

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE
MOLEKULĀRĀS BIOLOĢIJAS KATEDRA

BORRELIA BURGDORFERI ĀRĒJĀS VIRSMAS
PROTEĪNU BB0689 UN BBA73 FUNKCIONĀLIE
PĒTĪJUMI

Maģistra darbs

Autors: Kārlis Vilks
Stud. apl. Nr. KV10074
Darba vadītājs: Dr. biol. Renāte Ranka

RĪGA 2015

SATURA RĀDĪTĀJS

Satura rādītājs.....	2
Ievads	4
Kopsvilkums	5
Summary	6
Apzīmējumi un saīsinājumi	7
Literatūras apskats	8
<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato komplekss	8
<i>B. burgdorferi</i> genoma raksturojums	10
<i>B. burgdorferi</i> proteoma raksturojums.....	11
Laimboreliozes patogēnēze.....	12
Arējās virsmas proteīnu nozīme slimības patogēnēzē	15
Ārējās virsmas proteīns BB0689.....	17
Ārējās virsmas proteīns BBA73.....	17
Materiāli un reaģenti.....	20
Aparatūra un iekārtas	20
Ķīmiskie reaģenti un fermenti.....	21
Buferi.....	23
Metodes.....	25
<i>B. burgdorferi</i> rekombinanto proteīnu iegūšana	25
Audu lizātu pagatavošana	26
Ni ²⁺ afinitātes hromatogrāfija	27
Proteīnu kompleksu imūnprecipitācija (Co-IP).....	28
Attālinātais Western blots	31
SDS PAGE.....	33
Krāsošana ar Coomassie blue	33

Krāsošana ar sudrabu	34
Paraugu sagatavošana masas spektrometrijai.....	34
Ērču lizātu iegūšana	35
Proteīnu koncentrācijas noteikšana ar Nanodrop spektrometru.....	36
Rezultāti un diskusija.....	37
Sudraba un Coomasie krāsošanas salīdzinājums	37
Žurkas audu lizātu iegūšana	38
<i>Ixodes</i> ērču audu lizātu iegūšana.....	39
rBB0689 Ni-NTA afinitātes hromatogrāfija ar žurkas audiem.....	40
rBBA73 kompleksu imūnprecipitācija (Co- <i>Ip</i>) ar žurkas smadzeņu audiem.	44
Proteīnu mijiedarbības analīze ar attālinātā Western blotu.....	45
Co- <i>Ip</i> ar zīdītāju serumiem	47
Attālinātais Western blots ar Co- <i>Ip</i> elūcijas frakcijām	48
Veikts attālinātais western blots ar ērču lizātiem.....	49
Veikts Ni-NTA afinitātes hromatogrāfija ar ērču lizātiem.	51
Secinājumi.....	53
Pateicības	55
Izmantotā Literatūra.....	56

IEVADS

Borrelia burgdorferi sensu lato ir izplatītākais insektu pārnēsātais infekcijas slimību ierosinātājs Ziemeļu puslodē, ak kuru Eiropā gada laikā inficējas vidēji 65 tūkstoši cilvēku. Lai gan kopš šī patogēna atklāšanas 1982. gadā ir pagājis pietiekoši ilgs laiks, par šo patogēnu vēl aizvien ir daudz neatbildētu jautājumu, tai skaitā par baktērijas patoģenēzes mehānismiem un mijiedarbības procesiem gan ar siltasiņu, gan aukstasiņu saimniekorganismiem. Iegūstot informāciju par *B. burgdorferi* ārējās virsmas proteīniem un to lomu patoģenēzē, pavērtos iespēja izstrādāt jaunas, efektīvākas laimboreliozes diagnostikas, ārstēšanas un prevencijas metodes.

Par spīti intensīviem pētījumiem un centieniem, vēl aizvien pastāv liels daudzums *B. burgdorferi* ārējās virsmas proteīnu ar nezināmām funkcijām, kā arī hipotētisku proteīnu un vairāku paralogo gēnu produktu. Šis darbs ir veltīts divu *B. burgdorferi* ārējās virsmas proteīnu, kuri literatūrā minēti kā nozīmīgi komponenti infekcijas nodoršināšanā, funkcionālajiem pētījumiem.

Darba mērķis ir noskaidrot *B. burgdorferi* ārējās virsmas proteīnu BB0689 un BBA73 iespējamo lomu patogēna un saimniekorganisma mijiedarbībā. Lai sasniegtu šo mērķi, tika izvirzīti sekojošie uzdevumi:

- Izpētīt BBA73 un BB0689 mijiedarbību ar zīdītāju iekšējās vides proteīniem izmantojot proteīnu-proteīnu mijiedarbības pētījumu metodes.
- Izpētīt BBA73 un BB0689 mijiedarbību ar artropodu iekšējās vides proteīniem izmantojot proteīnu-proteīnu mijiedarbības pētījumu metodes.
- Izvērtēt BBA73 un BB0689 iespējamo lomu *B. burgdorferi* patoģenēzes mehānismos.

KOPSVILKUMS

Maģistra darbs veidots ar mērķi noskaidrot *B. burgdorferi* ārējās virsmas proteīnu BB0689 un BBA73 potenciālo lomu patogēna un saimniekorganisma mijiedarbībā, kas varētu paplašināt mūsu zināšanas par Laimboreliozes patogēnēzi. Borēlijas proteīnu un zīdītāju vai artropodu proteīnu iespējamā mijiedarbība ir noteikta, izmantojot Ni-NTA afinitātes hromatogrāfiju, proteīnu kompleksu imūnprecipitāciju (Co-IP) un attālināto Western blotu. Konstatēto mijiedarbības partneru identifikācijai ir izmantota MALDI-TOF masas spektrometrija. Pētījuma rezultātā ir konstatēta BB0689 iespējamā saistība ar vairākiem zīdītāju proteīniem, savukārt BBA73 gadījumā ir novērota tā mijiedarbība ar *Ixodes* ērcu proteīniem un atsevišķiem zīdītāju proteīniem. Iegūtie rezultāti norāda uz *B. burgdorferi* ārējās virsmas proteīnu BB0689 un BBA73 potenciālo lomu Laimboreliozes patogēnēzē.

Atslēgvārdi:

Borrelia burgdorferi, BB0689, BBA73, Ni-NTA Afinitātes hromatogrāfija, Co-IP, Attālinātais Western blots, MALDI-TOF.

SUMMARY

Aim of this Master thesis project was to determine a potential role of two *Borrelia burgdorferi* outer surface proteins BB0689 and BBA73 in host-pathogen interaction and Lyme disease pathogenesis. Possible interactions between borrelial and mammalian and arthropod proteins were determined using several protein-protein interaction assays such as Ni-NTA pulldown, Protein complex immunoprecipitation (Co-IP) and Far Western blot. MALDI – TOF mass spectrometry approach was used to identify visualised interaction partners. Interactions between BB0689 and numerous mammalian proteins were observed. For BBA73 protein, a possible interaction with Ixodes ticks and few mammalian proteins were detected. The results of this study highlight a possible role of BB0689 and BBA73 in Lyme disease pathogenesis.

Tags:

Borrelia burgdorferi, BB0689, BBA73, Ni-NTA pulldown, Co-IP, Far Western blot, MALDI-TOF

APZĪMĒJUMI UN SAĪSINĀJUMI

Mērķa proteīns (Prey protein) – nezināms proteīns, kuru ir mērķis identificēt

Ēsmas proteīns (Bait protein) – zināms proteīns, kuram tiek meklēti mijiedarbības partneri (Mērķa proteīni)

SDS PAGE – Nātrija dodecilsulfāta poliakrilamīda gēls

CO-IP – kompleksu imūnprecipitācija

ACA - *Acrodermatitis chronica atrophicans*, hronisks akrodermatīts

Ni-NTA – niķeļa nitriltriētiķskābe

ORF – (Open reading frame) atvērtie kodoni

IL-4 – interleikīns 4

IL-17 – interleikīns 17

IFN- γ – interferons γ

Bp – bāzu pāris

Kbp – kilobāžu pāris

FWB – Far western blots

kDa – kilodaltons

WB – Western blots

TFA – trifluoētiķskābe

PNS – Perifērā nervu sistēma

LITERATŪRAS APSKATS

Borrelia burgdorferi sensu lato komplekss

Borrelia burgdorferi (*B. burgdorferi*) ir Laima slimības jeb Laimboreliozes etoloģiskais izraisītājs, kurš pirmo reizi tika identificēts 1984. gadā ASV izdalot baktērijas no *Ixodes* ērcēm, kas bija ievāktas slimības endēmiskajos reģionos un secinot, ka ērces vidus zarnā esošās spirohētas saista Laimboreliozes slimnieku imūnglobulīnus (Burgdorfer et al. 1982). Pirmo reizi baktērijas izraisītā slimība tika aprakstīta 1978. gadā, kad vairākiem ASV Konektikutas štata Laima (Lyme, Connecticut) pilsētiņās iedzīvotājiem pēc ērces kodiena tika novērots apsārtums koduma vietā un sāpes locītavās (Steere et al. 1978).

Senākās liecības par baktērijas izraisīto slimību tika atklātas konstatējot 60% genomiskās DNS līdzības ar mūsdienu baktērijas genomu 5300 gadus vecās Vara laikmeta cilvēka atliekās, kas tika atrastas Austrijas alpos (Keller et al. 2012).

Apskatot baktērijas elektronu mikroskopā tika atklāta līdzība ar spirohētām no citām *Treponema* sugām; baktēriju garums ir no 10-30 μm, diametrs 0,18-0,25 μm, tās ir neregulāri spirālistiskas (1. attēls). Baktērijas šķērsgriezumā starp ārējo un citoplazmatisko membrānu labi saskatāmi filamentī, kas piešķir baktērijai spirālistisko formu (Burgdorfer et al. 1982).

B. burgdorferi spirohētas netiek klasificētas kā Gram (-) vai Gram (+). Krāsojot borēlijas izmantojot Gram krāsošanas metodi, atsevišķas no baktēriju līnijām iekrāsojas ļoti viegli (*B. burgdorferi*



1. Attēls. *Borrelia burgdorferi* *Ixodes* ērces viduszarnas bārkstiņās. Apzīmējumi: SP – spirohēta, MV – zarnas bārkstiņas. Āugšējā labajā stūrī redzams baktērijas šķērsgriezums (Burgdorfer et al. 1982)

Figure 1. *Borrelia burgdorferi* in microvascular epithelium of *Ixodes* tick midgut. Labels: SP – spirochete, MV – microvascular epithelium. Cross-section of bacterium is visible in upper right (Burgdorfer et al. 1982)

sensu stricto celms B31), savukārt citas nemaz, tāpēc tās dažkārt tiek uzskatītas par Gram negatīvām (Aberer, Duray, 1991). Šo īpašību var izskaidrot ar to, ka borēlijas ārējā membrāna satur ļoti daudz lipīdu. Borēlijām, tā pat kā pārsvarā visām spirohētām, ir ārējā membrāna, iekšējā membrāna un periplazmatiskā telpa ar peptidoglikānu kārtu, kas baktērijas šūnas sienu padara līdzīgu Gram negatīvo baktēriju šūnas sienai, neskatoties uz tās krāsošanas īpatnībām (Todar 2006).

Sākotnēji Laimboreliozi izraisošās spirohētas tika uzskatītas par vienu sugu, *B. burgdorferi*, taču samērā neilgi pēc tam tālāki pētījumi lika secināt, ka šī baktēriju suga ir heterogēna un sastāv no vairākām genosugām. *B. burgdorferi* sensu lato grupa sākotnēji tika sadalīta trīs atšķirīgās genosugās (*B. burgdorferi* sensu stricto (*B. burgdorferi* s.s.), *B. garinii* un VS461) izmantojot restrikcijas fragmentu garuma polimorfismu analīzi, proteīnu elektroforēzes ainas atšķirības, kā arī pēc atšķirībām reaktivitātē ar monoklonālajām peļu antivielām (Baranton et al. 1992). Vēlāk genosugai VS461 tika piešķirts nosaukums *B. afzelii* (Canica et al. 1993).

Šobrīd ir zināmas 18 sugas, kā arī ir daži neklasificēti genotipi (1. tabula).

1. Tabula.

Borrelia burgdorferi sensu lato grupas baktēriju izplatība un vektori (Rudenko et al. 2011; Stanek, Reiter 2011)

Table 1

Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato group and their vectors (Rudenko et al. 2011; Stanek, Reiter 2011)

<i>Borrelia</i> suga	Vektors	Ģeogrāfiska izplatība	Atklāšanas gads
<i>B. afzelii</i>	<i>I. ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i>	Āzija, Eiropa	1992
<i>B. burgdorferi sensu stricto</i>	<i>I. ricinus</i> , <i>I. scapularis</i> , <i>I. pacificus</i>	Eiropa, ASV	1992
<i>B. garinii</i>	<i>I. ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i> , <i>I. hexagonus</i> , <i>I. nipponensis</i>	Āzija, Eiropa	1992
<i>B. japonica</i>	<i>I. ovatus</i>	Japāna	1994
<i>B. andersonii</i>	<i>I. dentatus</i>	ASV	1995
<i>B. tanukii</i>	<i>I. tanuki</i>	Japāna	1996
<i>B. turdi</i>	<i>I. turdus</i>	Japāna	1996
<i>B. lusitaniae</i>	<i>I. ricinus</i>	Eiropa, Ziemeļāfrika	1997
<i>B. valaisiana</i>	<i>I. ricinus</i> , <i>I. granulatus</i>	Āzija, Eiropa	1997
<i>B. bissetii</i>	<i>I. ricinus</i> , <i>I. scapularis</i> ,	Eiropa, ASV	1998

	<i>I. pacificus</i> , <i>I. minor</i>		
<i>B. sinica</i>	<i>I. ovatus</i>	Ķīna	2001
<i>B. spielmanii</i>	<i>I. ricinus</i>	Eiropa	2006
<i>B. californiensis</i>	<i>I. pacificus</i> , <i>I. jellisonii</i> , <i>I. spinipalpis</i>	ASV	2007
Genomospecies 2	<i>I. pacificus</i>	ASV	2007
<i>B. yangtze</i>	<i>Haemaphysalis longicornis</i> , <i>I. granulatus</i>	Ķīna	2008
<i>B. americana</i>	<i>I. pacificus</i> , <i>I. minor</i>	ASV	2009
<i>B. bavariensis</i>	<i>I. ricinus</i>	Eiropa	2009
<i>B. carolinensis</i>	<i>I. minor</i>	ASV	2009
<i>B. kurtenbachii</i>	<i>I. scapularis</i>	Eiropa, ASV	2010

Šobrīd patogenitāte ir pierādīta 3 genotipiem: *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* un *B. afzelii*, bet iespējami patogēnās ir *B. lusitaniae*, *B. valaisiana* un *B. spielmanii* (Stanek, Reiter 2011).

