I. scapularis* jsou vektory celkem sedmi významných lidských patogenů – pěti bakteriálních (*A. phagocytophilum*; *Borrelia burgdorferi*, *Bo. mayonii* a *Bo. miyamotoi*; *Ehrlichia muris euclarensis*), parazitického prvoka *Babesia microti* a viru Powassan [27].

1.2 Klíštěcí genom

U klíšťat nebylo dosud provedeno sestavení celého referenčního genomu, který by byl vysoce kvalitní. Z tohoto nedostatku pramení i vznik konsorcia s názvem 1000 *Ixodes* Genomes, které si dalo za cíl osekvenování klíštěcího genomu v lepší kvalitě [30].

Prvním částečně osekvenovaným genomem klíštěte byl jaderný genom druhu *I. scapularis* [31]. Genom je velký – 2.1 Gbp [32] a obsahuje vysoké množství repetice, právě z tohoto důvodu byla jeho sekvenace náročná. Jelikož se jedná o zatím jediný publikovaný genom pro klíštěcí druh, může fungovat jako vhodný zdroj pro srovnávací genomové analýzy. Znalost klíštěcího genomu přispívá k pokroku v porozumění interakcím mezi klíštětem a patogenem, a parazitickým procesům, které jsou pro klíšťata unikátní [33]. Mimo jiné byl částečně osekvenován genom buněčné linie ISE6 původem z *I. scapularis* [34].

V nedávné době byla uvedena publikace srovnávací genomy šesti druhů tvrdých klíšťat s cílem objasnit jejich genetickou rozmanitost, strukturu populace a distribuci patogenů. Takto byly zkoumány druhy klíšťat vyskytující se především v Číně a východní Asii [35].

Dále proběhly snahy o sekvenaci dalších, pro člověka a zvířata klinicky významných druhů klíšťat, jako jsou například *Rhipicephalus microplus* [36] či *I. ricinus* [37], který je hlavním vektorem patogenů přenášených klíšťaty v Evropě. Sekvence druhu *I. ricinus* proběhla *de novo*, a to pouze částečně. Konkrétně šlo o sekvenaci střední části střeva, kdy byly podle odhadu zjištěny přibližně dvě třetiny genomu, které jsou unikátní právě pro tento druh. Mimo jiné bylo zjištěno, že 89 % doposud osekvenovaného genomu je homologní s genomem příbuzného *I. scapularis* [37]. Následně byla za použití sekvenování třetí generace tato známá sekvence rozšířena o sousední části. Tato studie byla zaměřena především na kódující oblasti genomu, zároveň byla odhadnuta celková velikost genomu *I. ricinus* – přibližně 2.65 Gbp [38].

Data o genomu *I. ricinus* nejsou stále kompletní, nicméně genovou expresi u tohoto parazita zkoumalo několik studií [37; 39; 40; 41]. Většina těchto studií se soustředila zejména na genovou expresi během sání krve, tudíž byla zkoumána genová exprese především v klíštěcích slinných žlázách [39] nebo ve středním střevě [37], a to kvůli tomu, že tyto orgány jsou důležité při přenosu patogenů. Nejnovější studie sledovaly změny genové exprese nejen na úrovni specifických tkání a orgánů, ale i na úrovni celého organismu [42]. Zároveň byly sledovány vývojově specifické transkripty pro jednotlivé fáze životního cyklu *I. ricinus* [43]. Současně byla provedena sekvence transkriptomů *I. ricinus* získaných z různých životních stádií organismu a identifikace procesů specifických pro tyto jednotlivé životní fáze [43]. Například bylo potvrzeno, že transkriptom *I. ricinus* obsahuje kompletní sadu genů pro metylaci DNA. [44]. Díky znalosti transkriptomu se zpřesňují dostupné informace o genomu a transkripci genů *I. ricinus*. To může zároveň napomoci k identifikaci genů nezbytných pro fyziologické procesy klíšťat, a tudíž i k vývoji nových strategií pro kontrolu šíření a aktivity klíšťat.

Studium klíštěcího genomu je tedy stále aktuálním tématem, které přispívá k celkovému porozumění klíšťat a jejich interakcí s hostiteli či patogeny. Znalost genomu pravděpodobně napomůže ke kontrole a snížení rizik u klíšťaty přenášených patogenů. Zároveň mohou být klíšťata potenciálním zdrojem nových farmaceutik [45]. Chybějící data o klíštěcím genomu tudíž značně omezují studium tohoto významného vektoru.

1.3 Genetická manipulace s klíšťaty

Genetickou manipulací se rozumí cílená úprava genomu daného organismu za použití biotechnologií.

U některých druhů klíšťat probíhala genetická manipulace především prostřednictvím využití RNAi [8]. RNAi byla použita hlavně za účelem analýzy biologických funkcí klíšťat a charakteristiky vztahu mezi klíštětem a klíšťaty přenášených patogenů [46; 47], nikoli jako nástroj k provádění změn v genomu. RNAi slouží zejména k post-transkripčnímu umlčení genové exprese či přechodnému potlačení exprese genu bez změny genetického kódu [48].

V pokusech, které měly za cíl exogenní přenos genu do klíštěcích buněčných linií embryonálního původu ISE6 a BME26, byl použit *Sleeping Beauty* transpozon [49; 50]. Další exprese transgenů v klíštěcích buňkách, konkrétně v buněčné linii BME/CTVM2, byla zprostředkována pomocí *Agrobacterium tumefaciens* [51]. Tyto nástroje ale rovněž neslouží k přímé editaci genomu, nýbrž k navození mutací či k vložení sekvencí transgenní DNA do daného organismu [52; 53].

Přímá editace genomu je obecně u eukaryotických organismů prováděna za pomoci technik, kterými jsou zinc finger nukleázy (ZFN), transcription activator-like effector nukleázy (TALEN) či CRISPR/Cas9 [54]. Jedná se o upravené endonukleázy, které jsou navrženy tak, aby při jejich použití došlo k vazbě přímo na požadovanou sekvenci DNA, kde díky nukleázové aktivitě dojde ke zlomům dvouřetězcové DNA. Takto poškozená DNA je opravena pomocí rekombinačních opravných mechanismů, které tak zanechávají požadované modifikace v cílených genech [55]. Nicméně žádná z výše zmíněných technik dosud nebyla aplikována na klíšťatech. Pokud bychom chtěli provést přímou editaci klíštěcího genomu, je nutné využít uvedené nástroje. V posledních letech je v porovnání s ostatními upřednostňován systém CRISPR/Cas9, a to kvůli své relativně jednodušší proveditelnosti nebo ceně [56]. Kromě toho byla již efektivita tohoto nástroje ověřena u mnoha členovců [57], zejména u hmyzu – u komárů [58; 59] či octomilek [60]. Jako jediný z podtřídy roztočů byl pomocí CRISPR/Cas9 upraven genom druhu *Tetranychus urticae* [61]. S potvrzením hypotézy, že metoda CRISPR/Cas9 může být použita k cílené mutagenezi u roztočů by se dalo předpokládat, že použití metody CRISPR/Cas9 by mohlo být úspěšné například i u klíšťat.

Nicméně pro účinnou genovou manipulaci s klíšťaty je nutné nalezení promotorů, které budou jednak získané z klíšťat samotných, a zároveň budou funkční *in vitro* v klíštěcích buňkách, potažmo v klíšťatech *in vivo*.

1.4 Klíštěcí buněčné linie

Na základě mnoha zveřejněných publikací zabývajících se problematikou klíštěcích buněčných linií [62] lze usoudit, že klíštěcí buněčné linie začaly být více používány jako nástroj k výzkumu především v posledním desetiletí. Použití klíštěcích buněčných linií slouží ke studiu biologie klíšťat a jimi přenášených patogenů, kde je zkoumán především účinek těchto patogenů na životaschopnost daných buněk [63; 64]. Dále byly klíštěcí buněčné linie použity například k proteomické analýze [65]. Klíštěcí buněčné linie jsou zároveň potencionálním vhodným nástrojem pro genetickou manipulaci s klíšťaty, a to zejména pro stabilní a přechodnou transfekci [7; 49; 51; 66] a využití reportérového systému v rámci klíštěcích buněk [10].

V současnosti je k dispozici přes 40 klíštěcích buněčných linií, a to z třinácti druhů čeledi Ixodidae a jednoho druhu z čeledi Argasidae [64]. První kontinuální buněčné linie z tvrdých klíšťat (Ixodidae) byly založeny v 70. letech minulého století, a to zejména za účelem jejich infikování vybranými viry [64; 67]. První publikace o použití buněčné linie z klíšťat rodu *Ixodes* byla vydána v roce 1993; zde byly použity buněčné linie IDE1, 8 a 12 z druhu *Ixodes dammini* [68], který začal být později synonymizován s *I. scapularis*. V následujícím roce byla vydána publikace popisující založení těchto buněčných linií a založení dalších *Ixodes* buněčných linií pojmenovaných ISE (ISE5 a 18). V této studii byly zároveň optimalizovány podmínky pro růst a kryoprezervaci klíštěcích buněk [69]. Dále bylo zaznamenáno první použití buněčné linie ISE6 [70]. Z druhu *I. ricinus* jsou v databázi The Tick Cell Biobank [63] dostupné tři buněčné linie: IRE11 [71], IRE/CTVM19 a IRE/CTVM20 [64]. V průběhu let se počet buněčných linií pocházejících z různých druhů klíšťat značně rozrostl, rovněž vzrostl počet mikroorganismů a virů, které byly v buněčných liniích množeny [64].

Většina dostupných klíštěcích buněčných linií je původem z embryonálních buněk klíšťat a všeobecně lze říct, že klíštěcí buněčné kultury mohou obsahovat dva nebo více buněčných typů [64; 69]. Buňky rostou v savčím médiu doplněném o savčí sérum při teplotách v rozmezí 28 °C až 34 °C, pH prostředí není přímo stanovené a může se lišit. Obecně nejsou klíštěcí buňky vysoce adherentní a rostou spíše ve formě monovrstvy a suspenze. Buněčné dělení probíhá pomalu, proto se udržují mezi jednotlivými pasážemi relativně dlouhé intervaly.

Nutno dodat, že klíštěcí buněčné linie se mohou vyznačovat vysokou životností a při pravidelné výměně média mohou přežít až několik let [64]. Zároveň pro klíštěcí buňky není doporučena kryoprezervace za účelem krátkodobého uskladnění, tudíž se obecně upřednostňuje dlouhodobá kultivace a udržování buněk za pomoci pasážování [72].

Ačkoliv je zřejmé, že použitím buněčných linií nelze nahradit celý organismus, je použití klíštěcích buněčných linií *in vitro* přístupnější, levnější a etičtější alternativou pro *in vivo* klíštěcí modely. Zároveň jsou klíštěcí buněčné linie také vhodným nástrojem pro studium buněčných a molekulárně-biologických mechanismů u klíšťat [73].

Při používání klíštěcích buněk jako modelového systému je však nutno brát v potaz, že se nejedná o stabilní model, jakým jsou například některé savčí buněčné linie, a to zejména kvůli jejich fenotypové a genotypové heterogenitě [64]. Byly například zaznamenány změny v karyotypu klíštěcích buněk, které byly dlouhodobě kultivovány [74]. Změny v karyotypu klíštěcích buněčných linií mohou být jedním z důsledků nemožnosti reprodukovat určité pokusy či mohou vést k dezinterpretaci výsledků [75].

1.5 Promotory využitelné v klíštěcích buňkách

Jedním z prvních kroků k efektivní integraci exogenní DNA do klíštěcích buněk s použitím metod pro genovou manipulaci je nalezení funkčního promotoru. Dále je důležitá optimalizace a vyvinutí protokolů pro efektivní transfekci klíštěcích buněčných linií. Rovněž je nutné nalezení vhodného expresního vektoru – plazmidu obsahujícího reportérový gen, či virového vektoru.

Promotorem se rozumí sekvence DNA, která je situována na 5' konci protein kódující sekvence DNA vlákna. Funkcí promotoru je definovat místo, kde započne transkripce genu, respektive kde se na sekvenci naváže RNA polymeráza společně s transkripčními faktory. Jedná se tedy o sekvenci, která má klíčovou roli v transkripci genu. Délka promotorové sekvence se různí, zpravidla se ale jedná o sekvence délky 100 až 1000 bp [76].

Z hlediska možnosti regulace funkce promotoru můžeme rozdělit promotory na konstitutivní a indukibilní. Za přítomnosti konstitutivního promotoru probíhá exprese genu vždy, nezávisle na okolních faktorech. Naproti tomu indukibilní promotory jsou ty, které lze regulovat například chemicky (jsou regulovány přítomností či nepřítomností chemické látky, např. alkoholu, antibiotik, hormonů, zdrojů uhlíku) či fyziologicky (např. regulace v závislosti na teple, světle) [77].

Studie zabývající se promotory, které by mohly být využitelné v klíčících buňkách se soustředily zejména na studium promotorů u klíčících buněčných linií *I. scapularis* či *R. microplus* [7; 10; 11]. Byly zkoumány, jak promotory jejichž sekvence byla získaná z genomové DNA klíšťat [7; 10; 11; 51; 78], tak promotory, které byly funkční v jiných organismech [10; 49; 51; 50].

1.5.1 Promotory získané na základě genomové DNA klíšťat

Promotorové sekvence původem z klíčící DNA zkoumalo několik studií. Tuckow a Temeyer (2015) zvolili pro svou práci promotor pro elongační faktor 1α (EF- 1α) a promotor pro ribozomální protein L4 (rpL4). Promotory pro tyto geny byly zvoleny zejména kvůli tomu, že oba geny jsou důležité při translaci a proteosyntéze v eukaryotických organismech a exprese těchto genů byla zaznamenána napříč všemi vývojovými stádii *R. microplus*. Získání promotorů bylo provedeno z gDNA *R. microplus* na základě bioinformatické analýzy dostupných cDNA sekvencí [10].

Kusakisako a kol. (2018) využil ve své studii promotory pro gen aktin (HAct) a ferritin1 (HIFer1) získané z gDNA klíčícího druhu *Haemaphysalis longicornis* [11]. Gen pro aktin byl vybrán z toho důvodu, že proteiny kódované tímto genem se nacházejí téměř ve všech eukaryotických buňkách. Zároveň bylo již dříve ověřeno, že sekvence promotoru pro aktin vykazuje vysokou míru exprese cizích genů u jiných organismů, např. u *Drosophila melanogaster* [79]. Gen pro vnitrobuněčný ferritin1 kóduje protein, který funguje v uskladňování železa. Tento protein je u *H. longicornis* konstantně exprimován, jelikož klíšťata jsou vystavena vysokému množství železa během sání krve [80]. Pro získání sekvence těchto promotorů bylo nutné provést bioinformatickou analýzu známé cDNA příslušných genů, vytvoření vhodných primerů a následně jejich použití s gDNA izolované z *H. longicornis*. Efektivita těchto promotorů byla testována na buněčné linii ISE6, jelikož pro druh *H. longicornis* neexistují dostupné buněčné linie. Ve studii je uvedeno, že reportérové geny pod promotorem HAct vykazovaly určitou míru exprese, tudíž se dá předpokládat, že bude mít vysokou promotorovou aktivitu. Naproti tomu, buňky obsahující vektor s HIFer promotorem nevykazovaly žádnou genovou expresi [11]. Funkce promotoru pro gen ferritin1 byla dále ověřena ve studii Hernandez a kol. (2019). Tato studie byla zaměřena na inducibilní systém genové exprese, kdy byla funkce promotoru HIFer1 indukována v buňkách ISE6 přidáním síranu železnatého a následně pozorována zvýšená exprese reportérového genu [7].

Machado-Ferreira a kol. (2015) použil ve své studii tzv. PBm promotor, promotor genu pro pyrethroid metabolizující esterázu (*CzEst9*) z *R. microplus* [51]. Tento promotor byl detekovaný při studiu struktury a exprese genu *CzEst9* v populaci klíštěte *R. microplus* rezistentního na pyrethroidové akaricidy [81]. Bylo prokázáno, že promotor PBm je schopný vést transgenní expresi v buněčné linii BME/CTVM2 a *in vivo* u *R. microplus* a *I. scapularis* [51].

Naranjo a kol. (2013) ve své studii charakterizovali strukturu a regulaci genu pro subolesin u klíštěte *I. scapularis* a zároveň lokalizovali promotor genu pro tento protein. V této studii byl daný promotor získán z DNA izolované z buněčné linie ISE6. Subolesin hraje u klíšťat roli v genové expresi, vrozené imunitní odpovědi a působí na infekce, kterými může být klíště napadeno. Zároveň bylo zjištěno, že potlačení exprese tohoto genu ovlivnilo klíštěcí biologické procesy [78].

1.5.2 Promotory původem z jiných organismů a virové promotory

Tuckow a Temeyer (2015) a Kusakisako a kol. (2018) použili ve svých studiích promotor pro lidskou fosfoglycerát kinázu hPGK, který byl součástí komerčně prodáváného plazmidu [10; 11]. Tento promotor úspěšně spouštěl genovou expresi u buněčné linie BME26. HPGK promotor se ukázal být efektivnější ve spouštění genové exprese u klíšťat v porovnání s ostatními promotory včetně těch izolovaných z gDNA klíšťat [10]. Rovněž bylo zjištěno, že HIAct a hPGK mají u buněk ISE6 téměř stejnou promotorovou aktivitu [11]. Dále Tuckow a Temeyer (2015) použili virový promotor HSV-TK (promotor pro herpes simplex virus thymidinkinázu), nicméně reportérový gen pod jeho vedením vykazoval nízkou expresi srovnatelnou s klíštěcím rpL4.

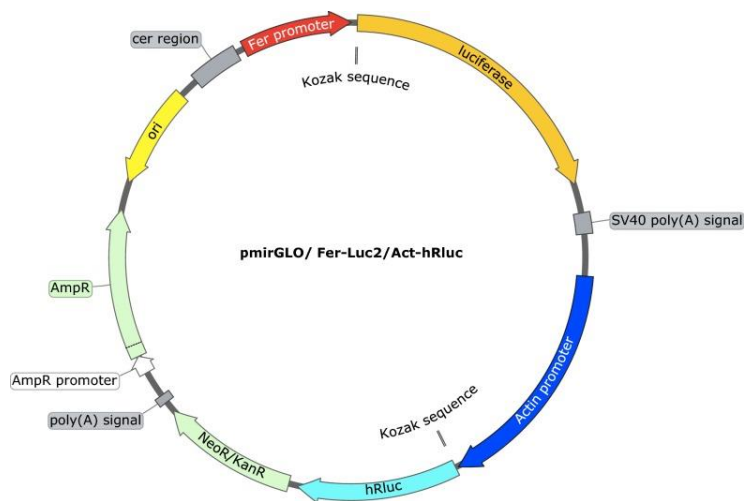
Kurtti a kol. (2008) použili pro transgenní expresi v klíštěcích buňkách ISE6 plazmid obsahující promotor CAGGS, který byl hybridem kuřecího β aktin promotoru a virového CMV promotoru (promotor pro cytomegalovirus), a plazmid s promotorem opičího viru 40 (Simian virus 40, SV40). Reportérové geny pod těmito promotory vykazovali v klíštěcích buňkách expresi [49]. Zároveň bylo prokázáno, že aktivita promotoru HIAct získaného z klíštěcí gDNA byla nižší než aktivita kuřecího β aktin promotoru. Oba promotory byly zaklonovány do identického plazmidového základu pocházejícího z plazmidu pCAAGS. Dle autorů mohl být rozdíl promotorových aktivit v tomto případě zapříčiněn problémem s kompatibilitou mezi HIAct promotorovou sekvencí a faktory spojenými s genovou expresí v plazmidu pCAGGS [11]. Promotor CAGGS byl rovněž použit pro expresi reportérového

genu ve studii Esteves a kol. (2008) u klíštěcích buněk BME26. Zároveň se ve společném konstruktů nacházel CMV promotor, který vedl genovou expresi genu pro transposázu, v buňkách probíhala přechodná exprese reportérového genu [50]. Na základě těchto studií lze vyvodit, že promotor kuřecího β aktinu a jeho obměny jsou funkční v klíštěcích buněčných liniích.

Machado-Ferreira a kol. (2015) použili ve své studii 35S promotor pro virus mozaiky kvěťáku a SV40 promotor. Prokázalo se, že oba promotory úspěšně vedly transgenní expresi u klíštěcí buněčné linie BME/CTVM2 *in vitro* a klíšťat *in vivo* v larvách *R. microplus* a *I. scapularis* [51].

