



Osaamista  
ja oivallusta  
tulevaisuuden  
tekemiseen

Jutta Hukka ja Johanna Mäkelä

## Virtaussytometrian optimointi bakteriologisiin tutkimuksiin

*Menetelmän optimointi Borrelia sp.-bakteereille sekä Borrelia hermsii-bakteerin komplementtijärjestelmän väistökyvyn tarkastelu*

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalytiikka (AMK)

Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma

Opinnäytetyö

17.4.2020

Tekijä(t) Otsikko	Jutta Hukka Johanna Mäkelä Virtaussytometrin optimointi bakteriologisiin tutkimuksiin
Sivumäärä Aika	36 sivua 17.4.2020
Tutkinto	Bioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalyttikko (AMK)
Ohjaaja(t)	Lehtori Merja Ojala Dosentti Karita Haapasalo Dosentti Taru Meri
<p>Virtaussytometrasta tutkimusmenetelmää ei ole aiemmin raportoidusti käytetty <i>Borrelia sp.</i>-bakteereille. Menetelmä kuitenkin mahdollistaa suuren bakteerimäärän laskemisen lyhyessä ajassa. Erilaisten tutkimusmenetelmien kehittäminen mahdollistaa erilaisten näkökulmien hyödyntämisen tuoden monipuolisuutta ja luotettavuutta tutkimustyöhön.</p> <p>Opinnäytetyö tehtiin Helsingin yliopiston bakteriologian ja immunologian osastolla dosentti Karita Haapasalon ja dosentti Taru Meren ohjauksessa. Opinnäytetyön tarkoituksena oli optimoida menetelmä, jolla pystytään laskemaan suuria määriä <i>Borrelia sp.</i>-bakteereja virtaussytometrisellä menetelmällä toisintokuumetta aiheuttavaa <i>Borrelia hermsii</i>-bakteeria käyttämällä. Optimoinnissa käytettiin eläviä bakteereja, joita laskettiin fluoresoivan leiman avulla. Optimoinnin lisäksi tämän menetelmän avulla selvitettiin, miten <i>B. hermsii</i> kykenee väistämään komplementtijärjestelmää tuottamansa FhbA-pintaproteiinin avulla. Tämän pintaproteiinin avulla <i>B. hermsii</i> kykenee sitomaan pinnalleen komplementtijärjestelmän säätelijätekijää, tekijä H:ta. Ensin komplementtijärjestelmän tappokykyä tarkasteltiin tavallisessa seeruminäytteessä. Tämän jälkeen näytteeseen lisättiin kilpaileva molekyyli, liukoinen rekombinantti FhbA, jotta nähtiin lisääkö kilpaileva molekyyli komplementtijärjestelmän tappokykyä.</p> <p>Tulokset osoittivat, että <i>Borrelia sp.</i>-bakteereja voidaan laskea virtaussytometrilla. <i>B. hermsii</i>n kuolleisuus lisääntyi, kun tekijä H:n sitoutumista bakteerin omaan FhbA-pintaproteiiniin estettiin kilpailevalla molekyylillä, liukoisella rekombinantti FhbA:lla. Tämä viittaa siihen, että FhbA on tärkeä molekyyli <i>B. hermsii</i>n seerumissa selviytymisen ja täten oleellinen tekijä sen taudinaiheuttamiskyvyssä.</p>	
Avainsanat	Virtaussytometri, <i>Borrelia hermsii</i> , Komplementtijärjestelmän väistö

Author(s) Title	Jutta Hukka Johanna Mäkelä Optimizing a Flow Cytometric Research Method for Bacteriological Studies
Number of Pages Date	36 pages 17 April 2020
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Biomedical Laboratory Science
Instructor(s)	Merja Ojala, Senior Lecturer Karita Haapasalo, Docent Taru Meri, Docent
<p>Flow cytometry is method that enables analysis of large amount of cells in a short time. The development of different research methods enables the use of different approaches thus making research more diverse and reliable. However, there are currently no reports that this method would have been used to analyse <i>Borrelia</i> sp. bacteria.</p> <p>The thesis was done at Helsinki University, department of Bacteriology and Immunology under supervision of docents Karita Haapasalo and Taru Meri. The aim of this thesis was to optimize a flow cytometric method to study bacterial complement evasion using <i>Borrelia</i> sp. bacteria for research purposes. Live bacteria marked with fluorescence dye was used in this study. This optimized method was used to study the role of binding of complement regulator factor H to <i>Borrelia hermsii</i> surface protein called FhbA in bacterial complement evasion. First the killing ability of complement system was observed in a regular serum sample. After that, a rival molecule, soluble recombinant FhbA was added to bacteria-serum -mixture to see if it increased the killing ability of serum complement.</p> <p>The results indicate, that <i>Borrelia</i> bacteria can be analysed by flow cytometry. The complement evasion ability of <i>B. hermsii</i> FhbA was confirmed by competing binding of factor H to surface exposed FhbA by a soluble recombinant FhbA. Inhibition of this binding resulted killing of this bacterium by serum complement indicating, that FhbA is an important for survival of <i>B. hermsii</i> in human serum and hence its pathogenesis.</p>	
Keywords	Flow cytometry, <i>Borrelia hermsii</i> , complement evasion

## Sisällys

1	Johdanto	1
2	Teoreettiset lähtökohdat	2
2.1	Komplementtijärjestelmä	2
2.1.1	Komplementtijärjestelmän klassinen tie ja lektiinitie	3
2.1.2	Oikotie ja sen aktivaatio	4
2.2	<i>Escherichia coli</i> -bakteeri	5
2.3	<i>Borrelia sp.</i> -bakteerit	6
2.3.1	<i>Borrelia hermsii</i>	7
2.3.2	Toisintokuume	8
2.4	Virtausytometria	9
3	Opinnäytetyön tarkoitus ja tavoite	10
4	Opinnäytetyön menetelmät ja toteuttaminen	10
4.1	Menetelmän optimointi	10
4.1.1	Optimointi <i>E. coli</i> -bakteerilla	11
4.1.2	Optimointi <i>B. hermsii</i> -bakteerilla	12
4.2	<i>Borrelia hermsii</i> -bakteerin kyky väistää komplementtijärjestelmää	13
4.3	Bakteerikannat ja kasvatus	15
4.4	Bakteerien käsittely	16
5	Opinnäytetyön tulokset ja niiden tarkastelu	17
5.1	Tulosten käsittely	17
5.2	Optimointitulosten tarkastelu	17
5.3	Optimoinnin virhetestit	19
5.4	Kilpailevan molekyylin merkitys	22
6	Pohdinta	28
6.1	Optimointiosuus	28
6.1.1	Optimointiin vaikuttavat tekijät: bakteerit	29
6.1.2	Optimointiin vaikuttavat tekijät: käytetyt reagenssit ja välineet	30
6.2	Kilpailevan molekyylin vaikutus	31
6.3	Johtopäätökset ja kehittämissuhteet	33
6.4	Tulosten hyödyntäminen	34
6.5	Luotettavuus ja eettisyys	34
6.6	Ammatillinen kasvu	35



## KÄSITELUETTELO

Apoptoosi	Ohjattu solukuolema
B-solut	Immuunijärjestelmän vasta-aineita tuottavat lymfosyytit
Beetalaktaamiantibiotti	Yleinen mikrobiantibiotti esim. penisilliinit, rikkoo soluseinän.
C1-C9	Komplementtijärjestelmässä toimivat proteiinit
Disseminoitua	Levitä, esim. disseminoitunut tulehdus eli levinnyt tulehdus
Domeeni	Geenin tai proteiinin tunnusomainen rakenneos
EDTA	Etyleenidiamiinitetraetikkahappo. Antikoagulantti, joka estää veren hyytymistä sitomalla muun muassa kalsiumia.
FhbA	Borreliabakteerien pintaproteiini (Factor binding protein A).
Fikoliini	Proteiiniryhmä, jolla on kollageeni- ja fibrinogeenirakenneosa.
Flagella	Mikrobin rihmamainen liikkumiselin
Gramnegatiivinen	Bakteeriryhmä, jonka nimitys tulee sen soluseinän rakenteesta, joka vaikuttaa siihen, että bakteeri värjäytyy gramvärjäyksessä punaiseksi eli negatiivisesti.
Hepatomegalia	Maksan suurentuminen
HIS	Seerumi, josta komplementti on inaktivoitu lämmöllä (heat inactivated serum).
IgG -vasta-aine	Merkittävin vasta-aineluokka, jota esiintyy eniten veressä. Rakenne on Y-mallinen.
IgM -vasta-aine	Muodostaa 5-10 % elimistön vasta-aineista. Rakenne pentaگون-mallinen.
<i>In vivo</i> -tutkimus	Elävillä soluilla tehty tutkimus
Kollektiini	Immuunipuolustukseen osallistuva proteiini, joka sisältää hiilihydraatteja tunnistavia domeeneja.
Konvertaasi	Entsyymi, joka aktivoi komplementin tiettyä osaa.
Lektiinit	Kollektiinien alaryhmä, jotka sitoutuvat hiilihydraatteihin.
MAC	Membrane attack complex – membraaneja tuhoava kompleks.
Mannaani	Haaraketjuinen polysakkaridi
Membraani	Solukalvo
Monoklonaaliset vasta-aineet	Vasta-aineet, jotka tunnistavat vain tiettyä antigeenin rakennetta
NHS	Käsittelemätön ihmisen seerumi (normal human serum).
Opsoniini	Mikrobin pintaan tarttuva tunnistusmolekyyli, aktivoi fagosytoosia
PBS	Muun muassa puskurina solulaskennassa käytetty suolaliuos (phosphate buffered saline).
Peptidoglykaani	Bakteerien soluseinän rakenneaine
Rekombinantti proteiini	Keinotekoisesti valmistettu proteiini
Splenomegalia	Suurentunut perna
Säätelytekijä	Elimistön toimintaa ohjaava geenituote
VBS	Komplementtitutkimuksissa yleisesti käytetty puskuriliuos (veronal buffer saline).
Vektoritartunta	Tartunta väli-isännän kautta

## 1 Johdanto

Komplementtijärjestelmä on perusta elimistön immuniteetin kykyyn puolustautua vierailta rakenteilta. Sen toiminnan ymmärtäminen antaa lisätietoa patogeenien eli tautia aiheuttavien bakteerien erottamiseen ei-patogeenista. Komplementtijärjestelmä sisältää monia eri tekijöitä, joilla kaikilla on oma tehtävänsä. Ymmärrys yksittäisten tekijöiden merkityksestä komplementtijärjestelmässä lisääntyy jatkuvasti, mikä tekee komplementin tutkimisesta tärkeää, sillä yksittäisten tekijöiden toiminnan avulla ymmärretään kokonaisuutta. Mitä enemmän komplementin tekijöiden toimintaa ymmärretään, sen paremmin pystytään suojautumaan esimerkiksi bakteeri-infektioilta ja kehittämään uusia hoitomuotoja. Jotta erilaisia patogeeniä voidaan ylipäättään tutkia laadukkaasti ja ymmärtää esimerkiksi komplementtijärjestelmän kautta, tulee käytettävien menetelmien ja työkalujen olla luotettavia. Täten voidaan edistää ihmisten terveyttä ja hyvinvointia esimerkiksi lääkehoidon ja rokotteiden kehityksellä.

Opinnäytetyö tehtiin Helsingin yliopistossa bakteriologian ja immunologian osastolla Karita Haapasalon ja Taru Meren ohjauksessa. Tarkoituksena oli optimoida virtausmittariaan perustuva tutkimusmenetelmä, jonka avulla tarkastellaan komplementtijärjestelmän säätelijäproteiinin sitomisen vaikutusta *Borrelia sp.*-bakteerin selviämiseen seerumissa. Tavoitteena oli testata ja optimoida tutkimusryhmälle menetelmä, joka edistää spirokeetta-bakteerien analysointia. Kaikki tulokset esiteltiin yliopiston tutkimusryhmälle, jolle tulokset myös luovutettiin. Tutkimuksissa käytettiin eläviä bakteerisoluja, joiden avulla oli tarkoitus nähdä, kuinka suuri merkitys borrelia-bakteerin pintaproteiinin, FhbA:n kyvyllä sitoa komplementtijärjestelmän säätelijäproteiinia tekijä H:ta on bakteerin taudinaiheuttamiskyvyssä. Sekä optimointiin että FhbA-proteiinin merkityksen tutkimiseen käytettiin toisintokuumetta aiheuttavaa *Borrelia hermsii*-bakteeria. *Borrelia sp.* -bakteereilla on pintaproteiineja, joiden avulla ne pystyvät väistämään komplementtijärjestelmää, mikä tekee niistä mielenkiintoisia tutkimuskohteita. Vastaavia puolustuskeinoja löytyy myös muilta patogeenisilta bakteereilta, joten tutkimustuloksia voidaan teoriassa hyödyntää saman ominaisuuden omaavien patogeenisten bakteerien kohdalla.

## 2 Teoreettiset lähtökohdat

### 2.1 Komplementtijärjestelmä

1800-luvun lopulla Nobel-palkittu Ilya Metchnikoff (The Nobel Prize 2019a) kehitti teorian, jonka mukaan veressä on yksisoluisia eliöitä, jotka suojelevat elimistöä bakteereilta (Gordon 2008). Komplementtijärjestelmän kannalta merkittävä henkilö oli saksalainen bakteriologi Hans Buchner. Hän löysi vuonna 1889 ilmiön, jota hän kutsui *alexineksi*: hän löysi verestä kuumentamiselle herkkiä bakteereja tappavia tekijöitä. Nobel-palkittu Paul Ehrlich (The Nobel Prize 2019b) nimesi *alexine*-ilmiön *Das Komplementfiks*i. (Cruse – Lewis 2010.)

Komplementti on sisäsyntyisen immunitetin järjestelmä, johon osallistuu liukoisia proteiineja ja membraaneihin kiinnittyviä reseptoreja. Jokainen yksittäinen tapahtuma aktivoi seuraavaa eli kyseessä on reaktiokaskadi. Komplementtijärjestelmä osallistuu elimistön immuunipuolustukseen monin tavoin. Se on puolustusmekanismi infektioita vastaan, koska se tuhoaa vieraaksi tunnistamiaan mikrobeja membraaneja tuhoavan kompleksin avulla ja osallistumalla fagosytoosiin merkitsemällä eli opsonoimalla tuhottavan kohteen. Reaktiokaskadin aikana komplementtijärjestelmän proteiineista pilkkoutuu liukoisia anafylatoksiineja, jotka houkuttelevat tulehduskohtaan syöjäsoluja ja vahvistavat tulehdusreaktiota. Komplementtijärjestelmän tehtävänä on myös apoptoottisten ja nekroottisten solujen poistaminen elimistöstä. Komplementtijärjestelmä myös sitoo yhteen soluvälitteisen ja vasta-ainevälitteisen immunitetin, sillä tietyt komplementin pilkkoutumistuotteet sitoutuvat ja aktivoivat reseptoreja lymfosyyttien pinnalla. (Haapasalo-Tuomainen 2012: 15; Jarva – Meri 2000.)

Komplementti on aktiivisena plasmassa, kudoksissa ja solun pinnalla. Siihen osallistuvat proteiinit tuotetaan pääosin maksassa. Komplementtijärjestelmä on alkujaan liitetty vasta-ainevälitteiseen immuunipuolustukseen. B-solujen tuottamat vasta-aineet osallistuvat opsonisaatioon eli reaktioon, jossa fagosyytti tunnistaa mikrobin siihen kiinnittyneiden vasta-ainemolekyylien avulla. Nykyään kuitenkin tiedetään, että komplementtijärjestelmä aktivoituu myös täysin vasta-aineista riippumatta, ollen näin tärkeä osa sekä luonnollista että opittua immunitettia. Tutkimus on myös laajentanut tietämystä komplementtijärjestelmään osallistuvista molekyyleistä. Perusyksiköiden C1-C9 lisäksi komplementtijärjestelmään kuuluu kymmeniä erilaisia proteiineja, jotka osallistuvat komplemen-



tin säätelyyn. Komplementtijärjestelmä voi aktivoitua kolmella eri tavalla, joita ovat klassinen aktivaatitietie, oikotie ja lektiinitie. Kaikkien aktivaatioreittien lopputulos on sama, eli membraaneja tuhoavan kompleksin muodostuminen. (Hajishengallis – Reis – Mastellos – Ricklin – Lambris 2017: 2; Merle – Church – Fremeaux-Bacchi – Roumenina 2015: 1; Merle – Noe – Halbwachs-Mecarelli – Fremeaux-Bacchi – Roumenina 2015: 1-2; Nesar-gikar – Spiller – Chavez 2012: 104.)