Dažādas borēliju sugas Eiropā ir pielāgojošās atšķirīgiem saimniekorganismiem, par ko liecina būtiskas atšķirības borēliju sugu izplatībā starp dažādām mugurkaulnieku sugām, bet par pārnēsātāju vektoru tiek izmantota pārsvarā tikai divas ērcu sugas *Ixodes ricinus* un *Ixodes persulcatus* (Kurtenbach et al. 1998; 2002).

***B. burgdorferi* genoma raksturojums**

B. burgdorferi pirmā pilna genoma sekvenēšana tika veikta 1997. gadā. Tika atklāts, ka baktērijas genoms sastāv no 1 lineāras 910 kbp hromosomas un 17 lineārām un cirkulārām plazmīdām (Fraser et al. 1997). Turpmāki pētījumi, izmantojot arī citu genosugu baktēriju izolātus parādīja, ka plazmīdu skaits starp izolātiem atšķiras, tomēr gēnu sastopamība starp izolātiem ir relatīvi konservatīva (Casjens et al. 2012). Tomēr *B. burgdorferi* genoma pētījumus sarežģī fakts, ka ilgstoši kultivējot baktērijas laboratorijas apstākļos ir novērojama atsevišķu baktērijas plazmīdu izzušana un tai sekojošs infektivitātes zudums (Biškup et al. 2011; Schwan et al. 1988).

Baktērijas hromosomas G+C saturs ir 28,6%, ORF kodējošā daļa ir 93%, savukārt plazmīdās guanīna un citozīna bāzu pāri sastāda no 23,1-32,3% no kopējās sekvences, ORF kodējošā daļa aizņem 71% no kopējās plazmīdu sekvences (Fraser et al. 1997). Genoma analīze un eksperimentālie dati ir parādījuši, ka baktērijām nav nepieciešams dzels, jo genomā

nav sastopami ne proteīni, kuriem būtu vajadzīgs dzels, nedz dzels importā iesaistītie proteīni. (Casjens 2000). Baktērijas lineārā hromosoma un tās telomēru uzbūve ir atšķirīga no pārējām baktērijām, jo hromosomas galu veido kovalenti aizvērta matadatas telomēru struktūra, ka vairāk ir raksturīga baku vīrusiem un iridovīrusiem (Hinnebusch, Barbour 1991).

B. burgdorferi daudzās plazmīdas satur prokariotiem neraksturīgi daudz pseidogēnu, kas varētu liecināt par to, ka atsevišķas plazmīdas pašlaik iziet strauju evolucionāru procesu (Casjens 2000). Ir parādīts, ka līdz pat 90 procentiem plazmīdās esošo kodējošo sekvenču nav novērojama homoloģija ārpus *Borrelia* ģints, kas norāda, iespējams, uz īpašu šo gēnu lomu Laimboreliozes patogēnēzē (Casjens et al. 2000). Savukārt ar *Treponema pallidum*, kas ir radniecīgākā spirohēta ārpus *Borrelia* ģints, *B. burgdorferi* genomam ir tikai 40 % līdzība (Subramanian et al. 2000).

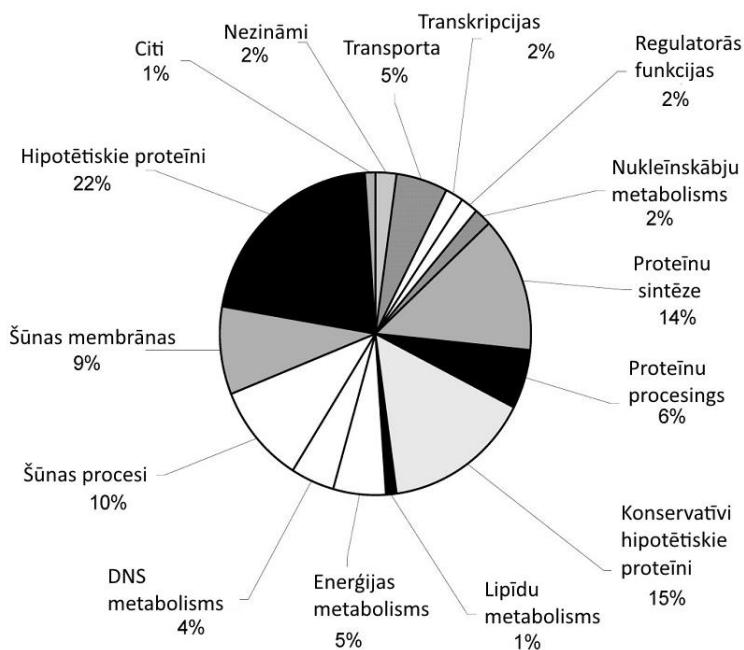
Šobrīd brīvi pieejamas ir 35 borēliju genoma sekvences, kas pārstāv 8 borēliju sugas, no kurām pilna garuma sekvences ir pieejams *B. burgdorferi* s.s., *B. garini* un *B. afzelii* (Di et al. 2014).

***B. burgdorferi* proteoma raksturojums**

Pirmās ziņas par *B. burgdorferi* proteomu tika iegūtas līdz ar tās pilna garuma DNS sekveni. Uzmanību piesaistīja fakts, ka brīdī, kad sekvenca tika publicēta lielākā daļa virulences faktorus kodējošo gēnu netika atrasta līdzība ar gēniem no citām baktērijām (Fraser et al. 1997). *B. burgdorferi* salīdzinājumā ar citām baktērijām ir salīdzinoši daudz lipoproteīnu, kopējais baktērijas kodēto lipoproteīnus kodējošo gēnu daudzums tiek lēsts no 5-8% no kopējās genoma sekvences (Fraser et al. 1997; Jacobs et al. 2005), kas ir ļoti daudz salīdzinot ar citām baktērijām, piemēram *H. pylori* lipoproteīni ir tikai 1,3% (Fraser et al. 1997).

Pēc gandrīz 10 gadiem 2005. gadā salīdzot proteoma atšķirības borēlijām 39% no 665 identificētajiem proteīniem vēl aizvien nebija zināmas to funkcijas (2. Attēls), tomēr tika noskaidrots, ka starp dažādām borēliju sugām pastāv 50% proteoma līdzība (Jacobs et al. 2005). Jāpiebilst, ka pētījumā detektētie proteīni pārstāvēja aptuveni trešo daļu no teorētiski iespējamajiem *B. burgdorferi* genoma kodējošajiem proteīniem.

Turpmākajos pētījumos tika noskaidrota konkrētu proteīnu saistība ar dažādiem baktērijas patoģenēzes apstākļiem, piem. Nowalk ar kolēģiem (Nowalk et al. 2006) noskaidroja proteīnus, kas aktīvi tiek ekspresēti zīdītāju infekcijas laikā, bet Livengood ar kolēģiem (Livengood et al. 2008) ieguva informāciju par neiroboreliozes proteoma profiliem; citi zinātnieki noskaidroja arī par apkārtējās vides apstākļu ietekmētām proteoma izmaiņām (Angel et al. 2010). Šie un līdzīgie pētījumi sniedz ieskatu par patoģenēzē iesaistītajiem proteīniem kopumā, tomēr tie nevar sniegt konkrētu ieskatu par katra konkrētā proteīna funkcijām patoģenēzē.



2. Attēls. Borēlijas proteoma procentuālais sadalījums pēc to funkcijām. (Jacobs et al. 2005)

Figure 2 Functional distribution of Borelial proteome (Jacobs et al. 2005)

Neskatoties uz intensīviem pētījumiem arī salīdzinoši nesēn

veiktos pētījumos, kas vērsti uz baktērijas ārējās virsmas proteīnu pētījumiem, joprojām nākas saskarties ar lielu daudzumu *B. burgdorferi* proteīnu, kuru precīzas funkcijas vēl aizvien nav zināmas (Gesslbauer et al. 2012).

Laimboreliozes patoģenēze

B. burgdorferi nonāk slimnieka organismā pēc inficētās ērces kodiena. Eksperimenti ar pelēm ir pierādījuši, ka spirohēta no inficētas ērces saimniekorganismā spēj nokļūt pēc 52 stundu netraucētas ērces barošanās (Ohnishi et al. 2001).

Laimboreliozei ir raksturīgas trīs slimības stadijas: agrīnā jeb lokālās infekcijas stadija, izplatīšanās jeb agrīnā diseminētā stadija, un vēlīnā stadija. Agrīnās stadijas laikā patoloģiskais process norit slimības izraisītāja iekļūšanas vietā, slimības pirmie simptomi parādās 1-3 nedēļas pēc inficētas ērces kodiena. Spirohētas zīdītāju organismā ir ārkārtīgi kustīgas, tāpēc dažu dienu laikā tās spēj izplatīties ādas slāņos izveidojot klasisku slimības simptomu *Erythema migrans* jeb migrējošajā eritrēmā. *Erythema migrans* sākas kā punktveida apsārtums, kas izplešas ar ātrumu līdz 3 cm dienā, izplešoties apsārtums var iegūt

gredzenveida formu. Apsārtuma plankums parasti veidojas ērces kodiena vietā un ir ne mazāk kā 5 cm diametrā liels, parasti nesāp un pēc kāda laika pazūd (3. Attēls).



3. Attēls. Borēliju izraisīta migrējošā eritrēma, *Erythema migrans* (Ogden et al. 2008).
Figure 3 *Erythema migrans* caused by *Borelia* (Ogden et al. 2008).

Otrās jeb izplatīšanās stadijas laikā borēlijas izplatās no iekļūšanas vietas pa organismu un nonāk iekšējos orgānos. Traucējumu simptomi var parādīties no 1 nedēļas līdz pat vairākiem mēnešiem pēc sākotnējās infekcijas; būtiski, ka ne vienmēr pirms tiem ir novērojams *Erythema migrans* tipa ādas apsārtums. Izplatīšanās stadijai ir raksturīgas dažādas klīniskās izpausmes, piemēram, multipla eritrēma (4. Attēls), boreliālā limfocitoma, kardīts, neiroborelioze, oftalmoborelioze. Uzskata, ka 10-15% neārstētu lokālās infekcijas stadijas pacientu attīstās neiroloģiski traucējumi, bet 5% neārstētu slimnieku – dažādi sirds bojājumi (atrioventrikulāra blokāde, akūts mioperikardīts, labā kambara

disfunkcija, reti kardiomegālija). Neuroborelioze biežums ir no 0,6–2,4 gadījumiem uz 100 000 iedzīvotāju Zviedrijā līdz 5,8–10 uz 100 000 iedzīvotāju Vācijā (Berglund et al. 1995; Huppertz et al. 1999). Slimības gadījumā attīstās nervu struktūru bojājums, kas var skart gan perifēro nervu sistēmu (PNS), gan centrālo nervu sistēmu (CNS), līdz ar to ir iespējamas daudzveidīgas neiroloģiskās izpausmes. Neuroboreliozei ir raksturīgi tādi simptomi kā nogurums, galvas sāpes, nelabums, svara zudums, neliela temperatūra vai sāpes roku un kāju locītavās, pakausi vai mugurā. Smagākos gadījumos var novērot mono- vai polineirītu, serozo (limfocitārs) meningītu, miozītu, meningoradikuloneirītu, mielītu, mieloradikulītu, encefalītu. Pieaugušajiem iespējama daļēja sejas paralīze.

Trešās jeb vēlīnās stadijas laikā patogēno baktēriju darbības rezultātā rodas dažādu orgānu bojājumi.



4. Attēls. *B. burgdorferi* izraisīta multiplā eritrēma (Heymann, Ellis 2012)
Figure 4 Multiple erythema migrans caused by *B.burddoreferi* (Heymann, Ellis 2012)

Klīniskās izpausmes var parādīties pat gadu pēc infekcijas, taču pēdējai slimības stadijai ir raksturīgi noturīgi neiroloģiski simptomi,



5. Attēls. Boreliozes izraisītie locītavu bojājumi (Stinco et al. 2014).

Figure 5 Knee joint damaged by boreliosis (Stinco et al. 2014)

periodisks artrīts, kā arī hronisks ādas iekaisums (Dattwyler, Luft 1991). Ja skartas locītavas, visbiežāk novērojamas periodiskas sāpju lēkmes un uztūkums atsevišķās locītavās. Var tikt skartas ceļu, potīšu, elkoņu un plaukstu locītavas, taču parasti ir skartas lielās locītavas (>90% ceļu locītavas) (5. Attēls). Vēlīnā stadijā var attīstīties nervu sistēmas

bojājumi (parēzes, paralīzes). Ja ir skarta āda, novēro raksturīgo *Acrodermatitis chronica atrophicans* (ACA) ainu, kas seko gadus pēc infekcijas sākuma. ACA tiek novērots ~10% neārstētiem pacientiem, tas

sākas ar violetisarkanu bojājumu, kas kļūst sklerotisks, atrofisks (6. Attēls).

Laimboreliozes svarīgā īpatnība ir tā, ka simptomi katrā attīstības stadijā var arī neizpausties. Šī iemesla dēļ to nereti ir grūti diagnosticēt (Bhate & Schwartz, 2011). Bez tam, ir novērojumi, ka dažādas *B. burgdorferi* sensu lato sugas izraisa atšķirīgus boreliozes simptomus. Pirmās liecības par atšķirīgu simptomu saistību ar dažādām sugām tika iegūtas 1995. gadā, no laimboreliozes slimniekiem izdalot un pēc tam identificējot borēlijas līdz sugas līmenim. Tiek uzskatīts, ka *B. afzelii* pārsvarā izraisa akrodermatītu un migrējošo eritrēmu (Canica et al. 1993) un par tā dabiskajiem rezervuāriem tiek uzskatītas peles un strupastes (Kurtenbach et al.