1.6 Expresní vektory a metody transfekce využitelné v klíštěcích buňkách

Volbou vhodného expresního vektoru u klíštěcích buněk (respektive linie ISE6) se ve své studii zabývají např. Kusakisako a kol. (2018), kde bylo otestováno několik komerčně dostupných vektorů. Jako nejefektivnější vektory se ukázaly plazmidy pmirGLO a pCAGGS [11]. Plazmid pmirGLO prokázal vysokou efektivitu u klíštěcích buněk BME26 (linie z *R. microplus*) [10], stejně tak jako plazmid pCAGGS, který byl u této klíštěcí buněčné linie rovněž úspěšný [50]. Jako reportérové geny byly v různých expresních vektorech využívány fluorescenční proteiny, zejména červený fluorescenční protein (DsRed) [49; 50; 78] a zelený fluorescenční protein (eGFP) [51], a různé typy luciferáz [7; 10].



Obr. 2: Schéma plazmidového konstruktů převzaté ze studie Hernandez a kol. (2019). Plazmid pmirGLO zde obsahuje dva reportérové geny, gen pro *Renilla* luciferázu vedený HIFer1 promotorem a gen pro firefly luciferázu vedený HIAct promotorem. Dále obsahuje: ori počátek replikace; cer oblast zajišťující stabilitu plazmidu; Kozakovu sekvenci hrající roli v translaci; poly (A) signal pro terminaci transkripce; a dva geny pro rezistenci na antibiotika [7].

Transfekce obecně slouží jako nástroj pro umělé vložení nukleové kyseliny do eukaryotických buněk. Může být prováděna pomocí chemických, biologických či fyzikálních metod. U klíštěcích linií byly zkoumány především možnosti transfekce za pomoci transfekčních činidel čili chemických látek. Výběrem vhodného transfekčního činidla pro použití u klíštěcích buněčných linií se ve své studii při zkoumání efektivity RNAi zabývali Barry a kol. (2013). U rozdílných klíštěcích buněčných linií, mimo jiné i IRE/CTVM19, byla testována různá transfekční činidla. Jako nejefektivnější transfekční činidla testovaná na IRE/CTVM19 se prokázaly Lipofectamine 2000 (Invitrogen) a X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent (Roche), přičemž X-tremeGENE u IRE/CTVM19 vykazoval vyšší efektivitu transfekce než Lipofectamine 2000 [66]. Lipofectamine 2000 byl rovněž úspěšně využit u dalších klíštěcí buněčné linie – ISE6 [78]. Dále byly pro transfekci klíštěcích buněk, konkrétně ISE6 a BME26, použity transfekční činidla Effectene [10; 49; 50] nebo HilyMax [11].

Lipofectamine 2000 je transfekční činidlo na bázi lipidových kationtů schopné přenést do buněk DNA i RNA. Doručení požadované nukleové kyseliny do buněk probíhá v uměle vytvořených lipozomech. Kationty vytvoří společně se záporně nabitou nukleovou kyselinou komplex, který je do buněk přijímán za pomoci endocytózy. Podle výrobce by mělo toto transfekční činidlo být efektivní u většiny eukaryotických buněk [82]. X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent je transfekční činidlo vyráběné společností Roche Diagnostics určené k přenosu RNA do buněk. Toto konkrétní činidlo funguje na principu lipidových polymerů tvořících lipozomy [83]. Effectene od společnosti Qiagen je dle výrobce transfekční činidlo určené pro transfekci primárních a senzitivních buněčných linií, zároveň je popisován jako transfekční činidlo obsahující lipidové kationty, avšak nevytvářející lipozomy, vhodné pro transfekci DNA [84]. HilyMax od společnosti Dojindo je popisován jako transfekční činidlo vhodné pro hmyzí buňky. Toto činidlo funguje na bázi tvorby lipozomu za pomoci lipidových kationtů [85].

U jiných druhů členovců, např. u buněčné linie *D. melanogaster* byly rovněž úspěšně využity transfekční činidla Effectene [86] nebo činidlo Lipofectin využívající k přenosu DNA lipozomy [87]. Cheng a kol. (2011) použili pro transfekci komárů dvě transfekční činidla, konkrétně FuGene 6 nevytvářející lipozomy a Cellfectin II vytvářející lipozomy pomocí lipidových kationtů. Přičemž FuGene 6 se projevil jako letální a Cellfectin II jako dobře tolerovaný v obou zkoumaných druzích komárů *Anopheles gambiae* a *Ae. Aegypti*. Zároveň však studie tvrdí, že Cellfectin II nebyl účinný v transfekci plazmidové DNA do *I. scapularis*.

Tento příklad poukazuje na fakt, že napříč různými druhy členovců se může senzitivita vůči transfekčním činidlům využívajícím lipozomy lišit [88].

Studie zabývající se transfekčními metodami aplikovatelnými přímo na nejvýznamnější evropský druh klíštěte *I. ricinus* nebyla doposud publikována. Všechny předchozí studie se zabývaly převážně jinými druhy klíšťat. Je tedy důležité zanalyzovat poznatky z těchto publikovaných vědeckých studií a pokusit se je aplikovat v praxi. Vyvinutí protokolů pro úspěšnou transfekci je společně s nalezením účinného promotoru důležitým krokem pro zavedení cizí DNA do buněk a identifikaci podmínek, které jsou zapotřebí pro manipulaci s genomem v rámci klíštěcích buněk. Zároveň tyto poznatky mohou přispět k vývoji alternativních metod pro kontrolu patogenů přenášených klíšťaty.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo vytvořit stabilně fungující postupy pro genovou manipulaci a efektivní iniciaci genové exprese v klíštěcím (*Ixodes*) systému, transfekci plazmidových vektorů do klíštěcího systému a ověření účinnosti vybraných promotorů.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Mikroskopování klíštěcích buněk

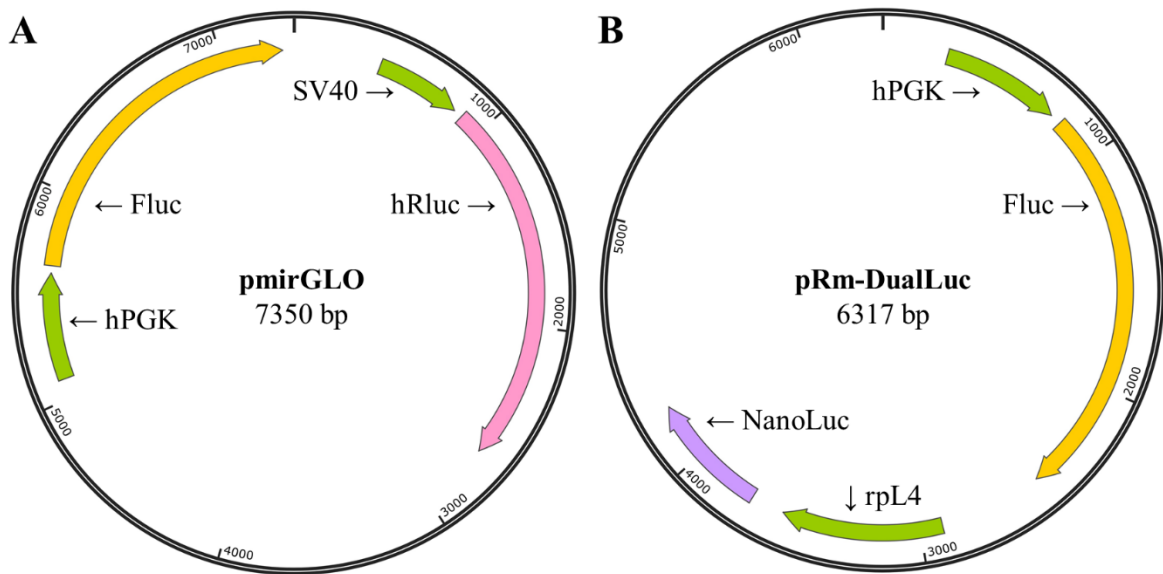
Obrazy živých buněk byly zachyceny ve fázovém kontrastu pomocí invertovaného mikroskopu Nikon ECLIPSE Ts2 (Nikon) s využitím kamery DFK 33UX174 (The Imaging Source), kontrastního slideru Nikon ELWD 0.3 T1-SNCP, softwaru NIS-Elements, verze 4.60 a objektivu se zvětšením 20x. Buňky byly pozorovány v kultivačních nádobách.

3.2 Použité plazmidy

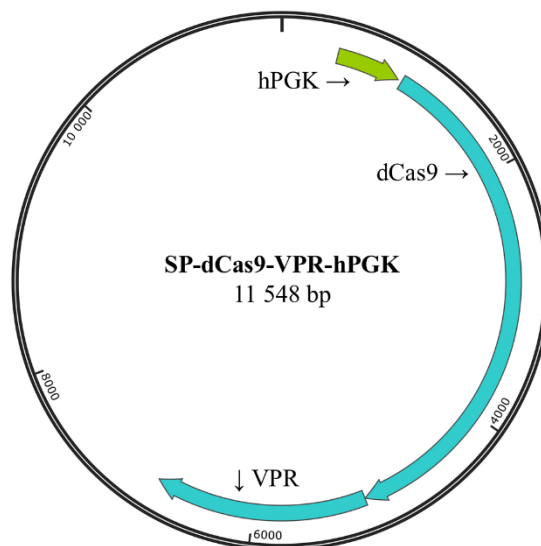
Na základě dostupné literatury bylo rozhodnuto o použití plazmidu pmirGLO [11] a jeho modifikované verze pRm-DualLuc [10]. Plazmid pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector (Promega) je komerčně dostupný plazmid obsahující hPGK promotor, který vede expresi genu pro firefly luciferázu a SV40 promotor vedoucí expresi *Renilla* luciferázy. Plazmid pRm-DualLuc, který byl poskytnut Dr. Temeyerem (USDA, Agricultural Research Service, Knipling-Bushland U.S. Livestock Insects Research Laboratory, USA), je modifikovanou verzí plazmidu pmirGLO a byl vytvořen za účelem použití RNAi v klíštěcích buňkách. Tento plazmid obsahuje hPGK promotor, který vede genovou expresi modifikované firefly luciferázy a *R. microplus* rpl4 promotor, který vede genovou expresi reportérového genu pro NanoLuc luciferázu [10].

Zároveň byly testovány plazmidy použité v mé bakalářské práci [89], čili pRSET-EF, pRSET-Act, pRSET-rpl4, kde byl jako základ použit plazmid pRSET/EmGFP (Invitrogen) a následně do plazmidu byly zaklonovány jednotlivé promotory, které byly navrženy podle gDNA klíšťat druhu *I. scapularis* na základě dostupné genomové sekvence [89]. Rovněž byl použit plazmid Monster Green Fluorescent Protein pHMGFP Vector (Promega) obsahující CMV promotor.

Dále byl použit plazmid SP-dCas9-VPR-hPGK, který byl vytvořen a poskytnut Dr. Katerynou Kotsarenko (CEITEC, Brno & PřF JU), přičemž se jednalo o modifikaci plazmidu SP-dCas9-VPR, který byl poskytnut Dr. Oksanou Piven (Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine). V tomto plazmidu byl použit promotor hPGK pro expresi genu dCas9-VPR. Tento plazmidový konstrukt byl použit za účelem ověření, zdali pod promotorem hPGK dochází v klíštěcích buňkách k expresi jiných genů než těch pro firefly luciferázu.



Obr. 3: **A:** Schéma plazmidu pmirGLO vytvořené v programu SnapGene Viewer. Plazmid pmirGLO obsahuje promotor pro lidskou PGK (hPGK), který vede expresi genu pro firefly luciferázu (Fluc). Druhým promotorem obsaženým v plazmidu je virový SV40, který vede expresi genu pro *Renilla* luciferázu (hRluc). **B:** Schéma plazmidu pRm-DualLuc vytvořené v programu SnapGene Viewer. Plazmid obsahuje promotor pro lidskou PGK (hPGK) vedoucí expresi genu pro firefly luciferázu (Fluc). Druhým promotorem obsaženým v plazmidu je klíčící promotor pro rpL4 gen vedoucí expresi genu pro NanoLuc luciferázu.



Obr. 4: Schéma plazmidu SP-dCas9-VPR-hPGK vytvořené v programu SnapGene Viewer. Plazmid obsahuje gen pro dCas9-VPR vedený promotorem hPGK.

3.3 Transformace bakterií

Transformace bakterií byla použita při amplifikaci plazmidové DNA. Jako hostitelské buňky byly použity chemicky kompetentní buňky *Escherichia coli* NovaBlue Singles Competent Cells (Novagen). Pro transformaci byl použit následující postup: bylo použito 50 µl suspenze kompetentních buněk, ke kompetentním buňkám byly přidány 20 ng plazmidu a proběhla inkubace 30 minut na ledu. Poté byl proveden teplotní šok – 30 sekund při 42 °C, následně byla zkumavka přesunuta na 2 minuty na led. Ke směsi bylo přidáno 250 µl SOC média pokojové teploty, směs byla inkubována za stálého třepání o frekvenci 225 rpm 1 hodinu při teplotě 37 °C. Po inkubaci byla buněčná suspenze rozetřena sterilní skleněnou hokejkou na kultivační LB agarovou půdu obsahující selektivní antibiotikum ampicilin v koncentraci 100 µg/ml ve dvou objemech 150 µl a 50 µl z důvodu zajištění optimálního počtu narostlých kolonií. Plotny byly inkubovány 24 hodin při 37 °C. Poté byly vybrané kolonie přeočkovány na nové LB agarové plotny, ze kterých proběhla příprava startovacích kultur. Práce s bakteriálními buňkami probíhala v laminárním boxu za sterilních podmínek.

Tabulka I: Chemikálie a buňky použité k transformaci bakterií.

Transformace a kultivace bakterií	
Kompetentní buňky	NovaBlue Singles Competent Cells (Novagen, Merck)
LB médium	na 1000ml: 10 g pepton, 5 g kvasinkový extrakt, 10 g NaCl (Carl Roth)
LB agar	agar v LB médiu (Carl Roth)
SOC médium	na 10ml: 2 % trypton, 0.5 % kvasinkový extrakt, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM glukózy (Carl Roth)
Antibiotika	Ampicilin (Carl Roth)

3.4 Izolace plazmidů

Pro izolaci plazmidu byly připraveny bakteriální kultury o rozdílném objemu. Bakterie pro izolaci plazmidů mini kitem byly kultivovány v 5 ml tekutého LB média + ampicilin (100 µg/ml). Pro přípravu bakterií pro izolaci maxi kitem byla připravena startovací kultura 5 ml buněk, která byla následně naředěna 1000x do 150 ml LB média + ampicilin (100 µg/ml).

K izolaci plazmidové DNA z kompetentních buněk byly využity soupravy Plasmid Mini Kit a Plasmid Maxi Kit (Qiagen). Obě soupravy fungují na principu nanesení bakteriálního lyzátu na anexovou kolonku, kde proběhne zachycení plazmidové DNA a její následná extrakce do elučního pufru. Izolace DNA byla provedena dle návodu výrobce. Plazmidy byly eluovány do TE pufru (10 mM Tris-Cl, pH 8,0, 1 mM EDTA).

3.5 Kultivace klíštěcích buněk

Klíštěcí buněčné linie ISE6 [70], ISE18 [69], IRE11 [71], IRE/CTVM19 a IRE/CTVM20 [64] byly poskytnuty z The Tick Cell Biobank. Kultivace buněk probíhala v L-15 médiu (Biowest) obsahujícího 20 % fetálního bovinního séra (Biosera), 10 % tryptóza-fosfátového bujónu (Sigma), 2 mM L-alanyl-L-glutamin (Merck), a směs antibiotik (100 jednotek/ml penicilin G, 100 µg/ml streptomycin a 0,25 µg/ml amfotericin B, Biowest), při 28 °C, v 10ml kultivačních nádobách s plochým dnem s těsným neventilovaným uzávěrem (Nunc). Buněčné kultury byly pasážovány každých 12-14 dní, kdy byly rozděleny v poměru 1:4. Práce s buňkami byla prováděna za sterilních podmínek v laminárním boxu.

3.6 Transfekce

3.6.1 Transfekce klíštěcích buněk

Ke transfekci byly použity následující klíštěcí buněčné linie: ISE6, ISE18, IRE11, IRE/CTVM19 a IRE/CTVM20.

řed nasazením buněk bylo odebráno 5 ml buněčné suspenze z pasážované kultury do sterilní plastové zkumavky a centrifugováno 7 minut při pokojové teplotě a 1390 rpm. Následně bylo odebráno médium a peleta rozsuspendovaná v 1 ml kompletního růstového L-15 média (Tabulka II). Poté bylo odebráno 100 µl buněčné suspenze, ke které bylo přidáno 100 µl trypanové modři a provedeno počítání buněk v Bürkerově komůrce.

Buňky byly nasazeny 24 hodin před transfekcí do 96 jamkových destiček pro tkáňové kultury (TPP) v počtu 30 000 buněk ve 100 µl kompletního růstového L-15 média na jamku. Transfekce byly prováděny pomocí elektroporace a transfekčních činidel FuGENE HD Transfection Reagent (Promega), PolyJet *In Vitro* DNA Transfection Reagent (SignaGen Laboratories), LipoJet *In Vitro* Transfection Kit (SignaGen Laboratories), X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent (Roche Diagnostics). Konfluence buněk v době transfekce dosahovala 60-70 %.

Elektroporace byla prováděna v přístroji Electro Cell Manipulator (ECM 630, BTX, Harvard Bioscience). Elektroporace buněčných linií s jednotlivými plazmidy byla provedena dle protokolu „DNA Transfection by Electroporation“ [90]. Před samotnou elektroporací byl připraven slepý vzorek ve formě kyvety obsahující PBS. Tento vzorek byl vložen do elektroporátoru, kde byl alespoň dvakrát spuštěn výboj. Následně bylo do 4mm kyvety (BTX)

přidáno 400 μ l média s buňkami. Posléze byly k buněčné suspenzi přidány 4 μ g DNA (plazmidu) v 10 μ l L-15 média bez glutaminu (Biosera), kyveta byla vložena do elektroporátoru, kde byly neprodleně spuštěny elektrické výboje. Poté byla kyveta ponechána 2 minuty na ledu a následně byla suspenze napipetována do jednotlivých jamek po 100 μ l na jednu jamku. Elektroporace probíhala za podmínek: odpor 300 Ω , kapacitance 1050 μ F, napětí 250 V. Elektroporace buněk a následné měření byly prováděny v technických triplikátech.

Postup u transfekčního činidla FuGENE HD Transfection Reagent (Promega) byl následující: nejčastěji používaný poměr transfekčního činidla ku DNA byl 3:1, přičemž bylo použito 100 ng DNA (zde plazmidu). Celkové množství směsi transfekčního činidla a DNA bylo použito 10 μ l na jamku, při poměru 3:1 tedy 0,3 μ l transfekčního činidla v 5 μ l L-15 média bez glutaminu (Biosera) a 100 ng DNA v 5 μ l L-15 média bez glutaminu (Biosera). Byl dodržován následující postup: k DNA médiu bylo přidáno požadované množství transfekčního činidla, směs byla ponechána 10 až 15 minut při pokojové teplotě a následně byly buňky transfekovány napipetováním směsi do jamek – 10 μ l směsi na 1 jamku. U ostatních transfekčních činidel – PolyJet *In Vitro* DNA Transfection Reagent (SignaGen Laboratories) a X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent (Roche Diagnostics) bylo postupováno stejným způsobem jako u FuGENE HD.

Rozdílný postup byl prováděn u LipoJet *In Vitro* Transfection Kit (SignaGen Laboratories). Nejprve byl připraven 1x transfekční pufr zředěním 5x LipoJet Transfection Buffer destilovanou vodou. Tento pufr byl při přípravě používán místo L-15 média. Dále bylo k určenému množství DNA v 1x transfekčním pufru přidáno příslušné množství transfekčního činidla LipoJet, směs byla ponechána 10 až 15 minut při pokojové teplotě a po inkubaci byly transfekovány buňky 10 μ l transfekční směsi na 1 jamku. Práce s buňkami byla prováděna za sterilních podmínek v laminárním boxu. Transfekce klíčících buněk a následné měření byly prováděny v biologických triplikátech.

Zároveň v různých transfekcích byly testovány různé poměry transfekčního činidla ku DNA a různá množství DNA, kdy byly kromě poměru popsaného výše testovány poměry transfekčního činidla ku DNA 1:1, 1,5:1, 2:1, 2,5:1 a 3,5:1. Bylo rovněž testováno použití většího množství DNA, a to 200 ng.

Tabulka II: Média používaná při transfekci klíštěcích buněk.