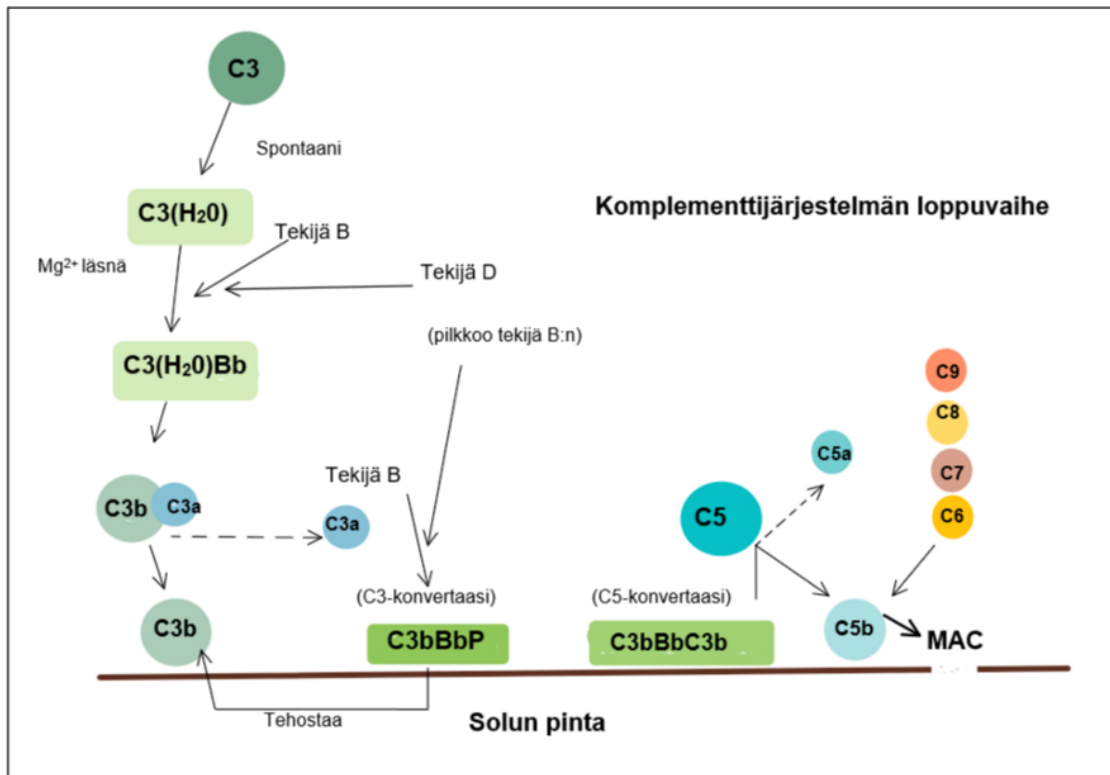
### 2.1.1 Komplementtijärjestelmän klassinen tie ja lektiinitie

Klassista tietä aktivoivat antigeeneihin sitoutuneet IgM- ja IgG -luokkien vasta-aineet. C1q on molekyyli, joka tunnistaa näitä vasta-aineita. Se on myös osa C1 -kompleksia, jonka muita osia ovat C1r- ja C1s -entsyymit. Nämä C1 -kompleksin osat toimivat klassisen tien aloituspalikoina. Reaktiokaskadin edetessä ne aktivoivat molekyylijä C4 ja C2, jotka puolestaan pilkkoutuvat ja muodostavat uuden entsyymin, C3 -konvertaasin, joka on komplementtijärjestelmän keskeisimpiä yksiköitä. Kolme komplementtitietä aktivoituvat eri tavoin, mutta kaikki päätyvät muodostamaan C3 -konvertaasin. Lektiniinien aktivoituminen alkaa tietyistä lektiineistä. Näitä ovat kollektiinit, mannaania sitovat lektiinit ja fikoliinit H, L ja M. Lektiniit sisältävät hiilihydraattia tunnistavia domeeneja, joita on usein elimistölle vieraiden mikrobien pinnoilla. Lektiniinien aktivoituessa syntyy C4:sta ja C2:sta pilkkovia molekyylijä. Sekä klassinen että lektiinitie muodostavat C4bC2a -yksi-kön, joka edelleen katalysoi C3 -konvertaasia. Tästä alkaa komplementin terminaali-vaihe, jonka ensimmäinen vaihe on C5 -konvertaasin muodostuminen. C3 -konvertaasi pilkkoo C3 -proteiinin C3a- ja C3b -alaysiköiksi. Näistä C3b on opsoniini, joka pystyy sitoutumaan vieraaseen rakenteeseen helpottaen fagosytoivien solujen kohteentunnis-tusta. Muodostunut C5 -konvertaasi pilkkoo C5 -molekyylin alaysiköiksi C5a ja C5b. Tämän seurauksena kompleksiin pystyy sitoutumaan C6, C7, C8 ja C9 -molekyylijä, jotka polymerisoituvat ja muodostavat lopullisen membraaneja tuhoavan kompleksin, MAC:n. Tämä lopullinen kompleksi tekee reiän solukalvoon, mikä johtaa solun tuhoutu-miseen. (Cedzynski – Swierzko – Kilpatrick 2012: 2; Hänninen 2011; Haapasalo-Tuo-mainen 2012: 16-20; Kere – Knuutila 2016; Liu ym. 2005; Lubbers – van Essen – van Kooten – Trouw 2017: 1; Reid 2018: 3-4; Meri 2011; Merle ym. 2015: 2-16; Mutanen – Voutilainen 2012; Santos ym. 2014; Solunetti 2006a; Solunetti 2006b; Vidarsson – Dek-kers – Rispens 2014.)

### 2.1.2 Oikotie ja sen aktivaatio

Komplementin oikotie on elimistössä aktiivisena koko ajan, jotta se voi tunnistaa jatkuvasti elimistölle vieraita rakenteita. Tässä mielessä se eroaa klassisesta aktivaatiotiestä ja lektiiniitiestä, jotka tarvitsevat aktivoituakseen joko C1q -molekyylin tai tietyt lektiinit. Vieraan rakenteen tunnistessaan oikotien aktivaatio syntyy C3 -proteiinin kautta. Oikotien löysi Louis Pillemer vuonna 1954, tosin se hyväksyttiin tieteellisissä piireissä vasta vuosikymmen sen löytämisen jälkeen. (Ferreira – Pangburn – Cortés 2011: 2-; Merle ym. 2015: 1-2; Meri 2001; Jarva – Meri 2000; Nesargikar ym. 2012.)

C3 -proteiinin sisäiset sidokset ovat hyvin reaktiivisia; se saattaa spontaanisti hajota C3b:tä muistuttavaksi C3 (H<sub>2</sub>O) -molekyyliksi (Nesargikar ym. 2012). Tämä reaktio käynnistää oikotieaktivaation. C3(H<sub>2</sub>O) -molekyylillä sitoo magnesiumin läsnä ollessa tekijä B:tä. Tekijä D -proteiini osallistuu reaktioon pilkkomalla tekijä B:n, jolloin muodostuu C3(H<sub>2</sub>O)Bb -konvertaasi (Laskowski – Thurman 2018). Tämä liukoinen molekyylipilkkoo C3 -molekyylejä C3b- ja C3a-alayksiköksi, joista C3a jää liukoiseksi plasmaan. C3b -alayksikkö kiinnittyy vaurioituneeseen kudokseen tai mikrobin pintaan voimistaen oikotien aktivoitumista. Kohteen pinnalla C3b:stä muodostuu myös C3 -konvertaaseja (C3bBbP) tekijä B:n sitoutuessa siihen, ja tekijä D:n pilkkoessa sen Bb:ksi. Konvertaasin stabiloi properdiini, mikä vahvistaa C3:sta C3b:ksi. Pinnalle muodostunut C5 -konvertaasi (C3bBbC3b) pilkkoo C5:sta kuten klassisessa tiessä johtaen membraaneja tuhoavan kompleksin syntyyn. (Haapasalo-Tuomainen 2012: 16-20.) Alla kuva oikotien aktivaatiosta. (kuvio 1.)



Kuvio 1. Oikotien aktivaatio ja loppuvaihe. Mukailtu: Haapasalo-Tuomainen 2012.

Terveissä soluissa on pinnalla komplementtijärjestelmän säätelijöitä, jotka pitävät huolen, ettei komplementti aktivoidu kehon omia soluja tai kudoksia vastaan (Stone – Brissette 2017; Haapasalo-Tuomainen 2012: 19; Meri 2011; Solunetti 2006c). Oikotien tärkein liukoinen säätelijä on tekijä H. Se on taipuisa yksiketjuinen glykoproteiini, joka koostuu 20 domeenista. Se kontrolloi oikotietä tunnistamalla solujen pinnalla olevia spesifejä markkereita kahdella viimeisellä domeenilla 19 ja 20. Se toimii myös kofaktorina C3b:n inaktivaatiossa iC3b:ksi käyttäen domeeneja 1-4: käytännössä se siis estää oikotien aktivaatiota (eikä siksi ole näkyvillä kuviossa 1). Komplementtiaktivaation oikotie on opinäytetyön kannalta oleellisin, koska *Borrelia sp.* -bakteereilla on kyky väistää komplementtijärjestelmää sitomalla tekijä H:ta pinnalleen. (Ferreira ym. 2011; Haapasalo-Tuomainen 2012: 19, 24-25; Stone – Brissette 2017.)

## 2.2 *Escherichia coli*-bakteeri

*Escherichia coli* on ihmisen suoliston normaaliflooraan kuuluva aerobinen gramnegatiivinen enterobakteeri. Luonnossa esiintyy runsaasti erilaisia virulenssiltaan vaihtelevia kantoja, jotka ovat kuitenkin hyvin lähellä toisiaan. *E. coli* on runsaasti tutkittu bakteeri,

jota on helppo ja halpa kasvattaa. Sen genomi ja aineenvaihdunta on hyvin tunnettua. Patogeeniset kannat ovat yleisimpiä verenkierron bakteeri-infektioiden aiheuttajista. Osa *E. coli*n serotyypeistä kykenee komplementtijärjestelmää muun muassa tuottamalla pinnalleen suojaavan polysakkaridikerroksen sekä keskeyttämällä komplementtikaskadin sitomalla komplementtijärjestelmän säätelijäproteiinia C4BP:tä. (Siitonen – Vaara 2010; Idalia – Bernardo 2017; Miajlovic – Smith 2014). Opinnäytetyössä käytettävä *E. coli*-kanta on laboratorioskanta ja seerumiherkkä, joten se soveltuu tutkimusmenetelmän testaamiseen.

### 2.3 *Borrelia sp.*-bakteerit

*Borrelia sp.* -sukuiset bakteerit ovat gramnegatiivisia spirokeettoja. Pinnalla niillä on lipidikaksoiskerros, johon kiinnittyneinä bakteerille ominaiset pintaproteiinit ovat. Pintakerroksen eli ulkomembraanin alla on periplasminen kerros sekä sisämembraani. Spirokeetta bakteerin tunnistus muista bakteereista perustuu usein morfologiaan. (Motaleb ym. 2000). Spirokeetat ovat korkkiruuvimaisia bakteereja, joiden liikkuminen perustuu niiden ulkokalvon ja solukalvon välissä oleviin flagella-kimppuihin. Poikkeuksellisesti flagellat eivät siis ole solun ulkopuolella, vaan pyörivät membraanien välissä, mikä aiheuttaa spirokeettojen pyörivän, korkkiruuvimaisen liikumisen. Tällaisia sisämembraanin ja ulkomembraanin väliin jäävää flagellaa kutsutaan periplasmiseksi flagellaksi. Liikehdintän mahdollistamisen lisäksi flagellat toimivat bakteerille tukirakenteena. Flagellat ovat kiinnittyneinä sisämembraanissa solunseinään kiinnittyneinä oleviin flagillaarisiin mootto-reihin, jotka taas ovat kiinnittyneinä bakteerin päihin. Lajista riippuen bakteerin koko, flagellojen määrä sekä korkkiruuvimainen muoto vaihtelee (Motaleb ym. 2000). Korkkiruuvimainen liikehdintä on oleellista bakteerin invasiivisuuden eli sen kyvyn tunkeutua kudoksissa eteenpäin kannalta. (Chang ym. 2019; Charon ym. 2013; Wolgemuth 2015.) Soluseinän peptidoglykaanin takia spirokeetat ovat herkkiä beetalaktaamiantibiootille. (Huupponen – Vaara – Khawaja – Kantele 2018; Oksi – Seppälä – Hytönen 2010a; Vaara – Skurnik – Sarvas 2010.)

*Borrelia sp.* -bakteerilla on useita eri mekanismeja, joilla suojautua ihmisen puolustusjärjestelmältä. Bakteerit kykenevät muuttamaan pintaproteiinejaan väistääkseen ihmisen immuunipuolustuksen. (Oksi ym. 2010a.) Pintaproteiinien muutoksia tarvitaan bakteerien kiertokulussa: esimerkiksi *Borrelia burgdorferi*, joka on yksi borrelioosin eli Lymen taudin aiheuttajista, elää puutiaisen suolessa, josta se irrottautuu puutiaisen pureman

yhteydessä muuttamalla pintaproteiinejaan. Muuttuneiden pintaproteiinien avulla se irrottautuu suolen epiteelistä, ja siirtyy sylkirauhasten välityksellä uuteen isäntään. (Oksi ym. 2010a; Charon ym. 2013).

*Borrelia sp.*-bakteerit kykenevät väistämään komplementtiaktivaation myös muun muassa sitomalla pintaproteiineillaan komplementtijärjestelmän säätelijäproteiinia tekijä H:ta. (Stone – Brissette 2017). Kyseisiä pintaproteiineja, jotka kykenevät tekijä H:ta sitomaan, kutsutaan yleisellä nimellä CRASPs, eli complement regulator-acquiring surface proteins. Tekijä H:n lisäksi tietyt pintaproteiinit sitovat myös muun muassa komplementtijärjestelmän komponentteja C7, C8 ja C9 estäen komplementtijärjestelmän aktivaatiokaskaadin etenemisen. (Hammerschmidt ym. 2015.)

Esimerkiksi vuonna 2006 julkaistussa tutkimusartikkelissa testattiin muun muassa tekijä H:n sitoutumisen merkitystä toisintokuumetta aiheuttavilla *Borrelia recurrentis* ja *Borrelia duttonii* spirokeettoilla. Tutkimuksessa käytettiin eläviä bakteereja, sekä muun muassa tekijä H:ta (joka oli vain yksi osa tutkimusta). Tekijä H leimattiin radioaktiivisella merkkiaineella, joka mahdollisti sen kiinnittymisen bakteeriin. PCR oli myös yksi tutkimusmenetelmistä. Tutkimuksessa tultiin tulokseen, että tekijä H:n sitominen on bakteerien kannalta oleellista, ja se mitä todennäköisimmin pitkittää bakteerien selviämistä. (Meri – Cutler – Blom – Meri – Jokiranta 2006). Vuonna 2006 tehtiin toinen tutkimus *Borrelia hermsii*lle, jossa mm. tarkasteltiin, kuinka yleistä tekijä H:n sitomiskyky on kyseisellä bakteerilla käyttämällä DNA-sekvensointia ja PCR:ää sekä immunologisia testejä. Tässä tutkimuksessa testattiin useampaa eri *B. hermsii*-kantaa eri puolilta maailmaa, sekä hiiriä, joihin kantoja tartutettiin. Tutkimuksissa havaittiin, että 24:stä kannasta kolme ei sitonut tekijä H:ta, mikä viittaa tämän ominaisuuden olevan merkityksellisyuden lisäksi laajalle levinnyt. (Hovis – Schriefer – Bahlani – Marconi 2006.) Grosskinsky ym. totesivat vuonna 2009 tekijä H:n sitomisen olevan oleellista borreliabakteerin selviämiselle seerumissa, tosin ei FhbA-pintaproteiinin, vaan vastaavan HcpA-pintaproteiinin toimesta. Vuonna 2017 Röttgerding ym. havaitsivat *B. Miyamotoi*-bakteerilla FhbA-pintaproteiinin kaltaisen pintaproteiinin CbiA-proteiinin, joka vastaavasti sitoo tekijä H:ta.

### 2.3.1 *Borrelia hermsii*

*Borrelia hermsii* on endeemistä toisintokuumetta (relapsing fever) aiheuttava bakteeri. Se on pehmeäkuorisen *Ornithodoros hermsi*-punkin pureman kautta leviävä bakteeri,

joka on levinnyt laajalle Pohjois-Amerikan pohjois- ja länsiosiin. *B. hermsiin* aiheuttamalle toisintokuumeelle endeemiset alueet ovat tavallisesti metsäalueita, joissa tartunnan saaneet ovat mökeissä yöpyneet. Vuosien 1990 ja 2011 välillä CDC:lle (Centers for Disease, Control and Prevention) ilmoitetuista 504:stä toisintokuumeetapauksesta 96% oli alkuperältään *B. hermsiin* endeemisiltä alueilta. (Johnson – Fischer- Raffel – Schwan 2016; Mafi ym. 2019). Bakteeria levittävät punkit voivat elää jopa kymmenen vuotta. Mikäli niitä ei esimerkiksi edellä mainituista mökeistä saada hävitettyä, ne voivat levittää infektiota pitkään. *O. hermsi* käyttää tavallisesti ravinnon lähteenä jyrsojia, mutta usein mökeillä näiden kantaa on tarkoituksenmukaisesti vähennetty; tämä on mahdollisesti lisännyt *B. hermsiin* aiheuttamia toisintokuumeinfektioita ihmisillä. (Mafi ym. 2019).

### 2.3.2 Toisintokuume

Toisintokuume on vektorin kautta leviävä *Borrelia sp.*-bakteerin aiheuttama vakava infektio (Oksi – Seppälä – Hytönen 2010b). Useimmiten toisintokuumetta aiheuttavia lajeja levittävät pehmeäkuoristen *Ornithodors*-suvun punkit. Amerikan lisäksi toisintokuumetta ilmenee endeemisesti myös tietyillä alueilla Afrikassa, jossa se on yksi kuumesairauksien yleisimmistä aiheuttajista. Osa toisintokuumeen aiheuttajista voi läpäistä istukan aiheuttaen sikiölle infektion. (Fine ym. 2014; Talagrand-Reboul – Boyer - Bergström - Vial – Boulanger 2018.) Toisintokuumeen ensimmäisen kuumevaiheen oireina ovat ”Horkkamainen kuume, päänsärky, lihas- ja nivelkivut, vatsakivut sekä silmien valonarkuus ja yskä”. (Hytönen ym. 2016). Tässä kuumevaiheessa toisintokuumbakteeri on verenkierrossa, lisääntyy siellä, ja etenee edelleen kudoksiin, elimiin ja keskushermostoon. Verenkierrossa ollessaan bakteeri voidaan nähdä veren sivelyvalmisteessa, mitä käytetään taudin diagnostiikassa. Ensimmäisen kuumevaiheen jälkeen sairastunut on noin viikon ajan oireeton, kunnes tulee parin päivän pituisia kuumeen uusiutumia. Uusiutumien, eli relapsien määrään vaikuttaa se, onko toisintokuume täin vai puutiaisen levittämä. Näiden kuumevaiheiden lopussa ilmenee jälkitauteina tai oireina spleno- ja hepatomegaliaa, keltaisuutta, ihottumaa, aivohermohalvauksia, aivokalvontulehduksia, toispuolisia halvauksia ja epileptisiä kohtauksia. (Chen – Prasad – Walsh – Ashok 2017; Hytönen ym. 2016; Kaaja – Kauppila 2015; Oksi ym. 2010b.)

Yhtä toisintokuumborrelia-lajia levittää vaateäiti, ja tämä laji, *Borrelia recurrentis*, aiheuttaa täin levittämän ns. epideemisen muodon toisintokuumeesta. (Chen – Prasad – Walsh – Ashok 2017; Hytönen ym. 2016; Kaaja – Kauppila 2015; Oksi ym. 2010b.) Turun yliopisto toteutti 2015 valtakunnallisen puutiaisten yleisökeräyksen, jossa saatiin kerättyä

20 000 puutiaisyksilöä. Tästä joukosta löytyi kuudesta eri puolelta Suomea lähetetystä näytteestä *Borrelia miyamotoi*-bakteeria. *B. miyamotoi*-bakteeri on tunnistettu vähän aikaa sitten toisintokuumeenaiheuttajaksi, ja sitä levittää kovakuorinen Ixodes-puutiainen. (Meri, 2019). (Turun Yliopisto 2017.)