6. Attēls *B. garini* un *B. burgdorferi* ss izraisītais hroniskais akrodermatīts *Acrodermatitis chronica atrophicans*. (Stinco et al. 2014)

Figure 6. *Acrodermatitis chronica atrophicans* caused by *B. garini* un *B. burgdorferi* ss (Stinco et al. 2014)

2002). *B. burgdorferi* s.s. infekcija rezultējās neiroloģiskās manifestācijās, kā arī ar artrītu (Balmelli, Piffaretti, 1995; Wang et al. 2002) Savukārt *B. garinii* līdzīgi *B. burgdorferi* s.s. arī

izraisītāja neiroloģiskus bojājumus un artrītu, kā arī kardiālus bojājumus (Balmelli, Piffaretti 1995) un to rezervuārs dabā ir dziedātāj un jūras putni (Kurtenbach et al. 2002). Lai gan jautājums, cik cieši laimboreliozes simptomi ir saistīti ar dažādām *B. burgdorferi* genosugām vēl nav līdz galam atrisināts, ir skaidri saskatāmas atšķirības dažādu slimības klīnisko izpausmju dažādos kontinentos, t.i. ASV un Eiropā (2. Tabula). Tas tiek skaidrots ar dažādiem *B. burgdorferi* sugu izplatības areāliem.

2. Tabula.

Laimboreliozes klīniskās izpausmes Eirāzijā un Ziemeļamerikā (Piesman, Gern 2004)

Table 2

Clinical manifestations of lyme boreliosis in Eurasia and N America (Piesman, Gern 2004)

Vektors	Ziemeļamerika	<i>I. scapularis, I. pacificus</i>
	Eirāzija	<i>I. ricinus, I. persulcatus</i>
Izraisītājs	Ziemeļamerika	<i>B. burgdorferi</i> ss
	Eirāzija	<i>B. burgdorferi</i> ss, <i>B. afzelii, B. garinii</i>
Klīniskās izpausmes	Ziemeļamerika	<i>Erythema migrans</i> , artrīts, daļējā sejas paralīze, meningīts, perifērā radikuloneiropātija,atrioventrikulārā blokāde
	Eirāzija	<i>Erythema migrans, acrodermatitis chronica atrophicans</i> , limfocitoma, artrīts, daļējā sejas paralīze, meningīts, perifērā radikuloneiropātija,atrioventrikulārā blokāde

Arējās virsmas proteīnu nozīme slimības patoģenēzē

Faktori, kas ļauj baktērijai izraisīt ilgstošu infekciju saimniekorganismā vēl aizvien tiek pētīti, tomēr par galveno īpašību, kas patogēnam ļauj netraucēti kolonizēt audus uzskata baktērijas spēju saistīties ar saimniekorganisma starpšūnu matriksu. Līdz šim nav atklāts neviens baktērijas ražots toksīns, kas tieši bojātu audus, tā vietā spirohēta saglabājas audos, ierosinot imūnreakciju, kā rezultātā no imūnsistēmas uzbrukumiem cieš arī saimniekorganisma šūnu struktūras (Jewett, Coburn 2012). Daži no patoģenēzē iesaistītajiem proteīniem ilustrēti 7. Attēlā.

Baktērijas ārējās virsmas proteīnus var nosacīti iedalīt trīs grupās pēc to lomas: saistīšanās ar ārpusšūnas matriksu, izvairīšanās no imūnās atbildes un ērces kolonizēšanas (Auwaerter 2011). Lielu daļu no šajos procesos iesaistīto proteīnu kodējošajiem gēniem inducē alternatīvais sigma faktors, RpoS, kas sāk darboties baktērijai nokļūstot zīdītāju iekšējai ķermeņa videi līdzinošos apstākļos (Caimano et al. 2007).

Ērces kolonizēšana

OspA ir ir iespējams detektēt ērcēs, kā arī borēliju infekcijas sākumstadijās, vedinot uz domām par tā lomu ērcu kolonizēšanā un saistīšanos ar ērces proteīniem (Yang et al. 2004).

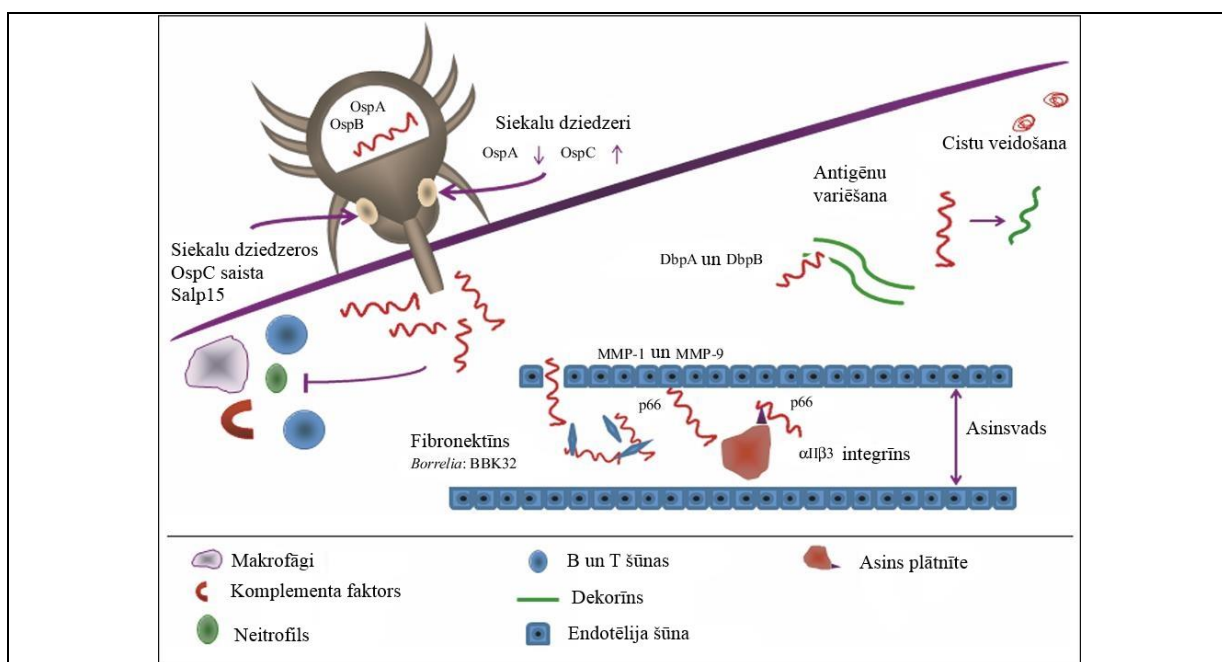
tomēr vēlāki pētījumi pierādīja to, ka šis proteīns ir iesaistīts neiroboreliozes attīstībā, jo ļauj spirohētai šķērsot asins smadzeņu barjeru (Pulzova et al. 2011), tādējādi parādot, ka viens ārējās virsmas proteīns ir spējīgs pildīt funkcijas gan aukstasiņu, gan siltasiņu organismā.

Lielā ģenētiskā līdzība starp OspA un OspB liek uzskatīt, ka OspB radies dublikācijas rezultātā. Šī proteīna funkcija ir nodrošināt baktērijas saistīšanos ar *Ixodes* ērcu zarnu epitēliju; pētījumi ir parādījuši, ka bez šī proteīna baktērijas nav spējīgas inficēt ērces to barošanās laikā (Fikrig et al. 2004).

Ārpusšūnas matriksu saistošie proteīni

DbpA un DbpB ir dekorīnu saistoši proteīni ar kuru palīdzību borēlija saistās ar dekorīnu un glikozaminoglikāniem, šie abi komponenti ir plaši sastopami zīdītāju ārpusšūnas matriksā, saistaudos kā arī uz zīdītāju šūnu virsmas (Shi et al. 2008). Spēja saistīt dekorīnu atšķirās starp dažādām borēliju sugām, kas saistīts ar katras sugas pielāgošanos konkrētiem siltasiņu saimniekorganisma audiem (Salo et al. 2011).

Ar BBK32 palīdzību borēlija saistās ar fibronektīnu un glikozaminoglikāniem, kas ar šī proteīna palīdzību ļauj baktērijai kolonizēt locītavas, kas samniekorganismā ar laiku var izraisīt artrīta veidošanos (Lin et al. 2015).



7. Attēls. Ārējās virsmas proteīnu nozīme baktērijas transmisijas laikā. Ar ārējās virsmas proteīnu palīdzību baktērija nokļūst no ērces zīdītāja organismā, izvairās no imūnās atbildes, kā arī pārvietojas pa zīdītāja audiem (Berende et al. 2010).

Figure 7. Importance of outer surface proteins during bacterial transmission. Outer surface proteins facilitate transmission from tick to mammal, evasion from host's immune reaction and dissemination through host's tissue (Berende et al. 2010).

Izvairīšanās no imūnās atbildes

vlsE kodējošais gēns ir lokalizēts lineārajā plazmīdā lp28-1 un sastāv no vlsE galvenās ekspresijas zonas, kā arī no 15 saistītiem klasteriem, kuriem ir 90% līdzība ar galveno ekspresijas zonu un 6 variabli reģioni. Zīdītāju infekcijas laikā, starp galveno ekspresijas zonu un saistītajiem klasteriem notiek rekombinācijas, kas noved pie izmainītiem proteīna epitopiem, tādējādi antivielas pret iepriekš sastopamajiem antigēna variantiem vairs nav efektīvas (Norris 2012). Interesanti, ka *B. burgdorferi* infekcijas laikā saglabā nelielu baktēriju koncentrāciju asinīs un audos ar lielu vls epitopu dažādību (Norris 2006).

CRASPs jeb komplementa regulatoru saistošie virsmas proteīni (complement regulator-acquiring surface proteins) tika atklāti pētot borēliju rezistenci pret zīdītāju serumiem. Ar šo proteīnu palīdzību baktērija spēj piesaistīt cilvēka komplementa faktoru H un tam līdzīgos proteīnus tādējādi izvairoties no imūnās sistēmas (Kraiczy et al. 2001). Pastāv trīs ģenētiski atšķirīgas CRASP grupas, kā arī katra borēliju suga ekspresē atšķirīgas kombinācijas CRASP gēnu, tādējādi sevi nomaskējot saimniekorganisma iekšējā vidē (Siegel et al. 2010).

Ārējās virsmas proteīns BB0689

Pirmās ziņas par šī proteīna eksistenci tika iegūtas līdz ar baktērijas pilna garuma sekvenču iegūšanu (Fraser et al. 1997). Analizējot proteīna kodējošo gēna sekveni BB0689 tika identificēts kā iespējamais lipoproteīns, jo proteīna N terminālajā galā sastopama MKKLI---IIFTLFLSQACNLST aminoskābju sekvenču, kas liecina par potenciālu lipidēšanu (Casjens et al. 2000). 2006. gadā tika iegūti eksperimentāli pierādījumi tam, ka BB0689 piemīt augstas imunoloģiskas īpašības un tas ir lokalizēts uz baktērijas ārējās virsmas (Chad et al. 2006). Cits pētījums, kurā tika veikta borēliju lipoproteīnu salīdzināšana starp borēliju izolātiem un sugām atklāja, ka BB0689 kodējošie gēni ir ļoti konservatīvi (Liang et al. 2002). Vēlāk tika atklāts, ka gēna ekspresija 35 grādu temperatūrā pieaug 1,6 reizes salīdzinājumā ar 23 grādu temperatūru, kas liecina par šī gēna aktivāciju apstākļos, kas ir līdzīgi siltasiņu zīdītāja organismam (Ojaimi et al. 2003). Gēna ekspresija ērces barošanās laikā pieaug 2,7 reizes līdz ar asins pieplūdi (Revel et al. 2002). Šie dati liecina par BB0689 neapšaubāmu līdzdalību laimborelīozes patogēnēzes procesā, taču precīza šī proteīna funkcija nav zināma.

Ārējās virsmas proteīns BBA73

Pirmā informācija par proteīna BBA73 esamību *B. burgdorferi* genomā iegūta pēc pilna garuma borēlijas genoma publicēšanas (Fraser et al. 1997). Ir novērots, ka proteīnu BBA73

kodējošā gēna ekspresija pieaug baktērijai nokļūstot no vides ar pH 8.0 uz vidi ar pH 7.0, gēna ekspresijas regulācija tiek veikta ar palindromiskās sekvenču palīdzību 22 nukleotīdus pirms starta kodona (Carroll 2000). Gēna ekspresija ērces barošanās laikā ir 11 reizes lielāka nekā neēdušā ērcē, savukārt gēnu ekspresija baktērijai nonākot zīdītāju organismā pieaug 3 reizes salīdzinot ar ērci, kas ir barojusies (Revel et al. 2002). Tomēr pētījumā 2003. gadā secināts, ka BBA73 zīdītāju dialīzes membrānas kamerā samazina savu ekspresiju 2,14 reizes (Brooks et al. 2003), atšķirīgie rezultāti tiek skaidroti ar to, ka gēna ekspresija tiek palielināta paaugstinoties temperatūrai, bet samazināta nokļūstot zīdītāju organismā. Salīdzinot *B. burgdorferi* ar *B. garinii* tika atklāts, ka gēns BBA73 ir gandrīz pilnībā identisks abām borēliju sugām (Glöckner et al. 2004). Tālāki pētījumi parādīja, ka proteīnu kodējošais gēns tiek īslaicīgi ekspresēts peļu infekcija laikā, un ka to ekspresē tikai infektīvas borēlijas (Hughes et al. 2008). Tomēr proteīna peļu imūnsēruma reaktivitātē ir stipri atšķirīga starp *B. afzelii*, *B. burgdorferi* un *B. garini* (Poljak et al. 2012). Interesanti ir arī tas, ka šī proteīna ievadīšana BALB/c pelēs stimulēja tikai IL-4 sekrēciju, bet ne IL-17 un IFN- γ (Poljak et al. 2012). Nosakot proteīna trīsdimensiālo struktūru atklājās, ka gan šķīdumā gan kristāliskā formā tas veido homodimērus (Brangulis et al. 2013).

