

**Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity**

Katedra medicínské biologie



**Identifikace glykoproteinů přítomných ve  
vzorcích izolátu CB53 spirochét *Borrelia  
burgdorferi* s.s.**

**MARTINA JONÁKOVÁ**

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Ján Štěrba

Školitel specialista: Prof. RNDr. Libor Grubhoffer, CSc.

2009

## **Bakalářská práce**

Jonáková M., 2009: Identifikace glykoproteinů přítomných ve vzorcích izolátu CB53 spirochét *Borrelia burgdorferi* s.s. [Identification of glycoproteins in samples of the CB53 isolate of the spirochete *Borrelia burgdorferi* s.s. BSc. thesis, in Czech] – 41 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

Glycosylation of *Borrelia burgdorferi* has been studied for a quite long time, but it's not clear so far, if borrelia spirochetes are able to glycosylate proteins. This work is focused on isolation of glycoproteins from *B. burgdorferi* outer membranes and periplasmic flagella, on their identification and characterization. My results imply that OspC, FlaB, and p83/100 proteins are potentially glycosylated.

Tato práce byla financována z grantů Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR MSM 6007665801, LC 06008, Grantové agentury České republiky GAČR 524/06/1479 a 206/09/1782, Grantové agentury Akademie věd České republiky KJB 600960906 a Grantové agentury Jihočeské univerzity 04-GAJU-45.

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 7. května 2009

.....

Martina Jonáková

## **Poděkování**

Největší poděkování patří zejména mému školiteli Mgr. Jánovi Štěrbovi za nekonečnou trpělivost při zodpovídání všech mých otázek a za ochotu mně kdykoliv a s čímkoliv pomoci. Dále bych chtěla poděkovat panu Prof. RNDr. Liborovi Grubhofferovi, CSc. za to že mně umožnil pracovat v jeho týmu i přesto, že měl plnou laboratoř. Za vytváření příjemné atmosféry a ochoty kdykoliv poradit bych chtěla zejména poděkovat Jarce, Patrikovi, Hance, Verče i všem dalším prima lidem z laboratoře. Za provedení analýzy hmotnostní spektrometrií děkuji Mgr. Petru Koníkovi. V neposlední řadě jsem vděčná mému příteli Michalu Dolejšovi za morální podporu a povzbuzování i ve chvílích nejhorších. A nakonec děkuji mým rodičům za to, že jsem se díky nim dostala až sem.

## **Obsah:**

<b>1. Úvod</b>	5
<b>2. Literární přehled</b>	6
2.1. Struktura spirochét Lymské boreliózy	6
2.2. Proteiny vnější membrány borelií	6
2.3. Glykokonjugáty spirochét	10
2.4. Adaptace spirochét Lymské boreliózy na hostitele	12
<b>3. Cíle práce</b>	15
<b>4. Materiál a metody</b>	16
4.1. Kultivace borelií in vivo	16
4.2. Izolace periplasmatických bičků, vnějších membrán a buněčných cylindrů borelií	16
4.3. SDS-PAGE a Western blot	16
4.4. Detekce glykoproteinů pomocí značených lektinů	17
4.5. Schiffovo barvení glykoproteinů	17
4.6. Purifikace glykoproteinů borelií afinitní chromatografií	18
4.7. Izoelektrofokusace	18
4.8. Precipitace proteinů	18
4.9. Analýza proteinů hmotnostní spektrometrií	19
<b>5. Výsledky</b>	20
5.1. Elektroforetická separace izolovaných periplasmatických bičků a vnějších membrán borelií	20
5.2. Glykoproteinový profil kmene B31 a izolátu CB53 <i>Borrelia</i> <i>burgdorferi</i> s.s.	21
5.3. Frakcionace vzorků metodou izoelektrofokusace	24
5.4. Afinitní chromatografie vnějších membrán izolátu CB53 spirochéty <i>Borrelia burgdorferi</i> s. s.	28
5.5. Analýza proteinů hmotnostní spektrometrií	29
<b>6. Diskuse</b>	40
<b>7. Seznam použité literatury</b>	43

## 1. Úvod

*Borrelia burgdorferi* s. l. je komplex spirochét zahrnující 14 druhů. Kolik z nich je původcem onemocnění u lidí není dosud přesně známo (9, 61).

Za nejčastější původce onemocnění Lymská borelióza jsou považovány tyto tři druhy: *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (s.s.), *B. garinii* a *B. afzelii*. U většiny pacientů s neuroboreliózou byla prokázána *B. garinii*, u druhu *B. burgdorferi* s.s. se předpokládá že způsobuje hlavně artritidu a *B. afzelii* byla izolována ze vzorků pacientů s dermatitidami (6). Nicméně všechny tři jmenované druhy jsou schopné zapříčinit každé ze jmenovaných onemocnění i mnohé jiné, jako například acrodermatitidu, zánět rohovky a poruchy vidění, časté je rovněž dvojité vidění (1). A. R. Pachner v jedné své práci nikoliv náhodou nazývá původce Lymské boreliózy „velkým imitátorem“ různých lidských nemocí (7).

V USA byly z pacientů izolovány spirochéty Lymské boreliózy, jež jsou zahrnovány do genetické skupiny DN127, známé dnes pod označením *B. bissettii* (17). U myši C3H/HeN byly schopny vyvolat příznaky onemocnění i spirochéty druhu *B. lusitaniae*. Infekce člověka tímto kmenem byla potvrzena před několika lety v Portugalsku u pacientky s chronickou kožní lézí (8). S onemocněním Lymské boreliózy bývá také spojován druh *B. valaisiana*. Posledním objeveným druhem způsobujícím Lymskou boreliózu je *B. spielmanii* (shrnutí v 18).

*B. burgdorferi* je patogen přenášený na člověka klíšťaty. U nás se nejčastěji nakazíme od klíštěte *Ixodes ricinus*. V Euroasii je hlavním přenašečem *I. persulcatus*, v Severní Americe *I. pacificus* a *I. scapularis* (5).

## **2. Literární přehled**

### **2.1. Struktura spirochét Lymské boreliózy**

Borelie z druhového komplexu *Borrelia burgdorferi* s. l. patří mezi spirochéty (řád *Spirochaetales*, třída *Spirochaetae*) (51). Jsou to gram-negativní, dvoumembránové bakterie, které žijí jako extracelulární patogeny (shrnutí v 5). Vnější buněčná membrána obklopuje protoplasmatický cylindr tvořený cytoplasmou a vnitřní buněčnou membránou. Celkem 7 až 11 bičíků je uloženo v prostoru mezi vnější membránou a protoplasmatickým cylindrem. Bičků borelie se podobně jako jiné bakteriální bičky skládá z bazálního tělíska, háčku a nejdelší část je tvořena vláknem obsahujícím flagelin FlaB. Přesné umístění a funkce druhého strukturního proteinu bičíků, FlaA, dosud není jasné (2, 3, 4). Borelie mají vysoce specializovaný způsob pohybu. Na rozdíl od ostatních spirochét, jejichž bičky rotují ve spirále, bičky borelií kmitají v plochých vlnách. Svazky bičíků rotují v protichůdném směru a způsobují kolem těla buňky vlnění, které zapřičiňuje pohyb buňky vpřed. Tento způsob pohybu jim umožňuje pohybovat se i ve viskózním prostředí, což je velice užitečná schopnost pro pohyb v různých tkáních (2, 3, 5). Bičků není pro spirochétu důležitý jen jako prostředek umožňující pohyb, ale propůjčuje jí i charakteristický tvar ploché vlny (3).

Jednotlivé druhy v rámci rodu *Borrelia* se navzájem liší v délce, ve vzdálenosti závitů, jejich pravidelnosti a počtu periplasmatických bičíků. Rozsah délek je od 8  $\mu\text{m}$  u *B. coriaceae* do 20 až 30  $\mu\text{m}$  u *B. burgdorferi* s. s., která je ze všech druhů zároveň nejužší. Průměr této bakterie je jen asi 0,2 - 0,3  $\mu\text{m}$ . Velikost buněk však může být různá v závislosti na hostiteli/prostředí ve kterém se bakterie momentálně množí (shrnutí v 4).

### **2.2. Proteiny vnější membrány borelií**

Všechny dosud zkoumané izoláty borelií z přírody obsahovaly velké množství proteinů na vnější membráně. Tyto proteiny jsou místem interakce mezi spirochéťou a jejím hostitelem. Míra produkce mnohých z nich je závislá na podmínkách vnějšího prostředí, zejména na teplotě a specifických podnětech přijatých od hostitele. Variabilitou exprese

těchto proteinů se je borelie schopná vyhýbat imunitní odpovědi hostitele i kolonizovat jeho různé tkáně (shrnutí v 55) .

U borelií kultivovaných *in vitro* se nejhojněji vyskytují membránové proteiny OspA a OspB („Outer surface protein“ A a B). OspA (31 kDa) je spolu s OspB (34 kDa) kódován dvojicí genů na 49-kb lineárním plasmidu. Oba geny jsou transkribovány v jedné transkripční jednotce (shrnutí v 11). Geny kódující OspA a OspB pravděpodobně vznikly genovou mutací z jediného genu, protože jsou z 53% identické a z 63% jsou si podobné (12). Struktura prvního z nich, OspA, byla analyzována pomocí rentgenové difrakce krystalů proteinu v komplexu s fragmenty specifických myších protilátek. Vzniklá struktura byla tvořena 21 po sobě jdoucími antiparalelními  $\beta$ -listy, spojenými krátkými smyčkami. Na C-konci se nacházel jediný  $\alpha$ -helix, což by mohlo být důležitou částí molekuly pro vývoj globální vakcíny proti Lymské borelióze (11). Právě proti C-konci jsou totiž směřovány ochranné protilátky napadeného organismu (23).

Struktura druhého ze zmiňovaných proteinů, OspB, byla podrobena výzkumu až o sedm let později. Proteiny OspB a OspA jsou si ve své struktuře v mnohém podobné. Molekula OspB se skládá z 12 antiparalelních  $\beta$ -řetězců následovaných, stejně jako v případě OspA, jediným  $\alpha$ -helixem. OspB je ovšem velice proměnlivý protein. U různých izolátů se liší v aminokyselinové sekvenci i v antigenní reaktivitě. U některých kmenů jsou běžné i formy se zkráceným C-koncem. Přestože je tedy OspB stejně jako OspA schopný vyvolat imunitní reakci u myši, pro vývoj vakcíny není nejvhodnější (23).

Funkce OspA a OspB pro životní cyklus borelie byla částečně objasněna teprve nedávno. Ukázalo se, že tato dvojice povrchových proteinů není nezbytná pro infekci myši, což dokázaly pokusy s mutantními kmeny borelií, které tyto membránové proteiny neprodukovaly. Avšak při sání klíšťat na myších infikovaných mutantními kmeny, nebyly spirochéty pozorovány ve střevech klíšťat, z čehož se dá usuzovat, že úloha OspA a OspB je nezastupitelná při kolonizaci a přežití borelií ve střevě klíštěte, a je tedy nezbytná pro jejich životní cyklus (12).

Borelie tvoří OspA ve střevech nenasátého klíštěte. V sajícím klíštěti se naopak

produkce OspA snižuje a prudce se zvyšuje exprese jiného proteinu vnější membrány, OspC. Tento je pak produkován borelií až do rané fáze infekce obratlovce. Zjistilo se, že tato změna exprese je závislá na teplotě prostředí, neboť OspC se exprimuje až při teplotách podobných teplotě těla savce (13, 16).

Experimenty prováděné na myších ale naznačují, že množství exprimovaného proteinu OspC není závislé přímo na teplotě, ale na alternativním sigma faktoru RpoS, jehož přítomnost postačuje pro spuštění exprese genu *ospC* i při teplotě pouhých 23°C (14). Hladina RpoS je regulována malou nekódující RNA Dsr A<sub>Bb</sub>, která je schopná reagovat na změny teploty. U mutantních kmenů *Borrelia burgdorferi*, kterým chyběla tato RNA byla hladina RpoS a tím i OspC regulována pH a denzitou buněk (36).

Pokusy na mutantních spirochétách zbavených genu *ospC* v porovnání s „wild-type“ spirochétami naznačují, že OspC je nezbytný pro průnik borelií do slinných žláz klíštěte (16). Role OspC v savčím hostiteli ale zůstává zatím neznámá. V práci Stewarda a kol. (15) byly zamítnuty obě dřívější hypotézy, podle nichž by OspC mohl mít roli při adaptaci na hostitele a nebo by boreliím umožňoval vyhnout se imunitní odpovědi hostitele.

Gen kódující OspC (21 – 25 kDa) se nachází na kruhovém plasmidu cp26. Gen *ospC* je velice variabilní a to i v rámci jednoho druhu (vnitrodruhový polymorfismus), a proto je možné ho použít k definování skupin příbuzných klonů (shrnutí v 5).

Dalším významným povrchovým lipoproteinem je OspD s molekulovou hmotností 28 kDa. Gen kódující OspD se nachází na lineárním plasmidu o velikosti 38kb. Tento plazmid borelie se často ztrácí po opakovaném pasážování *in vitro* (20) a chybí i u mnohých izolátů z přírody (21). OspD není pravděpodobně vůbec příbuzný s ostatními membránovými proteiny jako OspA a OspB. Je spíše podobný proteinu M *Streptococcus pyogenes*, což je povrchový protein uplatňující se při adhezi i v odolnosti bakterie vůči fagocytóze (20).

Studie ukázaly, že exprese OspD se mění v závislosti na různých podmínkách prostředí. Například při změně teploty z 23°C na 35°C se produkce OspD ve spirochétě sníží (22). Tato studie naznačuje, že geny *ospD* jsou odlišně exprimovány ve vnitřním prostředí



organismu savčího hostitele a v krevsajícím klíštěti.

V savčím hostiteli je exprese proteinu OspD velice nízká a pokusy s OspD-deficientními boreliemi potvrzují, že ztráta genu kódujícího OspD nemá nepříznivý vliv na schopnost přenosu spirochety z klíštěte na savčího hostitele a jeho následnou infekci. Původní kmen se ukázal být stejně infekční jako deficientní kmen neobsahující funkční gen *ospD*. Tyto závěry potvrzují i mnohé izoláty borelií z přírody i z pacientů, které neobsahovaly gen *ospD*, a přesto byly schopny vyvolat infekci. Produkce OspD nemá nejspíš pro borelii esenciální roli, ale pomáhá spirochetě udržet se ve střevech klíštěte. U klíšťat nakažených divokým kmenem bylo nalezeno ve střevech třikrát více spirochet než u klíšťat nakažených mutantním kmenem. Význam pro kolonizaci střeva klíštěte potvrzují i pokusy s rekombinantním OspD, který byl schopen vázat se na TGE (tick gut extract) v prostředí *in vitro* (24).

Poslední z dosud objevených vnějších membránových proteinů jsou OspE a OspF. Kódují je geny strukturně uspořádané za sebou v jedné transkripční jednotce. Pulzní gelovou elektroforézou na bylo zjištěno, že geny *ospE* a *ospF* leží na plasmidu o velikosti asi 45 kb. Metoda imunoprecipitace [<sup>3</sup>H] palmitátem značených proteinů OspE a OspF prokázala, že se jedná o lipoproteiny. Molekulová hmotnost OspE byla určena na 19 kDa. Gen *ospF* kóduje protein s celkovou molekulovou hmotností 26 kDa (25).