## 2.4 Virtausytometria

Virtausytometria on menetelmä, jossa liuostilassa olevia soluja tai muita partikkeleita ajetaan lasersäteen läpi ja rekisteröidään niiden sirontaa ja lähettämää fluoresoivaa valoa. Laite piirtää partikkeleista histogrammeja ja sirontakuvioita solujen koon, granulaa-risuuden ja fluoresoivan merkkiaineen mukaan. Virtausytometriä käytetään esimerkiksi veren solujen määrää sekä erilaisten solutyypin jakaumaa. Virtausytometria mahdollistaa suurien partikkelimäärien analysoimisen lyhyessä ajassa, mikä tekee siitä paljon käytetyn menetelmän esimerkiksi kliinisessä hematologiassa. (Siitonen – Penttilä 2015.)

Virtausytometrialaitteessa on paineistettu vaippaneste, jonka avulla solususpensio kohdistetaan lasersäteeseen. Säteen avulla mitataan partikkeleiden sirontaa ja muodostuu fotonipulsseja, jotka ohjataan detektorille. Solujen sirontaa mitataan kahdesta eri suunnasta. Pienestä kulmasta mitattu sironta eli *forward scatter* antaa tietoa solun koosta, ja sivusironta eli *side scatter* on verrannollinen solun granulaa-risuuteen ja tumen ja sytoplasman suhteeseen. Näiden sirontaominaisuuksien perusteella pystytään jaottelemaan esimerkiksi veren valkosolut. Analysoitaviin partikkeleihin sidotaan lisäksi fluoresoivia merkkiaineita, jotka ovat spesifisiä jollekin tutkittavan partikkelin rakenteelle. Näiden merkkiaineiden avulla voidaan visualisoida haluttuja molekyyliä, koska niiden avulla partikkelit emittoivat säteilyä ja muodostuu mitattavaa valoa. Fluoresoivat merkkiaineet voidaan esimerkiksi kiinnittää monoklonaalisiin vasta-aineisiin, jotka puolestaan tunnistavat tiettyjä solujen rakenteita. Merkkiaineista johtuva valo ohjataan valomonistin-putkeen linssien ja suodatinten avulla. Putkeen tulleet signaalit rekisteröidään ja niiden avulla piirretään tietokoneelle partikkeleiden määrää, kokoa ja rakennetta havainnoivia kuvaajia. (Ormerod 2000: 1-25; Siitonen – Penttilä 2015.)

### 3 Opinnäytetyön tarkoitus ja tavoite

Opinnäytetyön tarkoitus on

1 Optimoida *Escherichia coli*- ja *Borrelia hermsii* –bakteereita käyttämällä menetelmä, jolla *Borrelia sp.* -bakteereita voidaan laskea virtaussytometrillä.

2 Testata optimoidulla menetelmällä *Borrelia hermsii* -bakteerin FhbA –pintaproteiinin merkitystä komplementtijärjestelmän väistössä estämällä tekijä H:n sitoutumista solupinnan FhbA:han liukoosella rekombinantti FhbA:lla.

Tavoitteena tällä opinnäytetyöllä on testata ja optimoida tutkimusryhmälle tehokas ja luotettava tutkimusmenetelmä, joka edistää spirokeetta-bakteerien analysointia. Komplementtijärjestelmän väistön tutkimisen tavoitteena on kerätä tilastollista dataa tutkimusryhmän käyttöön.

### 4 Opinnäytetyön menetelmät ja toteuttaminen

Helsingin yliopisto vastasi kaikista testeissä tarvittavista näytemateriaaleista ja välineistä. Optimointi- ja testausvaiheet suunniteltiin yhdessä työelämäohjaajiemme Taru Meren ja Karita Haapasalon kanssa. Ennen testejä keskustelimme yhdessä työvaiheista ohjaajiemme kanssa ja teimme tarvittaessa muutoksia aiempien testien ja tulosten perusteella.

#### 4.1 Menetelmän optimointi

Ensimmäinen opinnäytetyön tarkoituksista oli optimoida virtaussytometrinen tutkimusmenetelmä *Borrelia sp.* -bakteereille. Ensin käytettiin seerumille herkkää *E. coli* –bakteeria, ja tämän jälkeen *Borrelia hermsii* -bakteeria. *E. coli* toimi ikään kuin kontrollina menetelmälle sen seerumiherkkyyden, eli toisin sanoen komplementtiherkkyyden vuoksi. Samalla varmistettiin virtaussytometrin toiminta.

*Borrelia sp.*-bakteereja ei aiemmin ole testattu virtaussytometrisella menetelmällä yksinään. Aiemmissa tutkimuksissa eri borrelia-kantoja on laitettu solujen sisälle ja näitä soluja ajettu virtaussytometrillä. Esimerkiksi Lymen tautia aiheuttavia borrelioita on tutkittu injektioimalla bakteeria puutiaissoluihin ja ajamalla soluja virtaussytometrillä (Teixeira



ym. 2016). *Borrelia*-bakteeri on haastava kasvattaa, sillä se on herkkä kuolemaan eikä kasva maljalla (Raffel ym. 2018; Veinović – Ružić-Sabljić – Strle – Cerar 2016). Tästä nousi tarve optimoida virtausytometrinen tutkimusmenetelmä borrelioiden analysoimiseen.

Tutkimuksissa käytettiin Dakon valmistamaa CyAn™ ADP -virtausytometriä. Tämä menetelmä mahdollistaa ison bakteerimäärän laskennan. Näytteiden mittausta on tehokasta ja mittaustuloksia saadaan suuresta määrästä bakteereja: laite ohjelmoitiin menetelmäoptimoinnissa laskemaan yhteensä 20 000 bakteeria.

Jotta bakteerit saatiin näkyviin virtausytometrin histogrammissa, ne värjättiin fluoresoivalla propidium iodide -leimalla. Kun komplementti läpäisi solun pinnan, tässä tapauksessa bakteerin, pääsi leima samalla bakteerin sisään ja kiinnittyi bakteerin DNA:han. Bakteerin ulkopuolelle jäänyt leima-aine pestiin pois, jotta se ei anna signaalia. Leima saatiin näkyviin aallonpituudella 488 nm. Leiman toimivuus tarkistettiin kontrollinäytteellä, jossa bakteereja hajotettiin vedellä.

Mitä enemmän virtausytometrin histogrammissa näkyi leimattua DNA:ta, sitä enemmän komplementtiaktivaatiota oli seoksessa eli propidium iodide oli päässyt bakteerin sisään komplementin tekemän membraaniaukon kautta. Virtausytometrin antamat tulokset analysoitiin FlowJo -ohjelmalla yliopiston lisenssillä. Saatuja lukuja tarkasteltiin Excel-ohjelmassa.

#### 4.1.1 Optimointi *E. coli*-bakteerilla

*E. coli* -tutkimuksessa tutkittiin eri seerumimääriä seoksessa, 3%, 10% ja 30%, jotta nähtiin mahdollisimman selkeä solujen värjäytyvyys. Solujen värjäytyvyydellä tarkoitetaan sitä rajattua aluetta, jossa fluoresenssi värjäytyvyys on komplementtijärjestelmän aikaansaamaa. Alla olevassa kaaviossa on esitetty menetelmäoptimoinnin näytteet ja niiden merkitykset (Taulukko 1).

Taulukko 1. *E. coli* näytetaulukko

Näyte	Merkitys
1. EDTA-kontrolli	EDTA estää komplementtiaktivaation: vähäinen fluoresenssileiman sitoutuminen.
2. PBS-kontrolli	Tarkistetaan fluoresenssileiman sitoutuminen muualle kuin DNA:han: auttaa tulosten rajauksessa.
3. NHS 3 %	Optimin värjäytyvyyden selvittäminen eri NHS -konsentraatioilla: pienin värjäytyvyys.
3. NHS 10 %	Optimin värjäytyvyyden selvittäminen eri NHS -konsentraatioilla: suurempi värjäytyvyys.
4. NHS 30 %	Optimin värjäytyvyyden selvittäminen eri NHS -konsentraatioilla: suurin värjäytyvyys.

Ensimmäinen kontrolliseos sisälsi PBS:n ja NHS:n lisäksi EDTA:ta, jolla inaktivoitiin komplementin toiminta. EDTA sitoo magnesiumia, joita komplementtijärjestelmä tarvitsee toimiakseen: tekijä B:tä sitoakseen ja oikotien etenemiseen hydrolyysi C3 tarvitsee  $Mg^{2+}$ -ionin läsnäolon. (Pathak – Palan 2012:58.) PBS eli phosphate buffered saline on suolaliuos, jota käytetään muun muassa solulaskennassa (Thermo Fisher Scientific Oy 2002.). NHS oli seoksessa mukana tuomassa bakteereille mahdollisimman samankaltaiset olosuhteet kuin muissa kontroleissa. NHS, eli normal human serum on tavallista seerumia, jossa komplementtiaktivaatio toimii. Käytetty seerumi saatiin vapaaehtoisilta Helsingin yliopiston henkilökuntaan kuuluvilta luovuttajilta HUS eettisen toimikunnan luvalla. Käytetty NHS oli pakastettu mahdollisimman nopeasti näytteenoton jälkeen. Sitä myös käsiteltiin nopean sulatuksen jälkeen jäissä, jotta ehkäistiin komplementtijärjestelmän ennenaikainen aktivaatio. Kokeilemalla eri kontroleja nähtiin, missä konsentraatioissa bakteerin hajoaminen eli kuolleisuus näkyi selkeimmin.

#### 4.1.2 Optimointi *B. hermsii*-bakteerilla

Kun menetelmää oli ensin testattu seerumiherkällä *E. coli*lla, voitiin siirtyä *B. hermsii*-bakteeriin. Alla taulukko käytetyistä näytteistä sekä niiden merkityksistä (taulukko 2).

Taulukko 2. *B. hermsii* näytetaulukko

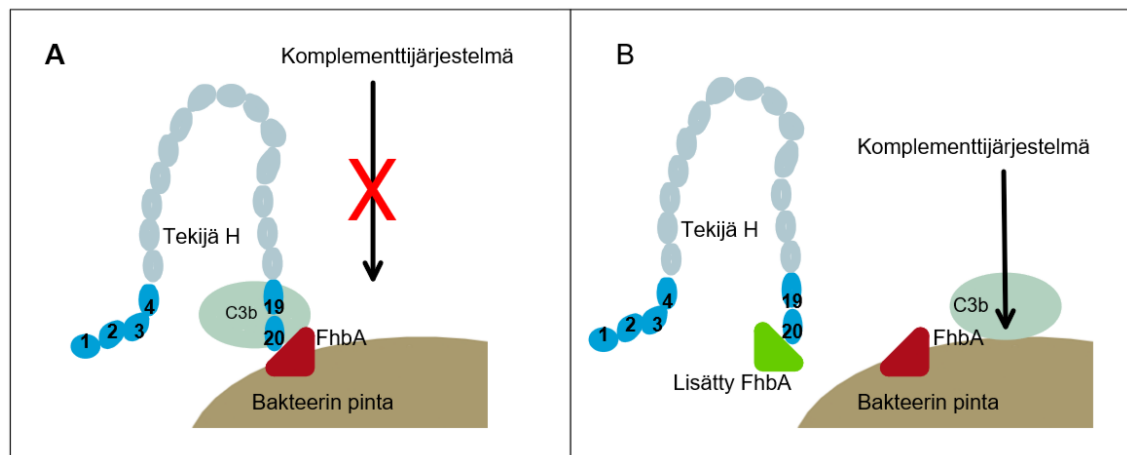
Näyte	Merkitys
Vesikontrolli	Positiivinen kontrolli. Sisältää HIS:ä.
VBS-kontrolli	Fluoresenssin leiman sitoutuminen muualle kuin DNA:han.
Leimaton kontrolli	Tarkistetaan virtausytometrin laskema tausta ilman fluoresenssileimaa.
NHS 40%	Bakteerin värjäytyvyys komplementtijärjestelmän toimesta.

Vesikontrolli on positiivinen kontrolli, jossa bakteerien kuolleisuuden tulee olla suuri. Puhdas vesi (MQ-vesi) hajottaa soluja tuhoten muun muassa niiden proteiinirakenteen veden tunkeutuessa osmoosin avulla solun sisään. (British Society for Cell Biology 2019). Rakenteen hajotessa fluoresenssileima pääsee kiinnittymään DNA:n. HIS:ä seokseen lisättiin luomaan oikeanlaiset olosuhteet bakteerille ilman aktiivista komplementtijärjestelmää. HIS, eli heat inactivated serum on seerumia, jota on lämmitetty 56 asteessa 30 minuutin ajan, jotta inaktivoidaan siinä olevat komplementtijärjestelmän entsyymit. (Thermo Fisher Scientific 2019). Vesikontrolli ilman HIS:ä aiheuttaisi solujen täydellisen hajoamisen, mikä johtaisi siihen, ettei virtausytometrillä olisi enää sopivan kokoisia partikkeleita laskettavaksi. Koska *E. coli*n tiedettiin olevan seerumiherkkä, ei vesikontrollille ollut tarvetta: *B. hermsii*n kohdalla haluttiin kuitenkin varmistaa bakteerin hajoaminen. *E. coli*-optimoinnista poiketen *B. hermsii*n kohdalla ei käytetty EDTA:ta lainkaan: EDTA voi jonkin verran inhiboida bakteeria (Finnegan – Percival 2015.) *B. hermsii* on *E. coli*a herkempi bakteeri, joten EDTA jätettiin varmuuden vuoksi pois ylimääräisen hajoamisen ennaltaehkäisemiseksi. Puskurina käytettiin VBS eli ”veronal buffer saline” -liuosta, koska se on komplementtitutkimuksissa parhaiten toimiva puskuri (Meri 2019). VBS-kontrolli toimi samanlaisena kontrollina kuin *E. coli*n PBS-kontrolli: sen avulla mitattiin leiman kiinnittymistä muualle kuin haluttuun DNA:han, joka helpottaa tulosten rajaamista. Värjäämättömällä, eli ei-leimatulla kontrollilla tarkistettiin laskettavien solujen taustafluoresenssi. NHS-näyte taas kertoi komplementtijärjestelmän toiminnan. NHS:n sopivaan määrään päädyttiin *E. coli*-optimoinnin perusteella.

#### 4.2 *Borrelia hermsii* -bakteerin kyky väistää komplementtijärjestelmää

Toisintokuumetta aiheuttava *Borrelia sp.* -bakteeri selviää hyvin elimistössä, koska se sitoo tekijä H:ta ja on resistenssi komplementin vaikutukselle. Oletuksena on, että kun

tämä ominaisuus poistetaan, bakteerin komplementiresistenssi vähenee tai häviää. FhbA (Factor H binding protein A) on näillä bakteereilla tunnettu tekijä H:ta sitova proteiini, eli oletuksena on, että ilman tätä proteiinia bakteeri ei enää pysty väistämään komplementtia. Opinnäytetyön tarkoituksena oli käyttää eläviä soluja ja analysoida, kuinka suuri merkitys komplementtisäätelijäproteiinin sitomisella on *B. hermsii*-bakteerin virulenssissa. Eli kun *B. hermsii*lle lisätään seeruminäytteeseen kilpaileva molekyyli, liukoinen rekombinantti FhbA:ta, tämän lisätyn proteiinin oletetaan kiinnittyvän tekijä H:n. Näin ollen bakteerin pinnassa oleva FhbA-proteiini ei pysty sitomaan tekijä H:ta bakteerin pintaan, eikä bakteeri täten pysty enää väistämään komplementtijärjestelmää. Oletettiin, että tämän seurauksena komplementtijärjestelmä aktivoituu tehokkaammin, mikä johtaa *B. hermsiin* pintakalvon reikiintymiseen. Tämä näkyy fluoresoivan merkkiaineen lisääntyneenä kiinnittymisenä bakteerien DNA:han. Alla havainnollistava kuva reaktiosta (Kuvio 2).



Kuvio 2. Tutkimuksen oletettu reaktio.

Molemmassa ruudussa tekijä H on kuvattu harmaan ja sinisen sävyillä ja bakteerin pinnalla oleva FhbA-proteiini tummanpunaisella. B-ruudussa kilpaileva molekyyli, eli lisätty FhbA-proteiini, on esitetty vihreällä. A-ruudussa komplementin C3b-alayksikkö on siis kiinnittynyt bakteerin pintaan, jolloin tilanne normaalisti etenisi oikotien aktivaation etenemiseen. Tässä tapauksessa tekijä H tulee kuitenkin inaktivoimaan C3b:n johtaen oikotien pysähtymiseen. B-ruudussa tekijä H ei siis pysty kiinnittymään bakteerin pinnan FhbA:n, jolloin oikotien aktivaatio pääsee etenemään normaalisti.

### 4.3 Bakterikannat ja kasvatus

Optimoinnin kontrollina käytettiin Helsingin yliopiston laboratorioskanta *E. coli* BL 21 (DE). *E. coli* kasvoi 37 asteessa hiilidioksidikaapissa, jossa hiilidioksidin osuus oli 5,0 %. Kanta viljeltiin Luria Bertani-maljalle. *B. hermsii*-kanta kasvatettiin samoissa olosuhteissa.

Opinnäytetyössä käytetyn *B. hermsii*-kannan Helsingin yliopisto on saanut alun perin Iso-Britanniasta *Borrelia sp.*-bakteereihin erikoistuneelta tutkijalta Sally Cutlerilta (University of East London 2019). *Borrelia sp.*-kanta on säilytetty Helsingin yliopistolla jäässä glyserolisäilytyksessä 15 vuotta. Bakteerien kasvatuksessa käytettiin BSK-H-liu-  
osseosta, jossa on runsaasti kasvua tukevia proteiineja, peptidejä, nukleosideja sekä vitamiineja. Seos sisältää myös kanin seerumia, jossa on tekijä H:ta. (Bio&Sell 2019.) Vaikka kanin tekijä H ei ole identtinen ihmisen tekijä H:n kanssa, voi tämä silti vaikuttaa komplementtijärjestelmän toimintaan, ellei bakteereja ensin pestä huolella. Pesemällä varmistetaan, ettei bakteeriin sitoudu kanin tekijä H:ta, mikä voisi vääristää tutkimustuloksia. BSK-H-seos ei myöskään sisällä antibioottia, joten bakterikasvatusnäytteen käsittelyn tulee olla mahdollisimman steriiliä. Tämä tarkoittaa, että seosta ja bakteereita käsiteltiin biosuojakaapissa ja työskenneltiin mahdollisimman aseptisesti. *Borrelia sp.*-bakteerit ovat herkkiä antibiooteille, joten mahdollinen antibioottialtistus bakteerien käsittelyn aikana voi tappaa ne herkästi.