Média	
Kompletní růstové L-15 médium	L-15 médium (Biowest) + 20 % fetální bovinní sérum (Biosera), 10 % tryptose phosphate broth (Sigma), 2 mM L-Alanyl-L-glutamin (Merck), antibiotická směs: 100 jednotek/ml penicilin G, 100 µg/ml streptomycin a 0,25 µg/ml amfotericin B (Biowest)
L-15 médium bez glutaminu (Biosera)	Bez přísad

3.6.2 Transfekce lidských buněk DAOY

Transfekce lidských meduloblastomových buněk DAOY ATCC HBT-186 byla použita k ověření funkčnosti plazmidu pmirGLO obsahujícího promotor pro lidskou fosfoglycerát kinázu.

Nejprve bylo původní médium vylito z kultivační nádoby a buňky promyty PBS. Jelikož se jedná o adherentní buňky, byla následně provedena trypsinizace buněk. Do kultivační nádoby bylo k narostlým buňkám přidáno 0,5 ml roztoku trypsinu (0,25% trypsin/koncentrace v HBSS (Biowest)) a inkubováno 2-5 minut v inkubátoru při 37 °C. Buňky byly poté rozsuspendovány v malém objemu DMEM Low Glucose média (Biowest) obsahujícího 10% fetální bovinní sérum (Sigma-Aldrich), 1% L-alanyl-L-glutamin (Biowest), 1% antibiotickou směs (Amphotericin B 0,25 µg/ml, Penicilin G 100 U/ml, Streptomycin 100 µg/ml; Biowest). Následně bylo odebráno 100 µl buněčné suspenze, ke které bylo přidáno 100 µl trypanové modři a provedeno počítání buněk v Bürkerově komůrce. Buněčná suspenze byla nasazena 24 hodin před transfekcí do 96 jamkového panelu v množství 30 000 buněk ve 100 µl obohaceného DMEM média na jamku.

Transfekce byla provedena pomocí PolyJet *In Vitro* DNA Transfection Reagent (SignaGen Laboratories) dle protokolu uvedeného výrobcem. Poměr transfekčního činidla ku DNA byl 1,5:1, použito bylo 200 ng plazmidové DNA. Celkové množství směsi transfekčního činidla a DNA bylo použito 10 µl na jamku, tedy 0,3 µl transfekčního činidla v 5 µl DMEM Low Glucose (Biosera) média a 200 ng DNA v 5 µl DMEM Low Glucose (Biosera). K DNA přidané do DMEM Low Glucose (Biosera) média bylo přidáno požadované množství transfekčního činidla, směs byla ponechána 10 minut při pokojové teplotě a následně byly buňky transfekovány danou směsí plazmidu a transfekčního činidla – množství 10 µl směsi na 1 jamku. Buňky byly kultivovány při 37 °C, s atmosférou obsahující 5 % CO₂. Po pěti hodinách byla provedena výměna média. Luminiscence u transfekovaných DAOY buněk byla

měřena 24 hodin po transfekci. Práce s buňkami probíhala v laminárním boxu za sterilních podmínek. Transfekce buněk a následné měření byly prováděny v biologických triplikátech.

3.7 Měření fluorescence a luminiscence

U plazmidů pRSET-EF, pRSET-Act, pRSET-rpL4 a pMGFP, obsahujících zelený fluorescenční protein, byla měřena fluorescence s parametry: excitační světlo o vlnové délce 485 nm a emitované světlo o vlnové délce 528 nm.

Testovací systémy pro detekci luminiscence fungují na principu přidání substrátu k danému luciferázovému enzymu, jehož exprese se v buňkách očekává. Tato reakce enzym-substrát následně vyvolá luminiscenci, pomocí které je možné sledovat aktivitu reportérového genu – luciferázy. U plazmidu pmirGLO, který obsahoval geny pro firefly a *Renilla* luciferázy, byly použity Luciferase Assay System (Promega) či Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega). U plazmidu pRm-DualLuc, který obsahoval geny pro firefly a NanoLuc luciferázy, byly aplikovány testovací systémy Luciferase Assay System (Promega) a Nano-Glo Luciferase Assay System (Promega). Jednotlivé systémy byly používány dle protokolů stanovených výrobcem. Měření probíhala 3-6 dní po provedené transfekci [10]. Měření fluorescence a luminiscence bylo prováděno na multidetekčním readeru Synergy H1 (BioTek).

Grafy z jednotlivých měření a statistická analýza byly zpracovány v programu MS Excel (Microsoft).

3.8 Izolace RNA pro PCR a RT-PCR

Po uplynutí určených dnů po transfekci bylo z jednotlivých jamek odebráno médium, buňky byly následně promyty 100 μ l PBS. Dále byl opět přidán PBS, ve kterém byly buňky rozpuštěny, suspenze byla centrifugována 5 minut při pokojové teplotě, poté byl odstraněn PBS a buněčný pelet uchován při -70 °C.

RNA byla z buněčného peletu izolovaná pomocí soupravy pro izolaci RNA z tkání a buněk NucleoSpin RNA Plus (Macherey-Nagel). Izolace RNA proběhla pomocí gravitačních kolonek dle protokolu stanoveného výrobcem. Výsledná koncentrace izolované RNA byla změřena na přístroji NanoPhotometer (Implen).

3.9 Syntéza cDNA

Nejprve byla u izolované RNA provedena DNázová reakce, která sloužila k odstranění zbytkové genomové DNA. Kvůli nízké koncentraci RNA u vzorků byl pro reakci použit větší objem RNA, než je doporučováno výrobcem. Konkrétně byly k 26 μl izolované RNA přidány 1 μl DNase I (Thermo Fisher Scientific) a 3 μl 10x DNase I Reaction Buffer + MgCl_2 (Thermo Fisher Scientific). Reakce byla inkubována 30 minut při 37 °C. Takto připravená RNA byla použita jako templát pro reverzní transkripci.

Reverzní transkripce byla provedena pomocí soupravy ProtoScript II First Strand cDNA Synthesis Kit (New England BioLabs) dle protokolu výrobce. K 30 μl RNA z předchozího kroku bylo přidáno 7,5 μl 60 μM směsi náhodných primerů, vzorek byl inkubován 5 minut při 65 °C, následně ponechán na ledu a krátce centrifugován.

Poté bylo přidáno 37,5 μl 2x ProtoScript II Reaction Mix a 7,5 μl 10x ProtoScript II Enzyme Mix a celá reakce byla inkubována 5 minut při 25 °C, následně 60 minut při 42 °C. Následně byl enzym inaktivován při 80 °C po dobu 5 minut. Reakce probíhala v termocycleru GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Výsledný cDNA produkt byl uchováván při -20 °C do dalšího použití.

3.10 Navržení primerů

Potřebné primery byly navrženy na základě známé sekvence plazmidů v programu Geneious Prime software. Vlastnosti vytvořených primerů byly zároveň ověřeny v online programu OligoAnalyzer Tool (<https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>). Navržené primery byly syntetizovány firmou Generi Biotech. Použité primery jsou zaznamenány v Tabulce III.

Tabulka III: Použité primery.

Název primeru	Sekvence 5' - 3'	Tm [°C]	Účel (produkt)
F_Cas9_1	GGAGTTGACGCCAAAGCAAT	56,3	Amplifikace části genu dCas9-VPR z plazmidu SP-dCas9-VPR-hPGK
R_Cas9_1	CACTCGCAGAATATCACTCAGCAG	57,4	
F_VPR_1	GGCTGACCCCAAGAAGAAGAG	57,6	
R_VPR_1	GCAGGTACTGGCTACCAACTT	57	

3.11 PCR

Polymerázová řetězová reakce posloužila k ověření funkčnosti vytvořených primerů. K reakci byla použita polymeráza Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs). Složení jedné reakce o celkovém objemu 25 μ l bylo následující: 5 μ l 5X Q5 Reaction Buffer, 2,5 μ l 2mM dNTPs, 1,25 μ l od každého 10 μ M primeru (5' primer a 3' primer), přičemž finální koncentrace primerů byla 0,5 μ M, 0,25 μ l polymerázy Q5 High-Fidelity DNA Polymerase, 5 ng templátové DNA v objemu 1 μ l anebo vyšším a PCR vody doplněné do finálního objemu. Reakce probíhala ve zkumavkách o objemu 200 μ l v přístroji T100 (Bio-Rad). Teplotní a časový profil reakce byl následovný: 30 sekund při 98 °C (úvodní denaturace), následně 30 cyklů: denaturace 10 sekund 98 °C, nasednutí primerů 30 sekund za specifické teploty pro jednotlivé primery, extenze při 72 °C 20 sekund, finální extenze 2 minuty při 72 °C a chlazení při 22 °C.

Pro separaci PCR produktů byla použita gelová elektroforéza s 2% agarózovým gelem (2% agarózy rozpuštěné v 1x TAE pufru), pro určení velikosti DNA fragmentů byl použit GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) + 1x GelRed Nucleic Acid Stain (Millipore, Merck), vzorky byly smíchány s 6x DNA Gel Loading Dye (Thermo Fisher Scientific) + 6x GelRed Nucleic Acid Stain (Millipore, Merck).

3.12 qRT-PCR

Kvantitativní real-time PCR byla použita k ověření úspěšnosti transfekce klišťecích buněk IRE11 a IRE/CTVM20 transfekovaných pomocí elektroporace s plazmidem SP-dCas9-VPR-hPGK. Reakce byla provedena s cDNA transfekovaných buněk pomocí kitu KAPA SYBR FAST One-Step qRT-PCR Master Mix (2x) Kit (Roche). Složení jedné reakce: 7,5 μ l KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x), 0,3 μ l od každého 10 μ M primeru (finální koncentrace primerů byla 0,2 μ M), 6 μ l templátové DNA či cDNA, doplněno PCR vodou do finálního objemu reakce 15 μ l. Cyklovací podmínky: úvodní denaturace 3 minuty při 95 °C, následně 45 cyklů: denaturace 3 sekundy při 95 °C, nasednutí primerů 15 sekund za specifické teploty pro jednotlivé primery. Za účelem detekce nespecifických produktů reakce byly nastaveny parametry pro zaznamenání křivky tání: teplota 55 °C až 95 °C po dobu 5 sekund. PCR reakce proběhla v přístroji C1000 Thermal Cycler, CFX96 Real-Time PCR System (Bio-Rad).

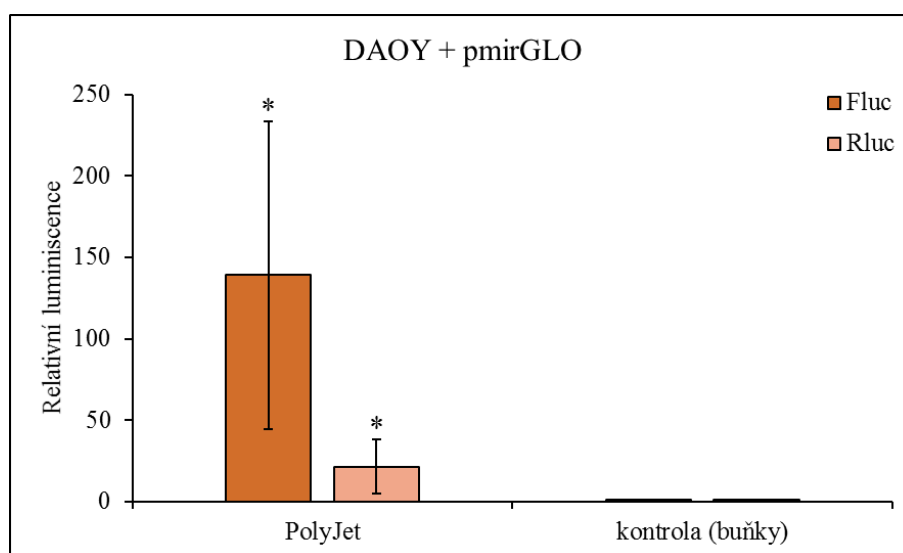
Výsledné amplikony byly ověřeny pomocí gelové elektroforézy s použitím 2% agarózového gelu (2 % agarózy rozpuštěné v 1x TAE pufu). Pro určení velikosti DNA fragmentů byl použit GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) + 1x GelRed Nucleic Acid Stain (Millipore, Merck), amplikony byly smíchány s 6x DNA Gel Loading Dye (Thermo Fisher Scientific) + 6x GelRed Nucleic Acid Stain (Millipore, Merck). Fotografie gelu byla pořízena v přístroji Gbox Chemi XX6 Bio-imaging (Syngene).

4 VÝSLEDKY

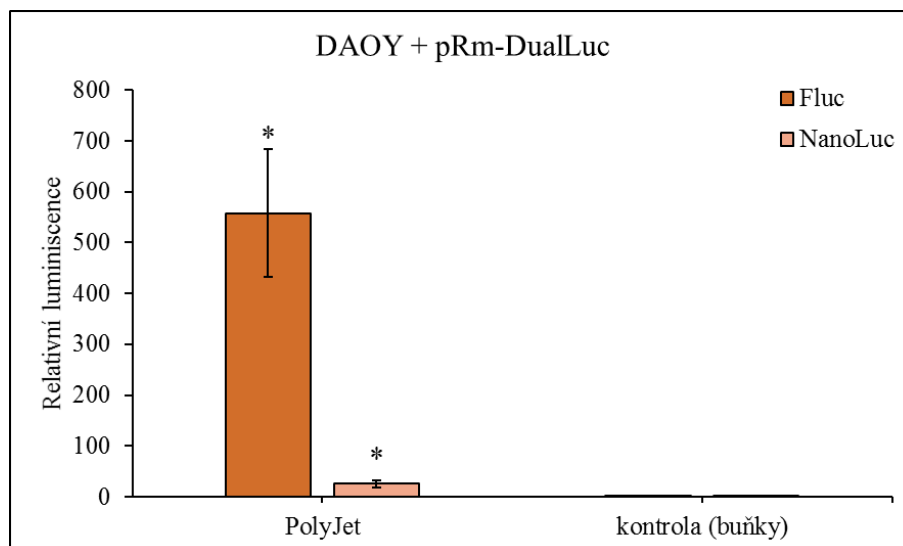
V případě měření luminiscence a fluorescence byly všechny hodnoty přepočteny jako poměr k naměřené hodnotě u kontroly (netransfekovaných buněk), které byla přiřazena relativní hodnota 1. Luminiscence firefly luciferázy je v grafech označena jako Fluc, luminiscence *Renilla* luciferázy je označena jako Rluc a luminiscence NanoLuc luciferázy jako NanoLuc.

4.1 Optimalizace transfekce pro eukaryotické buňky

Pro optimalizaci transfekce pro eukaryotické buňky byla použita lidská meduloblastomová buněčná linie DAOY, jejíž funkčnost byla již ověřena v mých předchozích experimentech [89]. Pro transfekci lidských buněk DAOY byl použit plazmid pmirGLO obsahující zavedený reportérový gen pro firefly luciferázu řízený lidským PGK promotorem. Efektivita transfekce tak byla pozorována pomocí měření luminiscence 1 den po transfekci.



Obr. 5: Relativní luminiscence vykazovaná lidskou buněčnou linií DAOY po transfekci plazmidem pmirGLO za pomoci transfekčního činidla PolyJet. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku. Signifikantní rozdíly oproti kontrole byly vypočteny pomocí dvouvýběrového nepárového Studentova t-testu (* $P < 0,05$).



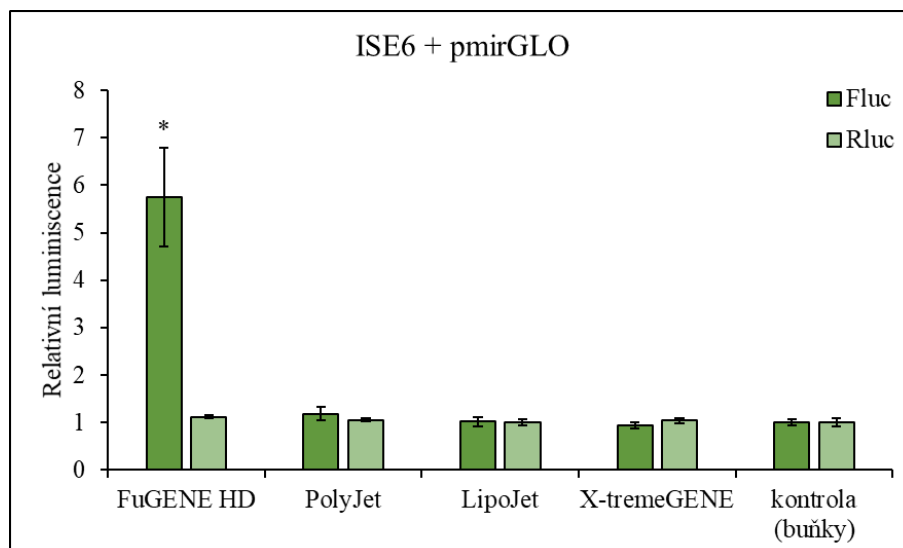
Obr. 6: Relativní luminiscence vykazovaná lidskou buněčnou linií DAOY po transfekci plazmidem pRm-DualLuc za pomoci transfekčního činidla PolyJet. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku. Signifikantní rozdíly oproti kontrole byly vypočteny pomocí dvouvýběrového nepárového Studentova t-testu (* $P < 0,05$).

Luciferázy kódované v obou plazmidech pmirGLO a pRm-DualLuc byly produkovány a generovaly luminiscenci (Obr. 5, Obr. 6). Promotory hPGK z obou plazmidů jsou tedy aktivní v eukaryotických – lidských buňkách a spouštějí expresi genů, které jsou jimi řízené.

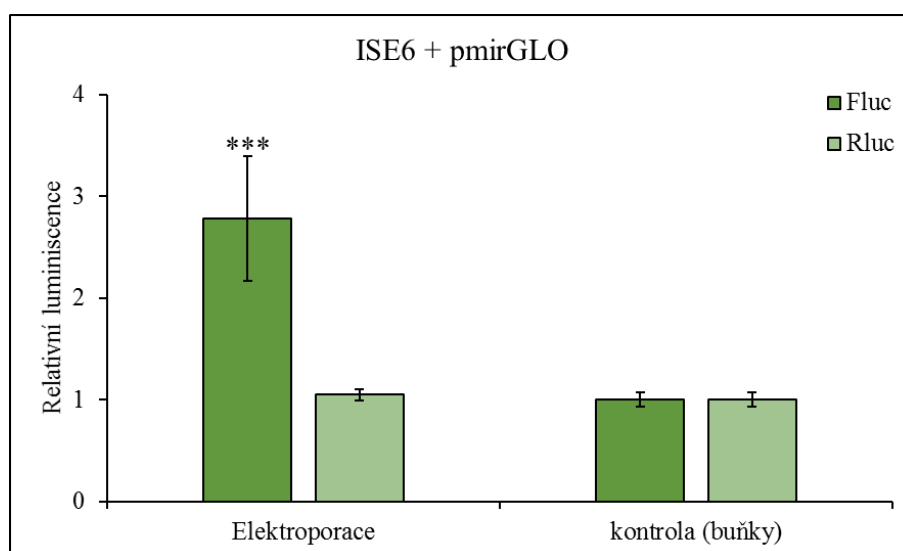
4.2 Transfekce ISE6 pomocí různých transfekčních činidel

Pro optimalizaci transfekčních metod používaných u klíštěcích buněk, byla testována různá transfekční činidla na klíštěcí buněčné linii ISE6. Klíštěcí buněčná linie ISE6 byla transfekovaná dvěma různými plazmidy, pmirGLO a pRm-DualLuc, za účelem zjištění funkčnosti promotorů obsažených v těchto plazmidech u ISE6 klíštěcích buněk.

Nejprve byla použita elektroporace a několik dalších transfekčních činidel na chemické bázi s plazmidem pmirGLO, který obsahuje reportérové geny pro luciferázy. Gen pro firefly luciferázu pod promotorem hPGK, gen pro *Renilla* luciferázu pod promotorem SV40. Měření luminiscence proběhlo 4 dny po elektroporaci a 3 dny po transfekci. Sumarizace měření je vyobrazena na Obr. 7 a Obr. 8.