Povrchové lipoproteiny, jenž sdílejí sekvenční homologii s OspE a OspF proteiny, se nazývají Erp (OspE/F-related proteins) (proteiny podobné OspE/F) (34). Některé Erp proteiny mají schopnost vázat faktor H. To je velice užitečná schopnost pro parazitující spirochetu, která se potřebuje vyhnout imunitní odpovědi hostitele. Komplement totiž hraje důležitou roli u člověka i u zvířat v obraně proti patogenům. Tělu vlastní buňky se před jeho účinky chrání navázáním inhibičního plasmatického faktoru H na svůj povrch. Faktor H způsobuje deaktivaci C3 konvertázy a degradaci C3b. Borelie, stejně jako mnoho jiných patogenních organismů, jsou schopny navázat faktor H na svůj povrch, díky čemuž mohou inhibovat aktivaci komplementu.

*Erp* geny jsou považovány za genovou rodinu, protože mají téměř identické sekvence promotoru, zabírají alelická místa na několika plasmidech, každý o velikosti 32kb, a kódují lipoproteiny s vysoce konzervovanou leader polypeptidovou sekvencí (35).

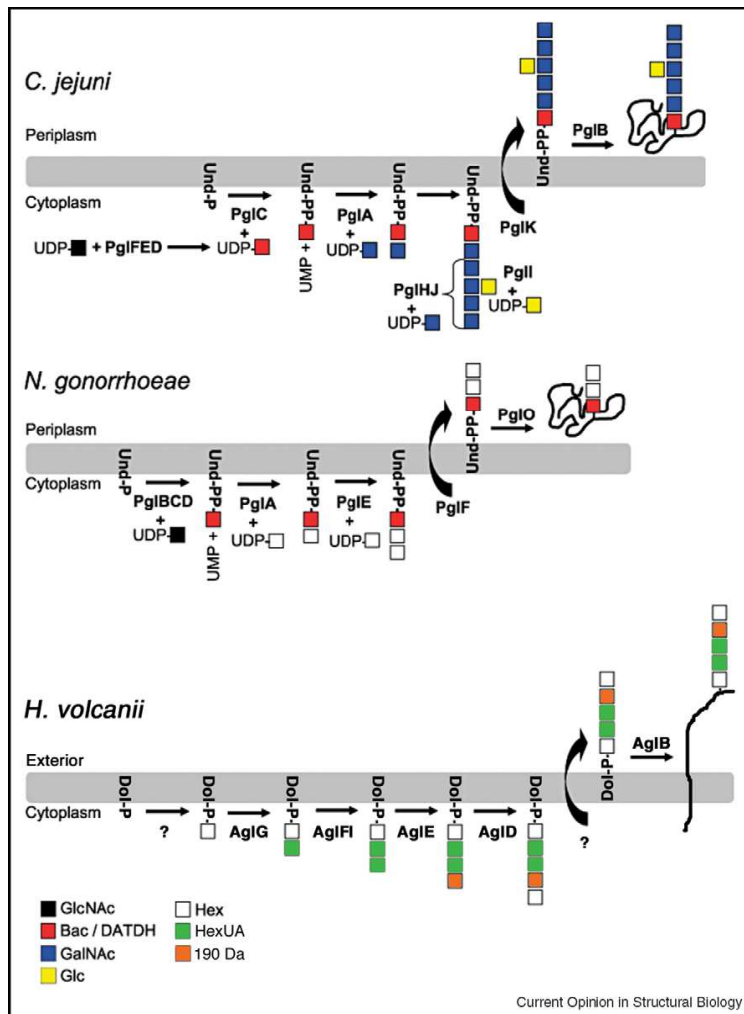
### 2.3. Glykokonjugáty spirochét

Glykosylace je jednou z nejběžnějších posttranslačních modifikací proteinů. Už dlouhou dobu je známé, že se netýká jen eukaryot, ale je možná i u archeí a prokaryot (38).

První bakterií, u které byl popsán kompletní průběh N-glykosylace, byl střevní patogen *Campylobacter jejuni*. Schéma průběhu této glykosylace v porovnání s průběhem N-glykosylace u archeí a O-glykosylace u bakterií je zobrazeno na obrázku 1. Zásadním objevem se stala skupina genů *pgl*, která kóduje pět glykosyltransferáz, a mnoho dalších proteinů, které jsou zodpovědné za glykosylaci u této bakterie. Tuto skupinu genů se podařilo exprimovat i v *Escherichia coli*, což by mohlo mít velký význam pro další výzkum i průmyslové využití (shrnutí v 38).

Průběh glykosylace u prokaryot a eukaryot se v mnohém liší. Mnohé rozdíly vyplývají už ze strukturních rozdílů ve stavbě prokaryotické a eukaryotické buňky. Vzhledem k tomu, že glykosylace eukaryotických proteinů probíhá v membránových systémech endoplazmatického retikula a Golgiho aparátu, a prokaryota tyto membránové systémy postrádají, nemůže glykosylace probíhat stejnými mechanismy. Z mnoha výzkumů vyplývá, že pro glykosylaci strukturních složek prokaryot je využíváno mnohem více druhů monosacharidových jednotek než u eukaryot. Například O-glykany bakterie *Neisseria meningitidis* obsahují DiAcTridH (2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxyhexóza) (26, 38).

Povrchové a bičíkové glykoproteiny představují jedny z nejlépe prostudovaných příkladů glykosylace prokaryotických proteinů. Už práce Brahmsa a Greenberka z roku 1988 (27) při které byla využita vazba na lektiny naznačuje, že nejméně dva bičíkové polypeptidy o velikosti 30 – 40 kDa bakterie *Spirochaeta aurantia* byly glykosylovány. University of Montreal ve spolupráci s Biotechnology Research Institute NRC v Kanadě delší dobu zkoumali 44-kDa protein vnější membrány bakterie *Serpulina hyodysenteriae*. Glykosylace proteinu byla dokázána barvením podle Schiffa. Výsledky práce naznačují, že tento protein je druhově specifický antigen (19).



**Obrázek 1. Schéma N-vázané a O-vázané glykosylace u bakterií *Neisseria. gonorrhoeae*, *Campylobacter jejuni* a archeí *Haloferax volcanii***

Bac, di-N-acetylbacillosamin; DATDH, 2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxyhexóza; Dol-P, dolichyl fosfát; GalNAc, N-acetylgalactosamin; Glc, glukóza; GlcNAc, N-acetylglucosamin; Hex, hexóza; HexUA, hexuronová kyselina; UMP, uridin monofosfát; Und-PP, undekaprenyl-pyrofosfát; 190 Da, necharakterizovaný 190 Da sacharid. Převzato z 38.

Prvními potvrzenými glykoproteiny *Borrelia burgdorferi* se staly povrchové proteiny OspA a OspB v roce 1992. Pomocí Schiffova barvení a deglykosylačních experimentů se podařila prokázat přítomnost N-vázaných glykanů (10).

Výzkum glykoproteinů probíhá i na bičíkových proteinech spirochéty *B. burgdorferi*. Bičíkový protein FlaA byly charakterizován pomocí lektinového afinoblotingu. Z pěti lektinoblotů vyšla pozitivně reakce s lektinem SNA, který se váže na  $\alpha(2-6)$  vázanou kyselinu sialovou a s lektinem GNA, který reaguje s terminálními manózovými zbytky. Vzhledem k tomu, že N-glykosidáza F byla schopná odštěpit glykany z bičíkového proteinu FlaA, můžeme předpokládat, že podobně jako bičíkové glykoproteiny archeí, také protein FlaA by mohl obsahovat glykany vázané N-glykosidickou vazbou (28).

Novější výsledky ovšem naznačují i možnost, že potvrzené glykosylace proteinů vnější membrány i bičků mohou být ve skutečnosti pouze pevně navázané sérové glykoproteiny z média BSK-H, ve kterém se běžně kultivují borelie *in vitro*. Proteiny OspA, OspB i FlaA a FlaB byly identifikovány hmotnostní spektrometrií v akrylamidovém gelu a následně detekovány pomocí značených lektinů a Schiffovým barvením. Žádný z výsledků nepotvrzoval dřívější domněnku, že by tyto proteiny mohly být glykosylované. U studovaného kmene borelií B31 ovšem bylo nalezeno několik proteinů s velkou molekulovou hmotností, které byly detekovány jako glykoproteiny. Kontrolní pokusy s kultivačním médiem předkládají přesvědčivé důkazy, že alespoň některé z těchto proteinů z něj pocházejí (44). Zajímavé výsledky rovněž poskytla analýza 6 genomů různých spirochét, která vyloučila, že by *Borrelia burgdorferi* obsahovala oligosacharyltransferázu STT3 (pglB), z již výše zmiňované skupiny genů pgl, důležitých pro glykosylaci proteinů (N. Rudenko, osobní sdělení).

#### **2.4. Adaptace spirochét Lymské boreliózy na hostitele**

Borelie jsou bakterie primárně parazitující na povrchu buňky, ale příležitostně jsou schopné vnitrobuněčné invaze, pokud extracelulární prostředí začne být příliš nehostinné, např. kvůli přítomnosti antibiotik. Proto můžeme ve společné kultuře borelií a klíštěcích buněk najít životaschopné spirochéty i po dvou týdnech působení penicilinu, zatímco čistá monokultura borelií není schopná takové podmínky přežít (31).

Životní cyklus borelie zahrnuje přenašeče (klíště) a hostitele (obratlovce). Cyklus přenosu začíná u neinfikovaného klíštěte sajícího krev na infikovaném hostiteli. To je obvykle malý savec, ale mohou to být i ptáci nebo i jiní obratlovci. U nás jsou rezervoáry borelií myšice křovinná, myšice lesní (39), myšice temnopásá (40), normík rudý (41), rejsek obecný, rejsek malý a zajíc polní (42). Jakmile je klíště nakaženo spirochétami Lymské boreliózy, zůstane přenašečem ve všech dalších fázích svého života a při každém následujícím krmení může nakazit dalšího hostitele (33).

Schopnost borelie přežít v odlišných prostředích organismů obratlovců i členovců je umožněna díky expresi různých genů podle momentálních podmínek. Ve střevě klíštěte je například hojně exprimován protein OspA, ale při přenosu na obratlovce je jeho

množství snižováno (13), aby spirochéta vůbec byla schopná opustit střevo. Důvodem je glykoprotein TROSPA (Tick Receptor for Outer Surface Protein A), který je schopen vázat OspA na povrchu spirochéty. Nachází se v mezibuněčném prostoru a na povrchu lumen střeva klíštěte. U sajícího klíštěte stoupá exprese TROSPA a současně borelie zvyšuje syntézu OspA, takže výsledkem je pevné navázání spirochét na střevo klíštěte. Naopak při sání klíštěte v dalším stádiu jeho životního cyklu se hladina těchto proteinů u obou organismů opět sníží a umožní tak borelii opustit střevo, dostat se do slinných žláz a nakazit dalšího hostitele. Míra jeho produkce je také závislá na vývojovém stádiu klíštěte. Nejhojněji je produkován larvami a u dospělců je sotva zjištělný. Zajímavý byl také objev, že klíště reaguje produkcí proteinu TROSPA na přítomnost borelií (43). Během infekce savčího hostitele už borelie většinou OspA nevytváří, protože jeho přítomnost vyvolává silnou imunitní reakci. V pozdějších stádiích onemocnění Lymfskou boreliózou byla výjimečně zjištěna jeho produkce u některých pacientů (45).

Po přenosu na savčího hostitele se spirochéty po několik dní množí v kůži, následně se infekce rozšíří do dalších tkání, kde může způsobit zánět. Imunitní odpověď savčího organismu má zřejmě velký vliv na expresi některých povrchových lipoproteinů, což bylo dokázáno srovnáním genové exprese spirochét infikujících imunokompetentní a imunodeficientní myši (45, 46).

Při studiu exprese 137 boreliálních lipoproteinových genů (exprimovaných u spirochét kultivovaných *in vitro*) v imunodeficientní myši bylo pozorováno snížení počtu exprimovaných genů na 116 proteinů. U imunokompetentních myší byla prvních deset dní překvapivě exprimována téměř nezměněná sada lipoproteinových genů, ale 17. den po infekci se jejich množství radikálně snížilo až na necelých 40 (45).

Proteiny exprimované bezprostředně po infekci savčího hostitele můžeme rozdělit na tři skupiny. První skupina, do které patří již výše zmiňovaný OspA, se přestane okamžitě exprimovat. Druhá skupina se exprimuje i nadále, ale následkem silného selekčního tlaku množství proteinu postupně klesá až exprese ustane. Sem bychom mohli zařadit lipoprotein OspC, který je ve větším množství produkován pouze v rané fázi infekce savce. Třetí skupinou jsou proteiny produkovány jako reakce na prostředí obratlovčího organismu, které jsou po celou dobu infekce. Ty patrně pomáhají borelii vyhnout se imunitní odpovědi. Mezi tyto proteiny patří zejména proteiny vážící proteoglykan

decorin – DbpA (Decorin-binding protein A) a DbpB (Decorin-binding protein B), a dále Bbk32, některé proteiny ze skupiny Erp a zejména VlsE (variable major protein-like sequence) (45, 46).

### **3. Cíle práce**

Cílem mojí práce bylo izolovat proteiny z periplazmatických bičíků a vnějších membrán. Za pomoci afinitní chromatografie jsem měla z borelií izolovat glykoproteiny a tyto následně identifikovat a dále charakterizovat hmotnostní spektrometrií, lektinovým afinoblotingem a Schiffovo barvením. Dalším cílem této práce bylo pokusit se charakterizovat proteinový profil lokálního izolátu *Borrelia burgdorferi* CB53 izolovaného ze samice *Ixodes ricinus* v jižních Čechách v roce 1998 a porovnat ho s modelovým kmenem *Borrelia burgdorferi*, B31.

## **4. Materiál a metody**

### **4.1. Kultivace borelií in vivo**

Spirochéty *Borrelia burgdorferi*, kmen B31 nebo izolát CB53, jsem kultivovala v médiu BSK-H (Sigma-Aldrich) alespoň sedm dní při 35°C. Izolát CB53 byl laskavě poskytnut doc. J. Kopeckým (Parazitologický ústav BC AVČR, České Budějovice). Kmen B31 byl získán od prof. Z. Hubálka (Ústav biologie obratlovců AVČR, Valtice), původně pochází od Dr. Anderson (USDA, New Haven, Connecticut, USA).

### **4.2. Izolace periplasmatických bičků, vnějších membrán a buněčných cylindrů borélií**

Po dosažení nejvyšší denzity spirochét jsem borelie centrifugovala po dobu 30min při 9000 G a 4°C. Vzniklý pelet jsem pečlivě rozsuspendovala ve vychlazeném fosfátovém pufru (0,13 M fosfátový pufr, pH 7,4) a znovu centrifugovala. Promytí jsem zopakovala ještě jednou. Pelet borelií jsem poté důkladně rozsuspendovala ve 20 ml 1% roztoku Triton X-100 ve fosfátovém pufru a inkubovala jednu hodinu při 37°C. Po inkubaci jsem roztok centrifugovala opět po dobu 30min při 9000 G a 4°C. Supernatant obsahující vnější membrány jsem odsála pipetou a uschovala pro pozdější ultracentrifugaci. Pelet jsem rozsuspendovala v cca 20ml fosfátového pufru a spolu se skleněnými kuličkami (průměr 1 mm) jsem vortexovala na nejvyšší rychlost po dobu 45 sekund – tím jsem z buněčných cylindrů odstranila bičky. Směs jsem centrifugovala za stejných podmínek jako v předešlých případech. Supernatant obsahující bičky jsem spolu s uschovanou frakcí vnějších membrán ultracentrifugovala při 100 000 G po dobu jedné hodiny při teplotě 10°C. Vzniklý pelet obsahoval čisté bičky nebo membrány, které jsem rozpustila v cca 100 - 150µl destilované vody a uschovala při -20°C pro pozdější použití.