*Borrelia sp.*-bakterikantoja kasvatettiin ottamalla alkuperäistä jäädytettyä kantaa steriilillä silmukalla tai tikulla, ja sekoittamalla tämä steriilissä putkessa olevaan mediaan eli kasvatusseokseen. Tämän jälkeen bakteerit jätettiin kasvamaan hiilidioksidikaappiin keskimäärin kolmeksi vuorokaudeksi. Kasvua tarkasteltiin mikroskoopilla pimeänäkökentällä ja kasvun määrä arvioitiin 400-kertaisella suurennoksella. Testeihin käytettiin bakterikasvuja, joissa voitiin nähdä noin 150 – 200 bakteeria yhdessä näkökentässä. Bakteereita tulee olla runsas määrä, jotta mahdollistetaan riittävä bakteerien laskenta, ottaen huomioon mahdollisen kuolleisuuden pelkän käsittelyn aikana. Mikäli *Borrelia*-viljelyihin pääsi kontaminaatiota, eli muuta bakteeria, syrjäytti se *B. hermsii* hyvin nopeasti. Kontaminaation sattuessa viljelynäyte ei ollut enää pelastettavissa, jolloin kyseinen viljely hävitettiin ja viljeltiin uusi. *Borrelia*iden kasvun tarkastus pyrittiin pitämään minimissä, jotta kontaminaatoriski saataisiin myös minimoitua. Kun kasvua tarkasteltiin mikroskoopilla, otettiin bakterikasvustoa autoklaavatuilla pipetinkärjillä.

#### 4.4 Bakteerien käsittely

Ennen jokaista testiä bakteerien määrät tarkastettiin mikroskoopin pimeänäkökentällä. Kun kasvatuseoksessa saavutettiin riittävä bakteerimäärä, laskettiin testiin tarvittava bakteerimäärä käyttämällä seuraavaa kaavaa:

$$X \times 2,5 \times 10^4 \text{ bakteeria/ml}$$

Kaavassa X on bakteerien kappalemäärä/näkökenttä. Jotta saadaan bakteerien määrä millilitroissa, kerrotaan näkökentän bakteerien määrä kaavan kertoimella  $2,5 \times 10^4$ . Tämä kerroin arvioi bakteerien lukumäärän mikroskooppilasin ja peitinlasin väliin jäävässä tilavuudessa. Jokaiseen testissä käytettyyn eppendorf-putkeen haluttiin bakteerien määräksi  $1 \times 10^6$  bakteeria/ml. Edellä mainittua kaavaa käyttämällä voitiin määrittää tarvittava millilitramäärä esimerkiksi neljälle eppendorf-putkelle:

$$Y \times (200 \times 2,5 \times 10^4 \text{ bakteeria/ml})/4 = 1 \times 10^6$$

Kaavassa Y on testissä tarvittun bakteeriliuoksen määrä. Tällöin tarvittiin siis 0,8 ml bakteeriliuosta. Laskettu määrä otettiin kasvatusputkesta, ja siirrettiin falcon-putkeen. Bakteerit pelletoitettiin sentrifugaamalla putkea 5000 rpm:ssä 15 minuuttia, jonka jälkeen supernatantti poistettiin. Tämän jälkeen putken pohjalle jäänyt bakteerinäppä pestiin kahdesti lisäämällä putkeen 1 ml veronaalipuskuria (VBS). VBS sisältää barbituraattijohdannaisia (Veronal), magnesiumkloridia ja kalsiumkloridia. Puskuri ylläpitää haluttua pH-tasoa näytteessä. Pestäessä näytettä seosta sekoitettiin kevyesti pipetillä, siirrettiin neste 1,5 ml eppendorf-putkeen, fuugattiin putki 8000 rpm:ssä 10 minuutin ajan ja poistettiin supernatantti. Pesu toistettiin, jonka jälkeen supernatantti otettiin jälleen pois ja putkeen lisättiin VBS:ää.

Kaikki pipetoinnit tehtiin jäissä, jotta ehkäistiin komplementin aktivaatio ennen aikaisesti seerumin lisäyksen jälkeen. Ennen propidium iodide -leiman lisäystä bakteeriliuoksesta otettiin 20 µl sivuun värjäämätöntä kontrollia varten. Tämä mittaa virtaussytometrin laskemaa taustaa. Kun bakteereihin oli lisätty propidium iodide (1 µl/100 µl bakteeriliuosta), näytteet suojattiin valolta, jottei leiman teho heikkene. Tämän jälkeen leimattu bakteeri jaettiin niin moneen eppendorf-putkeen kuin näytteitä ja kontrolleja oli yhteensä. Seuraavaksi pipetoimme kaikkiin näytteisiin puskurin. Viimeisenä pipetoitiin NHS ja HIS, koska haluttiin välttää komplementin ennenaikainen aktivoituminen.

Näytteitä inkuboitiin 38 asteessa 90 minuutin 850 rpm tasoravistelussa. Inkubaation aikana komplementtiaktivaatio käynnistyy ja päättyy membraaniaukkoon, jota kautta leima pääsee kiinnittymään bakteerin DNA:han. Inkubaation jälkeen näytteet pestiin kaksi kertaa, jotta poistettiin ylimääräinen leima ja pysäytettiin mahdollisesti vielä toimiva komplementtijärjestelmä. Pesulla tarkoitetaan sitä, että inkubaation jälkeen näyteputket fuugattiin 8000 rpm:ssä 10 minuutin ajan, jonka jälkeen supernatantti poistettiin. Tilalle laitettiin 500 µl VBS:sää, sekoitettiin hellävaraisesti, ja fuugattiin uudelleen. Pesujen jälkeen supernatantti jälleen poistettiin, ja tilalle laitettiin 100 µl 4% paraformaldehydiä. Tämä kiinnittää näytteen ja estää bakteerien lisääntymisen sekä niiden hajoamisen. Kun bakteerit olivat kiinnittyneet jäissä 30 minuuttia, näytteisiin lisättiin 700 µl PBS:sää laskentaa varten.

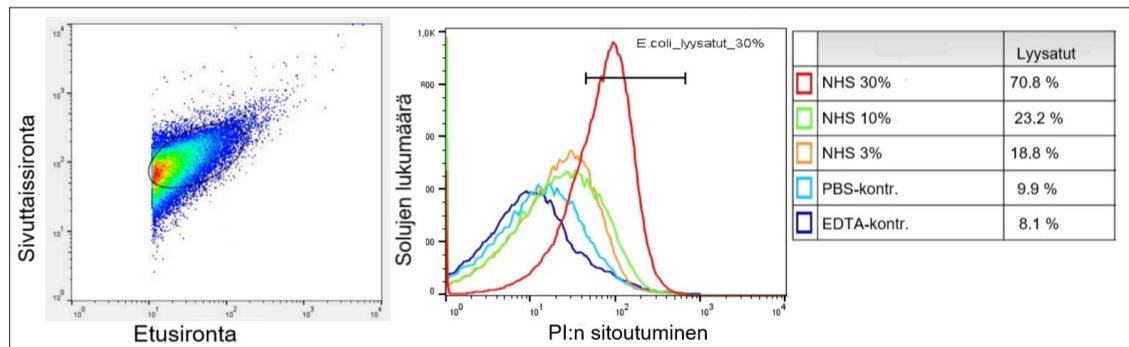
## 5 Opinnäytetyön tulokset ja niiden tarkastelu

### 5.1 Tulosten käsittely

Tulosten käsittelyssä käytettiin FlowJo -ohjelmaan ajettuja kuvaajia ja tilastollisessa laskennassa Excel-ohjelmaa. FlowJo -ohjelma on tarkoitettu virtaussytometrin tulosten analysointiin ja tulkintaan (BD Biosciences 2018). Virtaussytometrin antamista tuloksista määritettiin fluoresenssi ja laskettujen partikkeleiden lukumäärä. FlowJo -ohjelmassa näistä tuloksista saatiin värjäytyneiden solujen määrä rajaamalla mitattava alue. Tuloksista laskettiin fluoresenssin intensiteetin keskiarvo ja keskihajonta, joiden avulla tarkasteltiin tulosten toistettavuutta. Keskiarvo kuvaa jakauman keskikohtaa ja se on saatu laskemalla koko sarjan tulokset yhteen ja jakamalla tämä tulos näytteiden lukumäärällä. Keskihajonnalla kuvataan havaintoarvojen sijoittumista jakauman keskiarvon ympärille ja se on laskettu ottamalla varianssista neliöjuuri. T-testillä tarkastelimme, onko FhbA:n lisäämisellä näytteisiin tilastollisesti merkitsevää eroa. T-testiä käytetään, kun halutaan tarkastella kahden ryhmän keskiarvojen eron merkitsevyyttä ja päätellä johtuuko ero ryhmien välillä satunnaisvaihtelusta vai onko kyseessä todellinen merkitsevä ero. Tuloksia käsiteltiin värjäytyvyyden osalta, mikä kuvastaa haluttua bakteerin kuolleisuutta. (Excel Easy; Leskinen 2019; Tilastokeskus).

### 5.2 Optimointitulosten tarkastelu

Ensin tehtiin menetelmän optimointi *E. coli*-bakteerilla. Alla kuva mitatuista bakteereista sekä bakteeripopulaation rajaamisesta histogrammin tekoa varten (Kuvio 3).



Kuvio 3. *E. coli* optimointi. Toisen ja kolmannen laatikon ”lyysatut” viittaa värjäytyneisiin soluihin.

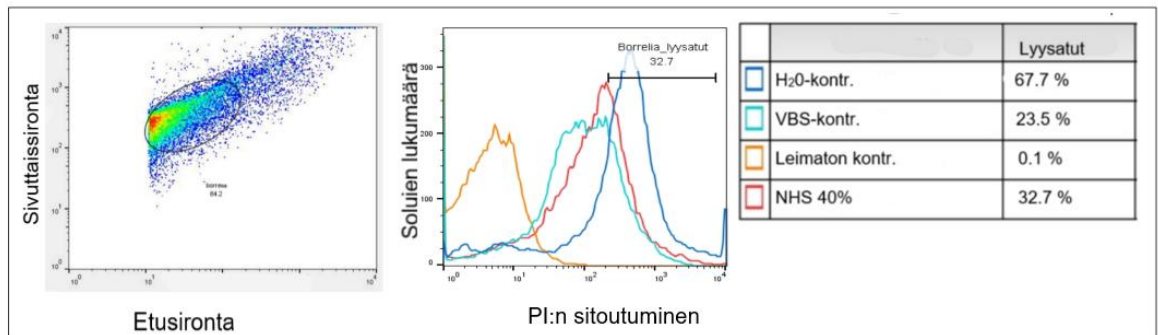
Kuvion 3 vasemmalla puolella on kuvattuna koko virtausytometrin laskema bakteeripopulaatio. X-akselilla on etusironta, forward scatter, joka kertoo solun koosta. Y-akselilla taas on sivuttaissironta, side scatter. Tämä kertoo solun granulaarisuudesta. Näiden sirontojen avulla pystytään erottamaan eri solupopulaatiot toisistaan (FlowJo 2019).

Tästä mustan soikion populaatiosta on taas rajattu mitattava alue (musta soikio kuvion 3 vasemmassa laatikossa populaation päällä), josta itse tuloksia tarkastellaan. Kuvion 3 oikealla puolella taas rajatulla alueella olevat mittaukset ovat histogrammin muodossa. Histogrammin värit ovat selitettynä histogrammin vieressä. Y-akseli kuvaa solujen laskettua määrää, X-akseli taas fluoresenssileiman sitoutumisen määrää: mitä enemmän oikealle päin X-akselia histogrammit sijoittuvat, sitä enemmän fluoresenssileimaa virtausytometri on saanut mitattua. VBS- ja EDTA-kontrollien mukaan rajattiin kuvassa 3 toisessa mustana janana näkyvä rajausalue, joka kuvaa kuolleisuuden todellista määrää. Kummassakaan kontrollissa ei komplementtijärjestelmän mukaista bakteerien solujen hajoamista tulisi olla, sillä kummassakaan ei toimivaa komplementtijärjestelmää ole. Näistä mitattu fluoresenssileima on siis kiinnittynyt muualle kuin haluttuun DNA:n. Todennäköisesti näytteissä on myös hajonnut soluja, mutta se on muusta kuin komplementtijärjestelmästä johtuvaa.

Oleellista on, että EDTA-kontrolli (sininen) ja VBS-kontrolli (vaalean sininen) ovat huomattavasti pienempiä kuin NHS-näytteet, sekä sijoittuneet vasemmalle X-akselilla. Kuvion 3 näkee selkeästi, miten NHS-konsentraatioiden noustessa värjäytyneiden bakteerien määrä nousee. Alimmassa, eli 3%:n seerumikonsentraatiossa bakteerien värjäytyminen on 18,8%, sitä korkeammassa eli 10%:n konsentraatiossa 23,2%. Korkeimmassa NHS-konsentraatiossa värjäytyneiden bakteerien määrä on myös odotetusti kaikista suurin, 70,8%. Ensimmäisen ja toisen näytteen välillä värjäytyneisyys eli kuolleisuus nousi 4,4 prosenttiyksikköä, kun taas toisen ja kolmannen näytteen välillä ero on huomattavasti suurempi, 47,6 prosenttiyksikköä.



Koska havaittiin, että menetelmä toimi hyvin ja odotetusti *E. coli*n kohdalla, siirryttiin *B. hermsii*hin. Alla kuva mitatuista bakteereista sekä bakteeripopulaation rajaamisesta histogrammin tekoa varten (Kuvio 4).



Kuvio 4. *B. hermsii* optimointi. Toisessa ja kolmannessa laatikossa "lyysatut" viittaa värjäytyneisiin soluihin.

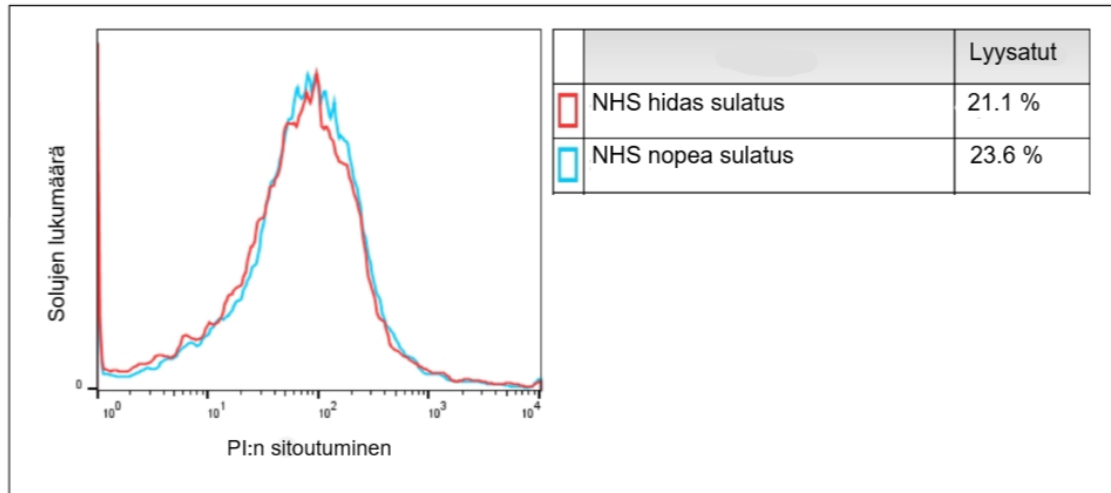
*B. hermsii*n tutkimusmenetelmän optimoinnin kohdalla rajaukset on tehty samalla periaatteella kuin *E. coli*n kohdalla. Vaikka bakteeripopulaatio on selkeästi levinnyt laajemmalle kuin *E. coli*n kohdalla, päästiin kuitenkin tavoitteeseen: bakteereja saatiin laskettua virtaussytometrillä. Kuten oletettua, vesikontrollissa on suurin bakteerien värjäytyminen, ja leimattomassa kontrollissa pienin. VBS-kontrollissa värjäytymistä on, mutta NHS-näytteessä sitä on kuitenkin enemmän. VBS-kontrollin ja NHS-näytteen ero on 9,2 prosenttiyksikköä.

### 5.3 Optimoinnin virhetestit

Optimointiosioon kuului erilaisia virhelähteiden minimointeja. Ne osiot, joita oli mahdollista tietyn aikarajan puutteissa varmistaa, on esitetty tässä osiossa.

Mahdolliseksi virhelähteeksi huomioitiin esimerkiksi käytetty seerumi. Jotta varmistettiin mahdollisimman pieni autoaktivaatio komplementtijärjestelmän suhteen, testattiin seerumin eri sulatusmenetelmiä (kaikki käytettävä seerumi oli pakastettu heti näytteenoton ja erottelun jälkeen). Halusimme nähdä, onko seerumin sulatusmenetelmällä tulosten kannalta oleellista merkitystä.

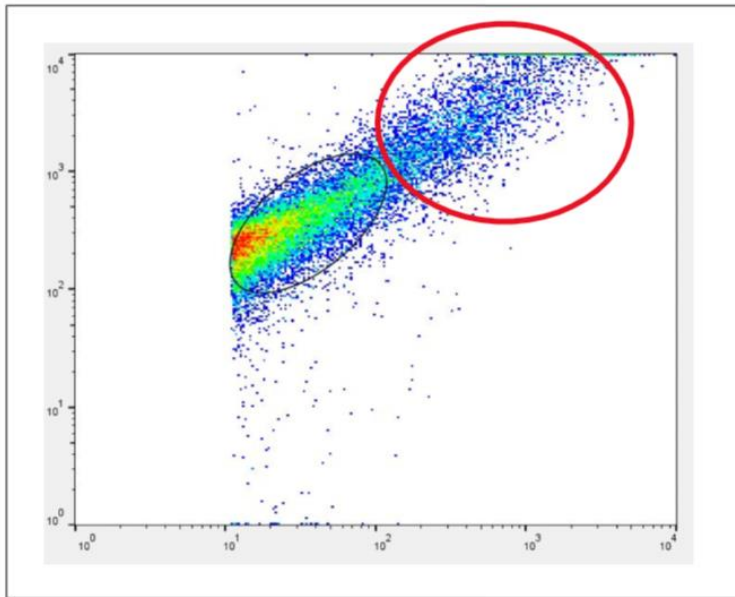
Testissä käytettiin kahta samaan aikaan otettua ja pakastettua seeruminäytettä, joista toinen sulatettiin nopeasti kädessä ja laitettiin sen jälkeen jäihin, ja toinen sulatettiin hitaasti laittamalla seerumi pakkasesta suoraan jäihin. Molemmista seerumeista tehtiin rinnakkaisnäytteet. Alla histogrammikuva saaduista tuloksista (Kuvio 5).