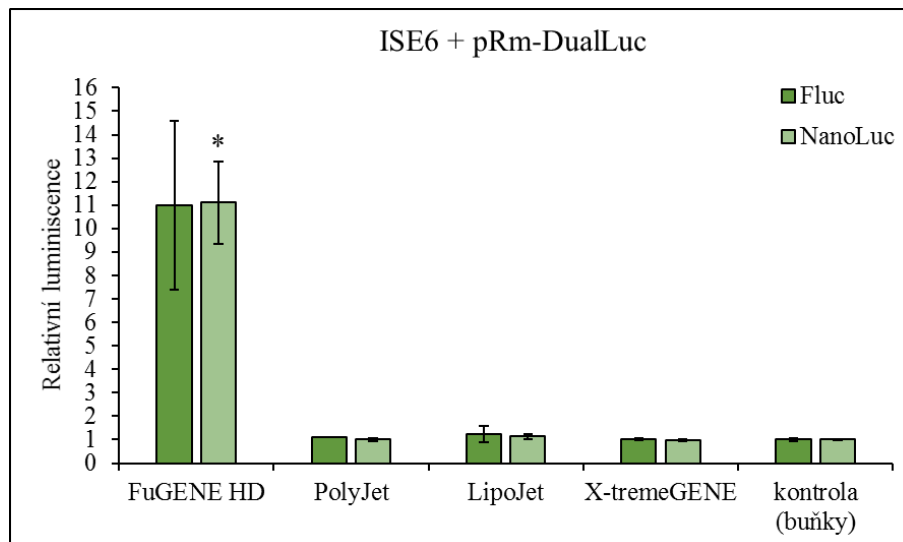
Obr. 7: Relativní luminiscence vykazovaná buněčnou linií ISE6 po transfekcích plazmidem pmirGLO za pomoci různých transfekčních činidel. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku. Signifikantní rozdíly oproti kontrole byly vypočteny pomocí dvouvýběrového nepárového Studentova t-testu (* $P < 0,05$).



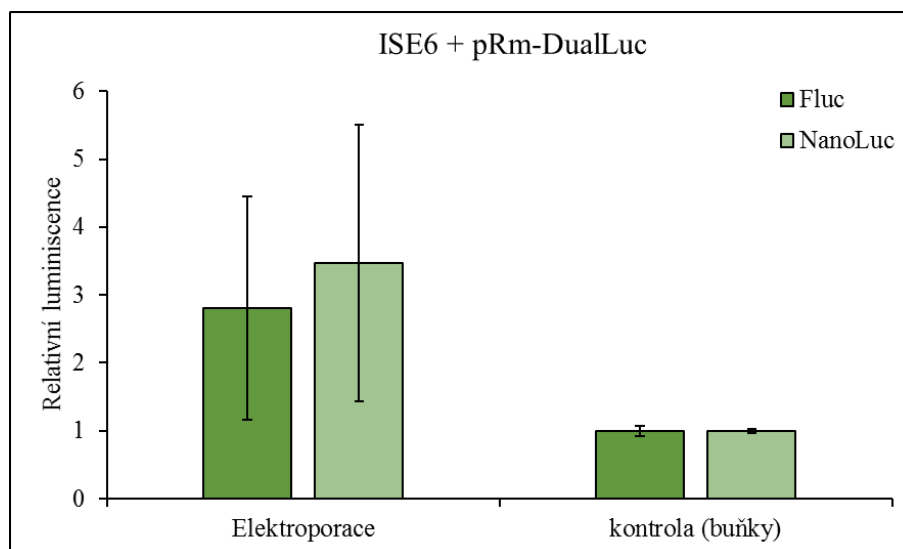
Obr. 8: Relativní luminiscence vykazovaná buněčnou linií ISE6 po transfekci plazmidem pmirGLO za pomoci elektroporace. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku. Signifikantní rozdíly oproti kontrole byly vypočteny pomocí dvouvýběrového nepárového Studentova t-testu (*** $P < 0,001$).

Nejvyšší luminiscence byla pozorována u buněk transfekovaných pomocí FuGENE HD Transfection Reagent (Promega) a u reportérového genu pro firefly luciferázu, který byl pod hPGK promotorem (Obr. 7). U *Renilla* luciferázy pod SV40 promotorem nebyla pozorována zvýšená luminiscence. Metoda elektroporace rovněž vykazovala zvýšenou luminiscenci u firefly luciferázy vedené hPGK promotorem (Obr. 8), v tomto případě nebyla opět u *Renilla* luciferázy vedené SV40 promotorem pozorována zvýšená luminiscence.

Následně byl k transfekci použit plazmid pRm-DualLuc. Měření luminiscence proběhlo 4 dny po elektroporaci a 3 dny po transfekci, sumarizace měření je vyobrazena na Obr. 9.



Obr. 9: Relativní luminiscence vykazovaná buněčnou linií ISE6 po transfekci plazmidem pRm-DualLuc za pomoci různých transfekčních činidel. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku. Signifikantní rozdíly oproti kontrole byly vypočteny pomocí dvouvýběrového nepárového Studentova t-testu (* $P < 0,05$).



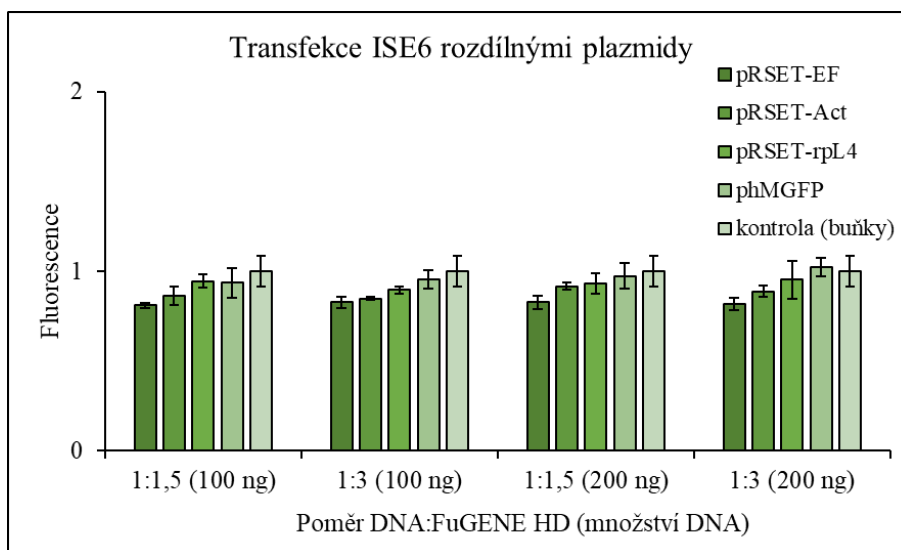
Obr. 10: Relativní luminiscence vykazovaná buněčnou linií ISE6 po transfekci plazmidem pRm-DualLuc za pomoci elektroporace. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku.

Podle grafu na Obr. 9 vykazoval reportérový gen pro firefly luciferázu zvýšenou míru exprese při transfekci pomocí FuGENE HD se signifikantním rozdílem oproti kontrole. Zvýšenou míru exprese rovněž vykazoval gen pro NanoLuc vedený promotorem pro klíčící rpL4. Graf na Obr. 10 ukazuje zvýšenou luminiscenci u elektroporovaných buněk, která však nebyla statisticky významná. Nicméně plazmid pRm-DualLuc nám byl poskytnut pouze za účelem

testování, nikoli za účelem používání jeho částí nebo celku ke klonování, proto bylo rozhodnuto, že další testování bude prováděno s plazmidem pmirGLO.

4.3 Transfekce buněk s plazmidy pRSET a phMGFP

Na základě přechozího zjištění, že transfekční činidlo FuGENE HD se zdá být efektivním nástrojem pro transfekci klíčící buněčné linie ISE6, byla aplikována transfekce pomocí FuGENE HD s plazmidy, které byly již použity v mé bakalářské práci [89]. Jednotlivé plazmidy obsahovaly rozdílné promotory a reportérový gen pro zelený fluorescenční protein (GFP). Rovněž byly vyzkoušeny rozdílné poměry DNA ku transfekčnímu činidlu a rozdílná množství DNA (plazmidu) transfekovaná do buněk. Měření fluorescence proběhlo 3 dny po transfekci.

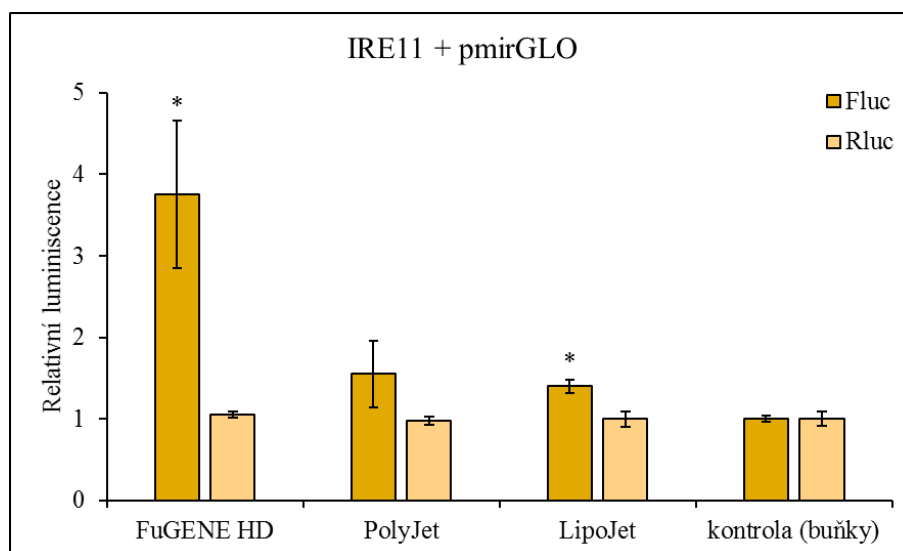


Obr. 11: Fluorescence vykazovaná ISE6 buňkami transferovanými plazmidy s rozdílnými promotory. Excitační světlo o vlnové délce 485 nm a emitované světlo o vlnové délce 528 nm. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku.

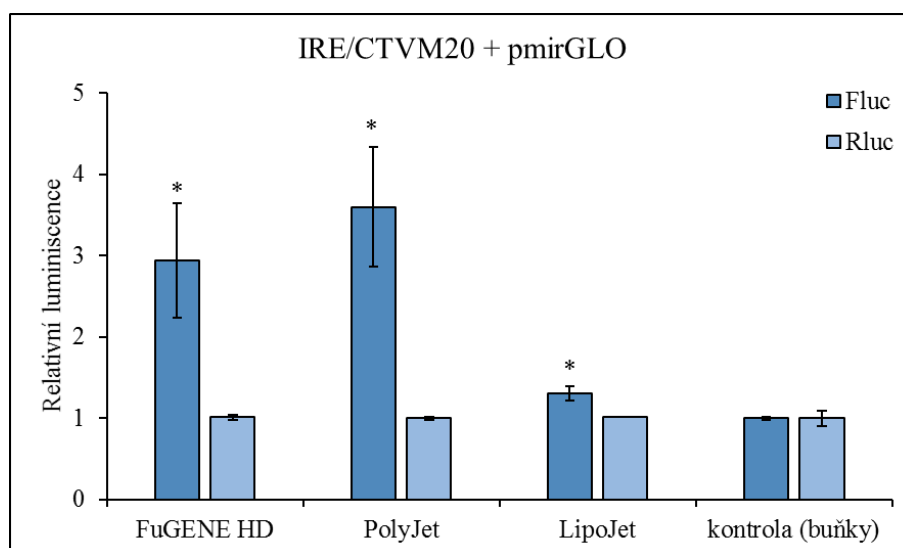
Výsledky patrné z grafu na Obr. 11 ukázaly, že fluorescence u transfekovaných buněk není oproti kontrolám zvýšená, z čehož plyne, že promotory obsažené v těchto plazmidech neinicují expresi reportérového genu a tyto plazmidy nejsou tedy vhodné k transfekci ISE6 buněk.

4.4 Transfekce různých IRE buněčných linií s různými transfekčními činidly

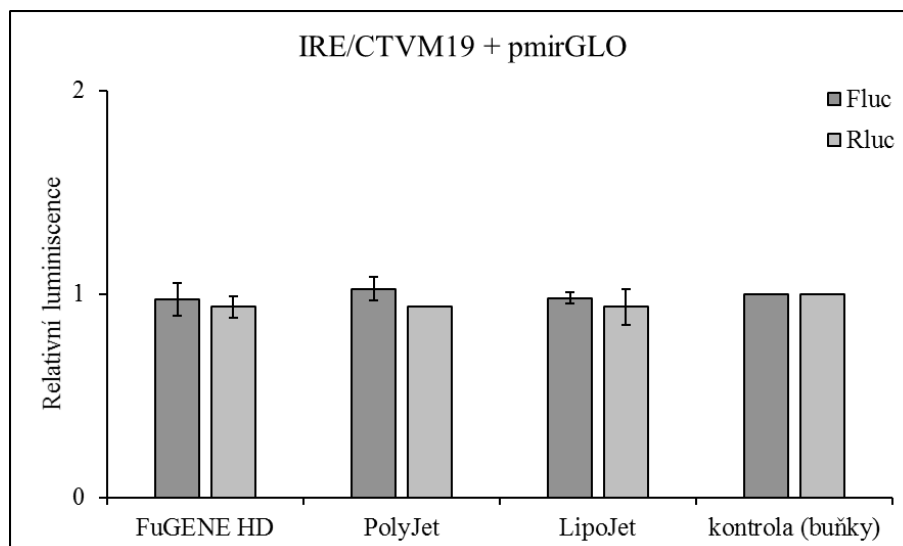
Různé klíčecí buněčné linie z druhu *I. ricinus* byly transfekovány plazmidem pmirGLO, za účelem vybrání nejvhodnější klíčecí buněčné linie pro transfekci. Zároveň byly použity různé druhy transfekčních činidel za účelem ověření nejvhodnějšího způsobu transfekce těchto buněčných linií. Měření luminiscence proběhlo 5 dní po transfekci.



Obr. 12: Relativní luminiscence vykazovaná buněčnou linií IRE11 po transfekcích plazmidem pmirGLO pomocí různých transfekčních činidel. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku. Signifikantní rozdíly oproti kontrole byly vypočteny pomocí dvouvýběrového nepárového Studentova t-testu (* $P < 0,05$).



Obr. 13: Relativní luminiscence vykazovaná buněčnou linií IRE/CTVM20 po transfekcích plazmidem pmirGLO pomocí různých transfekčních činidel. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku. Signifikantní rozdíly oproti kontrole byly vypočteny pomocí dvouvýběrového nepárového Studentova t-testu (* $P < 0,05$).

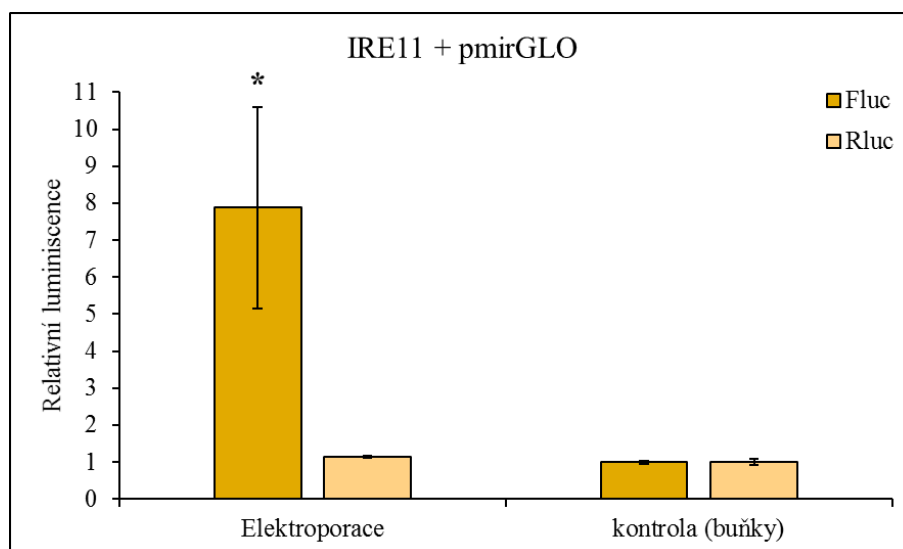


Obr. 14: Relativní luminiscence vykazovaná buněčnou linií IRE/CTVM19 po transfekcích plazmidem pmirGLO pomocí různých transfekčních činidel. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku.

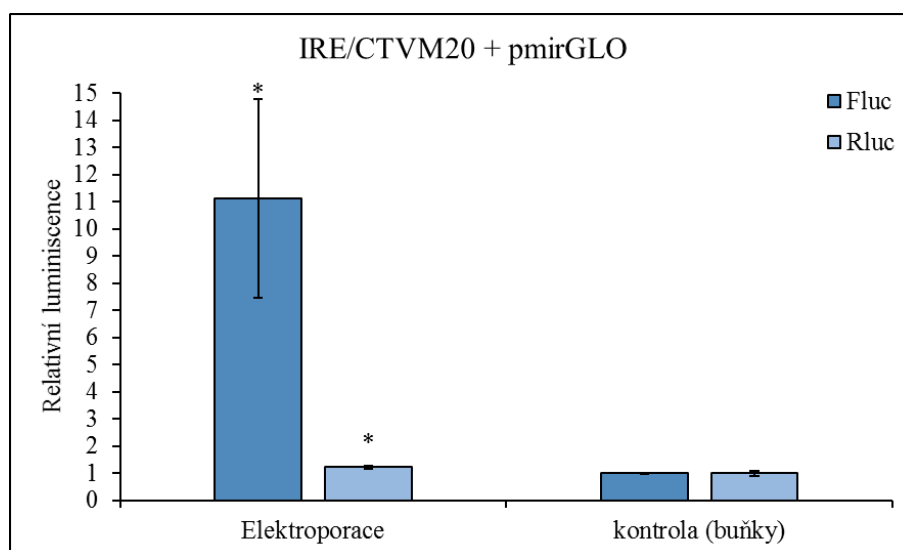
U klíčtější buněčné linie IRE11 byla zaznamenána zvýšená luminiscence u genu pro firefly luciferázu vedeného promotorem pro hPGK. Nejvyšších hodnot dosahovala luminiscence u buněk, které byly transfekovány pomocí FuGENE HD. U klíčtější buněčné linie IRE/CTVM20 byla zaznamenána rovněž zvýšená luminiscence u hPGK promotoru, a to u buněk transfekovaných pomocí PolyJet a FuGENE HD. U klíčtější buněčné linie IRE/CTVM19 nebyla zaznamenána změna intenzity luminiscence oproti kontrolám. Na základě tohoto výsledku bylo rozhodnuto, že linie IRE/CTVM19 nebude při dalších experimentech používána.

4.5 Transfekce různých IRE buněčných linií pomocí elektroporace

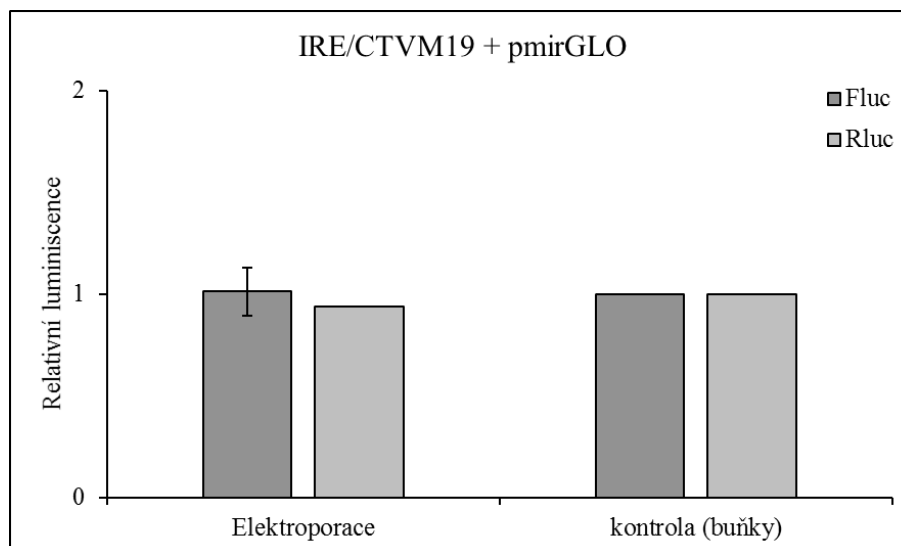
Různé druhy klíštěcích buněčných linií původem z druhu *I. ricinus* byly transfekovány plazmidem pmirGLO za účelem výběru nejvhodnější klíštěcí buněčné linie pro transfekci. K transfekci byla použita metoda elektroporace z důvodu ověření vhodnosti této metody pro transfekci daných klíštěcích buněk. Měření luminiscence proběhla 6 dní po provedené elektroporaci.



Obr. 15: Relativní luminiscence vykazovaná buněčnou linií IRE11 po transfekci plazmidem pmirGLO pomocí elektroporace. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku. Signifikantní rozdíly oproti kontrole byly vypočteny pomocí dvouvýběrového nepárového Studentova t-testu (* $P < 0,05$).



Obr. 16: Relativní luminiscence vykazovaná buněčnou linií IRE/CTVM20 po transfekci plazmidem pmirGLO pomocí elektroporace. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku. Signifikantní rozdíly oproti kontrole byly vypočteny pomocí dvouvýběrového nepárového Studentova t-testu (* $P < 0,05$).