### **4.3. SDS-PAGE a Western blot**

Vzorky membrán a bičků jsem smíchala s adekvátním množstvím 4x koncentrovaného redukujícího vzorkového pufru. Směs jsem vařila asi 3 minuty, ochladila a krátce centrifugovala. Vzorky jsem elektroforeticky dělila ve dvou 12% polyakrylamidových



gelech, při napětí 120 V asi 1 hodinu. Po dokončení elektroforézy byl jeden gel obarven v barvicím roztoku PageBlue (Coomassie Brilliant Blue R-250) (Fermentas) a dle potřeby z něj byly vyřezány vzorky pro analýzu hmotnostní spektrometrií (MS). Paralelní gel nebyl barven a separované proteiny byly dále přeneseny na PVDF (polyvinyliden fluorid) membránu metodou podle Towbina (47). Před blotováním jsem gely ekvilibrovala ve 100ml blotovacího pufru (25mM Tris, 192mM glycin, pH 8,3) obsahujícího 20% methanolu. Během této doby jsem připravila i membránu PVDF o potřebné velikosti namočením do methanolu a následně do blotovacího pufru. Polosuchý elektroblot probíhal po dobu jedné hodiny při 25V.

#### **4.4. Detekce glykoproteinů pomocí značených lektinů**

Při tomto barvení jsem použila DIG Glycan Differentiation Kit od firmy Roche. Nejprve jsem membránu blokovala při pokojové teplotě hodinu v blokovacím roztoku (3% BSA v PBS nebo blokovací roztok od firmy AppliChem). Pro detekci glykoproteinů jsem použila lektiny DSA (*Datura stramonium* agglutinin), GNA (*Galanthus nivalis* agglutinin), MAA (*Maackia amurensis* agglutinin), PNA (*Arachis hypogea* agglutinin) nebo SNA (*Sambucus nigra* agglutinin) značené digoxigeninem. Inkubace s lektiny probíhala v pufru s obsahem 1mM MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>. Poté jsem membránu inkubovala v roztoku protilátek namířených proti digoxigeninu konjugovaných s alkalickou fosfatázou. Barvení probíhalo v substrátovém roztoku BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát/4-nitroblue tetrazolium chlorid).

#### **4.5. Schiffovo barvení glykoproteinů**

Při barvení glykoproteinů jsem používala DIG Glycan Detection Kit (Roche). Proteiny separované pomocí SDS-PAGE jsem imobilizovala na PVDF membránu a sacharidové složky glykoproteinů jsem oxidovala pomocí jodistanu sodného. Vytvořené aldehydové skupiny následně reagovaly s hydrazidem kyseliny DIG-0-3-succinyl-ε-aminokaproové. Po aplikaci protilátek namířených proti digoxigeninu, konjugovaných s alkalickou fosfatázou, jsem membrány barvila v roztoku BCIP/NBT.

#### **4.6. Purifikace glykoproteinů borelií afinitní chromatografií**

Pro afinitní chromatografii jsme použila lektiny Concanavalin A a SNA, navázané na CNBr-aktivovanou Sepharózu (objem 1 ml). Lektin SNA se specificky váže na zbytky kyseliny sialové, lektin ConA má širší specifitu a umožňuje odhalit vázanou manózu nebo glukózu (48). Kolonu jsem nejprve ekvilibrovala trojnásobným promytím roztokem SampleB (20mM Tris, 0,15M NaCl, 1mM MnCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>). Pak jsem přidala 2ml roztoku SampleB spolu s 500μl vzorku a nechala jsem uzavřenou kolonu vertikálně hodinu promíchávat aby se glykoproteiny navázaly na lektin. Pak jsem dvakrát promývala kolonu pěti mililitry roztoku SampleB a zachytávala protékající roztoky – FT1 a FT2. Nakonec jsem zachycené proteiny dvakrát vymyla 2ml elučního pufru SampleB obsahujícího 0,1M a 0,5M laktózou a vzorky jsem označila Lac1 a Lac2.

#### **4.7. Izoelektrofokusace**

Pro dělení proteinů isoelektrofokusací (IEF) jsem použila frakci vnějších membrán izolátu CB53. Suspenze vnějších membrán jsem centrifugovala 30 min při 9000 G a 4°C a pelet jsem rozsuspendovala v solubilizačním pufru (7M močovina, 2M thiomčovina, 4% CHAPS, 0,02M DTT, 0,8% carrier ampholytes CA 3-10). Pro dokonalé promíchání jsem vzorek dlouho vortexovala a pak použila ultrazvukový sonikátor. Roztoky jsem opět centrifugovala při 9000 RPM a pro IEF jsem použila supernatant.

Pro isoelektrofokusaci jsem použila aparaturu ZOOM<sup>®</sup> IEF Fractionator od firmy Invitrogen a postupovala jsem dle návodu. Při separaci jsem používala disky s rozsahem pH 3; 4,6; 5,4; 7 a 10 – proteiny se dělily dle pI v komůrkách v rozmezí těchto pH. Isoelektrofokusace probíhala při napětí 100 V po dobu 20 minut, 200 V po dobu 80 minut a nakonec 600 V po dobu 80 minut. Poté jsem z každé komůrky odsála všechn roztok a jednotlivé frakce jsem precipitovala 20% TCA (viz níže).

#### **4.8. Precipitace proteinů**

U vzorků z afinitní chromatografie a izoelektrofokusace jsem před dalším použitím zakoncentrovala obsažené proteiny srážením 20% kyselinou trichloroctovou v ledově vychlazeném acetonu. Ke každému vzorku jsem přidala přibližně stejný objem precipitačního roztoku jako byl objem vzorku. Pak jsem nechala srážet proteiny asi hodinu při -20°C. Vzorky jsem poté centrifugovala 15 min při 9000 G a 4°C. Supernatant jsem odsála, pelet rozsuspendovala v co největším množství ledově vychlazeného acetonu a opět nechala srážet minimálně 1 hodinu při -20°C. Za stejných podmínek jsem vzorek opět centrifugovala, supernatant jsem slila a pelet jsem nechala vyschnout na vzduchu. Vysušené vzorky jsem k dalšímu použití rozsuspendovala v co nejmenším množství destilované vody.

#### **4.9. Analýza proteinů hmotnostní spektrometrií**

Vzorky byly analyzovány Mgr. Petrem Koníkem v Laboratoři strukturní biologie PřF JU na hmotnostním spektrometru vybaveném UPLC kapalinovou chromatografií, nanoACQUITY-ESI-Q-ToF-PREMIER (Waters).

Proteinové proužky, vyřezané z SDS-PAGE gelu po elektroforetické separaci, byly promyty deionizovanou vodou a dvakrát odbarveny v 40% ACN v 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 8,0. Homogenizovaný gel byl poté vysušen ve vakuu a rehydratován ve 20 µl roztoku 0,1µg/µl trypsinu (Sigma ALdrich) v 9% ACN/100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 8,0. Štěpení trypsinem probíhalo přes noc při 37°C. Vzniklé peptidy byly následně pomocí špiček Zip Tip (Millipore) převedeny do 20 µl 50% ACN v 0,1% kyselině mravenčí (FA), roztok byl zahuštěn na 10 µl a následně naředěn přidáním 10 µl 0,1% FA.

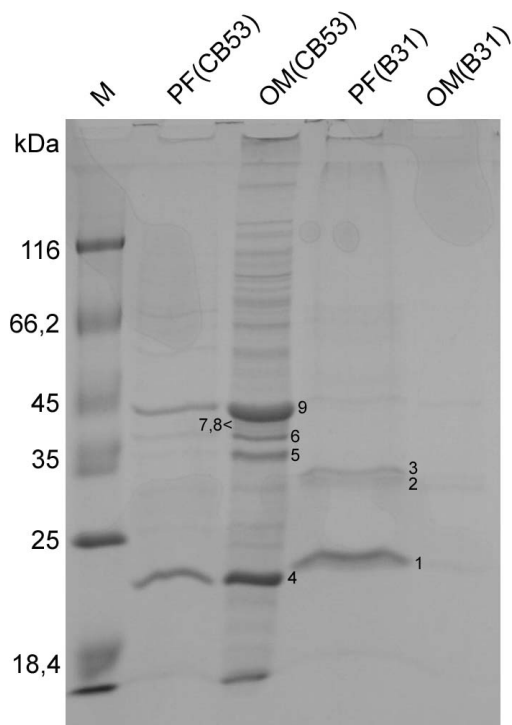
Tryptické štěpy byly separovány UPLC chromatografií na C-18 koloně (Waters) a separovány v gradientu 3 – 60% ACN v 0,1% FA, ionizovány metodou ESI a m/z hodnoty pro jednotlivé peptidy byly získány v Q-ToF hmotnostním spektrometru. V případě potřeby byla provedena MS/MS analýza.

Data byla analyzována softwarem ProteinLynxGlobalServer 2.3 (Waters). Pro identifikaci peptidů byly použity databáze NCBI hypotetických i identifikovaných proteinů spirochét *Borrelia burgdorferi* a obecná databáze SWISSPROT (obsahující většinu známých proteinů).

## 5. Výsledky

### **5.1. Elektroforetická separace izolovaných periplasmatických bičků a vnějších membrán borelií**

SDS-PAGE elektroforéza jednotlivých frakcí ukázala na mnoho rozdílů v proteinovém složení vzorků získaných z kmene B31 a z izolátu CB53. Výrazný protein o hmotnosti asi 22 kDa se obarvil ve všech frakcích obou kmenů borelií, ale u periplasmatických bičků kmene B31 se objevily ještě dva proteiny s molekulovou hmotností kolem 32 - 33 kDa, které nebyly zaznamenány u izolátu CB53 (viz obr. 2).

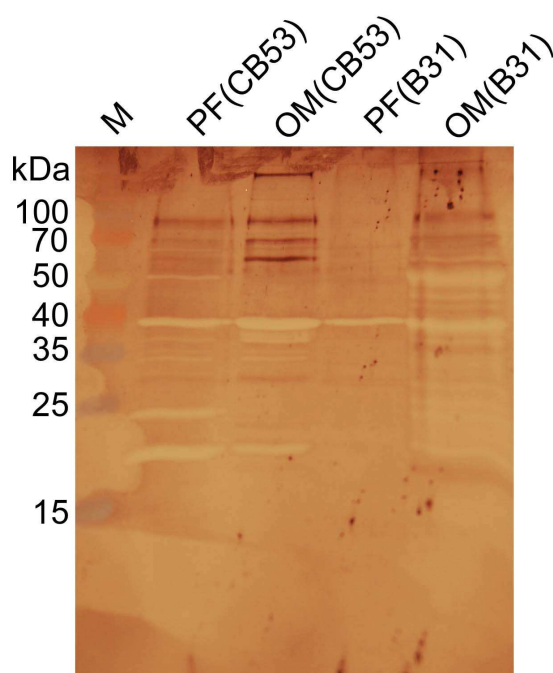


**Obrázek. 2. SDS-PAGE jednotlivých frakcí *Borrelia burgdorferi* kmene CB53 a B31**

M – proteinový standard, PF – frakce periplasmatických bičků, OM – frakce vnějších membrán. 1-9 vyznačuje proteiny, které byly vyřezány a poslány na MS analýzu

## 5.2. Glykoproteinový profil kmene B31 a izolátu C53 *Borrelia burgdorferi* s. s.

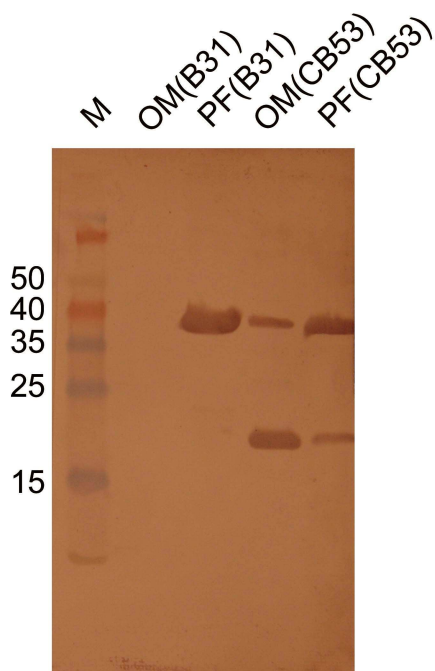
Schiffovo barvení glykoproteinů nám odhalilo několik glykokonjugátů s velkou molekulovou hmotností a to zejména ve vnějších membránách u obou zkoumaných kmenů. Pouze ve frakci vnější membrány kmene B31 je zaznamenán protein o velikosti 20 kDa (viz obr. 3) Slabá reakce, pozorována u tohoto proteinu v izolátu bičků kmene B31 bude pravděpodobně způsobena nižší koncentrací proteinů v analyzovaném vzorku.



**Obrázek 3. Schiffovo barvení glykoproteinů izolátů z *Borrelia burgdorferi***

M – značený proteinový standard, PF – frakce periplasmatických bičků, OM – frakce vnějších membrán.

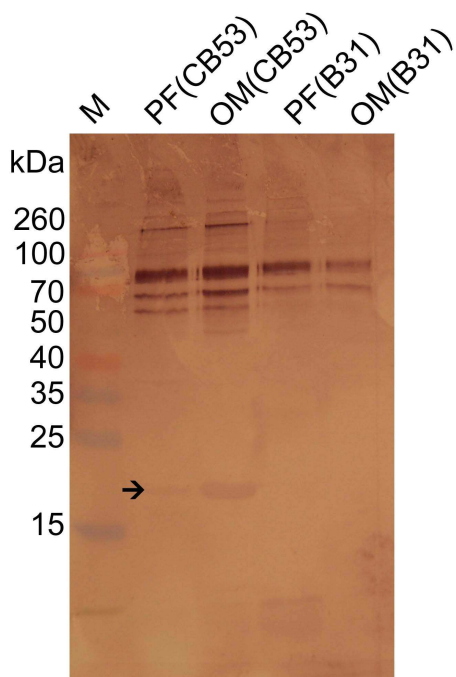
Při použití značeného lektinu MAA byla zaznamenána pozitivní reakce s proteinem o velikosti 40 kDa, který se objevuje ve větším množství u vzorků periplasmatických bičků v obou kmenech borelií. Slaběji byl detekován u vnějších membrán borelií izolátu CB53, ve frakci membrán B31 se ho detekovat nepodařilo vůbec, pravděpodobně kvůli nízkému obsahu v analyzovaném vzorku. Protein o velikosti asi 20 kDa byl výrazně značený lektinem MAA pouze u kmene CB53 (viz obr. 4).