Kuvio 5. Seerumin sulatustesti.

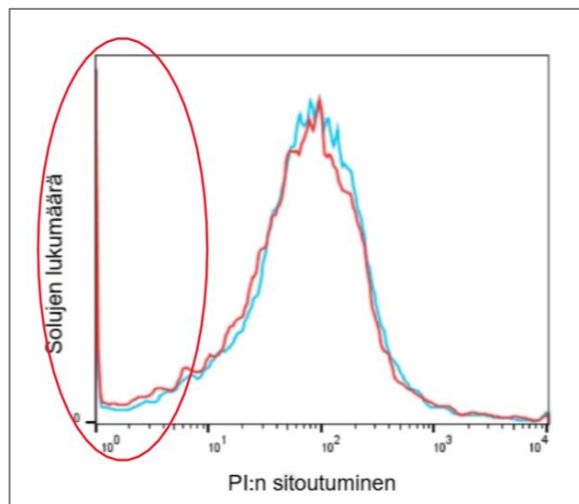
Kuvaajasta näkee, että käyrät ovat hyvin saman malliset. Ero värjäytyneissä soluissa oli 2,5 prosenttiyksikköä. Rinnakkaistulokset olivat johdonmukaiset, kuviossa 5 näkyvillä vain toiset tulokset.

*B. hermsii*-populaation rajaamisessa tuli huomioida bakteerin aggregoituminen: jos bakteerit kiinnittyvät toisiinsa, virtaussytometri voi erehtyä luulemaan useamman bakteerin aggregaatiota yhdeksi isommaksi partikkeliksi. Kuviossa 6 aggregoituminen on rajattu punaisella soikiolla.



Kuvio 6. Bakteerien aggregoitumisen ilmentyminen.

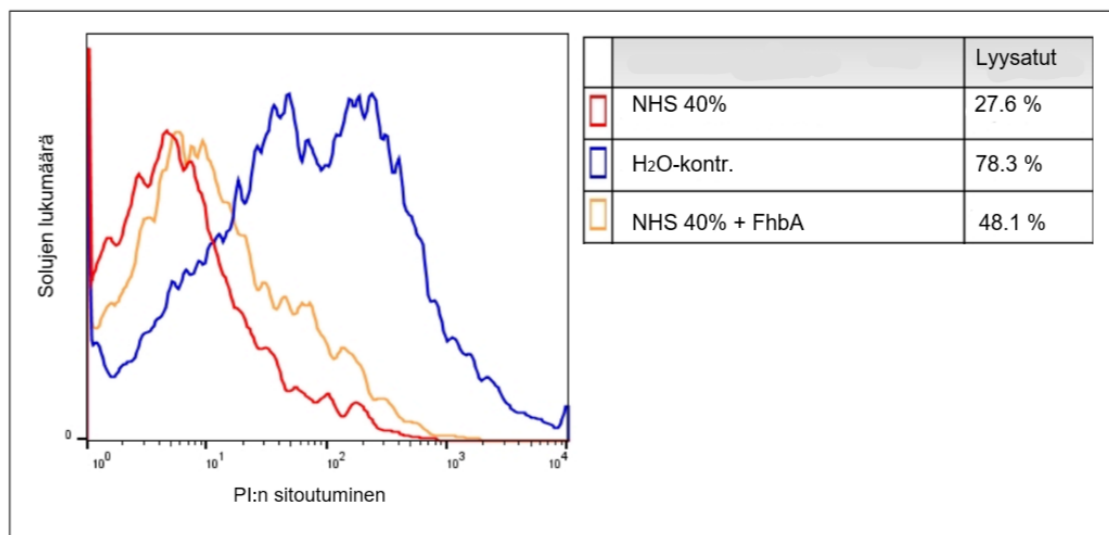
Huomionarvoinen asia on myös kontrollinäytteiden mahdolliset kontaminoitumiset. Jokaisessa virtausytometrianalysissämme näkyi kuvaajassa ns. ”alkupiikki”, mikä viittaisi siihen, että laite on mitannut myös jotain muuta kuin haluttua bakteeria. Kuviossa 7 kyseinen piikki on rajattu punaisella ellipsillä.



Kuvio 7. Mittausten taustapiikki.

#### 5.4 Kilpailevan molekyylin merkitys

Tätä osiota varten tehtiin kolme analysointia, joissa vertailtiin NHS-näytteen ja FhbA-näytteen eroja. Kaikkien kuvaajien rajaukset tehtiin vastaavalla periaatteella kuin optimointien kohdalla. Alla ensimmäinen analysointi. Y-akselilla on solujen lukumäärä, X-akseli kuvaa fluoresenssin leiman sitoutumista (Kuvio 8).



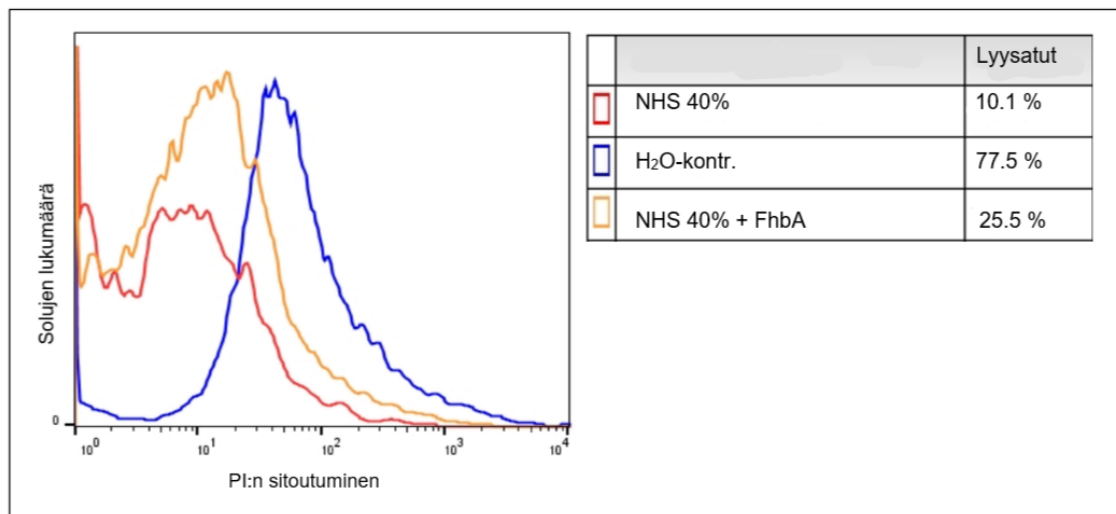
Kuvio 8. *B. hermsii* 1. testi. "Lyysatut" viittaa värjäytyneisiin soluihin.

Kuten optimoinnissa, vesikontrollissa solujen värjäytyneisyys on suurin. Vesikontrollissa näkyy kaksi huippua, joka viittaa kahteen populaatioon (johtuu mahdollisesti bakteerin spirokeetta-muodosta). Tämä on kuitenkin huomioitu rajauksessa. Punainen, eli NHS-näyte on selkeästi painottunut enemmän vasemmalle kuin oranssi kuvaaja eli kilpaileva molekyyli: lisätty FhbA-proteiini on siis lisännyt komplementtijärjestelmän tappokykyä. FhbA-proteiini lisäsi komplementtijärjestelmän tappokykyä 20,5 prosenttiyksikköä. Alla olevassa taulukossa on esitetty testin 1 fluoresenssi, laskettujen bakteerien lukumäärä ja värjäytyneiden hajoitettujen borrelioiden osuus prosentteina. FlowJo -ohjelman laskelema fluoresenssin intensiteetistä kuvaa fluoresoivan merkkiaineen kiinnittymistä partikkeliin. Jotta tällä luvulla olisi merkitystä, tulee virtausytometrillä kuvaajan olla normaalisti jakautunut (FlowJo 2017). Lukumäärä viittaa virtausytometrillä laskettujen partikkelien lukumäärään, tässä tapauksessa borreliabakteerien lukumäärään. Kuten todettu aiemmin, asetimme tavoitelukumääräksi 20 000 bakteeria. Borrelia lyysatut (%) kuvaa hajoitettujen ja värjäytyneiden borreliabakteerien prosentuaalista osuutta näytteessä. Tämän populaation rajausta kuvasimme edellä kappaleessa 5.2. Alla tuloksia tarkasteltuna taulukkomuodossa (Taulukko 3).

Taulukko 3. Testin 1 fluoresenssi, laskettujen bakteerien lukumäärä ja värjäytyneiden borrelioiden osuus (%).

	Fluoresenssi	Lukumäärä	Borrelia värjäytyneet (%)
Testi 1 NHS 40 %	7,53	4786	27,6
Testi 1 NHS 40% ja FhbA	14,9	10024	48,1
Testi 1 Vesikontrolli	88,2	19977	78,3

Vesikontrollissa värjäytyneisyyden tulisi olla suurin ja kuten taulukosta näkyy, fluoresenssi ja värjäytyneiden borrelioiden määrä on suurin kontrollinäytteessä. Tämän perusteella kontrolli on siis toiminut. Testissä 1 ei päästy yhdenkään näytteen kohdalla asetettuun 20 000 tavoitemäärään laskettujen borreliabakteerien osalta. Kuten taulukosta näkyy, sekä fluoresenssi että värjäytyneiden borrelioiden määrä ovat suuremmat näytteessä, johon on lisätty FhbA-proteiinia verrattuna näytteeseen, jossa on ollut pelkkää NHS:ia. Seuraavassa kuvassa on testin 2 vastaava kuvaaja (Kuvio 9).



Kuvio 9. *B. hermsii* 2. testi.

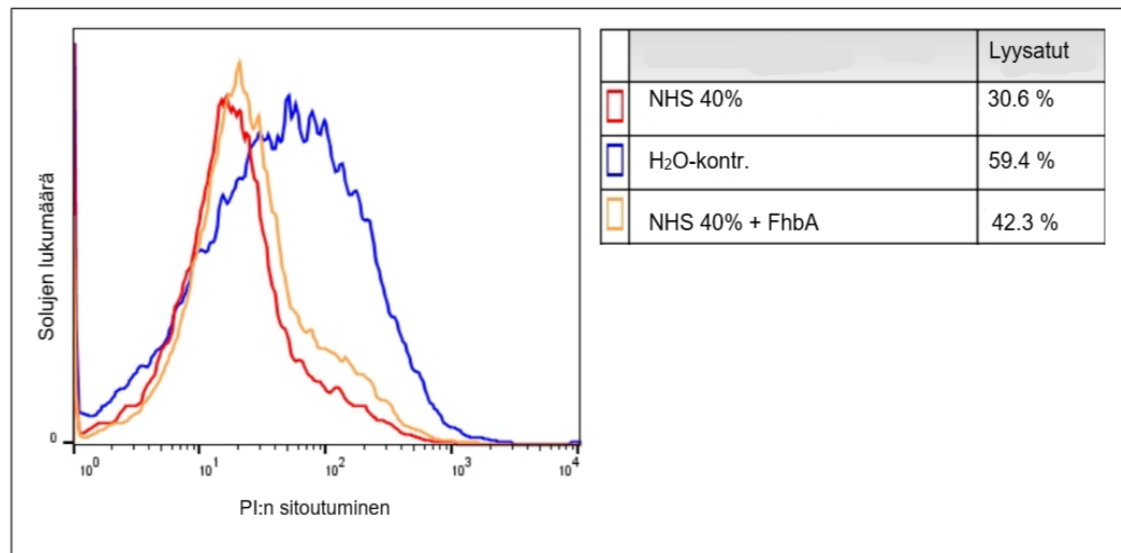
NHS näytteen kuvaaja on pienempi kuin vedessä ja FhbA-kuvaaja, mikä johtuu solujen laskennasta. Virtausytometri laski yksiköitä, eli bakteereita vähemmän kuin toivottiin, mutta tämä huomioitiin tulosten rajauksessa. Kuten ensimmäisessä ajossa, toisessa ajossa vesikontrolliin on sitoutunut eniten leimaa. FhbA-näytteessä bakteerien värjäyty-

neisyys on tälläkin kertaa suurempi kuin NHS-näytteessä, tällä kertaa leimattujen hajonneiden solujen lisääntyi 10,1%. Alla olevassa taulukossa 4 on esitetty testin 2 osalta vastaavat FlowJo -ohjelman laskemat arvot.

Taulukko 4. Testin 2 fluoresenssi, laskettujen bakteerien lukumäärä ja värjäytyneiden borrelioiden osuus (%).

	Fluoresenssi	Lukumäärä	Borrelia värjäytyneet (%)
Testi 2 NHS 40 %	6,39	3510	10,1
Testi 2 NHS 40% ja FhbA	12,5	20000	25,5
Testi 2 Vesikontrolli	56,1	20000	77,5

Toisessa testissä saatiin laskettua lukumääräisesti enemmän bakteereja kontrollinäytteessä ja FhbA:ta sisältävässä näytteessä. Sen sijaan NHS 40%:n näytteen bakteereja saatiin laskettua hieman vähemmän kuin testissä 1. Testissä 2 saatiin kuitenkin vastavia tuloksia kuin testissä 1 eli kontrollissa kuolleisuus on suurin ja FhbA-proteiinia sisältävässä näytteessä fluoresenssi ja värjäytyneiden borrelioiden määrä on suurempi kuin pelkkää NHS:ia sisältävässä näytteessä. Seuraava kuvaaja näyttää testin 3 tulokset (Kuvio 10).



Kuvio 10. *B. hermsii* 3. testi.

Myös testissä 3 vesikontrollin solujen värjäytyvyys on suurempi kuin kahdessa muussa. FhbA-näytteessä on myös korkeampi värjäytyminen kuin NHS-näytteessä, värjäytyvyys lisääntyi 11,7%. Taulukossa 5 on esitetty FlowJo -ohjelman laskemat tulokset.

Taulukko 5. Testin 3 fluoresenssi, laskettujen bakteerien lukumäärä ja värjäytyneiden borrelioiden osuus (%).

	Fluoresenssi	Lukumäärä	Borrelia värjäytyneet (%)
Testi 3 NHS 40%	36,2	20000	30,6
Testi 3 NHS 40% ja FhbA	45,3	20000	42,3
Testi 3 Vesikontrolli	91,1	20000	59,4

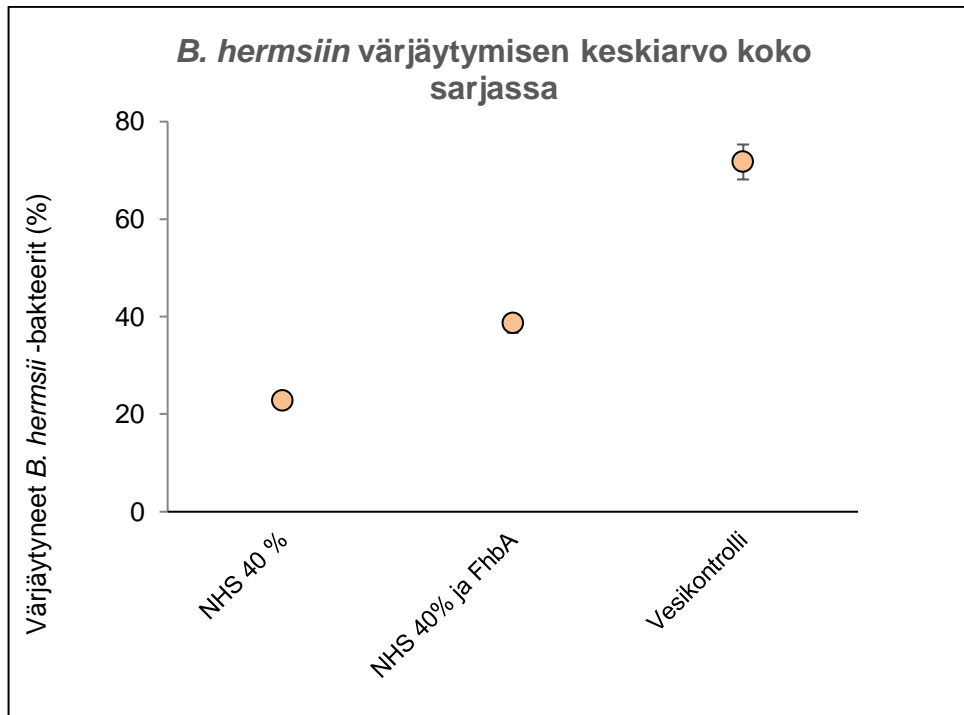
Testissä 3 kaikista näytteistä saatiin laskettua tavoitteelliset 20 000 kappaletta bakteereja. Kontrollissa bakteerien värjäytyneisyys on suurin eli kontrolli on onnistunut. Myös testissä 3 FhbA -proteiinia sisältävässä näytteessä sekä fluoresenssi että värjäytyneiden borrelioiden määrä on suurempi kuin pelkkää NHS:ia sisältävässä näytteessä.

Taulukossa 6 on esitetty testien värjäytyneiden borrelioiden (%) keskiarvo ja keskihajonta koko sarjassa. Testien hajoitettujen bakteerien (%) keskiarvo ilman FhbA -proteiinia oli 22,77 (keskihajonta = 9,04, n=3). Tämä oli pienempi kuin keskiarvo FhbA -proteiinia sisältävissä näytteissä 38,63 (keskihajonta = 9,58, n = 3). Riippuvien otosten t-testin perusteella ero ei ole merkitsevä:  $t(4) = 1,703$ ,  $p > 0,05$ , 2-suuntainen. Täytyy kuitenkin huomioida, että havaintoja on tässä tapauksessa vain kolme, mikä saattaa vaikuttaa t-testin luotettavuuteen. (Excel Easy; Leskinen 2019; Tilastokeskus).