Par paralogiem gēniem tiek uzskatīti gēni, kas veidojušies dublikāciju rezultātā viena organisma ietvaros (Henikoff 1997). Saistībā ar BBA73 bieži tiek pieminēta paralogo gēnu grupa 54 (PFam54). Šīs grupas pārstāvji tiek ekspresēti baktērijai nonākot zīdītāju organismam pielīdzinātos apstākļos 35 C, 7,0 pH, kā arī šie proteīniem piemīt augsta imunogenitāte, bet tie sastopami ļoti mazos daudzumos (Nowalk et al. 2006). Pgg 54 sastāv no 12 gēniem, no kuriem astoņi lokalizēti uz lineārās plazmīdas lp54, trīs gēni lokalizēti lineārajā plazmīdā lp28-4, bet viens lineārajā plazmīdā lp38 (Clifton et al. 2006). PFam54 paralogās gēnu ģimenes locekļi, kas atrodas uz lp54 ir *bba64*, *bba65*, *bba66*, *bba68*, *bba69*, *bba70*, *bba71*, *bba72*, *bba73* – lai gan *bba71* un *bba72* ir nefunkcionāli gēni un *bba70* nav sastopams lielākajā daļā *B. burgdorferi* celmu (Casjens et al. 2012). Pētījumā, kurā tika apskatīti trīs šīs grupas gēni - BBA65, BBA66 un BBA73, tika konstatēta līdzība šo gēnu ekspresijas profilā peļu infekcijas laikā. Visi šie proteīni tika ekspresēti infekcijas sākumā līdz 120 vai 180 dienai, kad to ekspresija pēkšņi izbeidzās, lai atkal pieaugtu laika posmā no 180-513 dienas pēc infekcijas. Līdzības šo gēnu ekspresijā dažādos orgānos vedina arī uz domām par to, ka šos gēnus regulē vienots faktors, kas sastopams zīdītāju organisma konkrētajos audos (Gilmore et al. 2008). Citā pētījumā, apskatot šos pašus PFam54 locekļus tika secināts, ka šie gēni ir konservatīvi starp infektīviem borēliju izolātiem, bet nav sastopami neinfektīvos baktēriju celmos, vēl tiešāk norādot uz to iesaisti laimboreliozes patogēnēzē (Hughes et al.

2008). Lai arī vairāki, ja ne visi PFam54 funkcionālie proteīni tiek saistīti ar Laimboreliozes patogēnēzi, precīza funkcija ir zināma tikai BBA68 jeb CspA proteīnam. Vienīgais no PFam54 ģimenes locekļiem, CspA saista komplementa regulatora faktoru H un faktoram H līdzīgo proteīnu-1, un tādejādi palīdz borēlijai atvairīt saimniekorganisma imūno atbildi (Kraiczky et al. 2004). Turpretim precīza BBA73 proteīna funkcija nav zināma.

MATERIĀLI UN REAĢENTI

Aparatūra un iekārtas

Iekārta	Nosaukums	Ražotājs
0,5ml plastmasas stobriņi	Safe seal tube, 0,5ml	Starstedt
1,5 ml plastmasas stobriņi	Safe seal tube, 1,5ml	Starstedt
10 µl pipešu uzgaļi	Pipettip 10 µl, yellow	Starstedt
10 ml stobriņi	50 ml Centrifuge tube	Starstedt
10µl Automātiskā pipete	N44169	Thermo LabSystems
1ml Automātiskā pipete	Eppendorf reaserch 1000	Eppendorf
1ml pipešu uzgaļi	Pipettip 1ml, blue	Starstedt
2 ml plastmasas stobriņi	Safe seal tube, 2 ml	Starstedt
20µl Automātiskā pipete	H25305E	Glison
200 µl pipešu uzgaļi	Pipettip 200µl, yellow	Starstedt
200µl Automātiskā pipete	Finnpipette	Thermo Scientific
50 ml stobriņi	50 ml Centrifuge tube	Starstedt
Analītiskie svāri	Series 320 XB - Model XB120A	Precisa
Automātiskais maisītājs	Multi Bio RS-24, Programmable rotator Platform PRS-5/12	Biosan
Centrifūga	Microcentrifuge 5415R (5415D)	Eppendorf
Elektroforēzes gēla iekārta	SE 245 Dual Gel Caster	Hofer
Elektroforēzes strāvas avots	EPS 301 Power Supply	Amersham Biosciences
Ependorfu statīvs	DBGM Sarsted 10-Vile tube rack	Sarsted
Homogenizators	FastPrep®-24 Instrument	MP Biomedicals
Homogenizēšanas stobriņi	Lysing Matrix D Spherical	MP Biomedicals
Lateksa cimdi	Disposable latex examination gloves	Great Glove
Ledusskapis		Snaige
Magnētiskais statīvs	DynaMag-2	Life technologies
MALDI TOF MS	Autoflex	Bruker Daltonics
Milipora ūdens destilētājs	Crystal 10	Adrona Laboratory systems
NanoDrop spektrometrs	NanoDrop 3300	Thermo scientific
Nitrocelulozes filtrs	Membrane Filter	Eppendorf
Saldētava		Snaige
Skalpelis	Feather disposable scalpel No 21. No 11	Feather Co
Svāri	TE Precision Balance TE412	Sartorius
Termostats	DT Hetotherm	Heto
Velkmes skapis	Fume cupboard type DSI	IAB-LAB
Vertikālās elektroforēzes iekārta	Electrophoresis plate	Amersham Biosciences
Vortekss	Microspin FV-2400	Biosan

Kīmiskie reāģenti un fermenti

Reāģents	Nosaukums	Ražotājs
Acetonitrils	CH ₃ CN	Eksma Co
Akrilamīds		Reahim-Samara
Amonija citrāts DHAC	Ammonium citrate dibasic ~98% (capillary GC)	Sigma- Aldrich
Amonija hidrogēnkarbonāts	Ammonium bicarbonate eluent additive for LC-MS	Sigma- Aldrich
Amonija persulfāts	Ammonium persulfate ACS reagent grade	USB
Bisakrilamīds	N,N'-Methylene-bis-Acrylamide Ultrapure, MB Grade	USB
Bromfenolzilais	4,4'-(1,1-dioxido-3H-2,1- benzoxathiole-3,3-diyl)bis(2,6- dibromophenol)	Reanal
Butanols	C ₄ H ₉ OH	Reahim-Samara
Co-İp komplekts	Pierce Co-Immunoprecipitation kit	Thermo scientific
DHAP	2,5-Dihydroxyacetophenone, 1g	Bruker Daltonics
Etanols	Grain neutral alcohol	Jaunpagasts plus
Etiķskābe		Reahim-Samara
Glicerīns	Glycerin	Sigma- Aldrich
HCl	Kwas solny min 35%	PPH Stanlab
Imidazols	1 M Imidazole solution, pH 7.0, 50 ml	QIAGEN
Kārāsviela G-250	Serva Blue G C.I.42655	Serva
Magnētiskās agarozes bumbiņas	Ni-NTA MAgnetic Agarose Beads 2x1 ml	QIAGEN
Marķieris	Pierce Prestained Protein Molecular Weight Marker	Thermo Scientific
Masas Spertrometra kalibrācijas standarts	Peptide calibration standard II	Bruket Daltonics
NaCl	Sodium chloride AnalaR NORMAPUR® ACS, ISO, Reag.Ph.Eur. analytical reagent	VWR BDH Prolabo
NaOH	Sodium hydroxide	PPH Stanlab
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride	Serva
SDS	Dodecylsulfate·Na-salt	Serva
Sudraba krāsa	Silver Stain	Pierce
Sudraba krāsas atkrāsotājs A	Silver Destain Reagent A	Pierce
Sudraba krāsas atkrāsotājs B	Silver Destain Reagent B	Pierce
Sudraba krāsas attīstītājs	Silver Stain Developer	Pierce
Sudraba krāsas ierosinātājs	Silver Stain Sensitizer	Pierce
Sudraba krāsas pastiprinātājs	Silver Stain Enhancer	Pierce
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethane-1,2- diamine	Reanal
Tiourīnviela	Thiourea, ACS reagent, ≥99.0%	Sigma- Aldrich
Trifluoretiķskābe TFA	Trifluoroacetic acid ReagentPlus®, 99%	Sigma- Aldrich

Tripsīns	Pierce Trypsin Protease, MS Grade	Thermo scientific
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane ACS reagent, ≥99.8%	Sigma
Tris-Cl	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3- propanediol hydrochloride	Reanal
Tween 20	TWEEN® 20 for molecular biology, viscous liquid	Sigma
Urīnviela	Urea, powder, BioReagent, for molecular biology, suitable for cell culture	Sigma- Aldrich
β-mercatoethanols	2-Mercaptoethanol ≥99.0%	Sigma- Aldrich

Buferi

Nosaukums	Sastāvs
10% SDS šķīdums	1 g SDS H ₂ O līdz 10 ml
2X hromatogrāfijas buferis	100 mM NaH ₂ PO ₄ 600 mM NaCl, pH 8.0
Akrilamīda/Bis akrilamīda šķīdums	29 g akrilamīds 1 g Bisakrilamīds H ₂ O līdz 100 ml
Aktivētā tripsīna šķīdums	1 µL Tripsīna darba šķīdums 9 µL šķelšanas buferis
Amonija persulfāta šķīdums	0.1g Amonija persulfāts 1 ml H ₂ O
Atkrāsošanas šķīdums	25mM Amonija Bikarbonāts 50% Acetonitrils
Coomasie blue krāsviela	0.8 g G-250 40 ml Etilspirts 10 ml HClO ₄ H ₂ O līdz 200ml
Darba buferis	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 20 mM imidazols 0.005% Tween 20, pH 8.0
DHAC šķīdums	18 mg DHAC H ₂ O līdz 1ml
Elūcijas buferis	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 250 mM imidazols 0.005% Tween 20, pH 8.0
Etanola mazgāšanas šķīdums	10% Etanols 90% miliQ ūdens
Fiksējošais šķīdums	30% Etanols 10% Etiķskābe 60% miliQ ūdens
Laemli 5X buferis	60mM Tris-Cl 2% SDS 10% glicerīns 5% β-merkaptotetanols 0.01% bromfenolzilais, pH 6.8
Maldi Matrix	2mg DHAP 33µl DHAC šķīdums 100 µl etanols
Mazgāšanas buferis	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 20 mM imidazols 0.005% Tween 20, pH 8.0
Saharozes buferis	0,25 M Saharoze 1 mM EDTA

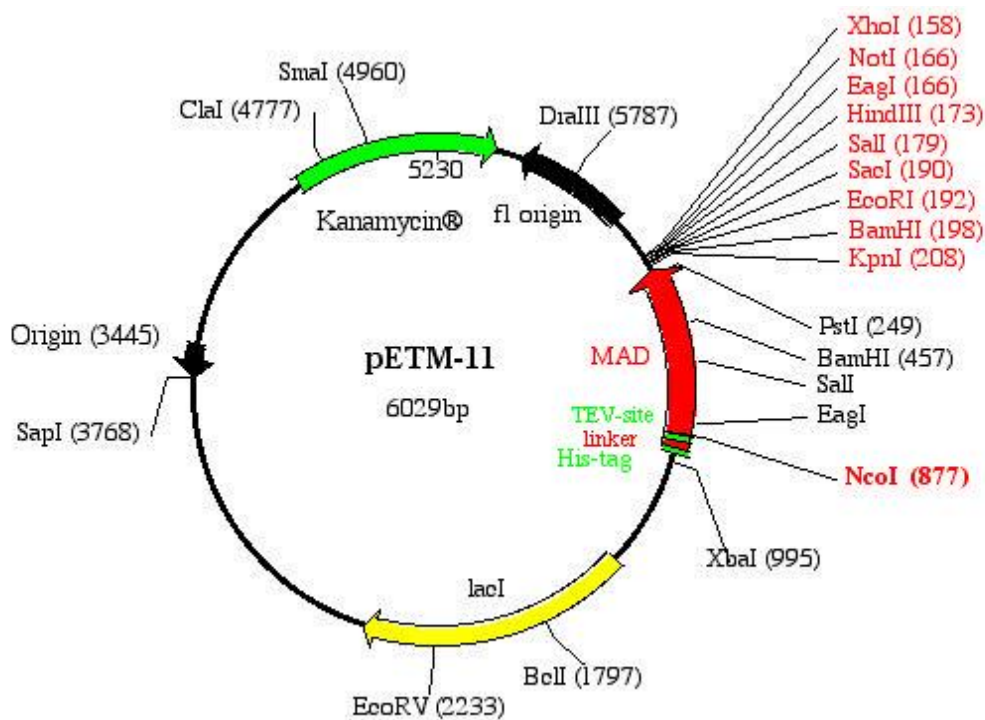
	50 mM Tris
Saistīšanās buferis	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 20 mM imidazols, pH 8.0
SDS PAGE elektroforēzes buferis	50mM Tris 384mM Glicīns 3.5 mM SDS
Stop šķīdums	5% Etiķskābe 95% miliQ ūdens
Šķelšanas buferis	25mM amonija bikarbonāts
Tripsīna darba šķīdums	5 μl Tripsīna stock šķīdums 45μ miloQ ūdens
Tripsīna stock šķīdums	Liofilizēts tripsīns 20μl miloQ ūdens
Tris buferis	50mM Tris 150mM NaCl pH 7.6
Urīnvielas buferis	7,0 M Urīnviela 2,0 M Tiourīnviela 40 mM Trīs 1,0% C7BzO pH 10,4

METODES

B. burgdorferi rekombinanto proteīnu iegūšana

Darbā tikai izmantoti *B. burgdorferi* sensu stricto rekombinantie proteīni rBB0689 un rBBA73, kas tika iegūti iepriekšējos pētījumos LBMC Molekulārās mikrobioloģijas laboratorijā prof. V. Baumaņa vadībā.