**Obrázek 4. Lektinový afinobloting, lektin MAA**

M – značený proteinový standard, PF – frakce periplasmatických bičíků, OM – frakce vnějších membrán

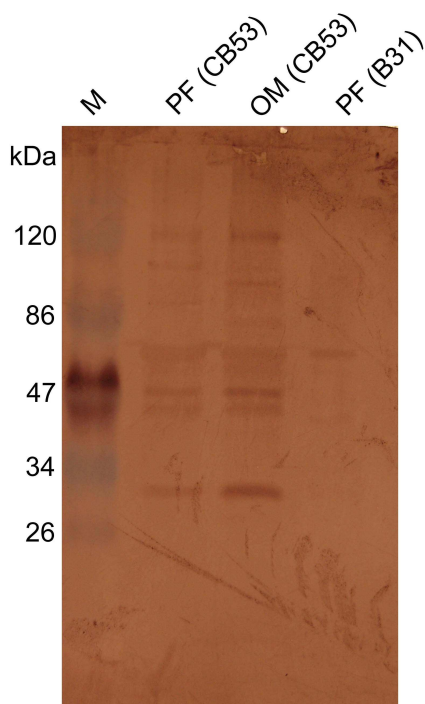
Značený lektin SNA u všech frakcí jednotně rozeznával cca 200 kDa velký protein, a dále několik proteinů v rozmezí velikostí od 60 až k 100 kDa. Pouze u borelií izolátu CB53, stejně jako v případě značení lektinem MAA, slabě reagoval protein o velikosti 20 kDa v obou frakcích (viz obr. 5).



**Obrázek 5. Lektinový afinobloting, lektin SNA**

M – značený proteinový standard, PF – frakce periplasmatických bičíků, OM – frakce vnějších membrán

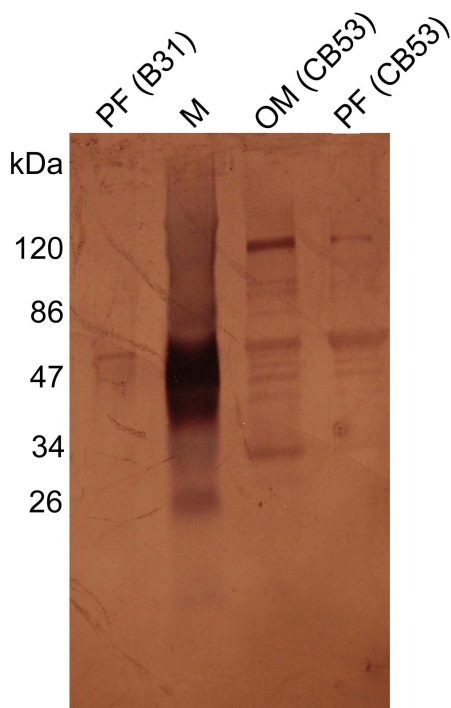
V případě značeného lektinu GNA bylo detekováno mnoho proteinů v obou frakcích borelií izolátu CB53. Detekovatelné proteiny u kmene B31 jsou pouze dva, přítomnost dalších proteinů nemohu posoudit kvůli nízké koncentraci proteinů (viz obr. 6).



**Obrázek 6. Lektinový afinobloting, lektin GNA**

M – značený proteinový standard, PF – frakce periplasmatických bičíků, OM – frakce vnějších membrán

Při použití značeného lektinu DSA shodně reagovaly ve frakci bičíků kmene B31 i v obou frakcích kmene CB53 proteiny velikosti asi 60 kDa a 120 kDa. Protein o velikosti 30 kDa pravděpodobně chybí ve frakcích bičíků kmene B31 (viz Obr. 7).



**Obrázek 7. Lektinový afinoblotting, lektin DSA**

M – značený proteinový standard, PF – frakce periplasmatických bičků, OM – frakce vnějších membrán

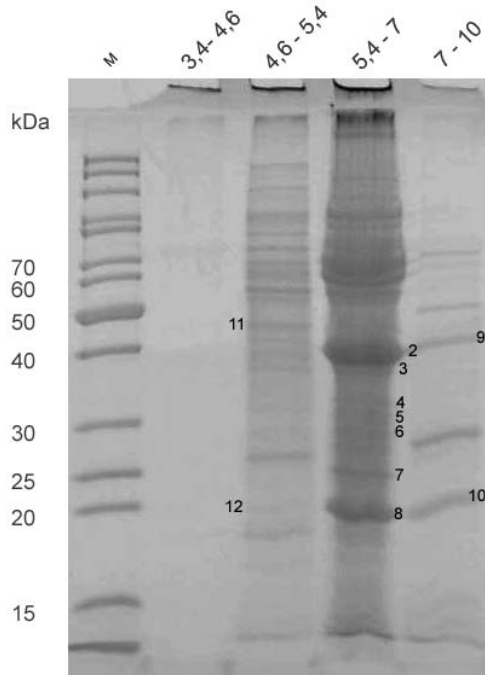
Na membráně inkubované značeným lektinem PNA se nepodařilo získat pozitivní reakci žádné ze zkoumaných složek borelií (bez obrazové dokumentace).

### 5.3. Frakcionace vzorků metodou izoelektrofokusace

Z důvodů přílišné komplexnosti vzorků, získaných z vnějších membrán, bylo třeba vzorek dále rozdělit aby bylo možné zřetelně rozlišit pozitivně reagující proteiny od nereagujících, neglykosylovaných proteinů. Proteiny ve vzorku vnějších membrán izolátu CB53 jsem proto dále frakcionovala metodou izoelektrofokusace podle izoelektrického bodu (pI). Ve výsledných vzorcích byly proteiny s pI v daném rozmezí koncentrovanější než v původním vzorku, a proto se podařilo detekovat řadu méně abundantních proteinů. SDS-PAGE elektroforéza jednotlivých frakcí odhalila, že hodnota izoelektrického bodu většiny proteinů ve vzorku vnějších membrán je v rozmezí 5,4 až 7. Výsledky detekce glykoproteinů i separace pomocí SDS-PAGE nám dávají lepší přehled o zastoupení proteinů ve frakci vnějších membrán CB53 a jejich případné glykosylaci. Proteiny odpovídající pozitivním reakcím na membránách PVDF byly vyříznuty z SDS-PAGE gelu a poslány na analýzu hmotnostní spektrometrií (MS). Pro

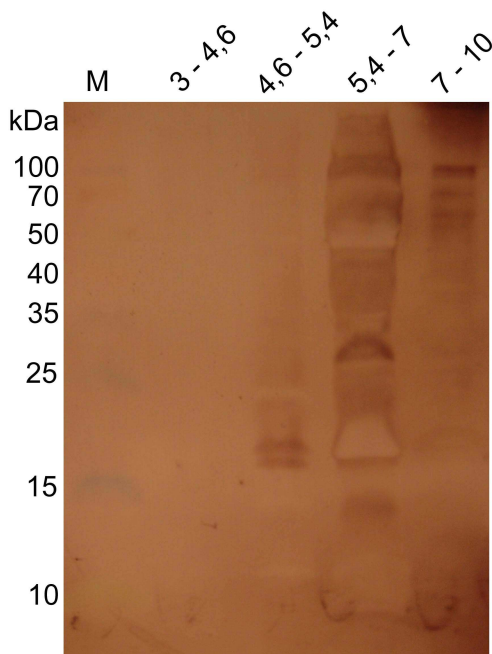


lepší porovnání výsledků získaných lektinoblotem vzorků membrán CB53 a vzorků separovaných izoelektrofokusací uvádím oba výsledky vždy vedle sebe.



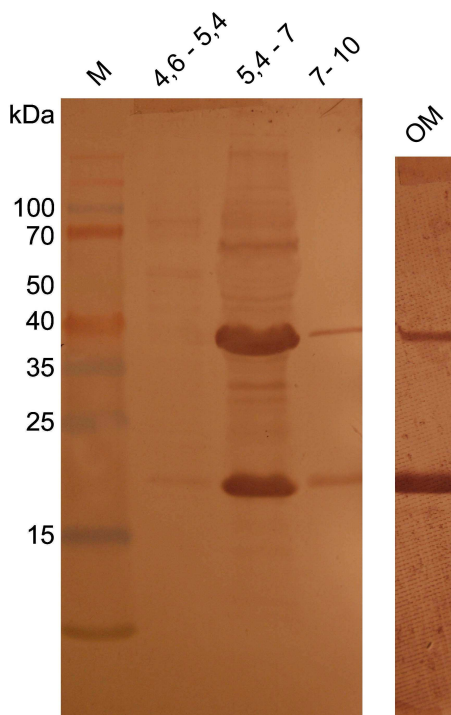
**Obrázek 8. SDS-PAGE vzorků z izoelektrofokuse**

M – proteinový standard, 2 – 12 v obrázku značí proteiny poslané na MS analýzu. Čísla označující jednotlivé vzorky představují rozsah pH podle použitých disků při izoelektrofokusaci. Vzorky vyřezané z tohoto gelu jsou dále v textu označovány kromě čísla písmenem „a“



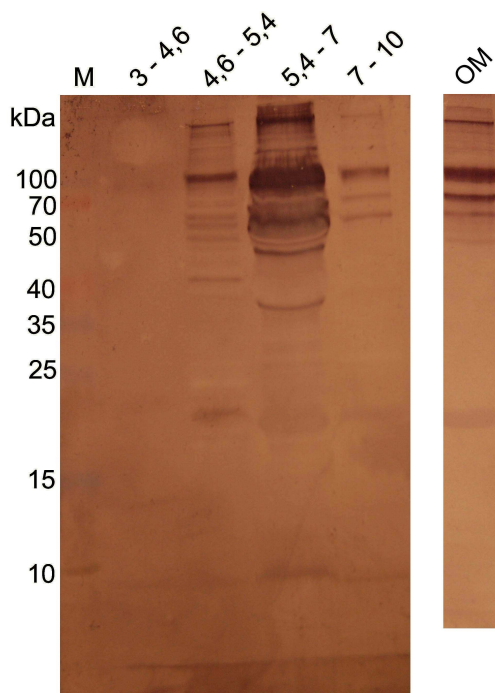
**Obrázek 9. Jodistanová oxidace glykoproteinů vzorcích z izoelektrofokuse**

M – značený proteinový standard, 3 – 10 rozsah pH podle použitých disků při izoelektrofokusaci izolátu CB53



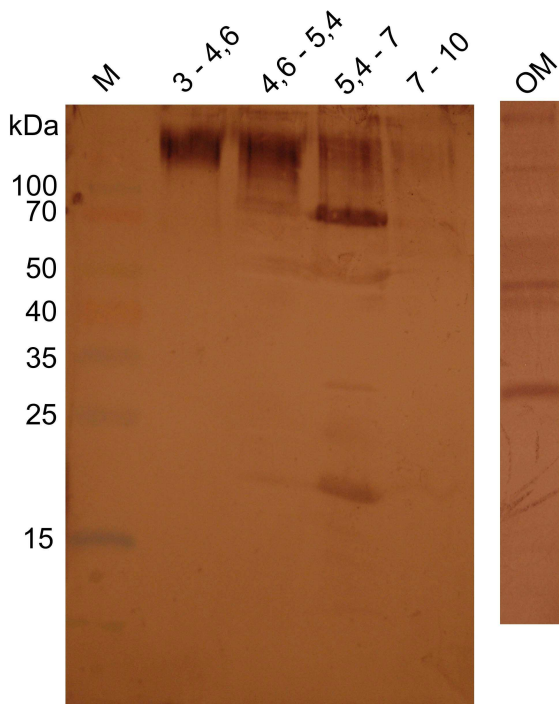
**Obrázek 10. Detekce glykoproteinů pomocí značených lektinů ve vzorcích z izoelektrofokusace, lektin MAA**

M – značený proteinový standard, 3 – 10 rozsah pH podle použitých disků při izoelektrofokusaci, OM – vnější membrány izolátu CB53



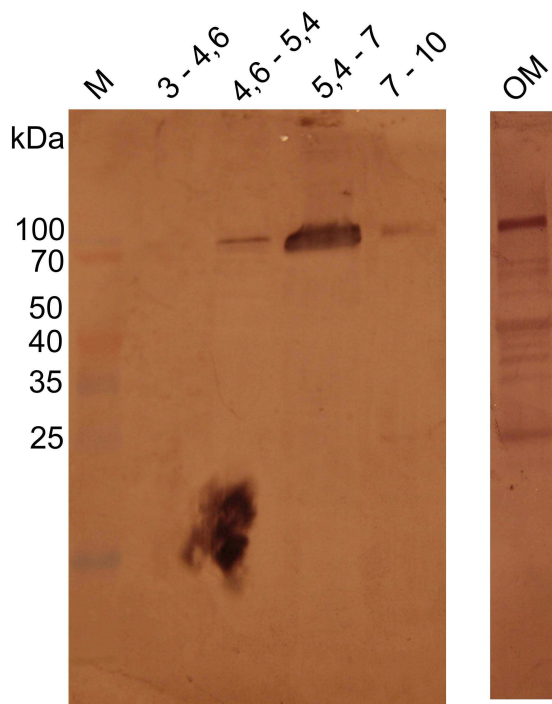
**Obrázek 11. Detekce glykoproteinů pomocí značených lektinů ve vzorcích z izoelektrofokusace, lektin SNA**

M – značený proteinový standard, 3 – 10 rozsah pH podle použitých disků při izoelektrofokusaci, OM – vnější membrány izolátu CB53



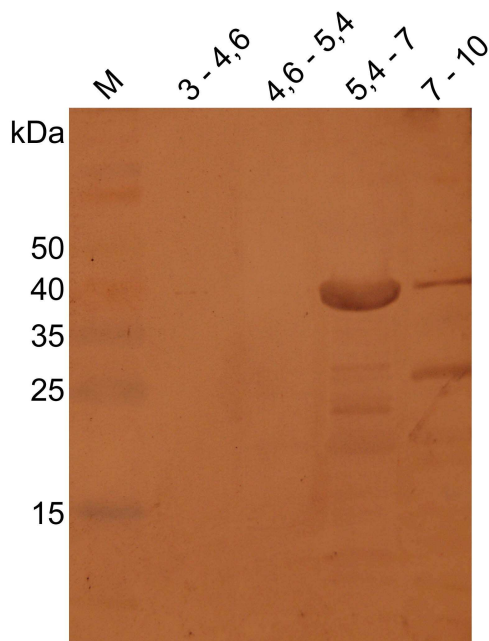
**Obrázek 12. Detekce glykoproteinů pomocí značených lektinů ve vzorcích z ioelektrofokusace, lektin GNA**

M – značený proteinový standard, 3 – 10 rozsah pH podle použitých disků při ioelektrofokusaci, OM – vnější membrány izolátu CB53



**Obrázek 13. Detekce glykoproteinů pomocí značených lektinů ve vzorcích z ioelektrofokusace, lektin DSA**

M – značený proteinový standard, 3 – 10 rozsah pH podle použitých disků při ioelektrofokusaci, OM – vnější membrány izolátu CB53

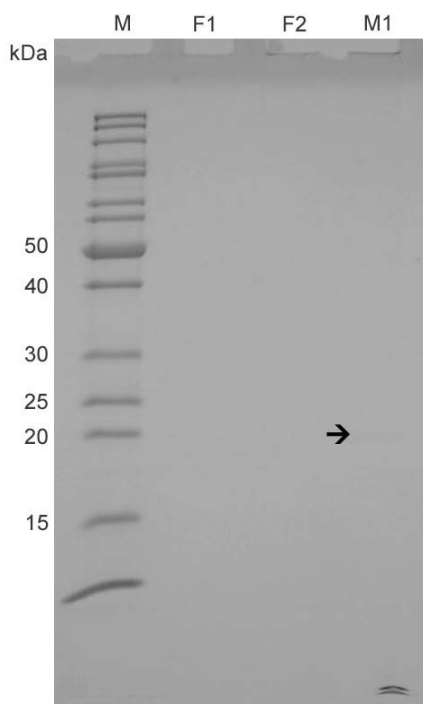


**Obrázek 14. Detekce glykoproteinů pomocí značených lektinů ve vzorcích z izoelektrofokusace, lektin PNA**

M – značený proteinový standard, 3 – 10 rozsah pH podle použitých disků při izoelektrofokusaci

#### **5.4. Afinitní chromatografie vnějších membrán izolátu CB53 *Borrelia burgdorferi* s. s.**

Jako první jsem provedla afinitní chromatografii na koloně obsahující lektin ConA. Barvení proteinů pomocí Coomassie Brilliant Blue vzorků separovaných pomocí SDS-PAGE ale neodhalilo přítomnost purifikovaných proteinů, zřejmě kvůli nízké koncentraci proteinů ve vzorku. Poté jsem tentýž pokus zopakovala s kolonou obsahující lektin SNA. Následná separace jednotlivých vzorků pomocí SDS-PAGE odhalila jediný protein o molekulové hmotnosti 20 kDa ve frakci M1, tedy ve vzorku získaném po aplikaci 0,1 M laktózy (obr. 15). Tento proteinový proužek jsem vyřízla a také poslala na MS analýzu.