Taulukko 6. Testien keskiarvot ja keskihajonnat

	Keskiarvo	Keskihajonta
Borrelia värjäytyneet (%) NHS 40 %	22,7	9,0
Borrelia värjäytyneet (%) NHS 40% ja FhbA	38,6	9,6
Borrelia värjäytyneet (%) Vesikontrolli	71,7	8,7

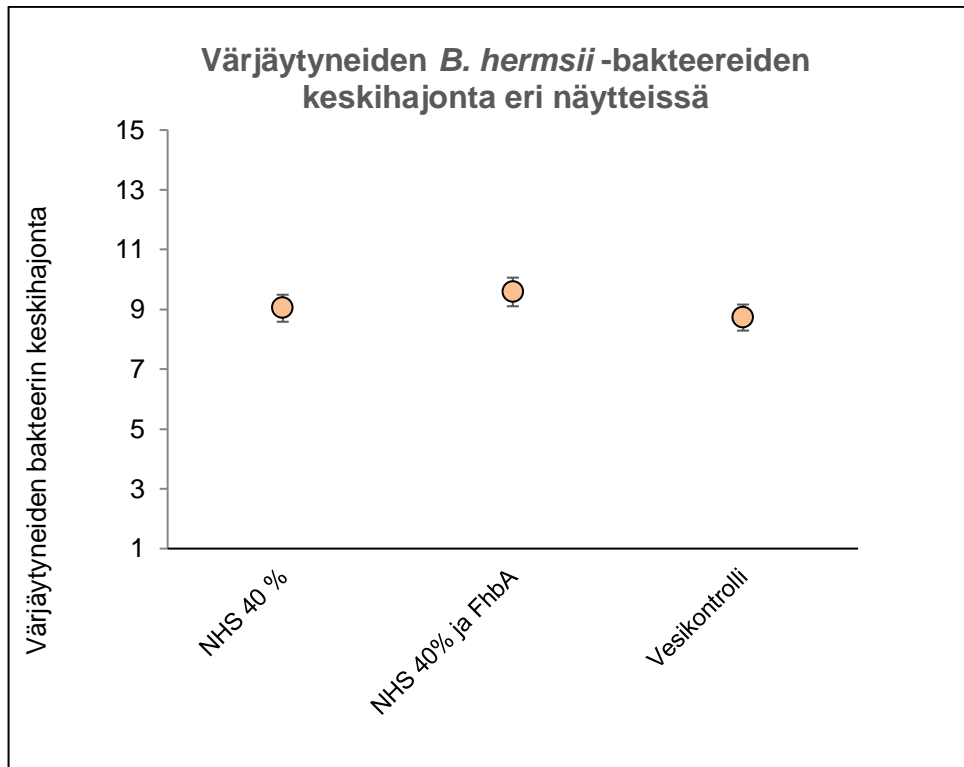
Kuvio 11 havainnollistaa *B. hermsiin* värjäytymistä koko sarjassa. Kuten kuviosta näkyy, vesikontrollissa värjäytyvyys on ollut korkein. Lisättäessä FhbA:ta bakteerien värjäytyvyys on noussut verrattuna näytteisiin, joissa on ollut pelkkää 40 %:sta seerumia.



Kuvio 11. *B. hermsiin* värjäytyminen keskiarvoina (%)

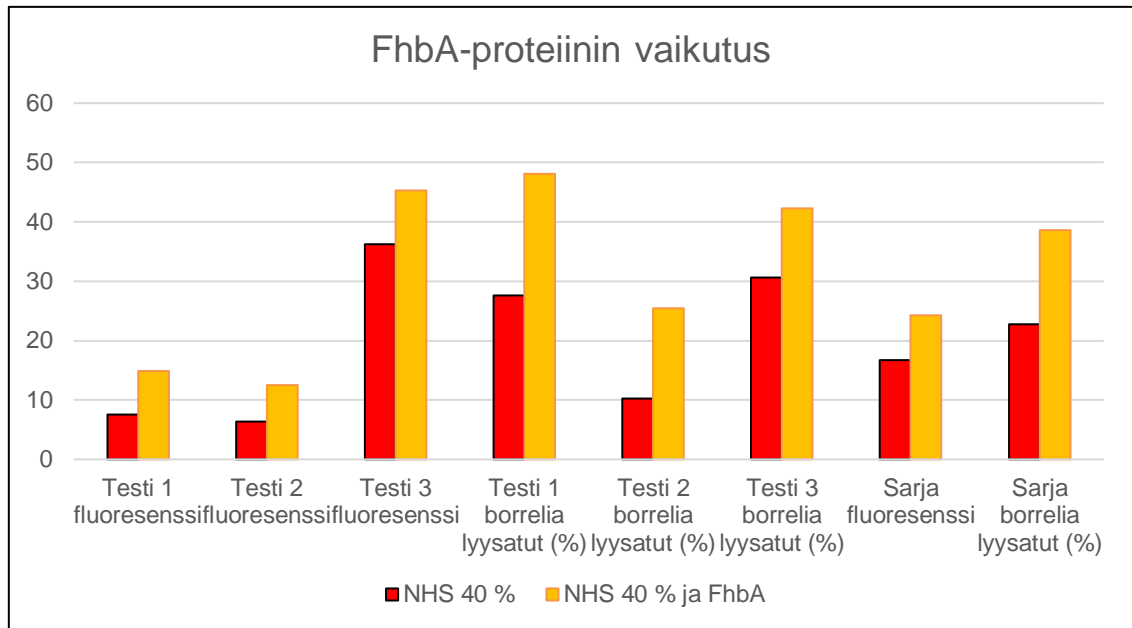
Kuvio 12 kuvaa havaintoarvojen sijoittumista jakauman keskiarvon ympärille koko näyttesarjassa. Kuten kuviosta näkyy, keskihajonta on ollut samaa tasoa kaikissa eri sarjanäytteissä.





Kuvio 12. Värjäytyneiden bakteerien keskihajonta

Taulukosta 6 nähdään, että NHS 40 %:n näytteissä värjäytyneiden borrelioiden keskiarvo oli 22,7 %. FhbA:ta sisältävien näytteiden keskiarvo oli 38,6 % joten FhbA:n lisäys nosti värjäytyneiden borrelioiden määrää 15,9 prosenttiyksikköä. Prosenteissa muutos on 7 %. Täytyy kuitenkin huomioida, että testeissä 1 ja 2 virtausytometri sai laskettua näytteen NHS 40 % bakteereja vähemmän verrattuna vastaavien testien FhbA:ta sisältäviin näytteisiin, mikä saattaa vaikuttaa tuloksiin. Keskihajonta vaihtelee näytteiden osalta välillä 8,7-9,6. Kontrollinäytteessä keskihajonta oli pienin ja toisaalta se oli ainoa näyte, jossa borrelia-bakteereita saatiin laskettua tavoitteellinen 20 000 kappaletta paitsi testissä 1 lukumäärä oli 19 977 kappaletta. Tämä määrä on joka tapauksessa erittäin lähellä tavoitemäärää. Taulukosta nähdään, että keskihajonnat eri näytesarjojen välillä ovat kuitenkin samansuuntaisia. Oheisessa kaaviossa esitetty testien eroja pylväsdiagrammina (kuvio 13).



Kuvio 13. FhbA-proteiinin vaikutus eri näytteissä.

## 6 Pohdinta

### 6.1 Optimointiosuus

Ajan puutteen vuoksi optimointiin käytettiin rajatusti erilaisia näytteitä. Tarkoituksena oli testata, että pystytäänkö spirokeetta-bakteereja ylipäänsä käyttämään virtausytometrisissä, missä onnistuimme. Optimoinnin tuloksia tarkasteltaessa päästiin tulokseen, että optimointi on onnistunut. Solut saatiin kuvaajaan näkyviin, vaikkakin laajemmalle levinneenä kuin *E. coli*n kohdalla. Tämä voidaan mahdollisesti selittää bakteerien aggregoitumisella tai poikkeavilla muodoilla. *E. coli*n muoto on huomattavasti yksinkertaisempi verrattuna *B. hermsii*n spirokeetta-muotoon. Toisaalta, vuonna 2015 julkaistussa tutkimusartikkelissa Meriläinen, Herranen, Schwarzbach ja Gilbert kirjoittivat havainnoistaan, joissa NHS vaikutti *Borrelia burgdorferi*-bakteeriin muuttaen sen morfologian pyöreäksi. Heidän tutkimuksessaan tosin *B. burgdorferi* altistettiin 10% NHS:lle jo mediassa ollessaan, ja morfologiamuutos tapahtui neljän päivän aikana. (Meriläinen – Herranen – Schwarzbach – Gilbert, 2015). Tässä opinnäytetyössä bakteerit olivat seerumille altistuneena maksimissaan vain kaksi tuntia, joten ne ovat mitä todennäköisimmin säilyttäneet spirokeetta-muotonsa. Mikäli muoto olisi muuttunut, olisi populaation muoto todennäköisesti muistuttanut enemmän *E. coli*-populaatiota.

### 6.1.1 Optimointiin vaikuttavat tekijät: bakteerit

Tutkimustyölle perinteiseen tapaan kaikki tulokset eivät luonnollisesti olleet johdonmukaisia. Tuloksiin vaikuttavia tekijöitä oli useita. Inhimilliset virheet kuuluvat aina käytännön työskentelyyn, kuten myös käytettävien välineiden ja reagenssien poikkeamat. Kuten jo mainittua, *Borrelia sp.*-bakteereja ei ainakaan toistaiseksi ole saatu kasvatettua kiinteällä kasvualustalla. Kasvatusmedia, jossa *B. hermsii* kasvatettiin, oli kaikki samaa kaupallista liuosta, mutta sen laadussa saattoi olla epätasalaatuisuutta. Mediaa oli pakastettu ja eri pakastusyksiköitä oli toisinaan säästösyistä sekoitettu keskenään. Se, ettei kaikki media todennäköisesti ollut tasalaatuista, on osaltaan voinut vaikuttaa *B. hermsii* kasvuun. Kasvu oli toisinaan hyvinkin hidasta; osassa kasvuista eläviä bakteereja saattoi havaita vasta yli viikon kuluttua viljelystä. Välillä bakteerit alkoivat myös kesken kasvun voida huonosti: kun *Borrelia sp.*-bakteerit alkavat voimaan huonosti, ne muodostavat kasoja eli ne aggregoituvat. Pyrimme välttämään tällaisten näytteiden käyttämistä. Tutkimuksen aikarajan vuoksi CyAn-ajaja tehtiin kuitenkin välillä kasvuista, joissa tällaisia aggregaatteja saattoi joissakin näkökentissä ilmetä. Epätasaisen kasvun ja aikarajan vuoksi bakteereja testattiin myös eri määrillä, 100-200 kpl/näkökenttä, mikä sekoi jo tuo epätasaisuutta tuloksiin. Tuloksiin valituilla kolmella tutkimuskerralla bakteerimäärät ovat olleet lähellä toisiaan, mikä lisää tulosten yhteneväisyyttä.

Bakteerien rakenteen kannalta oleellinen huomio on niiden plasmideissa. FhbA-pinta-proteiinia koodaava geeni sijaitsee lineaarisessa plasmidissa (Fine ym. 2014). On mahdollista, että bakteerissa ei ole plasmidia, eli ei myöskään kykyä tuottaa FhbA:ta, mikä taas olisi merkittävä asia sen komplementtiväistön tutkimisessa. Bakteerit eivät siis tarvitse plasmidia selvitäkseen, mutta se auttaa niitä pysymään elossa. (Science Learning Hub 2014). Asian tarkistamiseen tutkimuksen aikana ei kuitenkaan ollut riittävästi resursseja, joten tuloksia tarkasteltiin sillä oletuksella, että käytettävillä bakteereilla oli kyseinen geeni.

Bakteerien aggregoituminen (kuvio 6) vähentää rajattavien bakteerien määrää, mikä taas vaikuttaa tuloksiin. Parhaimmat ja luotettavimmat tulokset saataisiin, kun saadaan rajattua mahdollisimman tasainen populaatio. Sekä optimointi- että komplementtiväistötestissä huomioitiin aggregoituminen rajausta tehtäessä.

### 6.1.2 Optimointiin vaikuttavat tekijät: käytetyt reagenssit ja välineet

Valo voi heikentää fluoresenssileiman tehoa ja tämä huomioitiin tutkimuksessa suojaamalla leima, ja sitä sisältävät näytteet mahdollisimman hyvin. Mikäli merkkiaine on kuitenkin jossain vaiheessa altistunut liialle valolla, voi sen sitoutumiskyky olla heikentynyt, mikä mahdollisesti vaikuttaa tuloksiin. Testasimme tutkimuksen aikana leiman vaikutusta tuloksiin vaihtamalla merkkiaine-erää, mutta emme havainneet tällä olleen vaikutusta tuloksiin.

Seerumin sulatus mahdollisena virhelähteenä tarkistettiin konkreettisella testillä (kuvio 5) Yhdessä opinnäytetyön työelämäohjaajan kanssa tulimme tulokseen, ettei tämä ole merkittävää tutkimustulosten kannalta. Rinnakkaiskontrollit olivat johdonmukaiset, ja ero bakteerien hajoamisessa oli pieni.

Tulosten tarkastelussa tulee huomioida myös liukoisen rekombinantti FhbA:n käsittely. Näytteissä käytetty määrä oli pieni, alle 5 µl. Pienet pipetointimäärät voivat toisinaan olla hankalia pipetoitavia ja näin lisätä tulosten epätarkkuutta. Koska proteiinia oli käytettävissä rajoitettu määrä, sitä sulatettiin ja pakastettiin useamman kerran, mikä on mahdollisesti heikentänyt sen tehoa. Parhaimmat tutkimustulokset saatiin ensimmäisten laboraatioiden aikana, mikä tukee tätä päätelmää.

Tutkimuksessa käytettyyn seerumiin voi myös liittyä virhelähde. Seerumipoolimme vaihtui kesken tutkimuksen, koska alkuperäinen seerumi loppui. Tämä voi aiheuttaa sen, että uusi seerumipooli reagoi eri tavalla käyttämämme bakteerikannan kanssa. Seeruminäytteitä otettiin henkilöiltä, jotka eivät tietojensa mukaan olleet saaneet punkin puremaa tai heidän vasta-ainetasonsa borrelian suhteen oli aiemmin todettu. Tutkimuksen resurssit eivät kuitenkaan riittäneet seeruminäytteiden tarkempaan analysointiin. On siis mahdollista, että uuden seerumipoolin näytteissä oli borreliavasta-aineita tai komplementin toiminnassa oli eroja alkuperäiseen seerumipooliimme.

Testien väleillä virtaussytometria huuhdeltiin ja pestiin useita kertoja. Koska samaa virtaussytometrilaitetta käyttivät laboratorioissa useat eri henkilöt, on mahdollista, että eihaluuta tausta (kuvio 7) johtui laitteen huonosta yleisestä puhdistuksesta. Tämä taustamittaus on huomioitu tulosten rajauksessa.

Muita mahdollisia virhelähteitä olivat pipetointivirheet, pipettien toimintakunto (kalibrointi), liialliset pesut bakteereja käsiteltäessä (bakteerien pipetointi pois supernatantin mukana), ja virtausytometrin toiminta ja puhtaus. Mahdolliset kontaminaatiot bakteerien kasvatuksessa tai niiden käsittelyssä on saattanut aiheuttaa sen, että fluoresenssileima on kiinnittynyt muuhun DNA:n kuin nimenomaan *B. hermsiin* DNA:n.

## 6.2 Kilpailevan molekyylin vaikutus

Kaikki kolme testiä osoittivat FhbA-proteiinin merkityksellisyyden. Kaikissa testeissä proteiinin lisäys bakteeriseokseen lisäsi komplementtijärjestelmän tappokykyä verrattuna bakteeriseokseen, jossa oli pelkkä seerumi. Vaikka erot eivät olleet huomattavan suuria, eroja kuitenkin oli. Nämä havainnot tukevat suurinta osaa löytämistämme tutkimustuloksista, joissa painotettiin FhbA:n merkitystä bakteerin virulenssin kannalta. Toki poikkeavia johtopäätöksiä löytyy myös. Alla olevassa taulukossa on tehty yhteenveto tutkimustulosten arvoista ja prosentuaalisena muutoksena kuvattu FhbA:n vaikutusta näytteissä (taulukko 7).

Taulukko 7. FhbA:n vaikutus näytteissä. "Borrelia lyysatut" viittaa värjäytyneisiin soluihin.

	NHS 40 %, värjäytyneet solut	NHS 40 % ja FhbA, värjäytyneet solut	Muutos (%)
Testi 1 fluoresenssi	7,53	14,9	97,9
Testi 2 fluoresenssi	6,39	12,5	95,6
Testi 3 fluoresenssi	36,2	45,3	25,1
Testi 1 borrelia lyysatut (%)	27,6	48,1	74,3
Testi 2 borrelia lyysatut (%)	10,2	25,5	150,0
Testi 3 borrelia lyysatut (%)	30,6	42,3	38,2
Sarja fluoresenssi	16,71	24,23	45,0
Sarja borrelia lyysatut (%)	22,77	38,63	69,7

Testissä 1 ja testissä 2 prosentuaaliset muutokset ovat suurimpia. Täytyy kuitenkin huomioda, että näissä kahdessa testissä virtausytometri laski bakteereita lukumääräisesti

vähiten näiden testien NHS 40 % näytteissä kuten esitettiin aiemmin taulukoissa 3-5. Testissä 3 prosentuaaliset erot olivat pienemmät ja tässä testissä virtausytometri laski kaikista näytteistä partikkeleita täydet 20 000 kappaletta. Kun vertaillaan prosentuaalisia eroja koko sarjassa, FhbA:ta sisältävien näytteiden fluoresenssi nousi 45 % ja lyysattujen borrelioiden määrä 69,7 %.