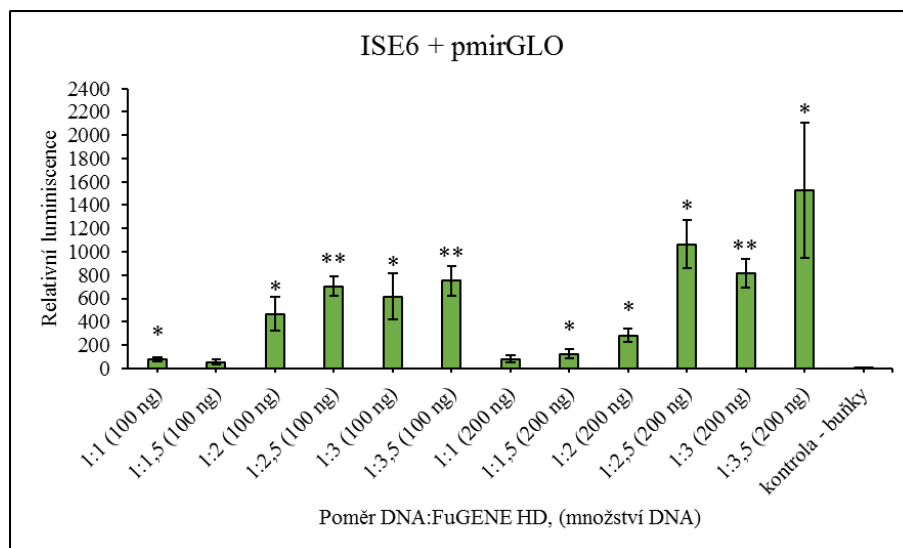


Obr. 17: Relativní luminiscence vykazovaná buněčnou linií IRE/CTVM19 po transfekci plazmidem pmirGLO pomocí elektroporace. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku.

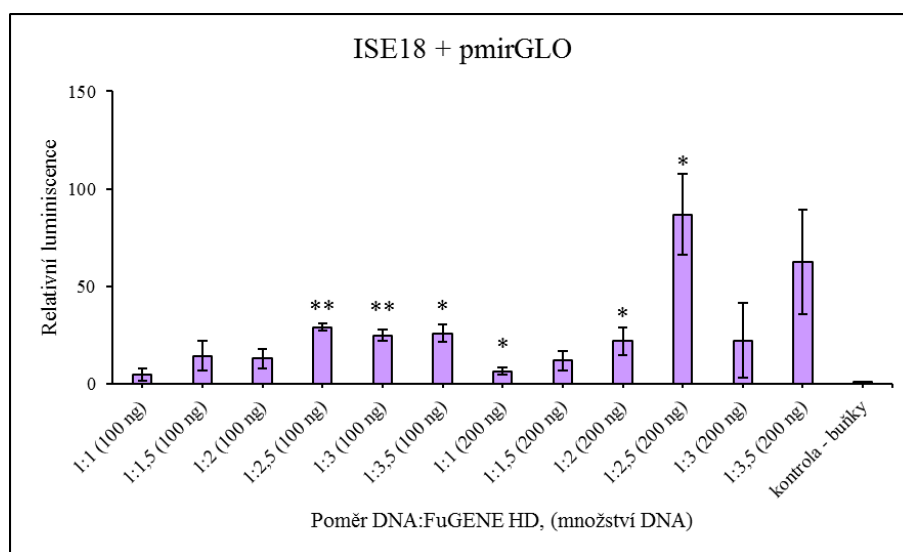
U klíčtčích buněk IRE11 a IRE/CTVM20 transfekovaných pomocí elektroporace byla zaznamenána zvýšená luminiscence u firefly luciferázy. Výsledky vykazovaly signifikanci oproti kontrole. U buněčné linie IRE/CTVM19 nebyla pozorována zvýšená luminiscence, stejně jako u jiných druhů transfekčních činidel testovaných na této buněčné linii.

4.6 Transfekce různých buněčných linií s různým poměrem transfekčního činidla

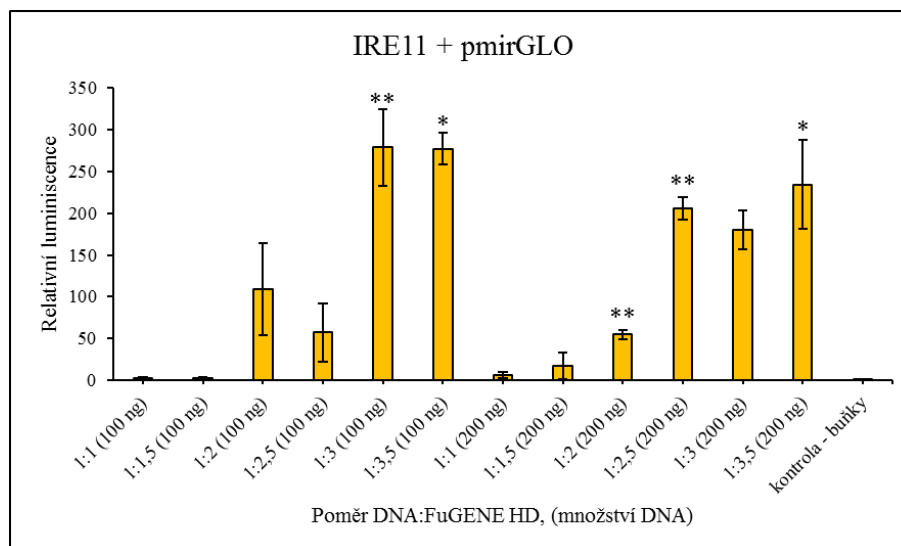
Byla provedena transfekce různých klíčtčích buněčných linií (ISE6, ISE18, IRE11, IRE/CTVM19, IRE/CTVM20) s plazmidem pmirGLO. Tento experiment byl proveden za účelem optimalizace použití transfekčního činidla FuGENE HD u různých klíčtčích buněčných linií. Transfekční činidlo FuGENE HD bylo v tomto případě zvoleno z důvodu, že při předchozích transfekcích byla u klíčtčích buněk transfekovaných pomocí toho činidla pozorována vyšší luminiscence v porovnání s ostatními činidly na chemické bázi. Zároveň byl prodloužen čas pro měření luminiscence po transfekci na 4 dny pro pozorování nejvyššího možného dosažení luminiscence [10]. Tento experiment byl proveden za účelem optimalizace použití transfekčního činidla FuGENE HD u různých klíčtčích buněčných linií. U tohoto experimentu byla měřena pouze aktivita firefly luciferázy, která byla vedena hPGK promotorem, a to z důvodu že *Renilla* luciferáza vedena promotorem SV40 nevykazovala u klíčtčích buněk v dosavadních pozorováních zvýšenou luminiscenci.



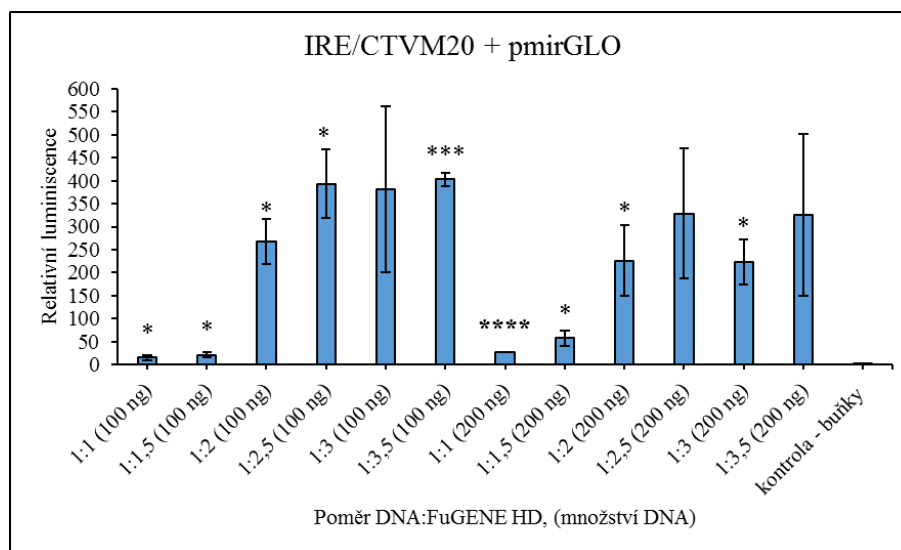
Obr. 18: Relativní luminescence vykazovaná buněčnou linií ISE6 po transfekci plazmidem pmirGLO za pomoci transfekčního činidla FuGENE HD při rozdílných poměrech DNA ku FuGENE HD a různých množství transfekované plazmidové DNA. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku. Signifikantní rozdíly oproti kontrole byly vypočteny pomocí dvouvýběrového nepárového Studentova t-testu (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).



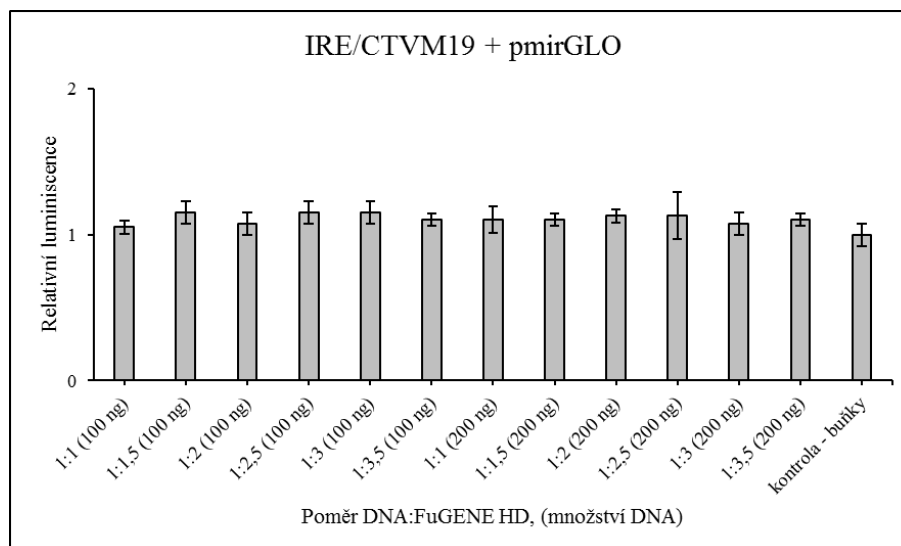
Obr. 19: Relativní luminescence vykazovaná buněčnou linií ISE18 po transfekci plazmidem pmirGLO za pomoci transfekčního činidla FuGENE HD při rozdílných poměrech DNA ku FuGENE HD a různých množství transfekované plazmidové DNA. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku. Signifikantní rozdíly oproti kontrole byly vypočteny pomocí dvouvýběrového nepárového Studentova t-testu (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).



Obr. 20: Relativní luminiscence vykazovaná buněčnou linií IRE11 po transfekci plazmidem pmirGLO za pomoci transfekčního činidla FuGENE HD při rozdílných poměrech DNA ku FuGENE HD a různých množstvích transfekované plazmidové DNA. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku. Signifikantní rozdíly oproti kontrole byly vypočteny pomocí dvouvýběrového nepárového Studentova t-testu (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).



Obr. 21: Relativní luminiscence vykazovaná buněčnou linií IRE/CTVM 20 po transfekci plazmidem pmirGLO za pomoci transfekčního činidla FuGENE HD při rozdílných poměrech DNA ku FuGENE HD a různých množstvích transfekované plazmidové DNA. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku. Signifikantní rozdíly oproti kontrole byly vypočteny pomocí dvouvýběrového nepárového Studentova t-testu (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$).



Obr. 22: Relativní luminescence vykazovaná buněčnou linií IRE/CTVM19 po transfekci plazmidem pmirGLO za pomoci transfekčního činidla FuGENE HD při rozdílných poměrech DNA ku FuGENE HD a různých množství transfekované plazmidové DNA. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku.

Ze všech buněčných linií vykazovala nejvyšší míru luminescence buněčná linie ISE6, a to u obou testovaných množství DNA u poměrů 1:2,5, 1:3 a 1:3,5.

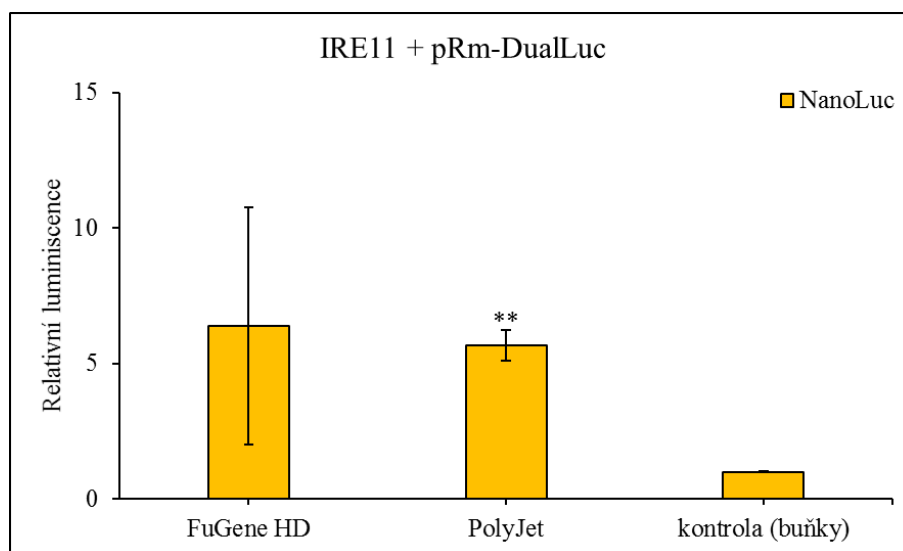
Cílem však bylo ověřit účinnost plazmidů na dalších buněčných liniích, především těch odvozených od druhu *I. ricinus*, tedy IRE 11, IRE/CTVM 20 a IRE/CTVM19. Proto byly další experimenty prováděny s těmito buněčnými liniemi. Byla testována rovněž buněčná linie ISE18, nicméně v porovnání s liniemi IRE11 a IRE/CTVM20 vykazoval ISE18 nižší intenzitu luminescence.

U buněk IRE11 a IRE/CTVM20 byla pozorována zvýšená luminescence. Nejvyšší luminescence byla sledována zejména při použití 100 ng transfekované DNA v poměru 1:3 a 1:3,5 ku transfekčnímu činidlu. U buněk IRE/CTVM19 nebyla pozorována zvýšená luminescence, což koresponduje s předchozími výsledky (Kapitola 4.4).

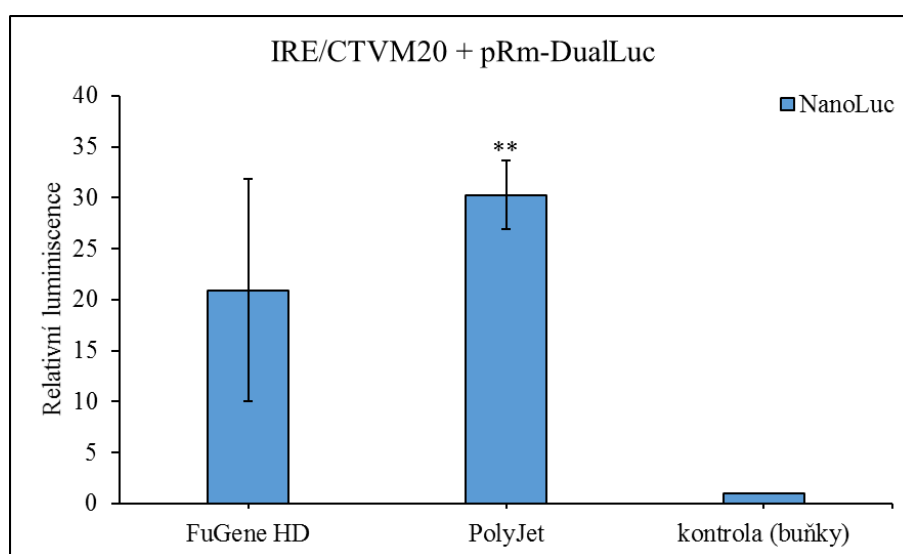
Na základě výsledků bylo rozhodnuto, že optimální množství DNA pro transfekci IRE buněčných linií bude 100 ng při poměru DNA ku transfekčnímu činidlu 1:3.

4.7 Transfekce IRE buněčných linií plazmidem pRm-DualLuc

Klíštěcí buněčné linie z druhu *I. ricinus* IRE11 a IRE/CTVM 20 byly transfekovány plazmidem pRM-DualLuc pomocí dvou rozdílných transfekčních činidel. Byla měřena luminiscence NanoLuc luciferázy. Gen pro NanoLuc byl pod promotorem pro klíštěcí rpL4. Měření luminiscence bylo provedeno 5 dní po transfekci, sumarizace měření je vyobrazena na Obr. 23 a Obr. 24.



Obr. 23: Relativní luminiscence vykazovaná buněčnou linií IRE11 po transfekci plazmidem pRm-DualLuc za pomoci transfekčních činidel FuGENE HD a PolyJet. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku. Signifikantní rozdíly oproti kontrole byly vypočteny pomocí dvouvýběrového nepárového Studentova t-testu (** P < 0,01).



Obr. 24: Relativní luminiscence vykazovaná buněčnou linií IRE/CTVM20 po transfekci plazmidem pRm-DualLuc za pomoci transfekčních činidel FuGENE HD a PolyJet. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou

odchylku. Signifikantní rozdíly oproti kontrole byly vypočteny pomocí dvouvýběrového nepárového Studentova t-testu (** P <0,01).

U klíštěcích buněk IRE11 byla pozorována nepatrně zvýšená luminiscence. Intenzita luminiscence byla u obou tranfekčních činidel srovnatelná, přičemž u činidla FuGENE HD byla vypočtena poměrně vysoká směrodatná odchylka průměru jednotlivých měření. Na základě naměřených hodnot nelze jednoznačně potvrdit, zdali v tomto případě u IRE11 buněk probíhala exprese NanoLuc luciferázy.

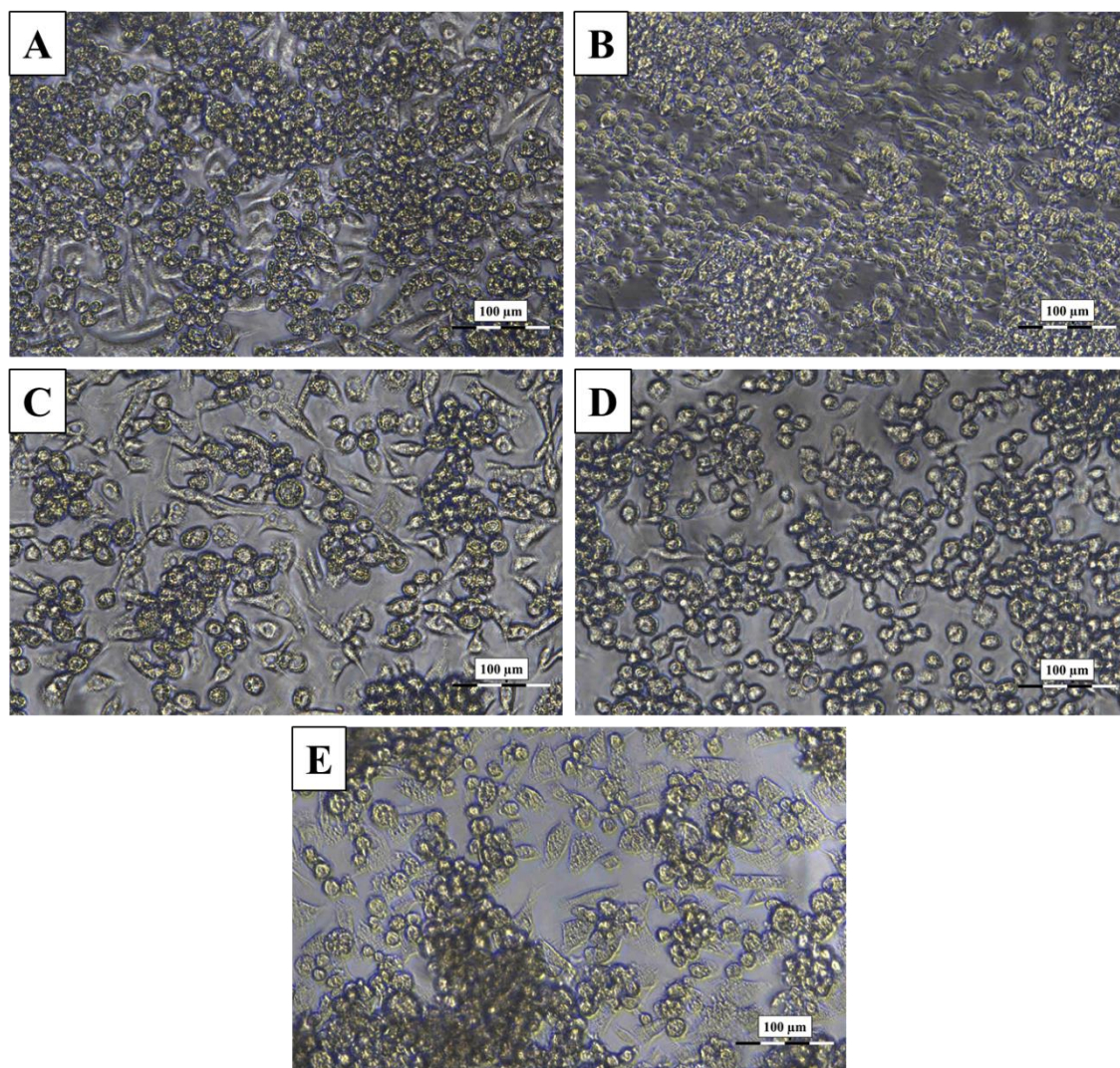
Oproti tomu buněčná linie IRE/CTVM20 vykazovala vyšší luminiscenci u obou transfekčních činidel, přičemž buňky transfekované pomocí PolyJet vykazovaly vyšší míru luminiscence než buňky transfekované FuGENE HD. Lze tedy říct, že klíštěcí promotor rpL4 byl efektivní při genové expresi NanoLuc luciferázy v IRE/CTVM20 buňkách.