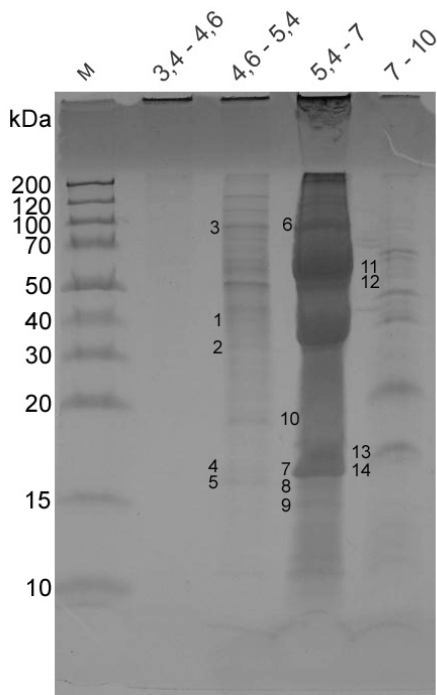


**Obrázek. 15. SDS-PAGE frakcí získaných z afinitní chromatografie využívající lektin SNA**

Afinitní chromatografii byla podrobena frakce vnějších membrán *Borrelia burgdorferi* kmene CB53. M – proteinový standard, F1 – první promývání vzorkovým puforem, F2 – druhé promývání vzorkovým puforem, M1 – první vymývání vzorkovým puforem s 0,1M laktózou. Purifikovaný protein vyřezaný z tohoto gelu je dále v textu označován 1a.

### 5.5. Analýza proteinů hmotnostní spektrometrií (MS)

Pro identifikaci proteinů, které poskytovaly pozitivní reakce při jodistanové oxidaci a při reakcích s lektiny, byly příslušné proužky vyřezány a poslány na analýzu hmotnostní spektrometrií. Pro analýzu byly použity vzorky z periplazmatických bičičků a vnějších membrán z obou kmenů (Obr. 2), vzorky z izoelektrofokusace (Obr. 8 a 16) a z afinitní chromatografie (Obr. 15). Vzorky proteinů, které jsou označené na Obrázku 2 nebyly identifikovány.



**Obrázek 16. SDS-PAGE vzorků z izoelektrofokusace**

M – Proteinový standard, 1 – 14 v obrázku značí proteiny poslané na MS analýzu, 3 – 10 nad obrázkem značí rozsah pH podle použitých disků při izoelektrofokusaci. Vzorky vyřezané z tohoto gelu jsou dále v textu označovány kromě čísla písmenem „b“

Podle získaných MS spekter bylo možno identifikovat vzorek 1a (viz tab. 1) z afinitní chromatografie jako OspC. Identifikovaný peptid představoval pokrytí 6,73% (viz Obr. 17). V spektrech získaných u vzorku 2a (viz tab.1), identifikovaném jako FlaB, bylo nalezeno 47.02% z celkové aminokyselinové sekvence tohoto proteinu (viz Obr. 19). Vzorek 8a (viz tab. 1) byl identifikován jako OspC, pokrytí aminokyselinové sekvence dosahovalo v tomto případě 29.67% (viz obr.21).

**Tab. 1. Výsledky k vzorkům z afinitní chromatografie a izoelektrofokusace (Obrázek 8 a 15)**

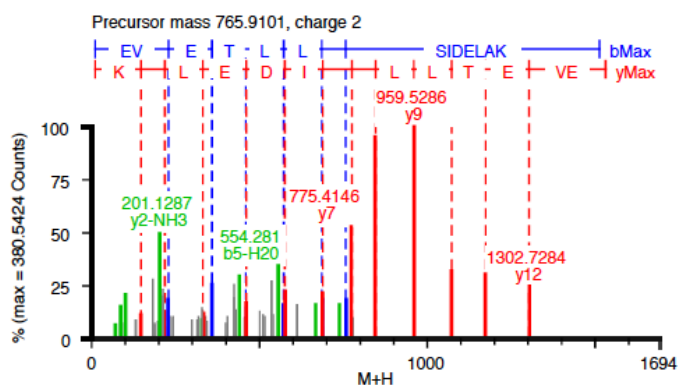
Číslo vzorku	Identifikovaný protein	Pokrytí (%)
1a	OspC	6,7
2a	FlaB	47,03
8a	OspC	29,67

MKKNTLSAILMTLFLFISCNNSGKDGNASANSADESVKGPNLAEISKKITESNA  
 VVLA VKEVETLLASIDELAKAIGQKIESNGGLNADGNQNGSLISGAYSISKLIK  
 QKLSILNSEALKEKIDAAKCCSEAFDTKLKNEHASLGKKDATDDDAKKA~~ILKT~~  
 NVDKTKGADELIKLSGSLESLSKAAQAILANSVKELTSPVVAESP~~KKP~~

**Obrázek 17. Aminokyselinová sekvence proteinu OspC (GenBank ABQ42951.1) identifikovaném ve vzorku 1a (viz Tab. 1)**

Zvýrazněný úsek představuje fragment proteinu, který byl identifikován v MS spektru. Potenciální N-glykosylační místa jsou odlišeny červenou barvou a velikostí písma.

EVETLLASIDELAK



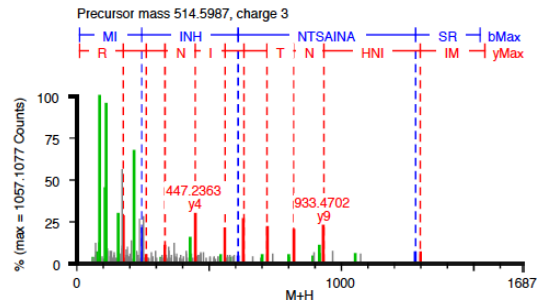
**Obrázek 18. Spektrum MS identifikovaného peptidu vzorku 1a**

MIINHNTSAINASRNGINAANLSKTQEKLSSGYRINRASDDAAGMGVSGKI  
 NAQIRGLSQASRNTSKAINFIOTTEGNLNEVEKVLVVRMKELAVOSGNGTYSD  
ADRSIQIEIEQLTDEINRIADQAQYNQMHMLSNKSASQNVRTAEELGMQP  
AKINTPASLSGSQASWTLRVHVGANQDEAIAVNIYAANVANLFSGEGAQTAQ  
 AAPVQEGVQQEGAQQPAPATAPSQGGVNSPVNVT~~TTTVDANTS~~SLAKIENAIRMI  
 SDQRANLGAFQNRLESIKNSTEYAIENLKASYAQIKDATMTDEVVAATTNSIL  
 TQSAMAMIAQANQVPQYVLSLLR

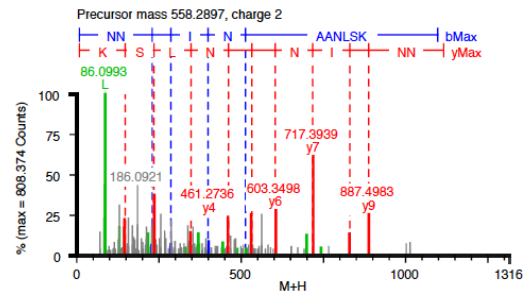
**Obrázek 19. Aminokyselinová sekvence proteinu FlaB (GenBank AAC66541.1) indetifikovaném ve vzorku 2a (viz Tab. 1)**

Zvýrazněné úseky představují fragmenty proteinů, které byly identifikovány v MS spektrech vzorku. Potenciální N-glykosylační místa jsou odlišeny červenou barvou a velikostí písma.

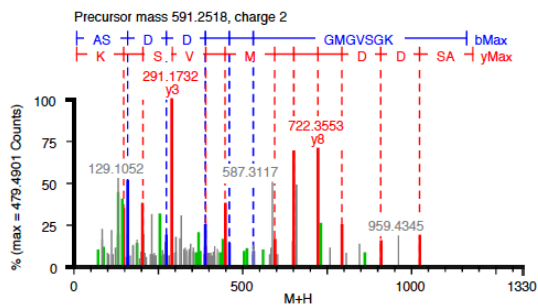
*MIINHNTSAINASR*



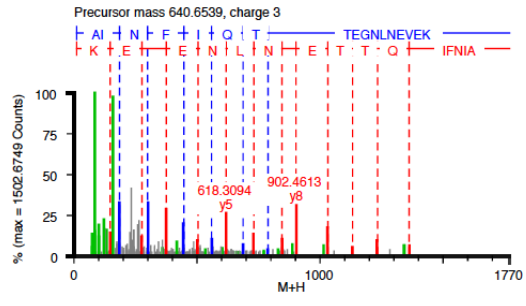
*NNGINAANLSK*



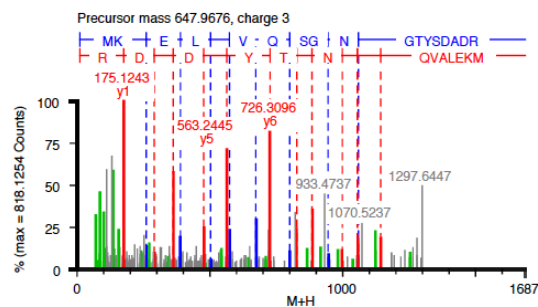
*ASDDAAGMGVSGK*



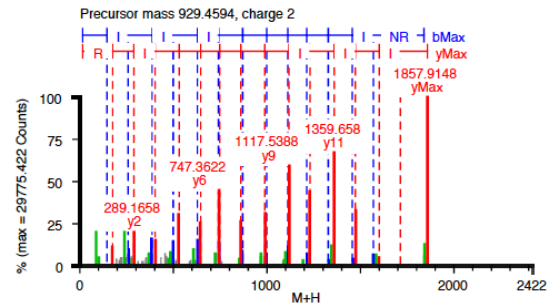
*AINFIQTTEGNLNEVEK*



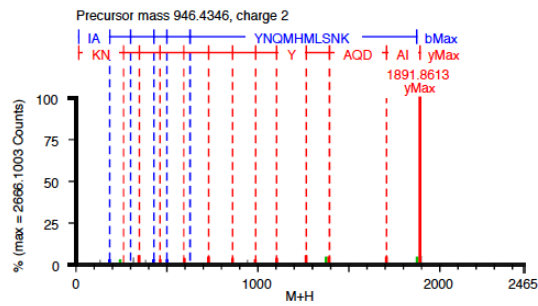
*MKELAVQSGNGTYSADR*



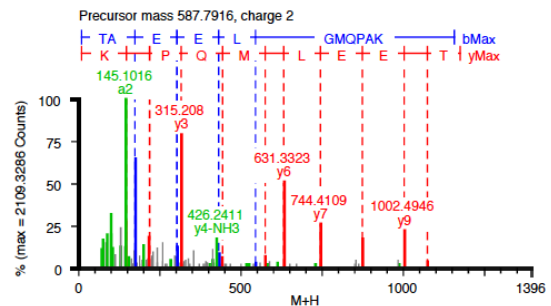
*GSIQIEIEQLTDEINR*



*IADQAQYNQMHLNSK*



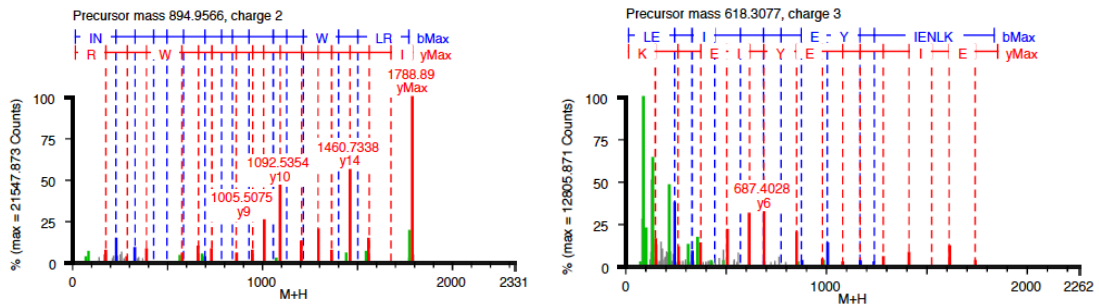
*TAEELGMQPAK*



*INTPASLSGSQASWTLR*

*LESIKDSTEYAIENLK*





Obr. 20. Vybraná MS spektra identifikovaných peptidů ve vzorku 2a (viz Tab.1)

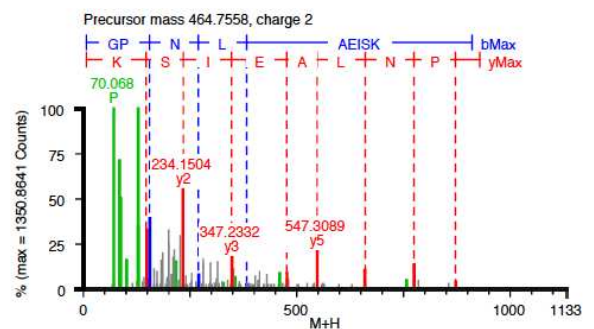
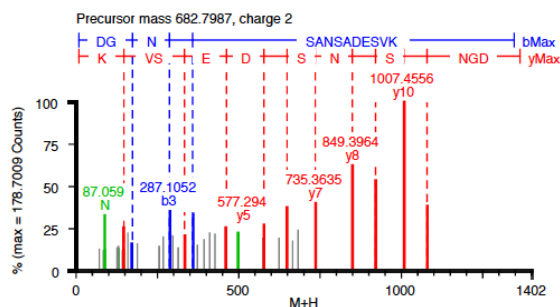
**MKKNTLSAILMTLFLFISCNNSGKDGNASANSADES**VKGP**NLAEISK**KITES**NAVVLAVKEVETLLASIDELAKAIGQKIESNGGLNADGNQNGSLISGAYSISKLI**  
**KQKLSILNSEALKEKIDAAKKCSEAFDCLKNEHASLGKKDATDDDAKKAILK**  
**TNVDKTKGADELIKLSGSLESLSKAAQAILANSVKELTSPVVAESPKP**

Obrázek 21. Aminokyselinová sekvence proteinu OspC (GenBank ABQ42951.1) identifikovaném ve vzorku 8a (viz Tab. 1)

Zvýrazněné úseky představují fragmenty proteinů, které byly identifikovány v MS spektrech vzorku. Potenciální N-glykosylační místa jsou odlišeny červenou barvou a velikostí písma.