Proteīni tika iegūti, amplificējot attiecīgo gēnu no *B. burgdorferi* s.s. celma B31 DNS un klonējot ekspresijas vektorā pETM-11 (8. Attēls). Ekspresijas vektors ir saņemts no G. Stiera (G. Stier), EMBL (European Molecular Biology Laboratory, Vācija). Amplificēto gēnu klonējot šajā vektorā zem T7-lac promotera attiecīgais proteīns tiek ekspresēts *E. coli* šūnās iekļaujot N galā 6 histidīna aminoskābes un TEV proteāzes šķelšanas saiti (3. Tabula)



8. Attēls. Ekspresijas vektora pETM-11 karte.

Figure 8 Map of Expression vector pEtm

3. Tabula
Iegūto rekombinanto proteīnu raksturojums.
Table 3
Characteristics of recombinant borelial proteins

Gēns (atrašanās vieta <i>B. burgdorferi</i> genomā)	Amplificētie nukleotīdi (aminoskābes)	Iegūtā rekombinantā proteīna aminoskābju secība un teorētiskā molmasa
BB0689 (hromosoma)	64 – 468 (22-155)	MKHHHHHPMSDYDIPTTENLYFQGAMGHKID TKEDMKILYSEIAELRKKLNLNHLEIDDTLEK VAKEYAIKLGENTTHTLFGTTPMQRIHKYD QSFNLTREILASGIELNRVVNAWLNSPSHKEA LINTDTDKIGGYRLKTTDNIDIFVVLFGKRKY KN 162 aa, M= 18886,22
BBA73 (lp54 plazmīda)	82 – 891 (28-296)	MKHHHHHPMSDYDIPTTENLYFQGAMGNTE AISELQSSPIKLGKIKVLQKTEKIVSTQNLQNL QQSQFFKNEKEKIIKKIAQEFDENEKLINKIGP NIEMFAQTINTDIQKIEPNDQFGINKTLFTEKK DNNIDFMLKDNRLRRLFYSSLNYDENKIKKLA TILAQTSSNDYHYTLIGLIFWTGFKIQEAFES AVNILTKDEQKRLIFNFRKTQVKEIQENFEKL MQERNVWIKIVDNIIGEYDKNTGGCKADGKIL GEVIRVGYEHELDSNKSMQILNNIETPLKTC DHIHY 297 aa, M= 34665,47

Piezīmes. Pasvītrotas 6XHis un TEV proteāzes šķelšanas vietas aminoskābju secības. *B. burgdorferi* proteīna aminoskābju secība ir izcelta.

Audu lizātu pagatavošana

1. Atkausē ledus vannā iepriekš iegūtos žurkas audus (šajā darbā smadzenes un aknas), sadala tās vienādos gabaliņos (aptuveni 1x1x1 mm) un ievieto tās homogenizēšanas stobriņos.
2. Pievieno 1 ml saharozes buferi
3. Homogenizē audus režīmā ar intensitāti 5, 30 sekundes, 3 cikli, starp cikliem veic atdzesēšanu ledus vannā.
4. Pēc homogenizācijas stobriņus centrifugē pie 10'000 rcf, 10 minūtes 4 C temperatūrā.
5. Nosūc supernatantu un pievieno urīnvielas buferi.
6. Atkāro 3. un 4. soli.

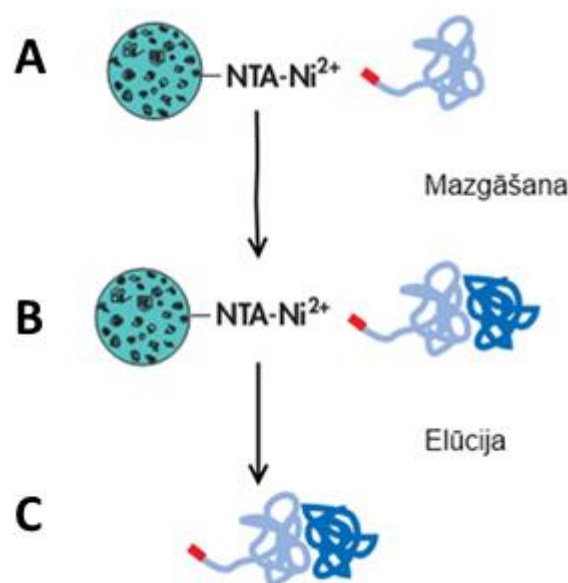
Ni²⁺ afinitātes hromatogrāfija

Darbā izmantotās metodes pamatā ir Ni²⁺ afinitātes hromatogrāfijas princips, kas pamatojas uz rekombinanto proteīnu 6XHis aminoskābju atlikumu saistīšanos ar Ni²⁺ joniem. Šī ir viena no metodēm, kura tiek plaši pielietota proteīnu mijiedarbības pētījumiem (9. Attēls). Šajā darbā tā tika izmantota, lai noteiktu *B. burgdorferi* ārējās virsmas proteīnu potenciālos mijiedarbības partnerus. Pētāmie *B. burgdorferi* proteīni (ēsmas proteīni, šajā darbā rBB0689 un rBBA73) tika piesaistīti pie imobilizēta nesēja (magnētiskām Ni-NTA agarozes bumbiņām) un tad apstrādāti ar žurkas audu lizātiem.

Ni²⁺ afinitātes hromatogrāfijas reakcija tika veikta saskaņā ar magnētisko lodīšu ražotāja QIAGEN norādītajiem ieteikumiem.

Darba gaita:

1. 400 µl saistīšanās buferī izšķīdina 20 µg ēsmas proteīna un pievieno 20 µl Ni NTA agarozes bumbiņu suspensijas. Agarozes bumbiņas vorteksē pirms katras pipetēšanas.
2. Stobriņus ar reakcijas maisījumu vorteksē, ievieto automātiskajā maisītājā un 1h inkubē istabas temperatūrā, tādējādi nodrošinot ēsmas proteīna piesaistīšanos pie nesēja.
3. Novieto stobriņus magnētiskajā statīvā uz 1 minūti, nosūc supernatantu.
4. Agarozes bumbiņas 2 reizes mazgā ar 400 µl mazgāšanas bufera, lai atbrīvotos no nepiesaistītā ēsmas proteīna un iespējamajiem piemaisījumiem.
5. Pēc mazgāšanas nosūc mazgāšanas



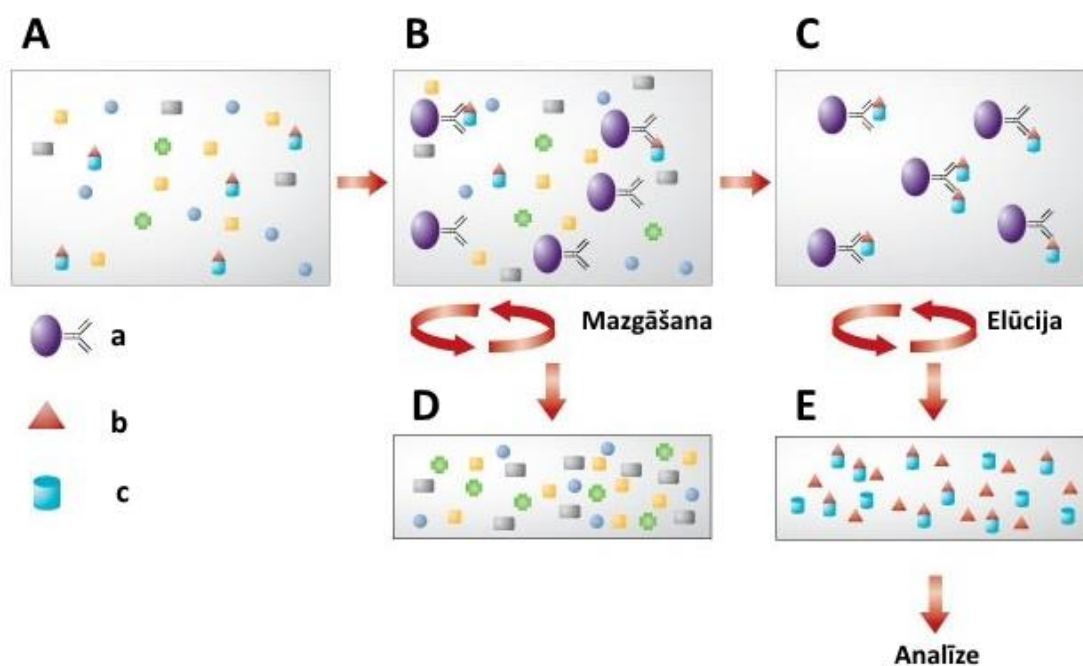
9. Attēls. Ni-NTA afinitāte hromatogrāfijas shēma. A – ēsmas proteīns, kas satur 6xHis iezīmi tiek pievienots pie nesēja, magnētiskas agarozes bumbiņas. B – nesējs un ēsmas proteīns tiek apstrādāts ar mērķa proteīnu saturošu audu lizātu. C – tiek aizvākts audu lizāts un piemaisījumi. Ēsmas un mērķa proteīna komplekss tiek eluēts.

Figure 8 Ni-NTA pulldown assay. A – bait protein with Poli His tag is immobilized on magnetic agarose bead, B – Bead and bait protein is treated with lysate containing prey protein. C – removal of lysate. Bait-prey protein complex elution.

- buferi un pievieno 100 μ l darba bufera, vorteksē, novieto uz magnētiskajā statīvā 1 minūti, nosūc supernatantu.
- Pievieno 400 μ l sagatavotā audu lizātu šķīduma (6,36 μ g/ml) un 2x hromatogrāfijas bufera attiecība 1:1), inkubē istabas temperatūrā uz automātiskā maisītāja 1 h.
 - Novieto stobriņus uz magnētiskā statīva 1 minūti, nosūc supernatantu, agarozes bumbiņu-proteīnu kompleksu 3 reizes mazgā ar 400 μ l porcijām darba bufera.
 - Veic elūciju 50 μ l elūcijas bufera. Vorteksē, patur 1 minūti uz magnētiskā statīva, savāc eluātu.
 - Eluātu izmanto tālākajās analīzēs.

Proteīnu kompleksu imūnprecipitācija (Co-Ip)

Proteīnu kompleksu imūnprecipitācija (Co-Ip) ir proteīnu-proteīnu mijiedarbības pētījumu metode, kurā ēsmas un mērķa proteīna komplekss tiek izdalīts ar imobilizētas antivielas palīdzību (ēsmas proteīns kalpo kā antigēns) (10. Attēls). Gala rezultātā eluātā tiek iegūts tīrs ēsmas-mērķa proteīna komplekss. Šai metodei tiek izmantoti rekombinantie proteīni bez poli histidīna iezīmes. Metode sastāv no vairākiem posmiem, kas uzskaitīti tālāk.



10. Attēls. Proteīnu kompleksu imūnprecipitācija. Apzīmējumi. A – audu lizāts vai proteīnu maisījums, B – Antivielu un proteīnu kompleksa izveide, C – izdalītais antivielas-antigēna-mērķa proteīna kompleksa maisījums, D – mazgāšanas frakcija, E – eluāts. a – imobilizēta antiViela, b – antigēns, c – mērķa proteīns

Figure 10 Protein complex immunoprecipitation. A – tissue lysate or protein mixture, B – formation of antibody-protein complex, C – extracted antibody-antigen-prey protein complex, D – wash fraction, E – eluate, a – immobilised antibody, b – antigen, c – prey protein

Co-IP: Antivielu imobilizēšana uz kolonas

1. Uzsilda AminoLink Plus Coupling Resin līdz istabas temperatūrai.
2. Sagatavo 2mL 1X Coupling bufera katrai Co-IP reakcijai, atšķaidot 20X buferi
3. Maigi saskalina AminoLink Plus Coupling resin pudeli, lai iegūtu vienmērīgu maisījumu un iepipetē 50 µl masas katrā spin-kolonnā. Novieto kolonnu uz mirkocentrifūgas un centrifugē 1000Xg 1 minūti, pēc tam atmet caurplūdes frakciju.
4. Kolonnu divas reizes mazgā ar 200 µl 1X Coupling bufera, centrifugē un atmet caurplūdes frakciju.
5. Ar kolonnas apakšu maigi uzsit pa filtrpapīru, lai aizvāktu atlikušās caurplūdes frakcijas un uzliek apakšējo korķīti.
6. Sagatavo antivielu šķīdumu koncentrācijā 1 µg/µl, pievienojot ultratīru ūdeni, antivielu šķīdumu un 20X coupling buferi (10 µl 20x Coupling bufera, 180 µl H₂O, 10 µl antivielu šķīduma). Darbā tika izmantots anti rBB0689 un rBBA73 proteīnu poliklonālās peļu antivielas.
7. Velkmes skapī pievieno 3 µl nātrija ciānborhidrāta šķīduma uz katriem 200 µl reakcijas maisījuma.
8. Kolonai pievieno vāciņu un inkubē istabas temperatūrā 90-120 minūtes, nodrošinot, ka reakcijas maisījums vienmērīgi maisās.
9. Noņem apakšējo korķīti un viegli atskrūvē augšējo vāciņu. Spin-kolonnu novieto uz savākšanas stobriņa un centrifugē, saglabā caurplūdes frakciju, lai varētu verificēt antivielu piesaisti.
10. Noņem skrūvējamo vāciņu, pievieno 200 µl Coupling bufera, centrifugē un atmet caurplūdes frakciju. Atkārti soli vēl vienu reizi.
11. Pievieno 200 µl Quenching buffera, centrifugē un atmet caurplūdes frakciju.
12. Ar kolonnas apakšu maigi uzsit pa filtrpapīru, lai aizvāktu atlikušās caurplūdes frakcijas un uzliek apakšējo korķīti. Pievieno 200 µl Quenching buffera.
13. Velkmes skapī pievieno 3 µl nātrija ciānborhidrāta šķīduma, uzliek augšējo vāciņu un inkubē 15 minūtes maigi rotējot kolonnu.
14. Noņem apakšējo vāciņu un atskrūvē augšējo vāciņu, novieto kolonnu savākšanas stobriņā un centrifugē. Atmet caurplūdes frakciju.
15. Noņem augšējo vāciņu un mazgā mikstūru divas reizes ar 200 µl 1X coupling bufera, centrifugē un atmet caurplūdes frakciju.