4.8 Transfekce klíštěcích buněk plazmidem SP-dCas9-VPR-hPGK

Na základě výsledků, kdy u buněk z druhu *I. ricinus* vykazovaly buňky transfekované pomocí elektroporace zvýšenou míru luminiscence (Obr. 15 a Obr. 16), bylo rozhodnuto o provedení elektroporace u buněčných linií IRE11 a IRE/CTVM20 s plazmidem SP-dCas9-VPR-hPGK. Tato část práce měla posloužit k ověření, zdali je elektroporace vhodným nástrojem pro vložení cizí DNA do klíštěcích buněk a zdali bude probíhat pod hPGK promotorem exprese jiného genu, než byl gen pro firefly luciferázu, zde konkrétně gen dCas9-VPR. Po elektroporaci byla provedena izolace RNA transfekovaných buněk a následný přepis do cDNA. Se získanou cDNA transfekovaných buněk byla provedena qPCR reakce s primery specifickými pro fragmenty plazmidu, konkrétně části VPR (s primery F_VPR_1 a R_VPR_1, viz. Tabulka III). Elektroporace byla provedena v biologických triplikátech.

U obou klíštěcích buněčných linií IRE11 a IRE/CTVM20 byly při amplifikaci cDNA pomocí qPCR a následné agarózové elektroforózy pozorovány nespecifické produkty, proto tyto výsledky nejsou v práci zahrnuty.

4.9 Morfologie klíčtécích buněk



Obr. 25: Morfologické rysy buněk klíčtécích buněčných linií (A) ISE6, pasáž 131; (B) ISE18, pasáž 50; (C) IRE11, pasáž 313; (D) IRE/CTVM19, pasáž 473; (E) IRE/CTVM20, pasáž 468. Zvětšení 20x.

Snímky buněk byly pořízeny 7 dní po pravidelné pasáži se čtrnáctidenními intervaly. Buňky u všech zachycených buněčných linií se vyznačovaly heterogenitou, buněčné kultury obsahovaly více buněčných typů. U všech buněčných linií převažoval kulovitý tvar buněk. Mimo to se u jednotlivých kultur vyskytovaly buňky nepravidelného tvaru. U kultur IRE11, IRE/CTVM20 a ISE6 se vyskytovaly buňky protáhlého tvaru připomínající fibroblasty. U linie IRE/CTVM20 byly pozorovány buňky kubického tvaru. U všech buněčných linií se tvořily shluky buněk. Linie ISE18 se vyznačovala tím, že obsahovala na pohled drobnější buňky než ostatní linie.

5 DISKUSE

Tato diplomová práce navazuje na mou bakalářskou práci, ve které bylo ověřováno několik promotorů pro expresi reportérových genů v klíčících buněčných liniích [89]. V bakalářské práci byly použity virové promotory pro SV40 a CMV. Zároveň byly použity sekvence promotorů získané analýzou genomové sekvence *I. scapularis*, a to promotory pro geny EF-1 α , aktin a rpL4. Všechny zmíněné promotory vedly reportérový gen pro GFP v plazmidovém konstrukt, který byl následně transfekován do klíčících buněk ISE6 a IRE/CTVM19 pomocí elektroporace a transfekčního činidla PolyJet *In Vitro* DNA Transfection Reagent (SignaGen). Nicméně za těchto podmínek nebyla pozorována exprese daného reportérového genu.

Předkládaná diplomová práce byla zaměřena na optimalizaci podmínek pro transfekci klíčících buněčných linií. V mé diplomové práci bylo použito širší spektrum transfekčních činidel. Jako reportérové geny zde posloužily geny pro luciferázu, které byly součástí plazmidových vektorů, a zároveň byly použity nové plazmidové vektory určené k použití v eukaryotických buňkách. Funkce těchto plazmidových vektorů byla ověřena v dřívějších studiích [10; 11]. Kontrolní transfekce byla provedena s lidskou meduloblastomovou buněčnou linií DAOY (Kapitola 4.1). Rozhodnutí o použití nového plazmidového vektoru bylo učiněno na základě nedávno uveřejněných publikací [7; 11], které popisují transfekci některých klíčících buněčných linií. Například použití plazmidového vektoru pmirGLO a jeho modifikací bylo popsáno celkem ve třech studiích [7; 10; 11]. Originální varianta tohoto vektoru obsahuje geny pro dva druhy luciferáz – gen pro firefly luciferázu pod lidským PGK promotorem a gen pro *Renilla* luciferázu pod virovým SV40 promotorem. Tyto zmíněné promotory fungují v lidských buňkách, což bylo potvrzeno transfekcí lidské buněčné linie DAOY (Obr. 5). Nicméně dá se předpokládat, že efektivita těchto promotorů může být u buněk hmyzu či pavoukovic odlišná.

Experimenty, které byly v mé práci provedené s klíčícími buňkami ukázaly, že promotor hPGK byl schopen iniciovat expresi genu pro firefly luciferázu v plazmidech pmirGLO a pRm-DualLuc. S použitím tohoto promotoru v plazmidovém vektoru byla pozorována zvýšená luminiscence u buněk ISE6 (Obr. 8, Obr. 9, Obr. 18), ISE18 (Obr. 19), IRE11 (Obr. 15, Obr. 20) a IRE/CTVM20 (Obr. 16, Obr. 21, Obr. 24). K podobnému závěru dospěli ve své studii Tuckow & Temeyer (2015), kteří potvrdili že promotor hPGK vedl k detekovatelné aktivitě firefly luciferázy v klíčících buňkách BME26 [10]. Funkčnost tohoto promotoru

rovněž ověřili Kusakisako a kol. (2018) u ISE6 buněk [11]. Současně SV40 promotor se u buněk transfekovaných plazmidem pmirGLO neprokázal být efektivním v iniciaci genové exprese *Renilla* luciferázy, a to u žádných z používaných klíštěcích buněk (Obr. 12; Obr. 13; Obr. 15; Obr. 16). Pro získání plazmidu pRM-DualLuc byla kontaktována výzkumná skupina Dr. Temeyera [10] s prosbou o poskytnutí tohoto jimi vytvořeného plazmidového konstruktů. Účelem bylo ověření aktivity jejich nového promotoru rpL4 z klíštěcího genomu *R. microplus* v našich klíštěcích buněčných liniích. Bylo potvrzeno, že promotor rpL4 byl funkční jak v klíštěcích (Obr. 9; Obr. 10; Obr. 23; Obr. 24), tak do určité míry i v lidských buňkách (Obr. 6). Tato pozorování nasvědčují faktu, že tento eukaryotický promotor může pracovat v různých druzích eukaryotických buněk – v lidských buňkách (Obr. 6), buňkách *R. microplus* [10], *I. ricinus* (Obr. 24) a *I. scapularis* (Obr. 9).

Jako transfekční metody pro klíštěcí buňky byly testovány elektroporace a různé druhy transfekčních činidel na chemické bázi. Funkce činidel pracujících na principu doručení nukleové kyseliny do buněk pomocí kationtových lipidů a lipozomů již byla na klíštěcích buňkách ověřena v několika studiích [66; 78]. Pro mou práci bylo rovněž zvoleno transfekční činidlo fungující pomocí lipozomů, konkrétně LipoJet *In Vitro* Transfection Kit (SignaGen Laboratories). Nutno dodat, že transfekční činidla testovaná ve studii Barryho a kol. (2013) byla u klíštěcích buněk používána za účelem doručení RNA pro umlčení cílových genů [66], nikoli za účelem přechodné exprese reportérových genů jako tomu bylo v mé práci. Dále byla v mé práci použita nelipozomální transfekční činidla obsahující polymery. Obsažené polymery tvoří společně s transfekovanou nukleovou kyselinou komplexy, které jsou následně doručovány do buněk. Konkrétně se jednalo o PolyJet *In Vitro* DNA Transfection Reagent (SignaGen Laboratories) a X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent (Roche Diagnostics). Rovněž bylo použito nelipozomální činidlo FuGENE HD Transfection Reagent (Promega), které se vyznačuje tím, že je určeno zejména pro buňky, které jsou těžko transfekovatelné včetně např. hmyzích buněk [91].

Další použitou metodou transfekce byla elektroporace. Elektroporace má výhodu v tom, že se jedná o univerzální metodu, kterou lze aplikovat na široké spektrum organismů a buněk. Nevýhodou elektroporace je možnost zvýšeného poškození buněk způsobeného vysokonapěťovými pulzy a nespecifický transport molekul do a ven z buňky [92]. O použití elektroporace u klíštěcích buněk není k dispozici žádná publikace, nicméně byla provedena

úspěšná elektroporace např. vajíček *R. microplus* [93] či vajíček a nymf *I. scapularis* za účelem utlumení genové exprese pomocí RNAi [94].

Zvolení vhodné metody transfekce není jediným parametrem důležitým pro účinnou transfekci. Dalšími důležitými faktory jsou například dobrý celkový stav buněk, konfluence buněk, číslo buněčné pasáže a v neposlední řadě také kvalita transfekované DNA [95]. U klíštěcích buněk se ukázala být důležitá rovněž volba vhodného plazmidového vektoru (Obr. 11).

Dalším důležitým faktorem, zejména u buněk, které nejsou savčího původu, je volba vhodného promotoru vedoucího reportérový gen. To bylo viditelné zejména při transfekcích plazmidem pmirGLO, kde měření ukázala, že nedocházelo k expresi reportérového genu pro *Renilla* luciferázu, který byl vedený virovým promotorem SV40 (Obr. 7; Obr. 8; Obr. 12; Obr. 13; Obr. 15; Obr. 16). Tyto výsledky korespondují s výsledky studie Tuckow & Temeyer (2015) [10], kde u klíštěcí buněčné linie BME26 původem z *R. microplus* nebyla detekována aktivita *Renilla* luciferázy, která byla vedená promotorem SV40. Jako důvod bylo uvedeno, že promotor SV40 pravděpodobně nefunguje s klíštěcími buňkami [10]. To bylo potvrzeno i v mé práci. Kromě toho jiná publikace uvádí, že promotor SV40 vykazoval slabou transkripční aktivitu i v hmyzích buněčných liniích [96]. Jako další důvod, proč nefungovala *Renilla* luciferáza uvádí Tuckow & Temeyer (2015) to, že gen pro *Renilla* luciferázu obsažený v plazmidu pmirGLO je optimalizován na použití v lidských buňkách [10]. Nicméně v rámci mého pozorování vykazovala *Renilla* luciferáza pod SV40 promotorem u lidských buněk podstatně nižší signál luminiscence oproti firefly luciferáze pod hPGK promotorem (Obr. 5).

Další proměnnou týkající se efektivní transfekce buněk mohou být (ne)vhodně zvolené časové intervaly měření luminiscence, tedy kolik dní po transfekci buněk je luminiscence měřena. Hodnoty luminiscence u transfekovaných klíštěcích buněk BME26 v rozdílných časových intervalech ve své studii porovnávaly Tuckow & Temeyer (2015) [10]. Přišli se zjištěním, že u buněk BME26 byla luminiscence detekována již 2 dny po transfekci, přičemž maximální aktivita luciferázy byla pozorována 5 dní po transfekci; zároveň byla stále detekována i 7 dní po transfekci [10]. Kusakisako a kol. (2018) uvádí, že u buněk ISE6 byla luminiscence s úspěchem měřena 4 dny po transfekci [11]. V rámci mé práce bylo vycházeno z těchto předpokladů a luminiscence byla u buněk měřena v rozmezí 3-7 dní po transfekci.

Výsledky transfekcí se u jednotlivých buněčných linií značně lišily. Například pro buněčnou linii ISE6 se zdála být nejvíce efektivní transfekce pomocí FuGENE HD (Obr. 7; Obr. 9; Obr. 18), zvýšená luminiscence byla rovněž pozorována u elektroporace (Obr. 8; Obr. 10). Buněčná linie ISE6 je klíčecí buněčnou linií široce používanou k experimentům s různým zaměřením. Byla používána například k ověření funkčnosti různých promotorů [7; 11; 78] či byly zkoumány přímo vlastnosti této klíčecí buněčné linie s cílem lépe objasnit interakce klíšťat s patogeny [97; 98; 99; 100]. Navzdory komplexnímu využívání ISE6 buněčné linie je k dispozici nedostatek publikací o transfekci a expresi cizích genů v této buněčné linii [7; 11; 49; 78]. Nutno dodat, že ve studii Kusakisaka a kol. (2018) byla u této klíčecí linie rovněž pozorována zvýšená míra luminiscence při použití plazmidu pmirGLO, ovšem za použití jiného transfekčního činidla [11].

U buněčné linie IRE11 byla pozorována zvýšená luminiscence při použití FuGENE HD (Obr. 12; Obr. 20; Obr. 23) a při použití elektroporace (Obr. 15). Tato klíčecí buněčná linie byla používána především ke studiu interakcí klíště-patogen [101] a ke studiu vlastností klíčecích endosymbiontů [71; 102]. Nejsou k dispozici žádné publikace zmiňující transfekci IRE11, proto mé výsledky nebylo možné porovnat s jinou studií.

U buněčné linie IRE/CTVM20 byla pozorována rovněž zvýšená luminiscence při použití FuGENE HD (Obr. 13; Obr. 21; Obr. 24), při použití PolyJet (Obr. 13; Obr. 24) a při elektroporaci (Obr. 16). Tato klíčecí buněčná linie byla též využívána především ke studiu klíšťaty přenášených patogenů [97], zejména k propagaci těchto patogenů v IRE/CTVM20 buňkách [103]. Stejně jako u buněk IRE11, není ani u buněk IRE/CTVM20 k dispozici publikace, která by komentovala metody transfekce využitelné na těchto buňkách, či dokonce promotory fungující v těchto buňkách.

U buněčné linie IRE/CTVM19 nebyla zaznamenána žádná změna luminiscence při použití různých metod transfekce (Obr. 14; Obr. 17; Obr. 22). Na klíčecí buněčné linii IRE/CTVM19 byly již v minulosti prováděny úspěšné transfekce [47; 66]. Nicméně v mých experimentech překvapivě nebyly po transfekcích pozorovány žádné změny luminiscence. Důvodů může být několik. Mohou to být zejména výše zmíněné faktory ovlivňující transfekci, např. nevhodně zvolené transfekční činidlo. V minulosti bylo na buňkách IRE/CTVM19 testováno transfekční činidlo na bázi lipozomů za účelem doručení RNA do buněk [66]. V mé práci bylo rovněž použito transfekční činidlo fungující na principu lipozomu (LipoJet), s tím rozdílem, že

transportovanou nukleovou kyselinou byla DNA. Nutno dodat, že přesná příčina toho, proč transfekce u buněk IRE/CTVM19 v mé práci nefungovaly nebyla dále zjišťována.

Překvapivé výsledky přineslo také testování různých poměrů transfekčního činidla a množství DNA prováděné na různých druzích klíčecích buněčných linií s transfekčním činidlem FuGENE HD (Kapitola 4.6). V tomto případě byla relativní luminiscence řádově o stovky vyšší než při testování transfekčního činidla FuGENE společně s ostatními činidly (Kapitola 4.2 a 4.4). Důvodem takto rozdílných výsledků mohl být fakt, že luminiscence byla měřena v delším časovém intervalu po transfekci (4 dny). Jako další vysvětlení se nabízí použití jiného testovacího systému pro měření luminiscence, než bylo používání v předchozích kapitolách, a to Luciferase Assay System (Promega). Tento systém využívá automatického dávkování reagensů k transfekovaným buňkám, kdy probíhá měření luminiscence bezprostředně po přidání reagensie. Systém používaný v ostatních případech při transfekci plazmidu pmirGLO – tedy Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega), využívá manuální dávkování reagensů k transfekovaným buňkám. V důsledku časového prodloužení mezi přidáním látky a měřením může tedy dojít k poklesu luminiscenčního signálu. Nicméně výrobcem je tento systém označován jako systém se stabilními signály luminiscence, které mají poločas až 2 hodiny, zároveň se jedná o systém vhodný k práci s větším množstvím vzorků [104]. Proto se tato hypotéza zdá být jako méně pravděpodobná. Nutno podotknout, že tato část mé práce sloužila pouze k optimalizaci množství transfekčního činidla a množství DNA. Výsledky se neodchylovaly od původního očekávání, nebylo tedy nezbytné tento experiment opakovat.

V mé práci byl rovněž proveden pokus o transfekci plazmidu SP-dCas9-VPR-hPGK do buněk IRE11 a IRE/CTVM20, který nebyl úspěšný (Kapitola 4.8). Tento plazmid obsahoval gen dCas9-VPR pod promotorem hPGK. Gen pro dCas9-VPR protein kóduje endonukleázu Cas9 spojenou s potřebným aktivátorem VPR [105]. Potencionální využití plazmidové kostry SP-dCas9-VPR je v aplikaci nástroje pro editaci genomu CRISPR/Cas9. Zvolenou metodou transfekce byla v tomto případě elektroporace. Ačkoli se promotor hPGK ukázal být jako funkční ve vedení přechodné exprese genu pro luciferázu v klíčecích buňkách, v tomto případně nebyla exprese genu detekována, respektive během qPCR reakce byl zachycen nespecifity u cDNA z netransfekovaných buněk. Bylo by tedy žádoucí zopakovat celou transfekci.

Všechny získané výsledky nasvědčují faktu, že pro každou buněčnou linii, byť pocházející ze stejného klíštěcího druhu, platí jiné podmínky transfekce [66]. Je tedy vhodné optimalizovat metody pro každou buněčnou linii individuálně. Zároveň je nutné zanalyzovat co nejvíce možných faktorů, které mohou úspěšnost transfekce ovlivnit.

Jedním z takových faktorů, který může ovlivnit efektivitu transfekce je druh transfekovaných buněk [95]. Populace studovaných klíštěcích buněčných linií byla heterogenní, obsahovala buňky, které nejsou zcela přisedlé k povrchu kultivační nádoby, volně plavající buňky a adherentní buňky protáhlého tvaru (Obr. 25). Z tohoto důvodu bylo těžké předpovědět, jak morfologie buněk může ovlivnit účinnost transfekce. Zároveň nemůžeme rozlišit, které buňky byly transfekované, a které nikoli. Izolace populace buněk s jednotným tvarem není možná, jelikož předchozí pokusy o klonování buněk jednotného tvaru vedly buď k opětovnému výskytu heterogenní populace anebo selhaly [63; 69]. Heterogenita buněk byla pozorována již od počátku formování klíštěcích buněčných linií [69] a byla udržována až do současnosti prostřednictvím dlouhodobé kultivace buněk [64].