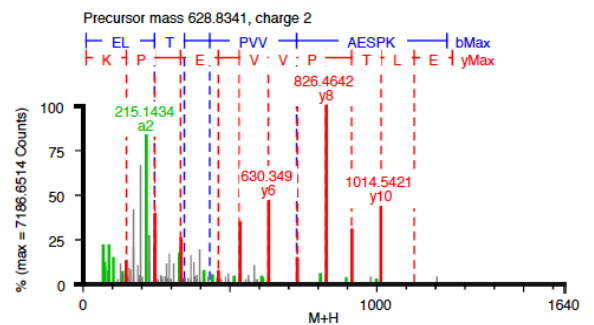
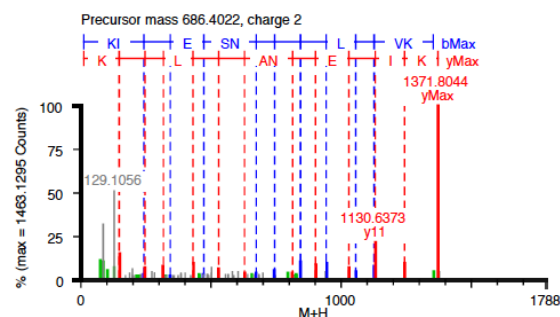
*DGNASANSADES***VK**

*GP***NLAEISK**



*KITESNA***VVLAVK**

*ELTSPVVAESPK*



Obrázek 22. Vybraná spektra MS identifikovaných peptidů vzorku 8a (viz Tab. 1)

Vzorek 2b (viz Tab. 2) byl identifikován MS analýzou jako FlaA s pokrytím 11,14% (viz Obr. 23). Protein označený 6b (viz Tab. 2) byl identifikován jako antigen p83/100 s pokrytím 9% animokyselinové sekvence (viz Obr. 25). Vzorky 7b a 13b (viz Tab. 2) byly shodně určeny jako OspC s pokrytím 15,78% a 22,49% (Obr. 27 a 31). V posledním vzorku číslo 10b, identifikovaném jako BB0238, byly nalezeny peptidy představující 25,39% saminokyselinové sekvence tohoto proteinu (Obr. 29).

**Tab. 2. Výsledky k vzorkům z izoelektrofokusace (obr. 15)**

Číslo vzorku	Identifikovaný protein	Pokrytí (%)
2b	FlaA	11,14
6b	antigen p83/100	9
7b	OspC	15,78
10b	BB0238	25,39
13b	OspC	22,49

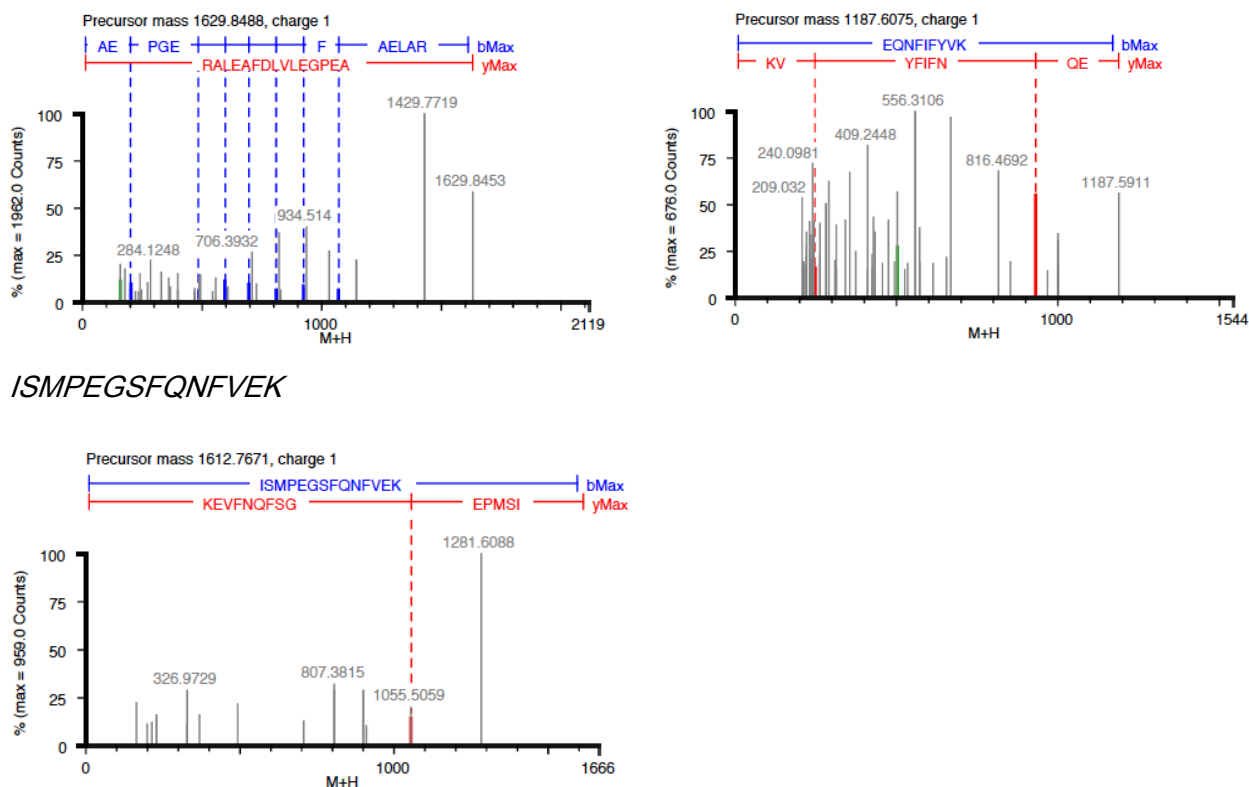
MVYMKRKAKSILFFLLSTVLFAQETDGLAEGSKRAAEPGELVLDFAEELARDPSS  
 TRLDLTNYVDYVYSGASGIVKPEDMVVDLGIN<sup>N</sup>WSVLLTPSARLQAYVKNSV  
 VAPAVVKSESKRYAGDTILGVRVLFPSYSQSSAMIMPPFKIPFYSGESGNQFLGK  
 GLIDNIKTMKEIKVSVYSLGYEIDLEVLFE<sup>N</sup>DMNGMEYAYSMTLKF<sup>N</sup>KGWADLI  
 WSNPNYIP<sup>N</sup>ISSRIKDDVPNYPLASSKMRFKAFRVSKSHSSKEQNFIFYVKDLR  
 VLYDKLSVSDIDSESVFKVYETSGTESLRK<sup>N</sup>KLKAHETFKRVLKLREKISMPEG  
SFONFVEKIESEKPEESSPKN

**Obrázek 23 Aminokyselinová sekvence proteinu FlaA (GenBank AAC67025.1) identifikovaném ve vzorku 2b ( viz Tab. 2)**

Zvýrazněné úseky představují fragmenty proteinu, které byly identifikovány v MS spektru. Potenciální N-glykosylační místa jsou odlišeny červenou barvou a velikostí písma.

*AEPGELVLDFAEELAR*

*EQNFIFYVK*



*ISMPEGSFQNFVEK*

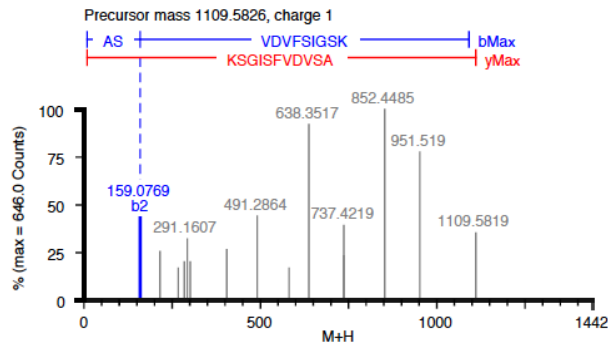
Obrázek 24. Vybraná spektra MS identifikovaných peptidů vzorku 2b (viz Tab. 2)

MKKMLLIFSFFLFLNGFPVSAREVDREKLKDFVNMDLEFVNYKGPYDSTNTYE  
 QIVGIGEFLARPLTNSNSNSSYYGKYFINRFIDDQDKKASVDVFSIGSKSELDSIL  
 NLRRLTGYLKSFYDRSSAELIAKVITIYNAVYRGDLDYYKGFYIEAALKSLS  
 KENAGLSRVYSQWAGKTQIFIPLKKDILSGNIESDIDIDSLVTDKVVAAALLSENE  
 AGVNFARDITDIQGETHKADQDKIDIELDNIHESDSNITETIENLRDQLEKATDE  
 EHKKEIESQVDAKKKQKEELDKKAINLDKAQQKLDSAEDNLDVQRNTVREKIQ  
 EDINEINKEKNLPGDVSSPKVDKQLQIKESLEDLQEQLKETGDENQKREIEKQ  
 IEIKKSDEKLLKSKDDKASKDGKALDLRELNSKASSKEKSKAKEEITKGKSQ  
 KSLGDLNNDENLMMPEDQKLPEVKKLDSKEFKPVSEVEKLDKIFKSNNNVGEL  
 SPLDKSSYKDIDSKEETVKNKDVNLQKTKPQVKDQVTSLNEDLTTMSIDSSSPVF  
 LEVIDPITNLGTLQLIDLNTGVRLKESTQQGIQRYGIYEREKDLVVIKMDSGKAK  
 LQILDKLENLKVVSESNFEINKNSSLYVDSKMILVAVRDKDSSNDWRLAKFSP  
KNLDEFILSENKIMPFTSFSVRKNFIYLQDEFKSLVILDVNTLKKVK

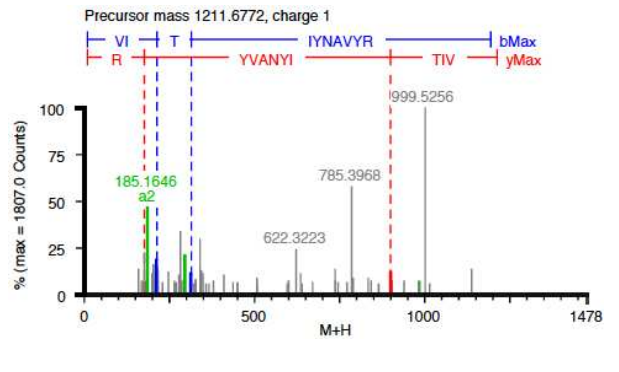
Obrázek 25. Aminokyselinová sekvence antigenu p83/100 (GenBank AAC67090.1) identifikovaném ve vzorku 6b (viz Tab. 2)

Zvýrazněné úseky představují fragmenty proteinů, které byly identifikovány v MS spektrech vzorku. Potenciální N-glykosylační místa jsou odlišeny červenou barvou a velikostí písma.

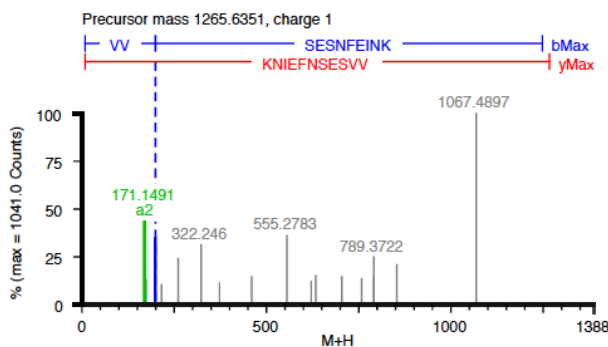
ASVDVFSIGSK



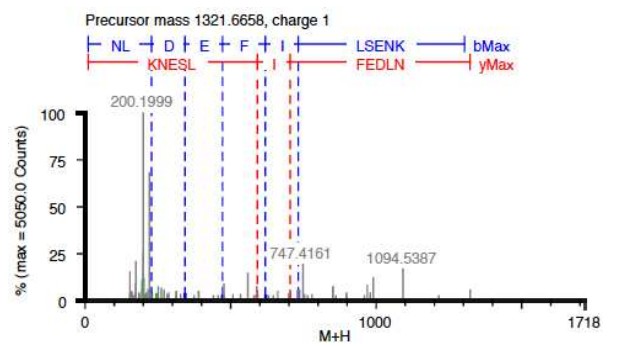
VITIYNAVYR



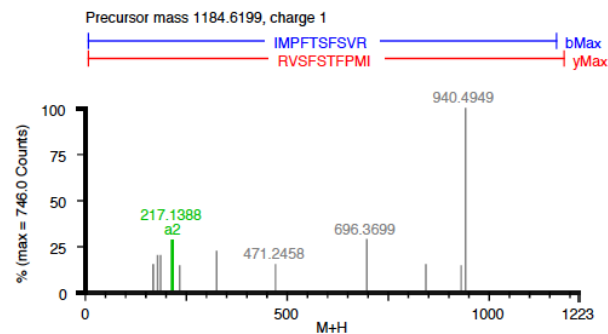
VVSESNFEINK



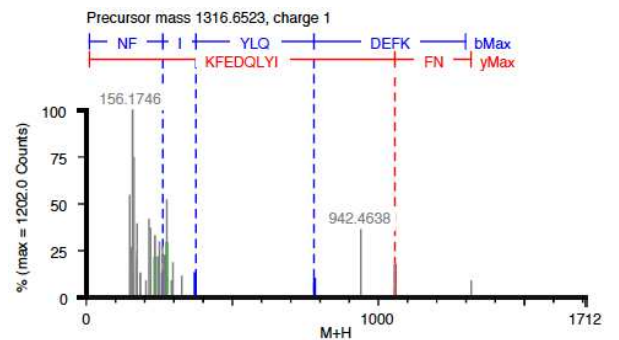
NLDEFILSENK



IMPFTSFSVR



NFIYLQDEFK



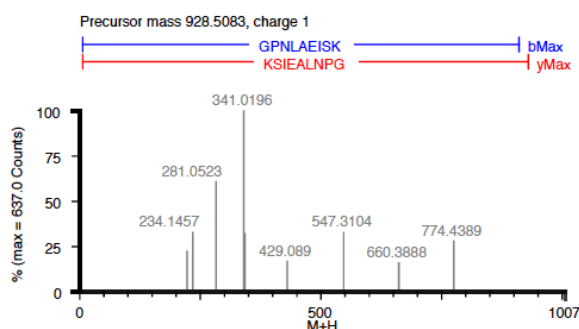
Obrázek 26. Vybraná spektra MS identifikovaných peptidů vzorku 6b (viz Tab. 2)

MKKNTLSAILMTLFLFISCNNSGKDGNASANSADESVK**GPNLAEISKKITESNA**  
**VVLA**VKEVETLLASIDELAKAIGQKIESNGGLNADGNQ**NGSLISGAYSISKLIKQ**  
 KLSILNSEALKEKIDAAKCKSEAFDCLKNEHASLGKKDATDDDAKKAILKTN  
 VDKTKGADELIKLSGSLESLSKAAQAILANSVK**ELTSPVVAESP**KKP

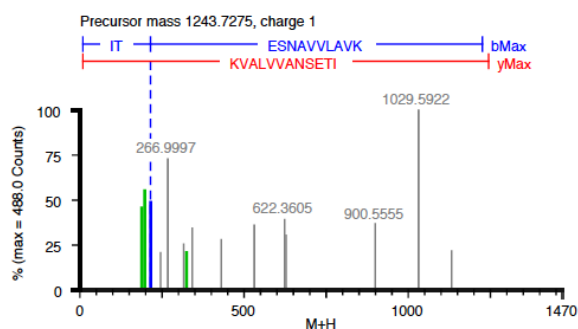
Obrázek 27. Aminokyselínová sekvence proteinu OspC (GenBank ABQ42951.1) identifikovaném ve vzorku 7b (viz Tab. 2)

Zvýrazněné úseky představují fragmenty proteinů, které byly identifikovány v MS spektru. Potenciální N-glykosylační místa jsou odlišeny červenou barvou a velikostí písma.