Woodman ym. julkaisivat 2007 American Society for Microbiology Journalsin ylläpitämällä Infection and Immunity -sivustolla tutkimusraportin, jossa kyseenalaistettiin, onko *B. burgdorferi* -bakteerin kyky sitoa tekijä H:ta lainkaan tarpeellinen *in vivo*-tutkimuksissa. He testasivat *B. burgdorferin* infektiota kehitystä hiirillä, joilla tekijä H toimii puutteellisesti, tavallisilla hiirillä, sekä tekijä B- ja C3-puutteellisilla hiirillä eri komplementtijärjestelmien tutkimista varten. Tutkimuksen tulosten mukaan tekijä H ei olisi kriittinen ainakaan *B. burgdorferin* aiheuttamissa infektioissa. Tutkimuksessa huomattiin, että bakteeri infektoi ja selviää niin tekijä H-puutteellisten kuin normaalien hiirien kudoksissa samantasoisesti. (Woodman ym. 2007). Vuonna 2014 Fine ym. julkaisivat myös American Society for Microbiologyn ylläpitämällä Infection and Immunity -sivustolla tutkimusraportin tukien päätelmää, ettei FhbA ole merkittävä komplementtiväistössä. Heidän tutkimuksessaan käytettiin myös hiiriä, joihin inokuloitiin mutatoitunutta *B. hermsitiä*, josta oltiin poistettu FhbA-geeni. Bakteerien määrää tarkasteltiin laskemalla niitä suoraan verinäytteestä mikroskoopilla, ja tekijä H:n sitoutumista tarkasteltiin immunoblottaus- sekä IFA-menetelmällä (indirect fluorescent-antibody assay). He tulivat tulokseen, ettei FhbA-proteiini ole oleellinen oikotien aktivaation väistämisen suhteen. (Fine ym. 2014). Molemmat tutkimukset käyttivät hiiriä, eikä kummankaan tutkimuksen menetelmänä ollut virtausytometriä.

Opinnäytetyössä tulleita tutkimustuloksia puoltavia tutkimuksia tekijä H:n sitomisen merkityksestä *Borrelia sp.*-bakteerin selviämiseksi on useampia. Kuten jo aiemmin tekstissä mainittiin, Meri ym. (2006), Grosskinsky ym. (2006) ja Röttgerding ym. (2017) totesivat tutkimuksissaan tekijä H:n olevan tärkeässä roolissa komplementtijärjestelmän väistössä, ja Hovis ym. (2006) totesi tämän ominaisuuden olevan laajalle levinnyt. Näistä tutkimustuloksista sekä opinnäytetyön tuloksista voidaan päätellä, että tekijä H:n sitominen on *Borrelia sp.*-bakteereille merkityksellinen. Opinnäytetyön tulosten perusteella FhbA-pintaproteiini on ainakin *B. hermsiin* kohdalla oleellinen tekijä bakteerin selviytymisessä, vaikka monissa tutkimustuloksissa painotetaan muitakin tekijöitä. Selvää kuitenkin on, että tekijä H:n sitominen ja sitä kautta oikotien aktivaation estäminen on merkittävässä roolissa *Borrelia sp.*-bakteerien selviämisessä.

### 6.3 Johtopäätökset ja kehittämisehdotukset

Opinnäytetyön tarkoituksena oli optimoida *E. coli*- ja *B. hermsii*-bakteereita käyttämällä menetelmä, jolla *Borrelia sp.*-bakteereita voidaan laskea virtausytometrilla. Tämän jälkeen testattiin optimoidulla menetelmällä *B. hermsii*-bakteerin komplementinväistökykyä ja kilpailevan molekyylin vaikutusta bakteerin selviytymiseen. Optimointiosuus onnistui siinä mielessä, että bakteereja saatiin onnistuneesti laskettua. Kilpailevan molekyylin vaikutus bakteerin selviytymiseen oli myös opinnäytetyössä tehtyjen testitulosten perusteella selkeä: tekijä H:n sitominen on oleellista bakteerin selviytymiselle.

Jatkotutkimusta ajatellen olisi aiheellista sulkea pois tässä työssä havaittuja mahdollisia virhelähteitä, joita kävimme läpi kappaleessa 6.1.1. Näitä olivat esimerkiksi kasvatusmedian epätasalaatuisuus ja seerumipoolin vaihtuminen kesken tutkimuksen. Rajatun aikataulun takia optimoinnissa testattiin melko suppeasti erilaisia konsentraatioita sekä liuosvaihtoehtoja. *E. coli*n kohdalla tulokset olivat huomattavasti selkeämmät kuin *B. hermsiin* kohdalla. Useammat toistot sekä konsentraatioiden hienosäädöt voisivat mahdollistaa selkeämmät tulokset. Vaikka komplementtiväistötulokset olivat kaikki johdonmukaisia, vaatii kyseinen testi lisää toistoa. Mitä enemmän näitä yhdenmukaisia testituloksia on, sitä luotettavampia tulokset ovat.

Mikrobikannoissa on eroja, jotka vaikuttavat muun muassa niiden taudinaiheuttamiskykyyn (Truong – Tett – Pasolli – Huttenhower – Segata 2017.) Tämän vuoksi voisi olla aiheellista testata optimointimenetelmää eri bakteerikannoilla. Helsingin Yliopistolla on myös *Borrelia garinii*-kanta, jota yritimme kasvattaa, mutta emme onnistuneet saamaan kannasta tarpeeksi bakteerikasvua, jotta sitä olisi voinut hyödyntää tutkimuksessa. *B. garinii* on seerumille herkkä borreliakanta, joka aiheuttaa Lymen tautia (Kraiczky – Skerka – Kirschfink – Brade – Zipfel 2001).

Kuten totesimme kappaleessa 6.1.1, bakteereissa ei välttämättä ole FhbA -proteiinia tuottavaa plasmidia. Tämä bakteerin rakenteellinen ominaisuus on tutkimuksen kannalta hyvin oleellinen, joten mahdollisessa jatkotutkimuksessa voitaisiin selvittää sekvensoimalla plasmidin olemassaolo bakteerissa ennen kyseisen kannan käyttämistä (Casjens ym. 2018.)

## 6.4 Tulosten hyödyntäminen

Kaikki opinnäytetyössä saadut tutkimustulokset, niin menetelmän optimoinnin kuin FhbA-pintaproteiinin merkityksellisyyden osalta luovutettiin dosenttien Karita Haapasalo ja Taru Meren tutkimusryhmien käyttöön. Optimoitu virtaussytometrinen menetelmä mahdollistaa suuren bakteerimäärän laskemisen nopeasti, mikä helpottaa ja nopeuttaa tutkimustyötä. Jatkotutkimusten myötä virtaussytometria voitaisiin teoriassa käyttää myös bakteerien analysointiin niiden laskemisen lisäksi. Tieto FhbA-pintaproteiinin merkityksellisyydestä *Borrelia sp.* -bakteerin selviämiseksi tuo lisätietoa mikrobiologian tutkimukseen koskien borreliabakteerien virulenssia. Tietoa voi mahdollisesti hyödyntää myös muiden bakteerien kohdalla, joilla on vastaavia pintaproteiineihin perustuvia puolustuskeinoja.

## 6.5 Luotettavuus ja eettisyys

Opinnäytetyö on toteutettu noudattaen hyvän tieteellisen käytännön periaatteita. Noudatamme sekä Helsingin yliopiston että Metropolia Ammattikorkeakoulun ohjeita sovitusta toimintatavoista, tulosten tallentamisesta ja esittämisestä ja opinnäytetyön tulosten arvioinnista. Tutkimustulokset julkaistaan avoimesti ja vastuullisesti Helsingin yliopiston kanssa sovitulla tavalla. Metropolia Ammattikorkeakoulu ja Helsingin yliopisto tekivät kirjallisen sopimuksen tulosten julkaisemistavasta. Opinnäytetyö julkaistiin Theseus -tietokannassa vasta, kun Helsingin yliopisto on itse julkaissut artikkelin, johon opinnäytetyön tilastollisia tuloksia käytetään. Opinnäytetyöhön ei saatu ulkopuolista rahoitusta. Tutkimuksissa käytetty seerumi on saatu vapaaehtoisilta Helsingin yliopiston henkilökuntaan kuuluvilta luovuttajilta, joilta on saatu allekirjoitetut suostumukset näytteiden tutkimuskäyttöön HUS:n eettisellä luvalla. Näytteitä ei merkattu luovuttajien nimillä, joten heitä ei pystytä jäljittämään. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta).

Pyrimme keräämään opinnäytetyömme pohjaksi mahdollisimman laajasti kirjallisuuslähteitä. Pyrimme valitsemaan mahdollisimman tuoreita julkaisuja. Painotus oli julkaisuissa, jotka olivat ilmestyneet viimeisen viiden vuoden sisällä. Mikäli emme löytäneet johonkin aiheeseen liittyen näin tuoreita julkaisuja, laajensimme aikaikkunaa viimeiseen kymmeneen vuoteen. Joissakin tapauksissa jouduimme käyttämään myös tätä vanhempia lähteitä, mutta tällöin pohdimme aina aihepiirin mukaan, kuinka vanhaa kirjallisuutta pystyimme vielä käyttämään luotettavasti. Esimerkiksi virtaussytometrin periaatteet eivät ole



muuttuneet viime vuosikymmenien aikana, joten tässä tapauksessa vanhempienkin julkaisujen käyttäminen on mahdollista.

Helsingin yliopistolla on vaatimus, että kaikista tutkimuksen laboratoriotöistä pidetään laboratoriopäiväkirjaa laadun varmistamiseksi. Kirjasimme päiväkohtaisesti mahdollisimman tarkasti ylös työvaiheet, käytetyt reagenssit, ajetut näytteet ja työskentelyn aikana havaitut virheet. Työelämäohjaajamme kävi läpi laboratoriopäiväkirjaamme. Opinnäytetyössä on myös hyödynnetty laboratoriopäiväkirjaa taustatietona erityisesti tulosten raportoinnissa.

Käyttämämme lähteet on merkitty asianmukaisella tavalla käyttäen Metropolia Ammattikorkeakoulun kirjallisen työn ohjetta. Opinnäytetyö on ajettu Turnitin -automaattisen plagioinnintarkistustietokannan läpi. Opinnäytetyöhön kuului suunnitelmaosio, joka esitettiin muille bioanalytiikan opiskelijoille erillisessä seminaarissa. Muilla opiskelijoilla ja opettajilla oli tällöin mahdollisuus kommentoida ja opponoida työtä, minkä perusteella teimme ehdotettuja muutoksia opinnäytetyöhön. Muut opiskelijat oppoivat opinnäytetyötä myös suunnitelmavaiheen jälkeen. Opinnäytetyön suunnitelma hyväksyttiin Metropolian puolelta ennen kuin aloitimme opinnäytetyöhön kuuluvien laboratorioskokeiden tekemisen. Pidimme läpi opinnäytetyöprosessin palaveria ohjaavan opettajan kanssa, joka antoi palautetta työstä. Lisäksi osallistuimme Metropolia Ammattikorkeakoulun järjestämiin työpajoihin, joissa annettiin ohjausta liittyen opinnäytetyön vaiheisiin ja käytettäviin työkaluihin. Työpajoihin oli pakollinen määrä osallistumisia ja ne raportoitiin ohjaavalle opettajalle.

## 6.6 Ammatillinen kasvu

Opinnäytetyömme ansiosta pääsimme työskentelemään Helsingin yliopiston tutkimuslaboratoriossa, mikä antoi meille mahdollisuuden vertailla keskenään kahta eri työskentely-ympäristöä; yliopiston tutkimuslaboratoriota ja sairaalan kliinistä laboratoriota. Tämä itsessään oli erittäin hyödyllistä ammatillisen kokemuksen laajentamiseksi, sillä opintojemme aikana kaikki pakolliset työharjoittelut tehdään kliinisissä laboratorioissa. Tutkimuksen ansiosta pääsimme perehtymään analyysimenetelmien kehittämiseen ja tämän myötä hahmotimme selkeämmin tutkimus- ja kehitystyön eri vaiheet. Tutkimusmenetelmän kehitys haastoi meitä myös pohtimaan eri työvaiheiden merkitystä ja teoriaa niiden takana. Jokaisen laboraation lopuksi tulosten analysointi ja sen pohjalta jatkotoimenpi-

teiden pohtiminen kehitti tapaamme käsitellä tietoa ja teorianäytämystämme menetelmään liittyen. Opimme myös tarkastelemaan tuloksia kriittisesti ja arvioimaan mahdollisia virhelähteitä. Opinnäytetyön kirjoittamisen osalta kehityimme tieteellisen tekstin tuottamisessa ja tieteellisten artikkeleiden lukemisessa. Teorianäytämämme aihepiiristä kasvoi käydessämme läpi laajasti aiheeseen liittyviä julkaisuja ja opimme samalla karsimaan pois lähteitä, jotka olivat joko epäolennaisia tai muuten sopimattomia lähteiksi.

## Lähteet

BD Biosciences 2018. BD Acuri News. Verkkojulkaisu. <<https://www.bdbiosciences.com/eu/instruments/s/aneews1802>>. Luettu 23.2.2020.

Bio&SELL GmbH 2019. BSK-H Medium for the cultivation of *Borrelia spec.* Tuote-esitely. <<https://www.bio-sell.de/en/cell-culture/special-media/bsk-h-medium-for-the-cultivation-of-borrelia-spec.html>>. Luettu 12.9.2019.

British Society for Cell Biology 2019. Water and Cells. Verkkojulkaisu. <<https://bscb.org/learning-resources/softcell-e-learning/water-and-cells/>>. Luettu 30.12.2019.

Casjens, Sherwood R. – Di, Lia – Akther, Saymon – Mongodin, Emmanuel F. – Luft, Benjamin J. – Schutzer, Steven E. – Fraser, Claire M. – Qiu, Wei-Gang 2018. Primordial origin and diversification of plasmids in Lyme disease agent bacteria. *BMC Genomics* 19. 218 (2018). Epub 2018 Mar 27. Verkkodokumentti. <<https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-018-4597-x>>. Luettu 1.3.2020.

Cedzynski, Maciej – Swierzko, Anna St. – Kilpatrick, David C. 2012. Factors of the lectin pathway of complement activation and their clinical associations in neonates. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012:363246. Epub 2020 Mar 22. Verkkodokumentti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22619494>>. Luettu 31.8.2019.

Chang, Yunjie – Moon, Ki Hwan – Zhao Xiaowei – Norris, Steven J. – Motaleb, MD A. – Liu, Jun. 17.7.2019. Structural insights into flagellar stator-rotor interactions. *eLife*. 2019; 8: e48979. Epub 2019 Jul 17. Verkkodokumentti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6663468/>>. Luettu 24.11.2019.

Charon, Nyles W. – Cockburn, Andrew – Li, Chunhao – Liu, Jun – Miller, Kelly A. – Miller, Michael R. – Motaleb, Md. – Wolgemuth, Charles W. 12.9.2013. The unique paradigm of spirochete motility and chemotaxis. *Annual Review of microbiology*. 2012; 66: 349–370. Epub 2013 Sep 12. Verkkodokumentti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3771095/>>. Luettu 25.11.2019.

Chen, Becky Biqi – Prasad, Chitra – Walsh, Joanna C. – Ashok, Dhandapani 2017. Eight-year-old girl with hepatomegaly. *Paediatr Child Health*. 2017 Jun; 22(3): 115–116. Epub 2017 May 8. Verkkodokumentti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5804887/>>. Luettu 20.9.2019.

Cruse, Julius M. – Lewis, Robert E. 2010. *Atlas of Immunology*. Third Edition. Taylor and Francis Group. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <<https://books.google.fi/books?id=kNI5Lk2z37sC&pg=PA25&dq=hans+buchner+komplement&hl=fi&sa=X&ved=0ahUKEwj41Y-I3OvkAhUGxYsKHau-XAYgQ6AEIMDAB#v=onepage&q=hans%20buchner%20komplement&f=false>>. Luettu 25.9.2019.

Excel Easy. t-Test. Verkkojulkaisu. <<https://www.excel-easy.com/examples/t-test.html>>. Luettu 21.3.2020.

Ferreira, Viviana P. – Pangburn, Michael K. – Cortés, Claudio 2011. Complement control protein factor H: the good, the bad, and the inadequate. *Molecular Immunology*. 2010 Aug; 47 (13): 2187–2197. Epub 2011 Aug 1. Verkkodokumentti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2921957/>>. Luettu 2.9.2019.

Fine, Lindy M. – Miller, Daniel P. – Mallory, Katherine L. – Tegels, Brittney K. – Earnhart, Christopher G. – Macroni, Richard T. 2014. The *Borrelia hermsii* Factor H Binding protein FhbA Is Not Required for Infectivity in Mice or for Resistance to Human Complement *In Vitro*. *Infection and Immunity*. 2014 Aug; 82 (8): 3324–3332. Verkkodokumentti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4136202/>>. Luettu 23.2.2020.

Finnegan, Simon – Percival, Steven L. 2015. EDTA: An Antimicrobial and Antibiofilm Agent for Use in Wound Care. *Advances in Wound Care*. 2015 Jul 1M 4 (7): 415–421. Verkkodokumentti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4486448/>>. Luettu 23.2.2020.

FlowJo 2017. Calculating the Number of Molecules on Cells Using FlowJo v10. Becton, Dickinson and Company. Verkkodokumentti. <<https://www.flowjo.com/blog/post/calculating-number-molecules-cells-using-flowjo-v10>>. Luettu 29.2.2020.

FlowJo 2019. Forward Scatter vs. Side Scatter. Becton, Dickinson and Company. Verkkodokumentti. <<https://www.flowjo.com/learn/flowjo-university/flowjo/getting-started-with-flowjo/58>>. Luettu 23.2.2020.

Gordon, Siamon 2008. Elie Metchnikoff: Father of natural immunity. *European Journal of Immunology*. Verkkodokumentti. <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/eji.200838855>>. Luettu 30.08.2019.

Grosskinsky, Sonja – Schott, Melanie – Brenner, Christiane – Cutler, Sally J. – Kraiczy, Peter – Zipfel, Peter F. – Simon, Markus M. – Wallich, Reinhard 2009. *Borrelia recurrentis* Employs a Novel Multifunctional Surface Protein with Anti-Complement, Anti-Opsin and Invasive Potential to Escape Innate Immunity. *PLoS One*. 2009; 4 (3): e4858. Epub 2009 Mar 24. Verkkodokumentti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2654920/>>. Luettu 25.3.2020.

Haapasalo-Tuomainen, Karita 2012. Role of the soluble complement regulator factor H in microbial survival and host infection susceptibility. University of Helsinki.

Hajishengallis, George – Reis, Edimara S. – Mastellos, Dimitrios C. – Ricklin, Daniel – Lambris, John D. 2017. Novel mechanisms and functions of complement. *Nature Immunology* 2017 18 (12). 1288–1298. Verkkodokumentti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29144501>>. Luettu 31.8.2019.