Rozdíly v efektivitě transfekce napříč různými druhy klíštěcích buněčných linií mohou být zapříčiněny nejen heterogenitou studovaných buněčných linií (Obr. 25), ale i rozdílnými karyotypy, které ve své studii popsali Kotsarenko a kol. [74]. Modální počet chromozomů u testovaných buněčných linií byl rozdílný v porovnání s klíšťaty stejného druhu, ze kterého buněčné linie pocházejí. Zároveň byl pozorován jiný modální počet chromozomů u stejné buněčné linie, která měla rozdílné číslo pasáže. Karyotyp buněčné linie IRE/CTVM19 byl označen za relativně nestabilní, jelikož vykazoval změny u buněk s vysokým počtem pasáží. V pasáži 179 obsahoval nejvyšší počet buněk očekávaný diploidní počet chromozomů 28, přičemž v pasážích 442 a 475 obsahoval nejvyšší počet buněk počet chromozomů v rozmezí 48-52, tudíž téměř dvojnásobek. Naproti tomu buněčná linie IRE/CTVM20 vykazovala v průběhu času relativně stabilní karyotyp, a to s modálním počtem chromozomů 23 [74]. Buněčné linie IRE11 a ISE6 měly ve vysokých pasážích modální počet chromozomů 22 (nepublikovaná data). Buněčná linie ISE18 měla u buněk s nízkým počtem pasáží (35) modální počet chromozomů 30, což bylo blízké číslo normálnímu počtu diploidních chromozomů u *I. scapularis* (tj. 28 [69]). Ve vyšší pasáži (133) měli ISE18 buňky počet modálních chromozomů 48 [74].

Publikované práce ukazují, že postupy genetické manipulace aplikovatelné na jiné eukaryotické buněčné systémy je možné aplikovat rovněž na klíčecí buněčné linie [49; 50; 51]. Klíčecí buňky mají potencionální využití jako expresní systémy pro výrobu specifických klíčecích rekombinantních proteinů, které by produkcí v klíčecích buňkách získaly nativní posttranslační modifikace [7]. Použití klíčecích buněčných linií v experimentech je však značně limitující. Pouze některé z klíčecích linií mohou být úspěšně transfekované, zároveň se liší úroveň exprese reportérových genů napříč různými druhy buněčných linií. Podstatný je rovněž výběr vhodného transfekčního činidla a podmínek transfekce. V neposlední řadě je důležitá volba vhodného vektoru a promotoru pro reportérový gen.

6 ZÁVĚR

V mé diplomové práci byla ověřena účinnost promotorů lidské PGK a rpL4 původem z *R. microplus* v klíčcích buněčných liniích ISE6, IRE11 a IRE/CTVM20. Dále byl optimalizován postup pro transfekci výše zmíněných klíčcích buněčných linií pomocí transfekčních činidel a elektroporace, a to za účelem produkce reportérových genů pro firefly a NanoLuc luciferázu.

7 SEZNAM ZKRATEK

bp	párů bází
CaMV	z angl. cauliflower mosaic virus
Cas9	z angl. CRISPR associated gene 9
cDNA	z angl. complementary DNA (komplementární DNA)
CRISPR	z angl. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CMV	cytomegalovirus
EF-1 α	elongation factor-1 α
Fluc	firefly luciferáza
Gbp	z angl. giga base pair
gDNA	genomová DNA
hPGK	z angl. human phosphoglycerate kinase
HSV-TK	z angl. herpes simplex virus thymidine kinase
PBS	z angl. Phosphate Buffered Saline (fosfátový pufr)
PCR	polymerázová řetězová reakce
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
Rluc	<i>Renilla</i> luciferáza
RNAi	RNA interference
rpL4	ribosomal protein L4
rpm	otáčky za minutu
RT-PCR	reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce
SV40	Simian virus 40
TALEN	z angl. Transcription activator-like effector nuclease
ZFN	z angl. Zinc finger nuclease

8 REFERENCE

- [1] HÖNIG, Vaclav, Pavel SVEC, Petr HALAS et al. Ticks and tick-borne pathogens in South Bohemia (Czech Republic) – Spatial variability in *Ixodes ricinus* abundance, *Borrelia burgdorferi* and tick-borne encephalitis virus prevalence. *Ticks and Tick-borne Diseases* [online]. 2015, **6**(5), 559-567 [cit. 2021-04-05]. ISSN 1877959X. Dostupné z: doi:10.1016/j.ttbdis.2015.04.010
- [2] JAIME BETANCUR HURTADO, Oscar a Cristian GIRALDO-RÍOS. Economic and Health Impact of the Ticks in Production Animals. *Ticks and Tick-Borne Pathogens* [online]. IntechOpen, 2019 [cit. 2020-05-17]. ISBN 978-1-78985-765-8. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.81167
- [3] ČERNÝ, Jiří, Geoffrey LYNN, Johana HRNKOVÁ, Maryna GOLOVCHENKO, Natalia RUDENKO a Libor GRUBHOFFER. Management Options for *Ixodes ricinus*-Associated Pathogens: A Review of Prevention Strategies. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. 2020, **17**(6) [cit. 2020-10-22]. ISSN 1660-4601. Dostupné z: doi:10.3390/ijerph17061830
- [4] BENELLI, Giovanni, Roman PAVELA, Angelo CANALE a Heinz MEHLHORN. Tick repellents and acaricides of botanical origin: a green roadmap to control tick-borne diseases?. *Parasitology Research* [online]. 2016, **115**(7), 2545-2560 [cit. 2020-05-18]. ISSN 0932-0113. Dostupné z: doi:10.1007/s00436-016-5095-1
- [5] CARVALHO, Danilo, Andrew MCKEMEY, Luiza GARZIERA et al. Suppression of a Field Population of *Aedes aegypti* in Brazil by Sustained Release of Transgenic Male Mosquitoes. *PLOS Neglected Tropical Diseases* [online]. 2015, **9**(7) [cit. 2020-05-06]. ISSN 1935-2735. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pntd.0003864
- [6] PAES DE ANDRADE, Paulo, Francisco ARAGÃO, Walter COLLI et al. Use of transgenic *Aedes aegypti* in Brazil: risk perception and assessment. *Bulletin of the World Health Organization* [online]. 2016, **94**(10), 766-771 [cit. 2020-05-06]. ISSN 0042-9686. Dostupné z: doi:10.2471/BLT.16.173377

- [7] HERNANDEZ, Emmanuel, Kodai KUSAKISAKO, Takeshi HATTA a Tetsuya TANAKA. *Characterization of an iron-inducible Haemaphysalis longicornis tick-derived promoter in an Ixodes scapularis-derived tick cell line (ISE6)* [online]. 2019, **12**(1) [cit. 2020-09-14]. ISSN 1756-3305. Dostupné z: doi:10.1186/s13071-019-3574-9
- [8] DE LA FUENTE, José, Katherine KOCAN, Consuelo ALMAZÁN a Edmour BLOUIN. RNA interference for the study and genetic manipulation of ticks. *Trends in Parasitology* [online]. 2007, **23**(9), 427-433 [cit. 2020-05-18]. ISSN 14714922. Dostupné z: doi:10.1016/j.pt.2007.07.002
- [9] BOETTCHER, Michael a Michael T. MCMANUS. Choosing the Right Tool for the Job: RNAi, TALEN, or CRISPR. *Molecular Cell* [online]. 2015, **58**(4), 575-585 [cit. 2020-05-18]. ISSN 10972765. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcel.2015.04.028
- [10] TUCKOW, Alexander a Kevin TEMEYER. Discovery, adaptation and transcriptional activity of two tick promoters: Construction of a dual luciferase reporter system for optimization of RNA interference in rhipicephalus boophilus) microplus cell lines. *Insect Molecular Biology* [online]. 2015, **24**(4), 454-466 [cit. 2020-05-20]. ISSN 09621075. Dostupné z: doi:10.1111/imb.12172
- [11] KUSAKISAKO, Kodai, Akiko IDO, Tatsunori MASATANI, Haruki MOROKUMA, Emmanuel HERNANDEZ, Melbourne TALACTAC, Kentaro YOSHII a Tetsuya TANAKA. Transcriptional activities of two newly identified Haemaphysalis longicornis tick-derived promoter regions in the Ixodes scapularis tick cell line (ISE6). *Insect Molecular Biology* [online]. 2018, **27**(5), 590-602 [cit. 2020-05-20]. ISSN 09621075. Dostupné z: doi:10.1111/imb.12497
- [12] Overview: Ticks, People, and Animals. SONENSHINE, Daniel a R. ROE. *Biology of ticks*. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 2014, s. 4-5. ISBN 978-019-9744-053.
- [13] NAVA, Santiago, Alberto GUGLIELMONE a Atilio MANGOLD. An overview of systematics and evolution of ticks. *Frontiers in Bioscience* [online]. 2009, **14**(8), 2857-77 [cit. 2020-10-19]. Dostupné z: doi:10.2735/3418

- [14] GUGLIELMONE, Alberto, Richard ROBBINS, Dmitry APANASKEVICH, Trevor PETNEY, Agustín ESTRADA-PEÑA, Ivan HORAK, Renfu SHAO a Stephen BARKER. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa* [online]. 2010, **2528**, 1-28 [cit. 2020-10-19]. Dostupné z: doi:10.5281/zenodo.196488
- [15] Tick maps: Tick species - Distribution maps. *European Centre for Disease Prevention and Control: An agency of the European Union* [online]. Stockholm: ECDC, 2020 [cit. 2020-10-20]. Dostupné z: <https://www.ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/surveillance-and-disease-data/tick-maps>
- [16] MEDLOCK, Jolyon, Kayleigh HANSFORD, Antra BORMANE et al. *Driving forces for changes in geographical distribution of Ixodes ricinus ticks in Europe* [online]. 2013, **6**(1) [cit. 2020-10-20]. ISSN 1756-3305. Dostupné z: doi:10.1186/1756-3305-6-1
- [17] OTRANTO, Domenico, Filipe DANTAS-TORRES a Maria SANTOS-SILVA, ed. *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758). ESTRADA-PEÑA, Agustín, Andrei MIHALCA a Trevor PETNEY. *Ticks of Europe and North Africa: A Guide to Species Identification*. Cham: Springer, 2017, s. 189-193. ISBN 978-3-319-63759-4.
- [18] ORLÍKOVÁ, Hana, Patrik LENZ a Jan KYNČL. Klišťová encefalitida v České republice v roce 2019 – zpráva o epidemiologické situaci v kontextu předcházejících let. *Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie* [online]. Praha: SZÚ, 2019, **28**(11-12), 221-218 [cit. 2020-10-22]. ISSN 1804 – 8676. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/KE/CEM_5_2020_klistata_Zprava_za_2019.pdf
- [19] ORLÍKOVÁ, Hana, Kateřina KYBICOVÁ, Martin GAŠPÁREK, Jan KYNČL a Marek MALÝ. Lymeská borrelióza v České republice: Roční zpráva o epidemiologické situaci za rok 2018. *Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie* [online]. Praha: SZÚ, 2019, **28**(11-12), 453-458 [cit. 2020-10-22]. ISSN 1804 – 8676. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/lym.borrel/publikace/surveillance_LB_2018.pdf

- [20] HERRMANN, Coralie a Lise GERN. Search for blood or water is influenced by *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus*. *Parasit Vectors* [online]. 2015, **8**(1) [cit. 2020-11-02]. ISSN 1756-3305. Dostupné z: doi:10.1186/s13071-014-0526-2
- [21] FRANCISCETTI, Ivo, Anderson SA-NUNES, Ben MANS, Isabel SANTOS a Jose RIBEIRO. The role of saliva in tick feeding. *Frontiers in Bioscience* [online]. 2009, (14), 2051-2088 [cit. 2020-10-20]. ISSN 10939946. Dostupné z: doi:10.2741/3363
- [22] ŠIMO, Ladislav, Maria KAZIMIROVA, Jennifer RICHARDSON a Sarah BONNET. The Essential Role of Tick Salivary Glands and Saliva in Tick Feeding and Pathogen Transmission. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. 2017, **7** [cit. 2020-10-20]. ISSN 2235-2988. Dostupné z: doi:10.3389/fcimb.2017.00281
- [23] SPRONG, Hein, Jos TRENTELMAN, Ingar SEEMANN et al. *ANTIDotE: anti-tick vaccines to prevent tick-borne diseases in Europe* [online]. 2014, **7**(1) [cit. 2020-10-22]. ISSN 1756-3305. Dostupné z: doi:10.1186/1756-3305-7-77
- [24] CHMELARĚ, Jindřich, Jan KOTÁL, Anna KOVAŘÍKOVÁ a Michail KOTSYFAKIS. The Use of Tick Salivary Proteins as Novel Therapeutics. *Frontiers in Physiology* [online]. 2019, **10** [cit. 2020-10-22]. ISSN 1664-042X. Dostupné z: doi:10.3389/fphys.2019.00812
- [25] EISEN, Rebecca a Lars EISEN. The Blacklegged Tick, *Ixodes scapularis*: An Increasing Public Health Concern. *Trends in Parasitology* [online]. 2018, **34**(4), 295-309 [cit. 2020-10-30]. ISSN 14714922. Dostupné z: doi:10.1016/j.pt.2017.12.006
- [26] EISEN, Rebecca, Lars EISEN a Charles BEARD. County-Scale Distribution of *Ixodes scapularis* and *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) in the Continental United States. *Journal of Medical Entomology* [online]. 2016, **53**(2), 349-386 [cit. 2020-10-30]. ISSN 0022-2585. Dostupné z: doi:10.1093/jme/tjv237
- [27] EISEN, Rebecca, Kiersten KUGELER, Lars EISEN, Charles BEARD a Christopher PADDOCK. Tick-Borne Zoonoses in the United States: Persistent and Emerging Threats to Human Health. *ILAR Journal* [online]. 2017, **58**(3), 319-335 [cit. 2020-10-30]. ISSN 1084-2020. Dostupné z: doi:10.1093/ilar/ilx005

- [28] KEIRANS, James, H. HUTCHESON, Lance DURDEN a J.S.H. KLOMPEN. Ixodes (Ixodes) scapularis (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology* [online]. 1996, **33**(3), 297-318 [cit. 2020-10-30]. ISSN 1938-2928. Dostupné z: doi:10.1093/jmedent/33.3.297
- [29] YUVAL, Boaz a Andrew SPIELMAN. Duration and Regulation of the Developmental Cycle of Ixodes dammini (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology* [online]. 1990, **27**(2), 196-201 [cit. 2020-10-30]. ISSN 1938-2928. Dostupné z: doi:10.1093/jmedent/27.2.196
- [30] MURGIA, Maria, Lesley BELL-SAKYI, José DE LA FUENTE et al. Meeting the challenge of tick-borne disease control: A proposal for 1000 Ixodes genomes. *Ticks and Tick-borne Diseases* [online]. 2019, **10**(1), 213-218 [cit. 2020-11-01]. ISSN 1877959X. Dostupné z: doi:10.1016/j.ttbdis.2018.08.009
- [31] GULIA-NUSS, Monika, Andrew NUSS, Jason MEYER et al. Genomic insights into the Ixodes scapularis tick vector of Lyme disease. *Nature Communications* [online]. 2016, **7**(1) [cit. 2020-09-22]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms10507
- [32] ULLMANN, Amy, C. LIMA, Felix GUERRERO, Joseph PIESMAN a William BLACK. Genome size and organization in the blacklegged tick, Ixodes scapularis and the Southern cattle tick, Boophilus microplus. *Insect Molecular Biology* [online]. 2005, **14**(2), 217-222 [cit. 2020-10-09]. ISSN 0962-1075. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2583.2005.00551.x
- [33] DE LA FUENTE, José, Robert WATERHOUSE, Daniel SONENSHINE, R. ROE, Jose RIBEIRO, David SATTELLE a Catherine HILL. Tick Genome Assembled: New Opportunities for Research on Tick-Host-Pathogen Interactions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. 2016, **6** [cit. 2020-10-05]. ISSN 2235-2988. Dostupné z: doi:10.3389/fcimb.2016.00103
- [34] MILLER, Jason, Sergey KOREN, Kari DILLEY, Derek HARKINS, Timothy STOCKWELL, Reed SHABMAN a Granger SUTTON. A draft genome sequence for

- the *Ixodes scapularis* cell line, ISE6. *F1000Research* [online]. 2018, **7** [cit. 2021-03-31]. ISSN 2046-1402. Dostupné z: doi:10.12688/f1000research.13635.1
- [35] JIA, Na, Jinfeng WANG, Wenqiang SHI et al. Large-Scale Comparative Analyses of Tick Genomes Elucidate Their Genetic Diversity and Vector Capacities. *Cell* [online]. 2020, **182**(5), 1328-134013 [cit. 2021-04-02]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2020.07.023
- [36] BARRERO, Roberto, Felix GUERRERO, Michael BLACK et al. Gene-enriched draft genome of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*: assembly by the hybrid Pacific Biosciences/Illumina approach enabled analysis of the highly repetitive genome. *International Journal for Parasitology* [online]. 2017, **47**(9), 569-583 [cit. 2020-10-05]. ISSN 00207519. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpara.2017.03.007
- [37] CRAMARO, Wibke, Dominique REVETS, Oliver HUNEWALD, Regina SINNER, Anna REYE a Claude MULLER. Integration of *Ixodes ricinus* genome sequencing with transcriptome and proteome annotation of the naïve midgut. *BMC Genomics* [online]. 2015, **16**(1) [cit. 2020-05-20]. ISSN 1471-2164. Dostupné z: doi:10.1186/s12864-015-1981-7
- [38] CRAMARO, Wibke, Oliver HUNEWALD, Lesley BELL-SAKYI a Claude MULLER. Genome scaffolding and annotation for the pathogen vector *Ixodes ricinus* by ultra-long single molecule sequencing. *Parasit Vectors* [online]. 2017, **10**(1) [cit. 2020-05-20]. ISSN 1756-3305. Dostupné z: doi:10.1186/s13071-017-2008-9
- [39] CHMELAŘ, Jindřich, Jennifer ANDERSON, Jianbing MU, Ryan JOCHIM, Jesus VALENZUELA a Jan KOPECKÝ. Insight into the sialome of the castor bean tick, *Ixodes ricinus*. *BMC Genomics* [online]. 2008, **9**(1) [cit. 2020-10-26]. ISSN 1471-2164. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2164-9-233
- [40] SCHWARZ, Alexandra, Björn REUMONT, Jan ERHART, Andrezza CHAGAS, José RIBEIRO a Michalis KOTSYFAKIS. De novo *Ixodes ricinus* salivary gland transcriptome analysis using two next-generation sequencing methodologies. *The FASEB Journal* [online]. 2013, **27**(12), 4745-4756 [cit. 2020-10-26]. ISSN 0892-6638. Dostupné z: doi:10.1096/fj.13-232140

- [41] KOTSYFAKIS, Michalis, Alexandra SCHWARZ, Jan ERHART a José RIBEIRO. Tissue- and time-dependent transcription in *Ixodes ricinus* salivary glands and midguts when blood feeding on the vertebrate host. *Scientific Reports* [online]. 2015, **5**(1) [cit. 2020-10-26]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep09103
- [42] CHARRIER, N., Marjorie COUTON, Maarten VOORDOUW, Olivier RAIS, Axelle DURAND-HERMOUET, Caroline HERVET, Olivier PLANTARD a Claude RISPE. *Whole body transcriptomes and new insights into the biology of the tick Ixodes ricinus* [online]. 2018, **11**(1) [cit. 2020-10-26]. ISSN 1756-3305. Dostupné z: doi:10.1186/s13071-018-2932-3
- [43] VECHTOVA, Pavlina, Zoltan FUSSY, Radim CEGAN, Jan STERBA, Jan ERHART, Vladimir BENES a Libor GRUBHOFFER. *Catalogue of stage-specific transcripts in Ixodes ricinus and their potential functions during the tick life-cycle* [online]. 2020, **13**(1) [cit. 2020-10-26]. ISSN 1756-3305. Dostupné z: doi:10.1186/s13071-020-04173-4
- [44] KOTSARENKO, Kateryna, Pavlina VECHTOVA, Zuzana HAMMEROVA, Natalia LANGOVA, Lenka MALINOVSKA, Michaela WIMMEROVA, Jan STERBA a Libor GRUBHOFFER. Newly identified DNA methyltransferases of *Ixodes ricinus* ticks. *Ticks and Tick-borne Diseases* [online]. 2020, **11**(2) [cit. 2020-10-26]. ISSN 1877959X. Dostupné z: doi:10.1016/j.ttbdis.2019.101348
- [45] MARITZ-OLIVIER, Christine, Christian STUTZER, Frans JONGEJAN, Albert NEITZ a Anabella GASPAR. Tick anti-hemostatics: targets for future vaccines and therapeutics. *Trends in Parasitology* [online]. 2007, **23**(9), 397-407 [cit. 2020-10-09]. ISSN 14714922. Dostupné z: doi:10.1016/j.pt.2007.07.005
- [46] HONIG MONDEKOVA, Helena, Radek SIMA, Veronika URBANOVA, Vojtech KOVAR, Ryan REGO, Libor GRUBHOFFER, Petr KOPACEK a Ondrej HAJDUSEK. Characterization of *Ixodes ricinus* Fibrinogen-Related Proteins (Ixoderins) Discloses Their Function in the Tick Innate Immunity. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. 2017, **7** [cit. 2020-10-11]. ISSN 2235-2988. Dostupné z: doi:10.3389/fcimb.2017.00509