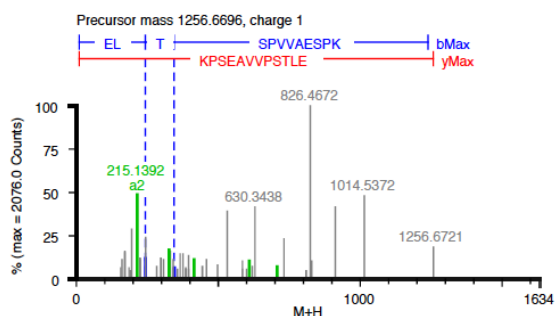
### GPNLAEISK



### ITESNAVVLAVK



### ELTSPVVAESPK



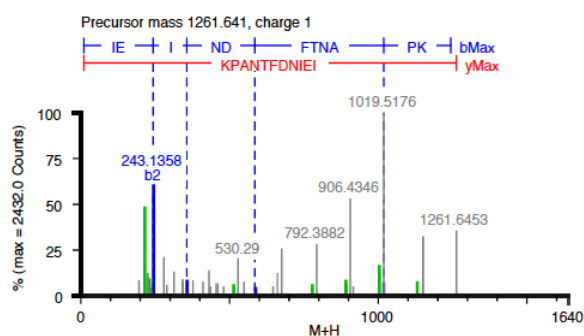
Obrázek 28. Vybraná spektra MS identifikovaných peptidů vzorku 7b (viz Tab. 2)

MRRLFLLYILCSFVFLNLFAQGSSSYIDKQKELAIIFYEYVQRYINVGKIKKGGKL  
FQAKALKIYPDLKKGFDIKLAVKELDARIKDDNPKVVMLEDIKLEEIPGIVHEKI  
**EINDFTNAPK**IEYIAQRERSKNQDKIIKFQFGKFARALISR**NFDLFDSVIADKVN**  
**VMGQFESKNDFISTLSSASSK**ADADELEYLSVDDYYDLKSLKISK**SNDT**SFAV  
**NVNAK**KNDVTKNFPFWKER**QTLIFT**EDDNNWFLSSIN

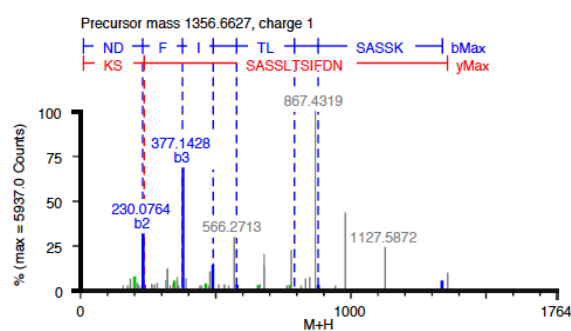
Obrázek 29. Aminokyselínová sekvence proteinu BB0238 (Genbank NP\_212372.1) identifikovaném ve vzorku 10b (viz Tab. 2)

Zvýrazněné úseky představují fragmenty proteinů, které byly identifikovány v MS spektrech vzorku. Potenciální N-glykosylační místa jsou odlišeny červenou barvou a velikostí písma.

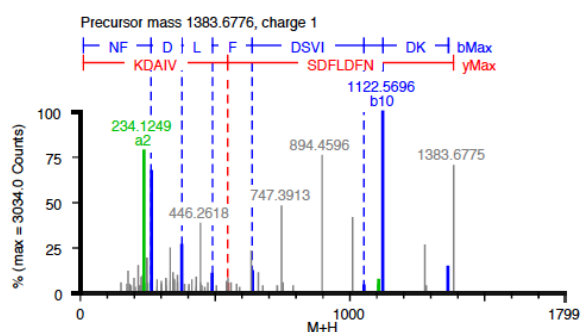
*IEINDFTNAPK*



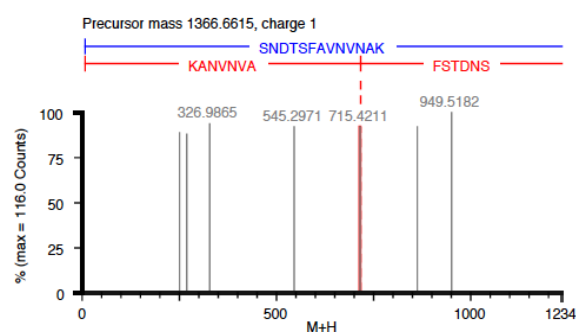
*NDFISTLSSASSK*



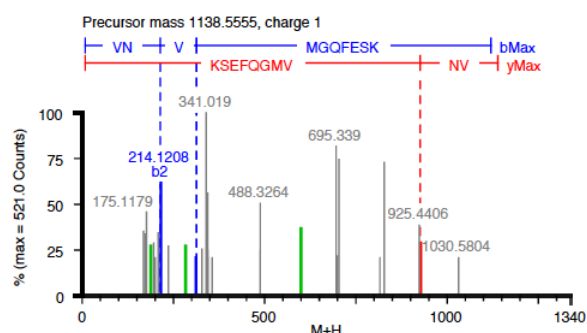
*NFDLFDSVIADK*



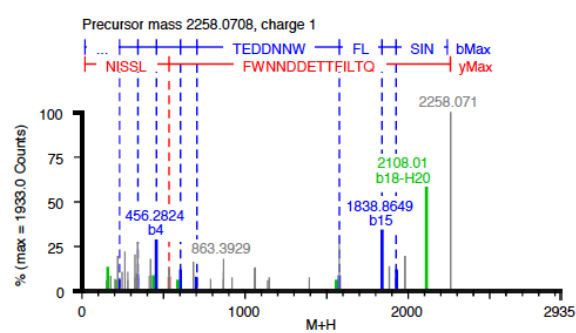
*SNDTSFAVNVNAK*



*VNVMGQFESK*



*QTLIFTTEDDNNWFLSSIN*



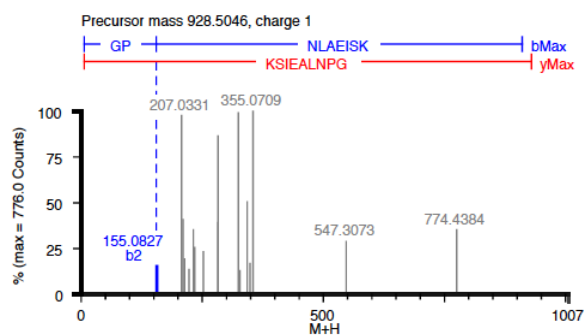
Obrázek 30. Vybraná spektra MS identifikovaných peptidů vzorku 10b (viz Tab. 2)

MKKNTLSAILMTLFLFISCNNSGKDGNASANSADESVKGPNLAEISKKITESNA  
VVLAVKEVETLLASIDELAKAIGQKIESNGGLNADGNQNGSLISGAYSISKLIK  
 QKLSILNSEALKEKIDAAKKCSEAFDKLNEHASLGKKDATDDDAKKAILKT  
 NVDKTKGADELIKLSGSLESLSKAAQAILANSVKELTSPVVAESPPKP

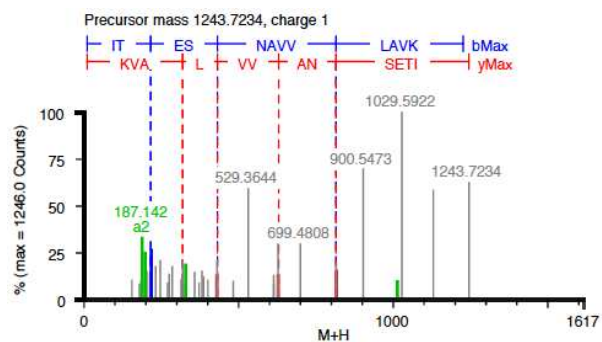
Obrázek 31. Aminokyselinová sekvence proteinu OspC (GenBank ABQ42951.1) identifikovaném ve vzorku 13b (viz Tab. 2)

Zvýrazněné úseky představují fragmenty proteinů, které byly identifikovány v MS spektrech vzorku. Potenciální N-glykosylační místa jsou odlišeny červenou barvou a velikostí písma.

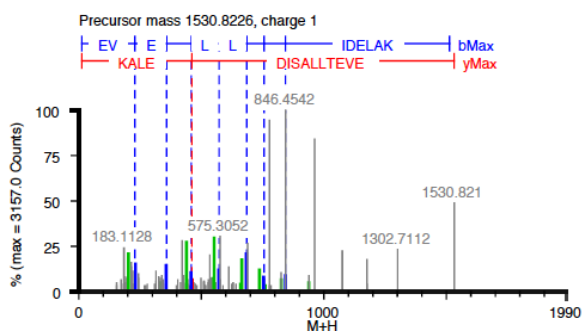
*GPNLAEISK*



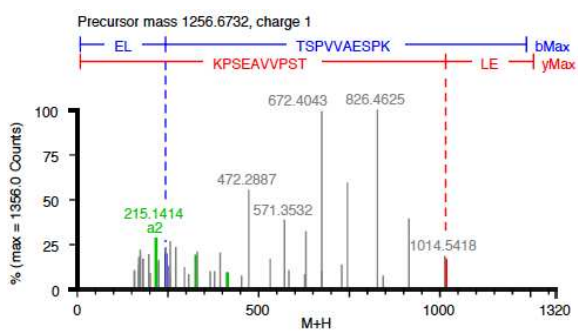
*ITESNAVVLAVK*



*EVETLLASIDELAK*



*ELTSPVVAESPK*



Obrázek 32. Vybraná spektra MS identifikovaných peptidů vzorku 13b (viz Tab. 2)

## 6. Diskuse

Ačkoli se u řady spirochét už dlouhou dobu předpokládá přítomnost glykosylace jejich povrchových proteinů, dosud byla tato modifikace přesvědčivě prokázána jen u několika z nich. O několika spirochétách byly publikovány studie prokazující glykosylaci jejich bičíkových proteinů. Už v roce 1988 v práci Brahamsha a Greenberga byla popsána vazba bičíkových proteinů bakterie *Spirochaeta aurantia* na lektin Concanavalin A (27). O pět let později byla prokázána glykosylace i u další spirochéty *Serpulina hyodysenteriae* (19). Enzymatická deglykosylace poskytla důkazy o přítomnosti glykokonjugátů u lidského patogena *Treponema pallidum* (49). Dosavadní studie o glykosylaci spirochéty Lymské boreliózy však nejsou jednotné (10, 28, 44), a ačkoli v genomu spirochéty *Borrelia burgdorferi* u kmene B31 nebyly nalezeny žádné známé glykosyltransferázy (57), nebyla dosud vyvrácena možnost, že by proteiny této spirochéty mohly být glykosylovány. Cílem této práce bylo proto podat důkazy o glykosylaci alespoň některých z mnoha povrchových proteinů *Borrelia burgdorferi*.

Jodistanová oxidace prokázalo přítomnost velkého množství glykokonjugátů ve vzorcích. Výraznou reakci poskytovala celá řada velkých proteinů nad 60 kDa. Lektinobloting opakovaně detekoval protein ve velikosti asi 100 kDa. Odpovídající protein byl analyzován hmotnostní spektrometrií a podařilo se jej identifikovat jako antigen p83/100. V aminokyselinové sekvenci tohoto proteinu jsou tři potenciální N-glykosylační místa. Při použití značených lektinů DSA, GNA a MAA je lépe vidět glykosylace u vzorků frakcionovaných izoelektrofokusací. Tento protein ovšem poskytoval nejsilnější reakci se značeným lektinem SNA, což by mohlo znamenat přítomnost terminální kyseliny sialové na modifikujících glykanech (52). Kyselina sialová, prezentovaná na povrchu bakterie, je jedním z prostředků, jak se vyhnout imunitní odpovědi savčího hostitele. Bakterie takto totiž napodobuje savčí buňky. Tato strategie byla zatím prokázána u patogenů *Escherichia coli* K1, *Neisseria meningitidis*, B skupiny streptokoků, *Pasteurella hemolytica*, *Haemophilus ducreyi*, *C. jejuni* i u nepatogenní bakterie *Clostridium thermocellum*. Tyto bakterie jsou schopné syntetizovat kyselinu sialovou (shrnutí v 58, 59), ovšem bakterie jako např. *Haemophilus influenzae* nebo lidský symbiont *Bacteroides thetaiomicron* hojně využívá i možnost získat tento sacharid ze svého okolí (shrnutí v 60), což by mohl být i



případ borelií. V podrobnější analýze by mohlo být zajímavé ověřit způsob glykosylace tohoto dosud málo prozkoumaného proteinu.

Další protein, který byl výrazně rozeznáván lektiny, má molekulovou hmotnost asi 40 kDa. Silně reagoval zejména s lektiny MAA a PNA. Také v případě značených lektinů SNA a DSA byl tento protein slabě detekován. Oxidace jodistanem bohužel žádný takový protein nedetekovala. Pozitivní reakce značených lektinů MAA a SNA by opět mohla znamenat přítomnost kyseliny sialové (52, 53). Diskutabilní ovšem je, zda je tato kyselina sialová výsledkem glykosylace proteinů spirochétou, nebo zda tento glykokonjugát pochází z BSK-H médiu, podobně jako některé sialované proteiny identifikované v práci Vancová a kol. (56), Štěrba a kol. (44). V těchto pracích byly publikovány výsledky lektinového afinolotingu, které poskytly řadu pozitivních výsledků, ovšem pouze u glykanů lokalizovaných na vnitřní straně vnější membrány borelie lze předpokládat, že nepochází z kultivačního média.

Vzhledem k pozitivní reakci dalšího značeného lektinu PNA bychom mohli očekávat navázanou galaktózu (1-3)N-acetylgalaktosamin nebo i O-glykosylaci (54). O-glykany již byly studovány u několika druhů bakterií a ukazuje se, že jejich škála je neuvěřitelně pestrá, mnohem pestřejší než u eukaryot. Glykosylace pili u bakterií *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis* a u *Pseudomonas aeruginosa*, stejně glykosylace jiných struktur u bakterií *Helicobacter pylori* a *Campylobacter coli* plní řadu důležitých funkcí souvisejících se správnou funkcí pili a bičků, kolonizací hostitele nebo virulencí (38). O-glykosylace u borelií by ovšem musela být potvrzena analýzou MS nebo afinitní chromatografií, a pak by bylo třeba dále studovat mechanismus a význam glykosylace u těchto spirochét.

Velikost tohoto detekovaného proteinu kolem 40 kDa by mohla odpovídat bičíkovému proteinu FlaB, což potvrdila i analýza hmotnostní spektrometrií. Aminokyselinová sekvence tohoto proteinu obsahuje 7 potenciálních glykosylačních míst, z nichž několik se nacházelo přímo na identifikovaných peptidech. Glykosylace tohoto proteinu byla podrobně analyzována v práci Štěrby a kol. (44). Dle známé molekulové hmotnosti FlaB byly pomocí hmotnostní spektrometrie analyzovány odpovídající proteiny vyřezány z SDS-PAGE gelu. U tohoto proteinu glykosylace nebyla potvrzena; přítomnost modifikovaných molekul FlaB mimo zkoumanou oblast molekulových hmotností ovšem nebyla sledována. Z publikovaných výsledků je ovšem patrné, že

mimo zkoumané rozmezí byl shodně s mými výsledky obarven protein o přibližné velikosti 40 kDa pomocí lektinu MAA. V publikované studii byl studován kmen B31 na rozdíl od mnou sledovaného izolátu CB53, což může být také zdrojem rozdílných výsledků.