16. Mazgā mikstūru sešas reizes ar 150 µl Wash bufera, centrifugējot pēc katras mazgāšanas reizes.

17. Turpina ar šūnu lizēšanu un Co-IP

Co-IP: proteīnu kompleksa piesaistīšana

Visi soļi jāveic 4° C, ja vien nav norādīta cita temperatūra.

Protokolā lietoto IP lysis/Wash buferi var aizstāt ar Dulbecco PBS buferi.

1. Sajauc kopā ēsmas un mērķa proteīnu saturošo šūnu vai audu lizātu attiecībā 1:1, kā arī nodrošina attiecīgās kontroles.

2. Atšķaida abus proteīnus saturošo šķīdumu ar IP lysis/wash buferi, lai kopējais šķīduma daudzums būtu robežās 100-500 µl uz 1 spin kolonnu

3. Divas reizes mazgā spin-kolonnu, kurā atrodas agarozes masa ar piesaistītajām antivielām (sagatavota iepriekšējā posmā 12.4.1.), ar 200 µl IP lysis/wash buferi, centrifugē un atmet caurplūdes frakciju.

4. Viegli ar kolonnu uzsit pa papīra dvieli, aizvācot atlikušā šķīduma pilienus un uzliek apakšējo vāciņu.

5. Pievieno ēsmas-mērķa proteīna kompleksu, uzliek augšējo vāciņu un inkubē 1-2 stundas, vai uz nakti 4° C temperatūrā.

6. Noņem apakšējo korķīti, nedaudz atskrūvē augšējo un novieto spin-kolonnu uz savākšanas kolonnas. Centrifugē un savāc caurplūdes frakciju tālākam analīzēm.

7. Noņem augšējo vāciņu, ievieto spin-kolonnu jaunā savākšanas kolonnā, pievieno 200 µl IP lysis/wash buferi un centrifugē.

8. Mazgā paraugu vēl 2 reizes ar IP lysis/wash buferi un centrifugē pēc katras mazgāšanas reizes.

Katra mazgāšanas frakcija ir jāpārbauda, lai optimizētu procesu.

Co-IP: proteīnu kompleksa elūcija

1. Ievieto spin-kolonnu jaunā savākšanas stobriņā, pievieno 10 µl Elūcijas bufera un centrifugē.

2. Neizņemot spin-kolonnu no savākšanas stobriņa, pievieno vēl 50 µl Elūcijas bufera, inkubē istabas temperatūrā 5 minūtes. Nav nepieciešamības aiztaisīt vai kratīt kolonnu.

3. Centrifugē un savāc caurplūdes frakciju. Vajadzības gadījumā veic atkārtotu elūciju, pārbauda katru elūcijas frakciju.

4. Lai saglabātu ar antivielām apstrādātās agarozes masas aktivitāti, nekavējoties sāk masas reģenerēšanu un uzglabāšanu atbilstoši ražotāja rekomendācijām.

Co-IP: Agarozes masas reģenerēšana un uzglabāšana

Šis solis nav obligāts.

1. Pievieno 100 µl 1X Coupling buferi, centrifugē un atmet caurplūdes frakciju, atkārtoti šo soli vēlreiz.

2. Uzliek apakšējo vāciņu, pievieno 200 µl Coupling bufera, uzliek augšējo vāciņu. Lai masa neizžūtu, ietin apakšējo kolonnas daļu parafilmā. Uzglabāšanai ilgāk par 2 nedēļām pievieno nātrija azīda šķīdumu (sodium azide), līdz gala koncentrācijai 0.02%.

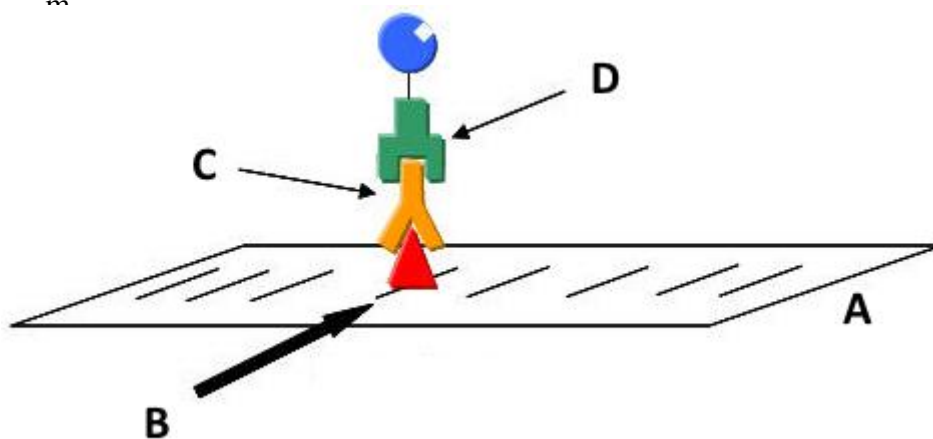
Attālinātais Western blots

Attālinātais (Far) Western blots ir tradicionālā Western blota modifikācija, kura tiek izmantota proteīnu-proteīnu mijiedarbības pētījumos. Līdzīgi kā standarta Western blota gadījumā sākotnēji tiek veikta mērķa proteīnus saturošā lizāta elektroforēze izmantojot SDS PAGE un proteīni tiek pārnesti uz membrānas. Pēc tam membrāna tiek bloķēta un apstrādāta ar ēsmas proteīnu. Ja ēsmas proteīns ir izveidojis kompleksu ar kādu no uz membrānas esošajiem proteīniem, to var detektēt līdzīgi kā tradicionālajā Western blotā. Primārās antivielas ir antivielas pret konkrēto ēsmas proteīnu, sekundārās antivielas ir antivielas pret primārajām antivielām, kas ir iezīmētas, lai būtu iespējams vizualizēt (11. Attēls).

Darba gaita:

1. Veic proteīnu paraugu elektroforēzi SDS-poliakrilamīda gēlā (SDS-PAGE; skat. sadaļu 12.6.)
2. Sagriež blotēšanas papīru un nitrocelulozes membrānu gēla izmērā; šajā darbā: 9x9 cm, 8 gabali papīra, 1 membrāna uz katru SDS PAAG gēlu).
3. Samitrina papīru un membrānu pārnese buferī.
4. Gēlu 5 minūtes inkubē pārnese buferī, istabas temperatūrā.
5. Pārnese kamerā vienu virs otras novieto 4 papīra loksnes, membrānu, gēlu un atlikušās papīra loksnes, uzmanoties, lai starp tām nepaliek burbuļi.

6. Kamerai pieslēdz strāvu un veic pārnesi 60 minūtes viena gēla gadījumā 25V 100mA vai 25V 200mA divu paralēlu gēlu gadījumā.
7. (Solis nav obligāts) Pēc pārneses membrānu samitrina un noglabā pie 4° C līdz tās tālākai izmantošanai.
8. Membrānu inkubē 10 mL bloķējošā buferī 1 stundu istabas temperatūrā.
9. Membrānu mazgā šūpojot ar 10 mL mazgāšanas bufera 5 minūtes, 3 reizes.
10. Membrānu vienu stundu inkubē 10 mL PBS buferī ar ēsmas proteīnu 1μ/ml
11. Atkārtoti 9. soli.
12. Membrānu 1 stundu inkubē kopā ar primārajām antivielām, kas izšķīdinātas 10 ml bloķējošajā buferī 1:1000.
13. Atkārtoti 9. soli.
14. Membrānu inkubē ar sekundārajām antivielām, kas izšķīdinātas 10 mL PBS buferī 1:2000.
15. Atkārtoti 9. soli.
16. Lai vizualizētu rezultātus veic krāsu reakciju izmantojot diamīna benzidīnu. 50mg diamīna benzidīna izšķīdina 5 mL Tris bufera (pH=7.6), pievieno 20 μL H₂O₂. Membrānu inkubē līdz proteīnu joslas ir redzamas (parasti 10-15



11. Attēls. Attālinātais Western blots. Apzīmējumi: A – blota membrāna ar mērķa proteīniem, B – membrānai piesaistījis ēsmas proteīns, C – primārā anti viela pret ēsmas proteīnu, D – ar enzīmu savienota sekundārā anti viela pret primāro anti vielu.

Figure 11 Far western blot. A – Blot membrane with target prey proteins, B – Bait protein, bond to membrane, C – primary antibody against Bait protein, D – Secondary antibody against primary antibody, coupled with enzyme

SDS PAGE

Lai pārlicinātos par eksperimentu rezultātiem tika veikta nātrija dodecilsulfāta denaturējošā poliakrilamīda gēla elektroforēze (SDS PAGE). Pirms elektroforēzes visi proteīni tiek denaturēti karsējot 1x Laemmli buferī, lai izjauktu to konformāciju, tādējādi proteīni elektriskajā virzās atkarībā pēc to molmasas.

1. Proteīnu maisījumam pievieno 5X Laemmli šķīdumu, attiecībā 5:1, vorteksē, karsē ūdens vannā 100°C 5 minūtes.
2. Sagatavo PAA sadalošā gēla maisījumu:

Sadalošais gēls (12%):

1.875 M Tris, pH 8.0	5 ml
H ₂ O	6,6 ml
Akrilamīda bisakrilamīda šķīdums	8 ml
10% SDS	0,2 ml
Amonija persulfāta šķīdums	0.2 ml

Sadalošā gēla šķīdumam pievieno 0.02 ml TEMED, vienmērīgi samaisa un nekavējoties iepilda šķīdumu gelam sagatavotajā vanniņā, atstājot no augšējās malas aptuveni 1.5 cm. Lai nodrošinātu to, ka gēla virsējais slānis ir līdzens, pa virsu uzpilina 10 µl butanola. Kad sadalošais gēls ir sacietējis, nolej nost šķīdumu.

3. Sagatavo PAA koncentrējošā gēla maisījumu:

Koncentrējošais gēls (2%):

0.6 M Tris, pH 6.8	1 ml
H ₂ O	7,5 ml
Akrilamīda/bisakrilamīda šķīdums	1,4 ml
10% SDS	0.1 ml
Amonija persulfāta šķīdums	0.14 ml

Koncentrējošajam gelam pievieno 7 µl TEMED, vienmērīgi samaisa, un piepilda atlikušo elektroforēzes formiņas daļu. Iestiprina ķemmīti un ļauj gelam sacietēt.

4. Gēla bedrītēs iepilda 5 µl elektroforēzes marķiera, un līdz 20 µl pētāmā parauga.
5. Elektroforēzes iekārtai uzliek vāku, pievieno to pie strāvas avota un veic elektroforēzi režīmā 100 V, 25 mA.
6. Elektroforēzi beidz, kad elektroforēzes krāsa sasniegusi 0,5 cm attālumu no gēla apakšas.

Krāsošana ar Coomassie blue

1. Gēlu ievieto 50% spirta šķīdumā un patur 10 minūtes istabas temperatūrā.

2. Gēlu izņem no spirta šķīduma un pārlej par Coomassie blue krāsas šķīdumu un velkmes skapī inkubē 10 minūtes.
3. Nolej nost krāsvielu un skalo gēlu ar destilētu ūdeni, kamēr ūdens vairs nemaina krāsu.
4. Atstāj gēlu ūdens peldē uz nakti, lai atkrāsojas.

Krāsošana ar sudrabu

1. Sagatavo Fiksēšanas šķīdumu, Stop un Etanola mazgāšanas šķīdumu.
2. Mazgā gēlu ultratīrā ūdenī 5 minūtes, nomaina ūdeni, atkārto vēl vienu rezi.
3. Nolej ūdeni un pievieno fiksējošo šķīdumu, inkubē istabas temperatūrā 15 minūtes, apmaina šķīdumu, un inkubē vēl 15 min - 24h.
4. Mazgā gēlu ar etanola mazgāšanas šķīdumu, 5 minūtes, kopumā 2 reizes.
5. Mazgā gēlu ar ultratīru ūdeni 5 minūtes, 2 reizes.
6. Tieši pirms lietošanas sagatavo Ierosinātāja šķīdumu sajaucot Sudraba krāsas ierosinātāju un ūdeni attiecībā 1:500, piem. 60 μ L uz 30 mL ūdens
7. Inkubē gēlu Ierosinātāja šķīdumā precīzi 1 minūti.
8. Nekavējoties mazgā gēlu ar ultratīru ūdeni 1 minūti, 2 reizes.
9. Sajauc Sudraba krāsas pastiprinātāju ar ar sudraba krāsu 1:100 un nekavējoties pievieno to gelam, inkubē 5 minūtes.
10. Ātri apmazgā gēlu ar ūdeni 20 sekundes 2 reizes.
11. Sagatavo Attīstīšanas šķīdumu sajaucot Sudraba krāsas pastiprinātāju ar sudraba krāsas attīstītāju 1:100 un nekavējoties pievieno gelam.
12. Kad sasniegta nepieciešamā krāsas intensitāte, nolej nost attīstīšanas šķīdumu un gēlu mazgā 2 reizes ar Stop šķīdumu. Otrā mazgāšanas reize ilgst aptuveni 10 minūtes.

Paraugu sagatavošana masas spektrometrijai

Paraugu atkrāsošana:

1. Ar tīru skalpeli izgriež attiecīgās proteīnu joslas no gēla un sadala tās 1x1x1 mm lielos gabaliņos.
2. Pievieno 200 μ L atkrāsošanas šķīduma un inkubē paraugus istabas temperatūrā 15 minūtes.
3. Nosūc atkrāsošanas šķīdumu un atkārto 2. soli.

Paraugu reducēšana un alkilēšana:

1. Pagatavo reducēšanas buferi, Katram paraugam pievieno 30µL reducējošā bufera un inkubē 10 minūtes, 60 C temperatūrā.
2. Atļauj paraugiem atdzist līdz istabas temperatūrai un aizvāc reducēšanas buferi.
3. Pagatavo alkilēšanas buferi un pievieno 30 µL katram paraugam. Inkubē tumsā, istaba temperatūrā 1h.
4. Aizvāc alkilēšanas buferi, un divreiz mazgā gēla gabaliņus ar 200 µL atkrāsošanas šķīduma 2 reizes, inkubējot paraugus 37 C 15 minūtes.