- [47] WEISHEIT, Sabine, Margarita VILLAR, Hana TYKALOVÁ et al. *Ixodes scapularis and Ixodes ricinus tick cell lines respond to infection with tick-borne encephalitis virus: transcriptomic and proteomic analysis* [online]. 2015, **8**(1) [cit. 2020-10-11]. ISSN 1756-3305. Dostupné z: doi:10.1186/s13071-015-1210-x
- [48] FARRELL, Robert E. RNAi: Take a RISC - Role the Dicer. *RNA methodologies: a laboratory guide for isolation and characterization* [online]. 4th. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2010, s. 539-560 [cit. 2020-10-13]. ISBN 9780123747273.
- [49] KURTTI, Timothy, Joshua MATTILA, Michael HERRON et al. Transgene expression and silencing in a tick cell line: A model system for functional tick genomics. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* [online]. 2008, **38**(10), 963-968 [cit. 2020-09-08]. ISSN 09651748. Dostupné z: doi:10.1016/j.ibmb.2008.07.008
- [50] ESTEVES, Eliane, Flavio LARA, Daniel LORENZINI et al. Cellular and molecular characterization of an embryonic cell line (BME26) from the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* [online]. 2008, **38**(5), 568-580 [cit. 2020-10-12]. ISSN 09651748. Dostupné z: doi:10.1016/j.ibmb.2008.01.006
- [51] MACHADO-FERREIRA, Erik, Emilia BALSEMÃO-PIRES, Gabrielle DIETRICH et al. Transgene expression in tick cells using *Agrobacterium tumefaciens*. *Experimental and Applied Acarology* [online]. 2015, **67**(2), 269-287 [cit. 2020-09-14]. ISSN 0168-8162. Dostupné z: doi:10.1007/s10493-015-9949-5
- [52] IVICS, Zoltán a Zsuzsanna IZSVÁK. Sleeping Beauty Transposition. *Mobile DNA III* [online]. American Society of Microbiology, 2015, **3**(2), 853-874 [cit. 2020-10-13]. ISBN 9781555819200. Dostupné z: doi:10.1128/microbiolspec.MDNA3-0042-2014
- [53] KRENEK, Pavel, Olga SAMAJOVA, Ivan LUPTOVCIK, Anna DOSKOCILOVA, George KOMIS a Jozef SAMAJ. Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: Principles, methods and applications. *Biotechnology Advances* [online]. 2015, **33**(6), 1024-1042 [cit. 2020-10-14]. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2015.03.012

- [54] DUNN, David a Carl PINKERT. Gene Editing. *Transgenic Animal Technology* [online]. Elsevier, 2014, , 229-248 [cit. 2020-10-11]. ISBN 9780124104907. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-410490-7.00008-6
- [55] GAJ, Thomas, Charles GERSBACH a Carlos BARBAS. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology* [online]. 2013, **31**(7), 397-405 [cit. 2021-03-16]. ISSN 01677799. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibtech.2013.04.004
- [56] GUPTA, Darshana, Oindrila BHATTACHARJEE, Drishti MANDAL et al. CRISPR-Cas9 system: A new-fangled dawn in gene editing. *Life Sciences* [online]. 2019, **232** [cit. 2020-10-13]. ISSN 00243205. Dostupné z: doi:10.1016/j.lfs.2019.116636
- [57] SUN, Dan, Zhaojiang GUO, Yong LIU a Youjun ZHANG. Progress and Prospects of CRISPR/Cas Systems in Insects and Other Arthropods. *Frontiers in Physiology* [online]. 2017, **8** [cit. 2021-02-27]. ISSN 1664-042X. Dostupné z: doi:10.3389/fphys.2017.00608
- [58] DONG, Shengzhang, Jingyi LIN, Nicole HELD, Rollie CLEM, A. PASSARELLI, Alexander FRANZ a Ya-Ping TANG. Heritable CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing in the Yellow Fever Mosquito, *Aedes aegypti*. *PLOS ONE* [online]. 2015, **10**(3) [cit. 2020-10-13]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0122353
- [59] KISTLER, Kathryn E., Leslie B. VOSSHALL a Benjamin J. MATTHEWS. Genome Engineering with CRISPR-Cas9 in the Mosquito *Aedes aegypti*. *Cell Reports* [online]. 2015, **11**(1), 51-60 [cit. 2020-10-13]. ISSN 22111247. Dostupné z: doi:10.1016/j.celrep.2015.03.009
- [60] BASSETT, Andrew a Ji-Long LIU. CRISPR/Cas9 and Genome Editing in *Drosophila*. *Journal of Genetics and Genomics* [online]. 2014, **41**(1), 7-19 [cit. 2020-10-13]. ISSN 16738527. Dostupné z: doi:10.1016/j.jgg.2013.12.004
- [61] DERMAUW, Wannes, Wim JONCKHEERE, Maria RIGA, Ioannis LIVADARAS, John VONTAS a Thomas VAN LEEUWEN. Targeted mutagenesis using CRISPR-Cas9 in the chelicerate herbivore *Tetranychus urticae*. *Insect Biochemistry and*

Molecular Biology [online]. 2020, **120** [cit. 2021-02-18]. ISSN 09651748. Dostupné z: doi:10.1016/j.ibmb.2020.103347

- [62] BELL-SAKYI, Lesley. Tick Cell and Tissue Culture Bibliography. In: *University of Liverpool* [online]. Liverpool, 2020 [cit. 2021-03-17]. Dostupné z: <https://www.liverpool.ac.uk/liverpool-shared-research-facilities/facilities/bio-resources/tick-cell-biobank/bibliography/>
- [63] BELL-SAKYI, Lesley, Alistair DARBY, Matthew BAYLIS a Benjamin MAKEPEACE. The Tick Cell Biobank: A global resource for in vitro research on ticks, other arthropods and the pathogens they transmit. *Ticks and Tick-borne Diseases* [online]. 2018, **9**(5), 1364-1371 [cit. 2020-09-08]. ISSN 1877959X. Dostupné z: doi:10.1016/j.ttbdis.2018.05.015
- [64] BELL-SAKYI, Lesley, Erich ZWEYGARTH, Edmour BLOUIN, Ernest GOULD a Frans JONGEJAN. Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research. *Trends in Parasitology* [online]. 2007, **23**(9), 450-457 [cit. 2020-09-08]. ISSN 14714922. Dostupné z: doi:10.1016/j.pt.2007.07.009
- [65] LOGINOV, Dmitry, Yana LOGINOVA, Filip DYCKA, Katharina BÖTTINGER, Pavlina VECHTOVA a Jan STERBA. *Tissue-specific signatures in tick cell line MS profiles* [online]. 2019, **12**(1) [cit. 2021-04-05]. ISSN 1756-3305. Dostupné z: doi:10.1186/s13071-019-3460-5
- [66] BARRY, Gerald, Pilar ALBERDI, Esther SCHNETTLER, Sabine WEISHEIT, Alain KOHL, John FAZAKERLEY a Lesley BELL-SAKYI. Gene silencing in tick cell lines using small interfering or long double-stranded RNA. *Experimental and Applied Acarology* [online]. 2013, **59**(3), 319-338 [cit. 2020-09-08]. ISSN 0168-8162. Dostupné z: doi:10.1007/s10493-012-9598-x
- [67] VARMA, M., Mary PUDNEY a C. LEAKE. The Establishment of Three Cell Lines from the Tick *Rhipicephalus Appendiculatus* (Agari: Ixodidae) and their Infection with Some Arboviruses. *Journal of Medical Entomology* [online]. 1975, **11**(6), 698-706 [cit. 2020-10-23]. ISSN 1938-2928. Dostupné z: doi:10.1093/jmedent/11.6.698

- [68] KURTTI, Timothy, Ulrike MUNDERLOH, Darryl KRUEGER, Russell JOHNSON a Tom SCHWAN. Adhesion to and Invasion of Cultured Tick (Acarina: Ixodidae) Cells by *Borrelia burgdorferi* (Spirochaetales. *Journal of Medical Entomology* [online]. 1993, **30**(3), 586-596 [cit. 2020-11-01]. ISSN 1938-2928. Dostupné z: doi:10.1093/jmedent/30.3.586
- [69] MUNDERLOH, Ulrike, Yan LIU, Maming WANG, Chunsheng CHEN a Timothy KURTTI. Establishment, Maintenance and Description of Cell Lines from the Tick *Ixodes scapularis*. *The Journal of Parasitology* [online]. 1994, **80**(4) [cit. 2020-11-01]. ISSN 00223395. Dostupné z: doi:10.2307/3283188
- [70] KURTTI, Timothy, Ulrike MUNDERLOH, Theodore ANDREADIS, Louis MAGNARELLI a Thomas MATHER. Tick Cell Culture Isolation of an Intracellular Prokaryote from the Tick *Ixodes scapularis*. *Journal of Invertebrate Pathology* [online]. 1996, **67**(3), 318-321 [cit. 2020-11-01]. ISSN 00222011. Dostupné z: doi:10.1006/jipa.1996.0050
- [71] SIMSER, Jason, Ann PALMER, Volker FINGERLE, Bettina WILSKE, Timothy KURTTI a Ulrike MUNDERLOH. *Rickettsia monacensis* sp. nov., a Spotted Fever Group *Rickettsia*, from Ticks (*Ixodes ricinus*) Collected in a European City Park. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2002, **68**(9), 4559-4566 [cit. 2020-11-01]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.68.9.4559-4566.2002
- [72] LALLINGER, Gertrud, Erich ZWEYGARTH, Lesley BELL-SAKYI a Lygia PASSOS. *Cold storage and cryopreservation of tick cell lines* [online]. 2010, **3**(1) [cit. 2020-10-26]. ISSN 1756-3305. Dostupné z: doi:10.1186/1756-3305-3-37
- [73] AL-ROFAAI, Ahmed a Lesley BELL-SAKYI. Tick Cell Lines in Research on Tick Control. *Frontiers in Physiology* [online]. 2020, **11** [cit. 2020-09-14]. ISSN 1664-042X. Dostupné z: doi:10.3389/fphys.2020.00152
- [74] KOTSARENKO, Kateryna, Pavlina VECHTOVA, Jaroslava LIESKOVSKA et al. Karyotype changes in long-term cultured tick cell lines. *Scientific Reports* [online]. 2020, **10**(1) [cit. 2020-09-14]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-70330-5

- [75] HUGHES, Peyton, Damian MARSHALL, Yvonne REID, Helen PARKES a Cohava GELBER. The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: how much more data do we need?. *BioTechniques* [online]. 2007, **43**(5), 575-586 [cit. 2020-09-14]. ISSN 0736-6205. Dostupné z: doi:10.2144/000112598
- [76] COOPER, Sara, Nathan TRINKLEIN, Elizabeth ANTON, Loan NGUYEN a Richard MYERS. Comprehensive analysis of transcriptional promoter structure and function in 1% of the human genome. *Genome Research* [online]. 2005, **16**(1), 1-10 [cit. 2021-04-05]. ISSN 1088-9051. Dostupné z: doi:10.1101/gr.4222606
- [77] KLUGE, Janina, Dominik TERFEHR a Ulrich KÜCK. Inducible promoters and functional genomic approaches for the genetic engineering of filamentous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2018, **102**(15), 6357-6372 [cit. 2020-10-15]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-018-9115-1
- [78] NARANJO, Victoria, Nieves AYLLÓN, José PÉREZ DE LA LASTRA et al. Reciprocal Regulation of NF- κ B (Relish) and Subolesin in the Tick Vector, *Ixodes scapularis*. *PLoS ONE* [online]. 2013, **8**(6) [cit. 2020-10-16]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0065915
- [79] CHAVOUS, David, F. JACKSON a Clare O'CONNOR. Extension of the *Drosophila* lifespan by overexpression of a protein repair methyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2001, **98**(26), 14814-14818 [cit. 2020-10-29]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.251446498
- [80] GALAY, Remil, Rika UMEMIYA-SHIRAFUJI, Eugene BACOLOD et al. Two Kinds of Ferritin Protect Ixodid Ticks from Iron Overload and Consequent Oxidative Stress. *PLoS ONE* [online]. 2014, **9**(3) [cit. 2020-10-29]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0090661
- [81] GUERRERO, Felix a Vishvanath NENE. Gene Structure and Expression of a Pyrethroid-Metabolizing Esterase, CzEst9, from a Pyrethroid Resistant Mexican Population of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae): Ixodidae). *Journal of Medical Entomology* [online]. 2008, **45**(4), 677-695 [cit. 2020-10-29]. ISSN 00222585. Dostupné z: doi:10.1603/0022-2585(2008)45[677:GSAEOA]2.0.CO;2

- [82] Lipofectamine Transfection Reagent. *Thermo Fisher Scientific* [online]. [cit. 2020-10-28]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/brands/product-brand/lipofectamine.html>
- [83] Introduction to Cell Transfection: Liposome-mediated Transfection. *Merck KGaA* [online]. Darmstadt [cit. 2020-10-28]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/transfection-reagents.html>
- [84] Effectene Transfection Reagent. *QIAGEN* [online]. [cit. 2020-10-28]. Dostupné z: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/functional-and-cell-analysis/transfection/effectene-transfection-reagent/#orderinginformation>
- [85] HilyMax: Description. *Dojindo Molecular Technologies, Inc.* [online]. Rockville [cit. 2020-10-28]. Dostupné z: <https://www.dojindo.com/product/hilymax/>
- [86] ZHOU, Rui, Stephanie MOHR, Gregory HANNON a Norbert PERRIMON. Inducing RNAi in Drosophila Cells by Transfection with dsRNA. *Cold Spring Harbor Protocols* [online]. 2013, **2013**(5), 074351-074351 [cit. 2020-10-27]. ISSN 1559-6095. Dostupné z: doi:10.1101/pdb.prot074351
- [87] SHIN, Hwa a Hyung CHA. Facile and Statistical Optimization of Transfection Conditions for Secretion of Foreign Proteins from Insect Drosophila S2 Cells using Green Fluorescent Protein Reporter. *Biotechnology Progress* [online]. 2002, **18**(6), 1187-1194 [cit. 2020-10-27]. ISSN 8756-7938. Dostupné z: doi:10.1021/bp0255331
- [88] CHENG, Gong, Lei LIU, Penghua WANG et al. An In Vivo Transfection Approach Elucidates a Role for Aedes aegypti Thioester-Containing Proteins in Flaviviral Infection. *PLoS ONE* [online]. 2011, **6**(7) [cit. 2020-10-27]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0022786
- [89] MUSTACOVÁ, Johana. *Identifikace promotorů klišťat pro využití v molekulárně biologických aplikacích*. České Budějovice, 2018. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, Ústav chemie. Vedoucí práce Ján Štěřba.

- [90] Protocol 5, DNA Transfection by Electroporation. SAMBROOK, Joseph a David RUSSELL. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, 16.33-16.36. ISBN 0-87969-576-5.
- [91] FuGENE® HD Transfection Reagent: Technical manual. In: *Promega* [online]. Madison: Promega Corporation, 2013 [cit. 2021-03-29]. Dostupné z: <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/fugene-hd-transfection-reagent.pdf?la=en>
- [92] KUMAR, Priti, Arvindhan NAGARAJAN a Pradeep D. UCHIL. Electroporation. *Cold Spring Harbor Protocols* [online]. 2019, **2019**(7) [cit. 2021-03-29]. ISSN 1940-3402. Dostupné z: doi:10.1101/pdb.top096271
- [93] RUIZ, Newton, Leonardo ABREU, Luís PARIZI et al. Non-Invasive Delivery of dsRNA into De-Waxed Tick Eggs by Electroporation. *PLOS ONE* [online]. 2015, **10**(6) [cit. 2021-03-29]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0130008
- [94] KARIM, Shahid, Emily TROIANO a Thomas MATHER. Functional genomics tool: Gene silencing in Ixodes scapularis eggs and nymphs by electroporated dsRNA. *BMC Biotechnology* [online]. 2010, **10**(1) [cit. 2021-03-29]. ISSN 1472-6750. Dostupné z: doi:10.1186/1472-6750-10-1
- [95] Transfection: Factors Influencing Transfection Efficiency. *Promega* [online]. Madison: Promega Corporation [cit. 2021-03-28]. Dostupné z: <https://worldwide.promega.com/resources/guides/cell-biology/transfection/>
- [96] QIN, Jane, Li ZHANG, Kayla CLIFT, Imge HULUR, Andy XIANG, Bing-Zhong REN, Bruce LAHN a Immo HANSEN. Systematic Comparison of Constitutive Promoters and the Doxycycline-Inducible Promoter. *PLoS ONE* [online]. 2010, **5**(5) [cit. 2021-03-28]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0010611
- [97] ALBERDI, Pilar, Nieves AYLLÓN, Alejandro CABEZAS-CRUZ, Lesley BELL-SAKYI, Erich ZWEYGARTH, Snorre STUEN a José DE LA FUENTE. Infection of Ixodes spp. tick cells with different Anaplasma phagocytophilum isolates induces the inhibition of apoptotic cell death. *Ticks and Tick-borne Diseases* [online]. 2015, **6**(6),

758-767 [cit. 2021-03-31]. ISSN 1877959X. Dostupné z:
doi:10.1016/j.ttbdis.2015.07.001

- [98] REIF, Kathryn, Jessica UJCZO, Debra ALPERIN a Susan NOH. Francisella tularensis novicida infection competence differs in cell lines derived from United States populations of Dermacentor andersoni and Ixodes scapularis. *Scientific Reports* [online]. 2018, **8**(1) [cit. 2021-03-31]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-018-30419-4
- [99] ALONSO, Beatriz, Elisa VENTURA, Eliane ESTEVES et al. A tick cell line as a powerful tool to screen the antimicrobial susceptibility of the tick-borne pathogen Anaplasma marginale. *Experimental Parasitology* [online]. 2020, **217** [cit. 2021-03-31]. ISSN 00144894. Dostupné z: doi:10.1016/j.exppara.2020.107958
- [100] MATEOS-HERNÁNDEZ, Lourdes, Natália PIPOVÁ, Eléonore ALLAIN et al. Enlisting the Ixodes scapularis Embryonic ISE6 Cell Line to Investigate the Neuronal Basis of Tick—Pathogen Interactions. *Pathogens* [online]. 2021, **10**(1) [cit. 2021-03-31]. ISSN 2076-0817. Dostupné z: doi:10.3390/pathogens10010070
- [101] AL-KHAFAJI, Alaa, Lesley BELL-SAKYI, Gerardo FRACASSO, Lisa LUU, Dieter HEYLEN, Erik MATTHYSEN, José OTEO a Ana PALOMAR. Isolation of Candidatus Rickettsia vini from Belgian Ixodes arboricola ticks and propagation in tick cell lines. *Ticks and Tick-borne Diseases* [online]. 2020, **11**(6) [cit. 2021-03-31]. ISSN 1877959X. Dostupné z: doi:10.1016/j.ttbdis.2020.101511
- [102] KURTTI, Timothy, Roderick FELSHEIM, Nicole BURKHARDT, Jonathan OLIVER, Chan HEU a Ulrike MUNDERLOH. Rickettsia buchneri sp. nov., a rickettsial endosymbiont of the blacklegged tick Ixodes scapularis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2015, **65**(3), 965-970 [cit. 2021-03-31]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijs.0.000047
- [103] DYACHENKO, Viktor, Christine GEIGER, Nikola PANTCHEV, Monir MAJZOUB, Lesley BELL-SAKYI, Inke KRUPKA a Reinhard STRAUBINGER. Isolation of canine Anaplasma phagocytophilum strains from clinical blood samples using the Ixodes ricinus cell line IRE/CTVM20. *Veterinary Microbiology* [online]. 2013, **162**(2-

4), 980-986 [cit. 2021-03-31]. ISSN 03781135. Dostupné z:
doi:10.1016/j.vetmic.2012.10.021

[104] Dual-Glo® Luciferase Assay System: Technical manual. In: *Promega* [online].
Madison: Promega Corporation [cit. 2021-03-30]. Dostupné z:
[https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-
manuals/0/dual-glo-luciferase-assay-system-protocol.pdf?la=en](https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/dual-glo-luciferase-assay-system-protocol.pdf?la=en)

[105] CHAVEZ, Alejandro, Jonathan SCHEIMAN, Suhani VORA et al. Highly efficient
Cas9-mediated transcriptional programming. *Nature Methods* [online]. 2015, **12**(4),
326-328 [cit. 2021-04-11]. ISSN 1548-7091. Dostupné z: doi:10.1038/nmeth.3312