Zajímavé výsledky byly získány MS analýzou proteinu izolovaného afinitní chromatografií, který byl určen jako OspC. V aminokyselinové sekvenci toho proteinu jsou známy 3 potenciální glykosylační místa. V MS spektrech se podařilo identifikovat jen jeden peptid odpovídající proteinu OspC, což nepostačuje pro jednoznačnou identifikaci proteinů při analýze MS. Identifikovaný protein ale odpovídá velikostně proteinům z dalších vzorků, které byly také identifikovány jako OspC (viz vzorky 7, 13, Tab. 2 a vzorek 8, Tab. 1). Všechny tyto vzorky získané z izolátu CB53 dávaly obdobné reakce při afinitním barvení pomocí značených lektinů (viz Obr. 4, 5, 9, 10, 11, 12, 14). Zejména značený lektin MAA reagoval s proteinem o velikosti asi 20 kDa velice výrazně. Schopnost tohoto proteinu vázat nejlépe MAA a SNA by poukazovala opět na přítomnost zbytku kyseliny sialové (52, 53). V souladu s těmito závěry jsou i výsledky z afinitní chromatografie, jelikož tento protein byl izolován právě lektinem SNA. Glykosylace proteinu OspC nebyla doposud prokázána, nicméně tato práce by mohla poskytnout předběžné výsledky k dalším analýzám.

Tato práce poukázala na možnou přítomnost glykosylace u boreliárních proteinů u izolátu CB53 spirochét *B. burgdorferi*. Schopnost borelií glykosylovat proteiny bude třeba dále potvrdit.

## **7. Seznam použité literatury**

1. Stottlemeyer J. E., 1999: Lyme disease: case report and review. *Clin. Eye Vis. Care.* 11: 89 – 95.
2. Goldstein S. F., Charon N. W., Kreiling J. A., 1994: *Borrelia burgdorferi* swims with a planar waveform similar to that of eucaryotic flagella. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 3433 – 3437.
3. Sal M. S., Li C., Motalab M. A., Shibata S., Aizawa S., Charon N. W., 2008: *Borrelia burgdorferi* regulates its motility gene and has an intricate flagellar hook – basal body structure. *J. Bacteriol.* 190: 1912 – 1921.
4. Barbour A.G., Hayes S.F., 1986: Biology of *Borrelia* species. *Microbiol. Rev.* 50: 381 – 400.
5. Grubhoffer L., Golovchenko M., Vancová M., Zacharovová-Slavíčková K., Rudenko N., Oliver J. H., 2005: Lyme borreliosis: insight into-/host-borrelia relations. *Folia Parasitol.* 52: 279-294.
6. Demaerschalck I., Messaud A. B., Kesel M., Hoyois B., Lobet Y., Hoet P., Bigaignon G., Bollen A., Godfroid E., 1995: Simultaneous presence of different *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in biological fluids of Lyme disease patients. *J. Clin. Microbiol.* 33: 602-608.
7. Pachner A. R., 1989: Neurologic manifestation of Lyme disease, the new „great imitator“. *Rev. Infect. Dis.* 11: 1482-1486.
8. Collares-Pereira M., Couceiro S., Franca I., Kurtenbach K., Schäfer S. M., Vitorino L., Goncalves L., Baptista S., Vieira M. L., Cunha C., 2004: First isolation of *Borrelia lusitaniae* from a human patient. *J. Clin. Microbiol.* 42: 1316-1318.
9. Richter D., Postic D., Sertour N., Livey I., Matuschka F-R., Baranton G., 2006: Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 873-881
10. Sambri V., Stefanelli C., Cevenini R., 1992: Detection of glycoproteins in *Borrelia burgdorferi*. *Arch. Microbiol.* 157: 205 – 208.
11. Li H., Dunn J. J., Luft B. J., Lawson C. L., 1997: Crystal structure of Lyme disease antigen outer surface protein A complexed with an Fab. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 3584-3589.
12. Yang X. F., Pal U., Alani S. M., Fikrig E., Norgard M. V., 2004: Essential role for OspA/B in the life cycle of the Lyme disease spirochete. *J. Exp. Med.* 199(5): 603-6.
13. Schwan T. G., Piesman J., Golde W. D., Dolan M. C., Rosa P. A., 1995: Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 2909-2913.
14. Gilbert M. A., Morton E. A., Bundle S. F., Samuels D. S., 2007: Artificial regulation of Osp C expression in *Borrelia burgdorferi*. *Mol. Microbiol.* 63:1259-73.
15. Stewart P. E., Xiaohui W., Bueschel D. M., Clifton R. C., Grimm D., Tilly K., Carroll J. A., Weis J. J., Rosa P. A., 2006: Delineation the requirement for the *Borrelia burgdorferi* virulence factor OspC in the mammalian host. *Infect. Immun.* 74: 3547-3553.
16. Pal U., Xiaofeng Y., Manchuan Ch., Bockenstedt L. K., Anderson J. F., Flavell R. A., Norgard M. V., Fikrig E., 2004: OspC facilitates *Borrelia burgdorferi* invasion of *Ixodes scapularis* salivary glands. *J. Clin. Invest.* 113: 220-230.
17. Postic D., Ras N. M., Lane R. S., Henderson M., Baranton G., 1998: Expanded diversity among Californian *Borrelia* isolates and description of *Borrelia bissettii* sp. nov. (Formerly *Borrelia* group DN127). *J. Clin. Microbiol.* 36: 3497-3504.

18. Herzberger P., Siegel C., Skerka C., Fingerle V., Schulte-Spechtel U., van Dam A., Wilske B., Brade V., Zipfel P. F., Wallich R., Kraiczy P., 2007: Human pathogenic *Borrelia spielmanii* sp. nov. resists complement-mediated killing by direct binding of immune regulators factor H and factor H-like protein 1. *Infect. Immun.* 75: 4817–4825.
19. Li Z., Dumas F., Dubreuil D., Jacques M., 1993: A species-specific periplasmic flagellar protein of *Serpulina hyodysenteriae*. *J. Bacteriol.* 175: 8000-8007.
20. Norris S. J., Carter C. J., Howell J. K., Barbour A. G., 1992: Low-passage-associated proteins of *Borrelia burgdorferi* B31: characterization and molecular cloning of OspD, a surface-exposed, plasmid-encoded lipoprotein. *Infect. Immun.* 60:4662-4672.
21. Palmer N., Fraser C., Casjens S., 2000: Distribution of twelve linear extrachromosomal DNAs in natural isolates of Lyme disease spirochetes. *J. Bacteriol.* 182:2476-2480.
22. Ojaimi C., Brooks C., Casjens S., Rosa P., Ellas A., Barbour A., Jasinskas A., Benach J., Kantona L., Radolf J., Calmano M., Skare J., Swingle K., Akins D., Schwartz D., 2003: Profiling of temperature-induced changes in *Borrelia burgdorferi* genes expression by using whole genome arrays. *Infect. Immun.* 71:1689-1705.
23. Becker M., Bunikis J., Lade B. D., Dunn J. J., Barbour A. G., Lawson C. L., 2005: Structural investigation of *Borrelia burgdorferi* OspB, a bactericidal Fab target. *J. Biol. Chem.* 280: 17363 – 17370.
24. Li X., Neelakanta G., Liu X., Beck D. S., Kantor F. S., Fish D., Anderson J. F., Fikrig E., 2007: Role of Outer surface protein D in the *Borrelia burgdorferi* life cycle. *Infect. Immun.* 75:4237-4244.
25. Lam T. T., Nguyen T. K., Montgomery R. R., Kantor F., Fikrig E., Flavell R. A., 1994: Outer surface protein E and F of *Borrelia Burgdorferi* the agent of Lyme disease. *Infect. Immun.* 62: 290-298.
26. Moens S., Vanderleyden J., 1997: Glycoproteins in prokaryotes. *Arch. Microbiol.* 168: 169-175.
27. Brahamsha B., Greenberg E. P., 1988: Biochemical and cytological analysis of the complex periplasmic flagella from *Spirochaeta aurantia*. *J. Bacteriol.* 170: 4023-4032.
28. Ge Y., Li C., Corum L., Slaughter C. A., Charon N. W., 1998: Structure and expression of the FlaA periplasmic flagellar protein of the *Borrelia burgdorferi*. *J. Bacteriol.* 180:2418-2425.
29. Coleman J. L., Benach J. L., Beck G., Habicht G. S., 1986: Isolation of the outer envelope from *Borrelia burgdorferi*. *Zentralbl. Bakteriolog. Microbiol. Hyg.* 263:123-126.
30. Kryuchevnikov V. N., 1951: Protective response of *Ixodoidea* hemocytes. *Mod. Acarol.* 1:331–334
31. Munderloh U. G., Kurtii T. J., 1995: Cellular and molecular interrelationships between tick and prokaryotic tick-borne pathogens. *Ann. Rev. Entomol.* 40: 221-43.
33. Anguita J., Hedrick M. N., Fikrig E., 2002: Adaptation of *Borrelia burgdorferi* in the tick and the mammalian host. *FEMS Microbiol. Rev.* 27: 493-504.
34. Helwage J., Meri T., Heikila T., Alitato A., Panelius J., Lahdenne P., Seppala I. J., Meri S., 2001: The complement regulator factor H binds to the surface protein OspE of *Borrelia burgdorferi*. *J. Biol. Chem.* 278: 8427- 8435.
35. Stevenson S., El-Hage N., Hines M. A., Miller J. C., Babb K., 2001: Differential binding of host complement inhibitor factor H by *Borrelia burgdorferi* Erp surface protein: a possible mechanism underlying the expansive host range of Lyme disease spirochetes. *Infect. Immun.* 70: 491- 497.
36. Lybecker M.C., Samuels D.S., 2007: Temperature induced regulation of RpoS by a

- small RNA in *Borrelia burgdorferi*. Mol. Microbiol. 64: 1075 – 1089.
37. Hossain H., Wellensiek H. J., Geyer R., Lochnit G., 2001: Structural analysis of glycolipids from *Borrelia burgdorferi*. Biochimie. 83: 683 – 92.
  38. Abu-Qarn M., Echler J., Sharon N., 2008: Not just for Eukarya anymore: protein glycosylation in *Bacteria* and *Archea*. Curr. Opin Struct. Biol. 18: 544 – 550.
  39. Aeschlimann A., Chamont A., Gigon F., Jeannert J. P., Kessler D., Walther C., 1986: *Borrelia burgdorferi* in Switzerland. Zentralbl. Bacteriol. Microbiol. Hyg. 263: 450 – 458.
  40. Matuschka F. R., Fisher P., Heiler M., Richter D., Spielman A., 1992: Capacity of European animals as reservoir hosts for the Lyme disease spirochete. J. Infect. Dis. 165: 479 – 483.
  41. Hovmark A., Jaenson T. G. T., Asbrink E., Forsman A., Jansson E., 1988: First isolations *Borrelia burgdorferi* from rodents collected in northern Europe. Acta. Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B. 96: 917 – 920.
  42. Tälleklint L., Jaenson T. G. T., 1993: Maintenance by hares of European *Borrelia burgdorferi* in ecosystem without rodents. J. Med. Entomol. 30: 273 – 276.
  43. Pal U., Li X., Wang T., Montgomery R. R., Ramamoorthi N., deSilva A. M., Bao F., Yang X., Pypaert M., Pradhan D., Kantor F. S., Telford S., Anderson J. F., Fikrig E., 2004: TROSPA, an *Ixodes scapularis* receptor for *Borrelia burgdorferi*. Cell. 119: 457 – 468.
  44. Štěrba J., Vancová M., Rudenko N., Golovchenko M., Tremblay T. L., Kelly J. F., MacKenzie C. R., Logan S. M., Grubhoffer L., 2008: Flagellin and outer surface proteins from *Borrelia burgdorferi* are not glycosylated. J. Bacteriol. 190: 2619- 2623.
  45. Liang F. T., Nelson F. K., Fikrig E., 2002: Molecular adaptation of *Borrelia burgdorferi* in the murine host. J. Exp. Med. 196: 275 – 280.
  46. Anguita J., Hedrick M. N., Fikrig E., 2003: Adaptation of *Borrelia burgdorferi* in the tick and the mammalian host. FEMS Microbiol. Rev. 27: 493 - 504
  47. Towbin H., Staehelin T., Gordon J., 1979: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to microcellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 4350 – 4354.
  48. Venable A., Mitalipova M., Lyons I., Jones K., Shin S., Pierce M., Stice S., 2005: Lectin binding profiles of SSEA-4 enriched, pluripotent human embryonic stem cell surfaces. BMC Dev. Biol. 5:15.
  49. Wyss C., 1998: Flagellins, but not endoflagellar sheath proteins of *Treponema pallidum* and of pathogen – related oral spirochetes are glycosylated. Infect. Immun. 66: 5751 – 5754.
  50. Bradford M. M., 1976: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248 – 254.
  51. <http://en.wikipedia.org/wiki/Borrelia>.
  52. Shibuya N., Goldstein I. J., Broekaert W. F., Nsimba-Lubaki M., Peeters B., and Peumans W. J., 1987: The elderberry (*Sambucus nigra L.*) bark lectin recognizes the Neu5Ac(alpha 2-6)Gal/GalNAc sequence. J. Biol. Chem. 262: 1596 -1601.
  53. Wang W. C., Cummings R. D., 1988: The immobilized leucoagglutinin from the seeds of *Maackia amurensis* binds with high affinity to complex-type Asn-linked oligosaccharides containing terminal sialic acid-linked alpha-2,3 to penultimate galactose residues. J. Biol. Chem. 263: 4576-4585.
  54. Goldstein I. J., Hayes C. E., 1978: The lectins: Carbohydrate-binding proteins of plants and animals. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 35: 127 - 340

55. Brooks C. S., Vuppala S. R., Jett A. M., Akins D. R., 2005: Identification of *Borrelia burgdorferi* outer surface proteins. *Infect. Immun.* 74: 296 - 304.
56. Vancová M., Nebesářová M., Grubhoffer L., 2005: Lectin-binding characteristic of a Lyme Borreliosis spirochete *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. *Fol. Microbiol.* 50: 229 – 238.
57. Fraser C. M., Casjens S., Huang W., Sutton G. G., Clayton R., Lathigra R., White O., Ketchum K. A., Dodson R., Hickey E. K., Gwinn M., Dougherty B., Tomb J.-F., Fleischmann R. D., Richardson D., Peterson J., Kerlavage A. R., Quackenbush J., Salzberg S., Hanson M., van Vugt R., Palmer N., Adams M. D., Gocayne J., Weidman J., Utterback T., Watthey L., McDonald L., Artiach P., Bowman C., Garland S., Fujii C., Cotton M. D., Horst K., Roberts K., Hatch B., Smith H. O., Venter J. C. 1997: Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature*: 390: 580 – 586.
58. Tanner M. E., 2005: The enzymes of sialic acid biosynthesis. *Bioorg. Chem.* 33: 216 – 228.
59. Mizanur R. M., Pohl N. L., 2008: Bacterial CMP-sialic acid synthetase: production, properties, and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80: 757 – 765.
60. Comstock L. E., Kasper D. L., 2006: Bacterial Glycans: Key mediators of diverse host immune responses. *Cell.* 126: 847 – 850.
61. Rudenko N., Golovchenko M., Grubhoffer L., Oliver J. H., 2009: *Borrelia carolinensis* sp. nov., a new (14<sup>th</sup>) member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex from the southeastern region of the United States. *J. Clin. Microbiol.* 47: 137 – 141.