Šķelšana ar tripsīnu:

1. Nosūc iespējami vairāk atkrāsošanas šķīduma
2. Atūdeņo gēla gabaliņus, pievienojot 50 µL tīra acetonitrila un inkubē paraugus 15 minūtes istabas temperatūrā.
3. Nosūc visu acetonitrilu un žāvē gēla gabaliņu istabas temperatūrā 15 minūtes.
4. Pagatavo Aktivēta tripsīna šķīdumu un katram paraugam pievieno 10 µl aktivētā tripsīna šķīduma.
5. Inkubē paraugus pie 30 C vismaz 12 stundas.

Paraugu sagatavošana masas spektrometrijai.

1. Uz katru paraugu atsevišķā stobriņā ievieto 1µl 2% Trifluoretiķskābes (TFA).
2. TFA pievieno 1 µl tripsīna šķelšanas galaproduktu.
3. MALDI matriksu uzsilda līdz 50 C, un uz katru paraugu pievieno 1 µl silta matriks TFA un parauga maisījumam. Vorteksē.
4. Uz spektrometra plates dubultā uzpilina 1 µl sagatavotā parauga un pilienus velkmes skapī izžāvē.
5. Plati ievieto masas spektrometrā un veic analīzi.

Ērcu lizātu iegūšana

1. Pieaugušas *Ixodes ricinus* un *Ixodes persulcatus* ērces sašķiro pa dzimumiem un sugām, nosusina, un 4-5 ērces ievieto katrā vienā Lysing matrix D stobriņā.
2. Pievieno 100µl urīnvielas buferi un novieto stobriņus uz ledus.

3. Homogenizē ērces 60 sekundes, ar intensitāti 6.0 kopumā 4 reizes, starp homogenizācijas cikliem novietojot tās ledus vannā.
4. Pēc homogenizācijas pievieno 1,5 ml saharozes buferi un 20 sekundes vorteksē.
5. Centrifugē 10 minūtes pie $10^7000\times g$, $4^{\circ} C$.

Nosūc supernatantu un izmanto to tālākiem pētījumiem.

Proteīnu koncentrācijas noteikšana ar Nanodrop spektrometru.

Ar Nanodrop spektrometru ir iespējams noteikt DNS un proteīnu koncentrāciju šķīdumos. Ār ierīci ir iespējams mērīt šķīduma absorbciju pie noteikts viļņa garuma, kā rezultātā ir iespējams spriest par attiecīgo biomolekulu daudzumu šķīdumā. Proteīnu gadījumā tiek mērīta parauga gaismas absorbcija pie OD280. Tomēr, mērot proteīnu maisījumus un lizātus jāņem vērā, ka deterģenti un vairāku proteīnu maisījumi var nepatiesi radīt daudz lielāku proteīnu koncentrāciju, nekā tā ir patiesībā.

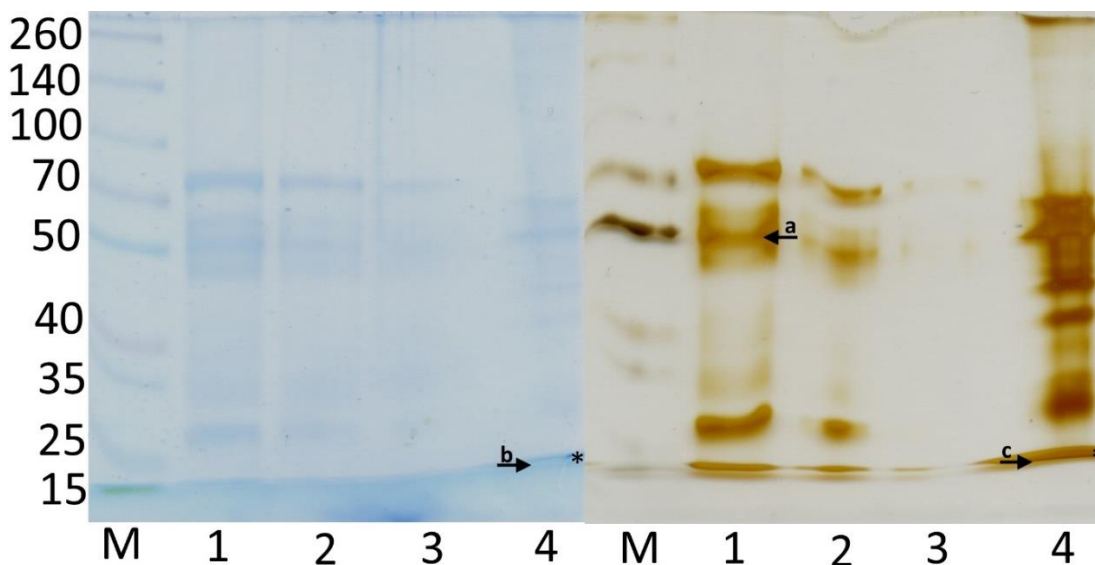
Mērīšanas procedūra:

1. Notīra spektrometra pjestālu un novieto uz tā $1\mu l$ miliQ ūdens, aizver vāku
2. Iestāda tukšo rezultātu, jeb nulles koncentrāciju
3. Novieto $1\mu l$ parauga uz pjestāla un aizver vāku.
4. Veic mērījumus katram paraugam, pirms tam pēc katra parauga notīrot un noslaukot spektrometra pjestālu ar miliQ ūdeni un salveti.

REZULTĀTI UN DISKUSIJA

Sudraba un Coomasie krāsošanas salīdzinājums

Sākotnēji, lai vizualizētu iegūtos rezultātus izmantojot PAAGE tika pielietota Coomasie blue krāsošanas metode, taču rodoties aizdomām par tās efektivitāti, tika nolemts izmantot sudraba krāsošanas komplektu (Silver stain for mass spectrometry). Paralēli krāsošanas intensitātei tika pārbaudīta arī abu metožu piemērotība tālākai proteīna joslu analīzei ar masspektrometrijas metodi. Uz gēla tika uzness BSA šķīdums (tika izvēlēts tāds BSA paraugs, kas bez BSA proteīna satur arī dažus blakusproduktus) dažādās koncentrācijās, kā arī viens no Ni-NTA afinitātes hromatogrāfija paraugiem (žurkas aknu audi, kas lizēti saharozes buferī ar rBB0689 proteīnu). Tika izveidoti divi SDS PAAGE gēli ar vienādu paraugu secību, veikta elektroforēze un tad viens no gēliem krāsots ar Coomasie blue, bet otra ar Sudraba krāsošanas komplektu (12. Attēls)



12. Attēls. Coomasie blue un Sudraba krāsošanas salīdzinājums. Apzīmējumi M – marķieris, kDa, 1– 24 μg BSA, 2 - BSA 12 μg, 3 - BSA 6 μg, 4 – Ni-NTA afinitātes hromatogrāfijas paraugs ar žurkas aknu lizātu saharozes buferī, * - proteīns rBB0689, C

Figure 12 Comparison between Coomasie blue and Silver staining. M – molecular weight marker, kDa, 1– 24 μg BSA, 2 - BSA 12 μg, 3 - BSA 6 μg, 6 – Ni-NTA Pulldown sample using rat liver lysate in Surcose buffer, * - rBB0689 protein, Arows indicates identified proteins (Table 4)

4. Tabula
MALDI TOF identificētie proteīni no 12. Attēlā
Table 4
Identified proteins from Figure 12 by MALDI-TOF

Apzīmējums	Nosaukums	UniProt Saīsinājums	Protein score
A	Acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3a OS=Bos taurus GN=SMPDL3A PE=2 SV=1	ASM3A_BOVIN	54
B	Uncharacterized protein BB_0689 OS=Borrelia burgdorferi (strain ATCC 35210 / B31 / CIP 102532 / DSM 4680) GN=BB_0689 PE=4 SV=1	Y689_BORBU	60
C	Uncharacterized protein BB_0689 OS=Borrelia burgdorferi (strain ATCC 35210 / B31 / CIP 102532 / DSM 4680) GN=BB_0689 PE=4 SV=1	Y689_BORBU	49

Tālāk tika veikta BSA trekā redzamo joslu identifikācija ar masspektrometrijas metodi, pieņemot ka analizējamais BSA paraugs, iespējams, nav pietiekoši labi attīrīts un līdz ar to sastāv no vairāku vēršu proteīnu maisījuma. Izmantojot sudraba krāsošanas metodi un paraugu sagatavošanu MS izdevās identificēt tikai vienu no „BSA” sastāvā esošajiem blakusproteīniem, savukārt izmantojot Coomassie krāsvielu „BSA” komponentu identifikācija nebija veiksmīga. To varētu skaidrot ar to, ka Silver stain komplektu ir iespējams labāk vizualizēt proteīnu joslas, tādējādi ļaujot tās precīzāk izdalīt no gēla. Tomēr, lai arī proteīnu joslas uz gēla ir vieglāk saskatīt un izgriezt, ar maziem proteīna daudzumiem nepietiek veiksmīgai to identifikācijai ar MS palīdzību. Uniprot datubāzē pieejamais apraksts par skābās spingomeliāzes fosfatāzi un norādītā molekulmasa atbilst novērotajiem rezultātiem (Proteīna teorētiskā molmasa ir 51 kDa, savukārt gēlā novērojamā zona atrodama pretim 50 kDa atzīmei).

Ar abām gēla krāsošanas metodēm ir izdevies identificēt izmantoto borēlijas ēsmas proteīnu rBB0689, veiksmīgā proteīna identifikācija, visticamāk, izdevusies pietiekoši lielās proteīna koncentrācijas dēļ.

Žurkas audu lizātu iegūšana

Iepriekš sasaldētas žurkas aknas un smadzenes tikai apstrādātas ar saharozes buferi (1. frakcija) un urīnvielas buferi (2. frakcija), kā rezultātā tika iegūtas 2 žurkas audu frakcijas ar atšķirīgiem proteīnu daudzumiem. Vadoties pēc literatūras datiem un izvēlētiem lizēšanas buferu sastāviem, 1. frakcija galvenokārt satur citoplazmatiskos un membrānu proteīnus, savukārt 2. frakcijā atrodami denaturēti nešķīstošie proteīni (5. Tabula).

5. Tabula
Iegūto žurkas aužu lizātu raksturojums.
Table 5
Characteristics of rat lysate

Aužu veids	Izmantotais buferis	Proteīnu koncentrācija, $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
Smadzenes	Saharozes lizēšanas buferis	6,36
Smadzenes	Urīnvielas lizēšanas buferis	83,96
Aknas	Saharozes lizēšanas buferis	13,33
Aknas	Urīnvielas lizēšanas buferis	83,35

Lielās atšķirības starp lizātiem, kas iegūti izmantojot šķīstošo un nešķīstošo lizēšanas buferi ir skaidrojamas divos veidos. Pirmkārt, saharozes lizēšanas buferī nav stipru reducējošu aģentu, tāpēc šajā lizātā galvenokārt atrodami tikai šķīstošie proteīni un solubilizēti membrānu proteīni, savukārt urīnvielas lizēšanas buferī atrodami spēcīgi reducētāji, kā rezultātā tas satur daudz vairāk denaturētu un daļēji denaturētu iepriekšējā buferī nešķīstošu proteīnu, kas tagad atradās izšķīdušā stāvoklī. Otrkārt, urīnviela visticamāk, ietekmēja proteīnu absorbciju mērot paraugu un deva iespaidu par milzīgu proteīnu koncentrāciju.

***Ixodes* ērcu aužu lizātu iegūšana**

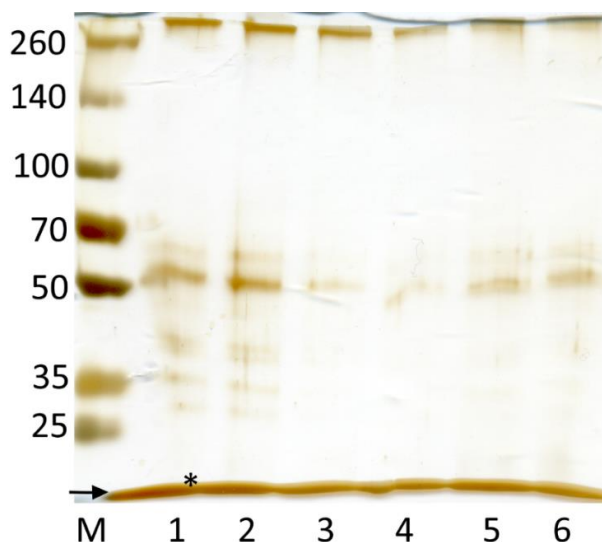
Sākotnējie mēģinājumi iegūt ērcu lizātus nebija sekmīgi, jo ērcu hitīna apvalks traucēja tās homogenizācijai, tāpēc tika izlemts tās homogenizēt 2 piegājienos, no sākuma tās homogenizējot nelielā tilpumā urīnvielas buferī, kas pēc tam tiku atšķaidīts ar saharozes buferi, lai denaturējošie aģenti pēc tam netraucētu vēlāk izmantojamajām metodēm. Rezultātā tika iegūti vairāki *Ixodes* ērcu aužu lizāti (6. Tabula).

6. Tabula
Iegūto *Ixodes* ērcu aužu lizātu raksturojums.
Table 6
Characteristics of *Ixodes* tick lysates

Parauga nosaukums	Izmantotais buferis	Proteīnu koncentrācija, $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
<i>Ixodes</i> tēviņi	Urīnvielas/Saharozes buferis 1:15	22,15
<i>Ixodes</i> mātītes	Urīnvielas/Saharozes buferis 1:15	17,37
<i>Ixodes ricinus</i> tēviņi	1x Laemli buferis	78,21
<i>Ixodes ricinus</i> mātītes	1x Laemli buferis	84,14
<i>Ixodes persulcatus</i> tēviņi	1x Laemli buferis	83,01
<i>Ixodes persulcatus</i> mātītes	1x Laemli buferis	83,96

rBB0689 Ni-NTA afinitātes hromatogrāfija ar žurkas audiem

Izmantojot iegūtos žurkas aknu un smadzeņu audu lizātus tika veikti vairākkārtīgi Ni-NTA afinitātes hromatogrāfija eksperimenti ar mērķi noskaidrot proteīna rBB0689 mijiedarbības partnerus. (13. un 14. Attēls).