Hammerschmidt, Claudia – Klevenhaus, Yvonne – Koenigs, Arno – Hallsrtöm, Teresia – Fingerle, Volker – Skerka, Christine – Pos, Klaas Martinus – Zipfel, Peter F. – Wallich, Reinhard – Kraiczy, Peter. 5.10.2015. BGA66 and BGA71 facilitate complement resistance of *Borrelia bavariensis* by inhibiting assembly of the membrane attack complex. *Molecular Microbiology*, volume 99, issue 2. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/mmi.13239>>. Luettu 24.11.2019.

Hovis, Kelley M. – Chriefer, Martin E. – Bahlani, Sonia – Macroni, Richard T. 2006. Immunological and Molecular Analyses of the *Borrelia hermsii* Factor H and Factor H-Like Protein 1 Binding Protein, FhbA: Demonstration of Its Utility as Diagnostic Marker and Epidemiological Tool for Tick-Borne Relapsing Fever. *Infection and Immunity*. 2006 Aug; 74 (8): 4519–4529. Verkkodokumentti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1539583/>>. Luettu 24.3.2020.

Huupponen, Risto – Vaara, Martti – Khawaja, Tamim – Kantele, Anu 2018. Beetalaktaamiantibiootit. Teoksessa Ruskoaho, Heikki – Hakkola, Jukka – Huupponen, Risto – Kantele, Anu – Korpi, Esa R. – Moilanen, Eeva – Piepponen, Petteri – Savontaus, Eriika – Tenhunen, Olli – Vähäkangas, Kirsi (toim.). 2018. *Lääketieteellinen farmakologia ja toksikologia*. Kustannus Oy Duodecim. Luettu 21.9.2019.

Hytönen, Jukka – Khawaja, Tamim – Grönroos, Juha O. – Jalava, Anna – Meri, Seppo -Oksi, Jarmo 2016. Toisintokuume: Infektio, joka tulee huomioida maahantulijan kuumetaudin diagnostiikassa. *Duodecim* 132 (21). 1952–1956. Luettu 7.9.2019.

Hänninen, Anu 2011. Akuutin tulehdusreaktion immunologinen säätely. Aikakausikirja *Duodecim*. 2011; 127 (16): 1679–87. Verkkodokumentti. <<https://www.duodecim-lehti.fi/lehti/2011/16/duo99721>>. Luettu 22.9.2019.

Idalia, Vargas-Maya Naurú – Bernardo, Franco 2017. *Escherichia coli* as a Model Organism and Its Application in Biotechnology. *Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications*. Epub 2017 Jul 12. Verkkodokumentti. <<https://www.intechopen.com/books/-i-escherichia-coli-i-recent-advances-on-physiology-pathogenesis-and-biotechnological-applications/-i-escherichia-coli-i-as-a-model-organism-and-its-application-in-biotechnology>>. Luettu 30.12.2019.

Jarva, Hanna – Meri, Seppo 2000. Kliinisesti merkittävät komplementtipuutokset. *Duodecim* 2000 116. 1367–1374. Verkkodokumentti. <<https://www.duodecim-lehti.fi/lehti/2000/13/duo91609>>. Luettu 15.9.2019.

Johnson, Tammi L. – Fischer, Robert J. – Raffel, Sandra J. – Schwan, Tom G. Julkaistu verkossa 20.11.2016. Host associations and genomic diversity of *Borrelia hermsii* in an endemic focus of tick-borne relapsing fever in western North America. *Parasites & Vectors*. 2016; 9: 575. Epub 2016 Nov 10. Verkkodokumentti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5105259/>>. Luettu 12.9.2019.

Kaaja, Risto – Kauppila, Marjut 2015. Suurentunut perna (splenomegalia). Teoksessa Porkka, Kimmo – Lassila, Riitta – Remes, Kari – Savolainen, Eeva-Riitta (toim.). 2015. *Veritaudit*. Kustannus Oy Duodecim. Luettu 22.9.2019.

Kraiczy, Peter – Skerka, Christine – Kirschfink, Michael – Brade, Volker – Zipfel, Peter F. 2001. Immune evasion of *Borrelia burgdorferi* by acquisition of human complement regulators FHL-1/reconectin and Factor H. *European Journal of Immunology*. 2001. 31: 1674–1684. Verkkodokumentti. <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/1521-4141%28200106%2931%3A6%3C1674%3A%3AAID-IMMU1674%3E3.0.CO%3B2-2>>. Luettu 1.3.2020.

Kere, Juha – Knuutila, Sakari 2016. Geenin käsite. Teoksessa Aittomäki, Kristiina – Moilanen, Jukka – Perola, Markus (toim.). 2016. Lääketieteellinen genetiikka. Kustannus Oy Duodecim. Luettu 19.9.2019.

Laskowski, Jennifer – Thurman, Joshua M. 2018. Chapter14 – Factor B. The Complement FactsBook. Verkkodokumentti. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128104200000146>> Luettu 22.9.2019.

Leskinen, Päivi. 2019. Tilastollinen testaaminen. Opetusmateriaali. Metropolia Ammattikorkeakoulu.

Liu, Yu – Endo, Yuichi – Iwaki, Daisuke – Nakata, Munehiro – Matsushita, Misao – Wada, Ikuo – Inoue, Keiichi – Munakata, Mitsuru – Fujita, Teizo 2005. Human M-ficolin is a secretory protein that activate the lectin complement pathway. The Journal of Immunology. 2005; 175: 3150–3156. Verkkodokumentti. <<https://www.jimmunol.org/content/jimmunol/175/5/3150.full.pdf>>. Luettu 19.9.2019.

Lubbers, R – van Essen, M. F. – van Kooten, C. – Trouw, L. A. 2017. Production of complement components by cells of the immune system. Clinical and Experimental Immunology 2017 188 (2). 183–194. Verkkodokumentti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28249350>>. Luettu 1.9.2019.

Mafi, Neema – Yaglom, Hayley D. – Levy, Graig – Taylor, Anissa – O’Grady, Catherine – Venkat, Heather – Komatsu, Kenneth K. – Roller, Brentin – Seville, Maria T. – Kusne, Shimon – Po, John Leander – Thorn, Shannon – Ampel, Neil M. Tick-Borne Relapsin Fever in the White Mountains, Arizona, USA, 2013-2018. 2019. Emerging Infectious Diseases. 2019 Apr; 25 (4): 649–653. Verkkodokumentti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6433026/>>. Luettu 24.11.2019.

Meri, Taru 2019. Molekulaaristen ja integratiivisten biotieteiden tutkija. Helsingin yliopisto, molekulaaristen ja integratiivisten biotieteiden tutkimusohjelma. Helsinki. Haastattelu 14.11.2019.

Meri, T – Cutler, S. J. – Blom, A. M. – Meri, S. – Jokiranta, T. S. 2006. Relapsing fever Spirochetes *Borrelia recurrentis* and *B. duttonii* Acquire Complement Regulators C4b-Binding Protein and Factor H. Infection and Immunity. 2006 Jul; 74 (7): 4157–4163. Verkkodokumentti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1489703/>>. Luettu 24.3.2020.

Meri, Seppo 2011. Aktivaatiotiet. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.). 2011. Immunologia. Kustannus Oy Duodecim. Luettu 21.9.2019.

Meriläinen, Leena – Herranen, Anni – Dchwarzbach, Armin – Gilbert, Leona. 2015. Morphological and biochemical features of *Borrelia burgdorferi* pleomorphic forms. Microbiology. 2015 Mar; 161 (Pt 3): 516–527. Verkkodokumentti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4339653/?report=classic>>. Luettu 23.2.2020.

- Merle, Nicolas S. – Remi, Noe – Halbwachs-Mecarelli, Lise – Fremeaux-Bacchi, Veronique – Roumenina, Lubka T. 2015. Complement system part II – role in immunity. *Frontiers in Immunology*. 2015; 6: 257. Epub 2015 May 26. Verkkodokumentti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4443744/>>. Luettu 31.8.2019.
- Merle, Nicolas S. – Church, Sarah Elizabeth – Fremeaux-Bacchi, Veronique – Roumenina, Lubka T. 2015. Complement system part I – molecular mechanisms of activation and regulation. *Frontiers in Immunology*. 2015 Jun 2; 6: 262. Verkkodokumentti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26082779>>. Luettu 1.9.2019.
- Miajlovic, Helen – Smith, Stephen G. 2014. Bacterial self-defence: how *Escherichia coli* evades serum killing. *FEMS Microbiology Letters*. 354 (1). Mat 2014: 1–9. Oxford Academic. <<https://academic.oup.com/femsle/article/354/1/1/527901>>. Luettu 30.12.2019.
- Motaleb, Mohammed Abdul – Corum, Linda – Bono, James L. – Elias, Abdallah F. – Rosa, Patricia – Samuels, D. Scott – Charon, Nyles W. 26.9.200. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2000 Sep 26; 97 (20): 10899–10904. Verkkodokumentti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC27121/>>. Luettu 24.11.2019.
- Mutanen, Merja – Voutilainen, Eeva 2012. Hiilihydraatit ja ravintokuitu. Teoksessa Aro, Antti – Mutanen, Marja – Uusitupa, Matti (toim.). 2014. Ravitsemustiede. Kustannus Oy Duodecim. Luettu 22.9.2019.
- Nesargikar – Spiller – Chavez. 13.6.2012. The complement system: history, pathways, cascade and inhibitors. *European Journal of Microbiology & Immunology*. 2012 Jun; 2 (2): 103–11. Epub 2012 Jun 13. Verkkodokumentti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3956958/>>. Luettu 30.08.2019.
- Oksi, Jarmo – Seppälä, Ilkka J.T. – Hytönen, Jukka 1.1.2010a. Borreliat, treponeemat ja leptospirat. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.). 2010. *Mikrobiologia*. Kustannus Oy Duodecim. Luettu 7.9.2019.
- Oksi, Jarmo – Seppälä, Ilkka J.T. – Hytönen, Jukka 1.1.2010b. Toisintokuume. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.). 2010. *Mikrobiologia*. Kustannus Oy Duodecim. Luettu 7.9.2019.
- Ormerod, Michael G. 2000. Flow cytometry. Kolmas painos. Oxford University Press.
- Pathak, Sulabha – Palan, Urmi 2012. Immunology, Essential & fundamental. Kolmas painos. Capital Publishing Company.
- Raffel, Sandra J. – Williamson, Brandi N. – Schwam, Tom G. – Gherardini, Frank C. 2018. Colony Formation in Solid Medium by the Relapsing Fever Spirochetes *Borrelia hermsii* and *Borrelia turicatae*. Ticks and tick-borne diseases. 2018 Feb; 9 (2): 281–287. Epub 2017 Nov 12. Verkkodokumentti. <[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5803322/#\\_\\_ffn\\_sectitle](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5803322/#__ffn_sectitle)>. Luettu 19.2.2020.

Reid, Kenneth B.M. 2018. Complement component C1q: historical perspective of a functionally versatile, and structurally unusual, serum protein. *Frontiers in Immunology* 2018 (9). Article 764. Verkkodokumentti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pub-med/29692784>>. Luettu 1.9.2019.

Röttgerding, Florian – Wagemakers, Alex – Koetsveld, Joris – Fingerle, Volker – Kirschfink, Michael – Hovius, Joppe W. – Zipfel, Peter F. – Wallich, Reinhard – Kraiczy, Peter 2017. Immune evasion of *Borrelia miyamotoi*: CbiA, a novel outer surface protein exhibiting complement binding and inactivating properties. *Scientific Reports*. 2017; 7: 303. Epub 2017 Mar 22. Verkkodokumentti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5428533/>>. Luettu 25.3.2020.

Santos, A.F.S. – da Silva, M.D.C. – Napoleão, T.H. – Paiva, P.M.G. – Correia, M.T.S. – Coelho, L.C.B.B. 2014. Lectins: function, structure, biological properties and potential applications. *Current Topics in Peptide & Protein Research*. Vol. 15, 2014. Verkkodokumentti. <<https://core.ac.uk/download/pdf/76177195.pdf>>. Luettu 22.9.2019.

Science Learning Hub 2014. Bacterial DNA – the role of plasmids. Verkkosivusto. <<https://www.sciencelearn.org.nz/resources/1900-bacterial-dna-the-role-of-plasmids>>. Luettu 23.3.2020.

Siitonen, Anja – Vaara, Martti 2010. *Escherichia coli*. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.). 2010. *Mikrobiologia*. Kustannus Oy Duodecim. Luettu 30.12.2019.

Siitonen, Sanna – Penttilä, Tarja-Leena 2015. Virtausytometriian periaate. Teoksessa Porkka, Kimmo – Lassila, Riitta – Remes, Kari – Savolainen, Eeva-Riitta (toim.). 2015. *Veritaudit*. Kustannus Oy Duodecim. Luettu 6.9.2019.

Solunetti 2006a. Vasta-aineet. Verkkosivusto. <<http://www.solunetti.fi/fi/histologia/vasta-aineet/3/>>. Luettu 20.9.2019.

Solunetti 2006b. Väliaineen hajotus. Verkkosivusto. <[http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/soluvaliaineen\\_hajotus/](http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/soluvaliaineen_hajotus/)>. Luettu 22.9.2019.

Solunetti 2006c. Entsyymit. Verkkosivusto. <<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/entsyymit1/3/>>. Luettu 22.9.2019.

Stone, Brandee L. – Brissette, Catherine A. 12.8.2017. Julkaistu verkossa 19.1.2019. Host Immune Evasion by Lyme and Relapsing Fever *Borreliae*: Findings to Lead Future Studies for *Borrelia miyamotoi*. *Frontiers in Immunology*. 2017; 8: 12. Epub 2017 Jan 19. Verkkodokumentti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5243832/>>. Luettu 8.9.2019.

Teixeira, R.C. – Baêta, B.A. – Ferreira, J.S. – Medeiros, R.C. – Maya-Monteiro, C.M. – Lara, F.A. – Bell-Sakyi, L. – Fonseca, A.H. 2016. Fluorescent membrane markers elucidate the association of *Borrelia burgdorferi* with tick cell lines. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2016; 49 (7): e5211. Epub 2016 Jun 20. Verkkodokumentti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4918789/>>. Luettu 4.12.2019.



Talagrand-Reboul, Emilie – Boyer, Pierre H. - Bergström, Sven – Vial, Laurence – Boulanger, Nathalie 2018. Relapsing Fevers: Neglected Tick-Borne Diseases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2018; 8: 98. Epub 2018 Apr 4. Verkkodokumentti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5893795/>>. Luettu 24.2.2020.

The Nobel Prize 2019a. Ilya Mechnikov – Biographical. Verkkodokumentti. <<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1908/mechnikov/biographical/>>. Luettu 30.08.2019.

The Nobel Prize 2019b. Paul Ehrlich – Biographical. Verkkodokumentti. <<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1908/ehrlich/biographical/>>. Luettu 30.08.2019.

Thermo Fisher Scientific Oy 2019. Heat-Inactivated Fetal Bovine Serum. Tuote-esittely. Verkkodokumentti. <<https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/fbs/heat-inactivated-fetal-bovine-serum.html>>. Luettu 25.9.2019.

Thermo Fisher Scientific Oy 2002. PBS, pH 7.4. Tuote-esittely. Verkkodokumentti. <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/10010031?CID=AFLBC-10010031>>. Luettu 14.9.2019.

Tilastokeskus. Käsitteet. Verkkodokumentti. <<https://www.stat.fi/meta/kas/index.html>>. Luettu 29.2.2020.

Truong, Duy Tin – Tett, Adrian – Pasolli, Edoardo – Huttenhower, Curtis – Segata, Nicola 2017. Microbial strain-level population structure and genetic diversity from metagenomes. *Genome Research*. 2017 Apr; 27 (4): 626–638. Verkkodokumentti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5378180/>>. Luettu 27.2.2020.

Turun Yliopisto 2017. Kansalaisten kerryttämä punkkipankki paljastanut puutiaisten kantamia taudinaiheuttajia. Turun Yliopisto. Mediatiedote. <<https://www.utu.fi/fi/ajankohtaista/mediatiedote/kansalaisten-kerryttama-punkkipankki-paljastanut-puutiaisten-kantamia>>. Luettu 20.9.2019.

Tutkimuseettinen Neuvottelukunta. Hyvä tieteellinen käytäntö (HTK). Tutkimuseettinen Neuvottelukunta (TENK). Verkkojulkaisu. <<https://www.tenk.fi/fi/hyva-tieteellinen-kaytanta>>. Luettu 19.9.2019.

University of East London 2019. Professor Sally Jane Cutler 2019. Verkkodokumentti. <<https://www.uel.ac.uk/staff/c/sally-cutler>>. Luettu 26.9.2019.

Vaara, Martti – Skurnik, Mikael – Sarvas, Matti 2010. Bakteerin soluseinä. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.). 2010. Mikrobiologia. Kustannus Oy Duodecim. Luettu 22.9.2019.

Veinović, Gorana – Ružić-Sabljić, Eva – Strle, Franc – Cerar, Tjaša 2016. Comparison of Growth of *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, and *Borrelia burgdorferi* Sencu stricto at

Five Different Temperatures. PLoS One. 2016; 11 (6): e0157706. Epub 2016 Jun 16. Verkkodokumentti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4911167/>>. Luettu 23.2.2020.

Vidarsson, Gestur – Dekkers, Gillian – Rispens, Theo 2014. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Frontiers in immunology*. 2014; 5: 520. Epub 2014 Oct 20. Verkkodokumentti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4202688/>>. Luettu 20.9.2019.

Wolgemuth, Charles W. 2015. Flagellar motility of the pathogenic spirochetes 2015. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2015 Oct; 46: 104–113. Epub 2015 Oct 17. Verkkodokumentti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4994469/>>. Luettu 27.2.2020.

Woodman, Michael E. – Cooley, Anne E. – Miller, Jennifer C. – Lazarus, John J. – Tucker, Kathryn – Bykowski, Tomasz – Botto, Marina – Hellwage, Jens – Wooten, R. Mark – Stevenson, Brian. Julkaistu verkossa 18.5.2007. *Borrelia burgdorferi* Binding of Host Complement Regulator Factor H Is Not Required for Efficient Mammalian Infection. *Infection and Immunity*. Vol 75 (6). June 2007: 3131–3139. Verkkodokumentti. <<https://iai.asm.org/content/75/6/3131>>. Luettu 14.9.2019.