13. Attēls. Ni-NTA afinitātes hromatogrāfija ar žurkas aknu audu lizātiem saharozes buferī. Apzīmējumi: M – marķieris, kDa, 1-6 – Žurkas aknu lizātu paraugi, * ēsmas proteīns rBB0689. Bultiņa norāda identificētos proteīnus (Tabula 5)

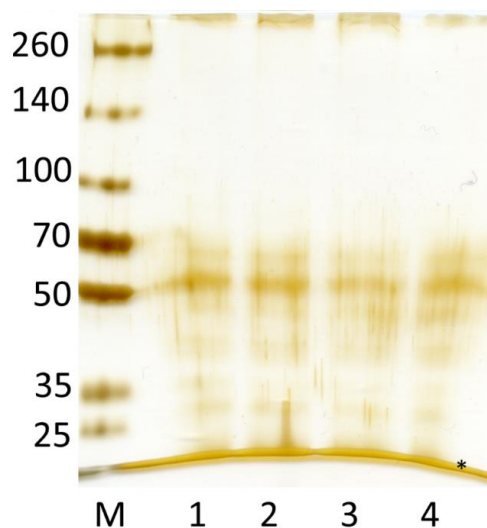
Figure 13. Ni-NTA Pull-down using rat liver lysate in sucrose buffer. M – molecular weight marker, kDa, 1-6 – Rat liver lysates, * - Bait protein rBB0689 Arrow indicates identified proteins (Table 5)

Lai pārlicinātos par metodes efektivitāti kontroles nolūkā katrā eksperimentā tika veikta ēsmas proteīna rBB0689 identifikācija ar masspektrometrijas metodi (5. Tabula).

5. Tabula
rBB0689 identifikācija ar MALDI TOF 13. attēlā redzamajā gelā
Table 5

Identification of rBB0689 using MALDI-TOF from gel visible in Figure 13

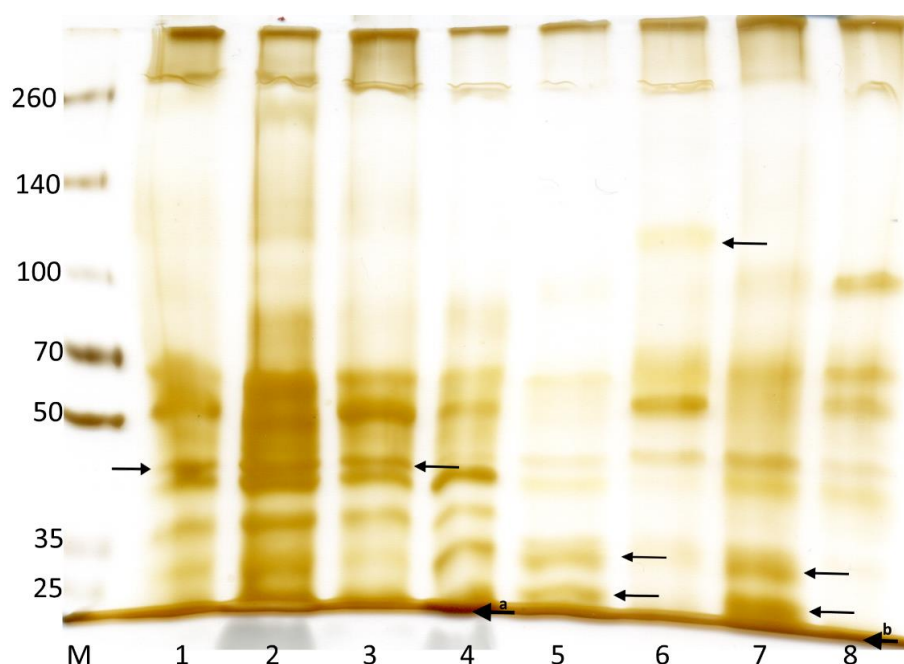
Apzīmējums	Nosaukums	UniProt Saīsinājums	Protein score
*	Uncharacterized protein BB_0689 OS=Borrelia burgdorferi (strain ATCC 35210 / B31 / CIP 102532 / DSM 4680) GN=BB_0689 PE=4 SV=1	Y689_BORBU	71



14. Attēls. Ni-NTA afinitātes hromatogrāfija ar žurkas aknu lizātiem saharozes buferī. Apzīmējumi: M – marķieris, kDa, 1-4 –žurkas aknu lizāti, *- Borēlijas ēsmas proteīns BB0689.

Figure 14. Ni-NTA Pulldown using rat liver lysate in sucrose buffer. M – molecular weight marker, kDa, 1-4 – Rat liver lysates, * - Bait protein rBB0689

Pēc vairākiem mēģinājumiem identificēt mijiedarbības partnerus, visi paraugi tika iekonzentrēti un sagatavoti MS analīzei (15. Attēls).



15. Attēls. Koncentrētu Ni-NTA afinitātes hromatogrāfija paraugu analīze. Apzīmējumi. M – marķieris kDa, 1-3 – žurkas aknu lizātu paraugi saharozes buferī, 4 – žurkas aknu kontroles variants, 5-7 – žurkas smadzeņu lizātu paraugi saharozes buferī, 8 – žurkas smadzeņu kontroles variants, ← - potenciālie rBB0689 mijiedarbības partneri, a, b – identificētās proteīnu joslas (6 Tabula)

Figure 15 Concentrated Ni-NTA pulldown samples. M – molecular weight marker, kDa, 1-3 – Rat liver lysates in sucrose buffer, 4 – rat liver control samle, 5-7 – rat brain lisates in sucrose buffer, 8 – rat brain control sample, ← - potencial interaction partners of rBB0689, a, b – identified proteins (Table 6)

-

6. Tabula
MALDI TOF identificētie proteīni 15. Attēlā
Table 6

Identified proteins from Figure 15 by MALDI-TOF

Apzīmējums	Nosaukums	UniProt Saīsinājums	Protein score
a	Hemoglobin subunit beta-1 OS=Rattus norvegicus GN=Hbb PE=1 SV=3;	HBB1_RAT;	77
a	Hemoglobin subunit alpha-1/2 OS=Rattus norvegicus GN=Hba1 PE=1 SV=3	HBA_RAT	65
a	Insulin-degrading enzyme OS=Rattus norvegicus GN=Ide PE=1 SV=1	IDE_RAT	54
b	Hemoglobin subunit alpha-1/2 OS=Rattus norvegicus GN=Hba1 PE=1 SV=3	HBA_RAT	57

Rezultāti uzrādīja, ka ir ievērojamas atšķirības proteīnu joslu spektrā starp Ni-NTA afinitātes hromatogrāfijas eksperimentiem ar žurkas aknu un smadzeņu audu lizātu paraugiem. Šis novērojums apstiprina proteīna-proteīna mijiedarbības reakciju specifiskumu

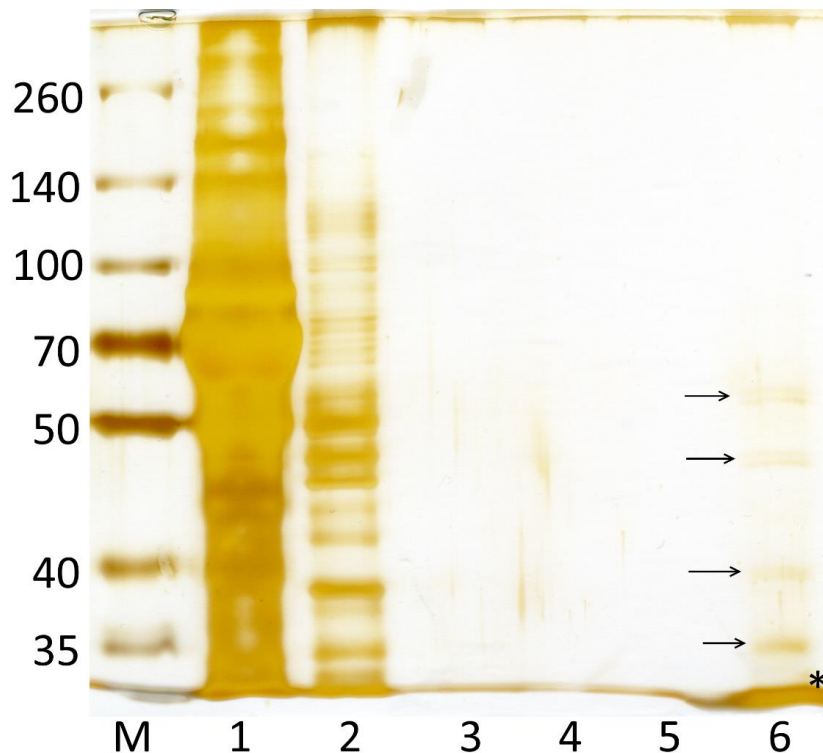
un var tikt skadrots ar atšķirīgiem proteoma profiliem šajos audos. Bez tam, rBBA73 proteīna gadījumā Ni-NTA afinitātes hromatogrāfijas eksperimentu laikā ar žurkas aknu audu paraugiem netika novērotas izteiktas potenciālu mijiedarbības partneru joslas. Novērojamas arī atšķirības starp attiecīgo lizātu eksperimenta un negatīvās kontroles variantiem, vedinot uz domām par specifisku piesaisti ēsmas proteīnam. Šis rezultāts arī pastiprina par absolūto nepieciešamību izmantot negatīvo kontroli katrā eksperimentā, kas ļauj izvairīties no nespecifisko proteīnu joslu analīzes. Liela daļa no joslām sakrīt visos variantos, liecinot par nespecifisku saistību un metālus saistošo proteīnu klātbūtni. Turpretīm atšķirības joslu intensitātē liecina par dažādām proteīnu koncentrācijām šajos audos.

Lai gan SDS-PAGE analīze uzrādīja vairāku proteīna joslu klātbūtni hromatogrāfijas eksperimentu paraugos, kas manāmi atšķirās no negatīvā kontrolē redzamo proteīnu profila, ar masspektrometrijas palīdzību ir izdevies identificēt proteīnus tikai no negatīvās kontroles variantiem (6. Tabula). Gan žurkas smadzeņu audu paraugā, gan žurkas aknu paraugā tika identificēts hemoglobīns, kura piesaisti pie agarozes bumbiņām var skaidrot ar to, ka hemoglobīns visticamāk piesaistījies agarozes bumbiņām uz tā imobilizēto niķeļa jonu dēļ. Smadzenes un aknas ir labi apasiņoti orgāni, tādēļ, visticamāk, arī to lizātos ir nonācis pietiekoši daudz hemoglobīna, lai paraugu koncentrēšanas rezultātā tā daudzums būtu pietiekams sekmīgai proteīna identifikācijai. Insulīnu degradējošais enzīms ir cinka metālpeptidāze (Noinaj et al., 2011). Šis enzīms tiek ekspresēts vairākos orgānos, tostarp arī aknās (Baumeister, Müller, Rehbein, & Richter, 1993), tā rezultātā aknu lizātā varētu būt pietiekoši lieli daudzumi šī proteīna, lai to veiksmīgi identificētu. Vienīgais apstāklis, kas nesakrīt ar novērojumiem ir šī proteīna masa, PAAGE gēlā proteīnu veidojošā josla atrodas starp 25 un 17 kDa atzīmi, savukārt Uniprot datubāzē pieejamā informācija vēsta, ka proteīna masa ir 117 kDa, kas ir aptuveni 10 reizes lielāka, nekā novērojumos. Šis apstāklis, visticamāk, norāda uz proteīna degradāciju analizējamā paraugā, kā arī pastāv iespējamība, ka iegūto masas spektru analīze ar „search unmached” opciju tomēr var nedot ticamus rezultātus.

rBB0689 potenciālos mijiedarbības partnerus nav izdevies identificēt, visticamāk, pārmērīgi mazās proteīnu koncentrācijas dēļ, kā rezultātā netika iegūts pietiekoši spēcīgs masas spektrs.

rBBA73 kompleksu imūnprecipitācija (Co-Ip) ar žurkas smadzeņu audiem.

Lai pārbaudītu rBBA73 proteīna potenciālo mijiedarbības partneru klātbūtni žurkas smadzeņu audos tika veikta kompleksu imūnprecipitācijas (Co-Ip) analīze (16. Attēls).

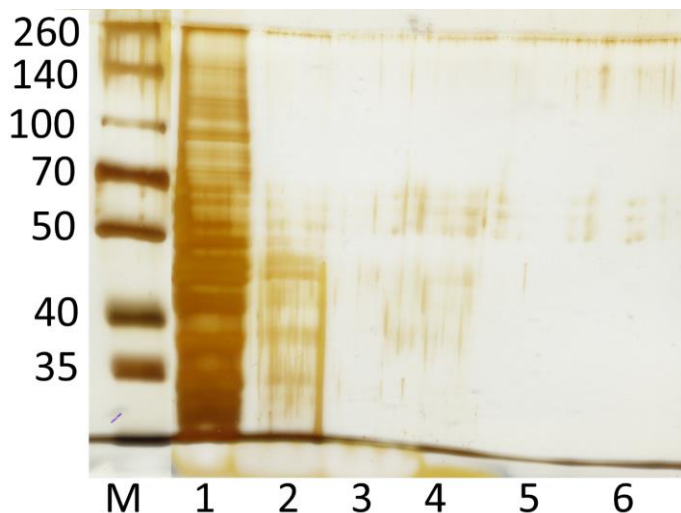


16. Attēls. Co-Ip izmantojot rBBA73 un žurkas smadzeņu audu lizātu saharozes buferī. Bultiņas norāda potenciālos mijiedarbības partnerus. * - ēsmas proteīns rBBA73. Apzīmējumi: M – marķieris, kDa, 1-5 - mazgāšanas frakcijas, 6 – eluāts.

Figure 16 Co-Ip using rBBA73 and rat brain lysate in sucrose buffer. Arows indicate potencial interaction partners. M – molecular weight marker, kDa, * - bait protein rBBA73 1-5 – wash fractions, 6 – Eluate.

Attēlā redzami rezultāti no Co-Ip eksperimenta, kas veikts izmantojot ēsmas proteīnu rBBA73 un žurkas smadzeņu audu lizātu nedēnaturējošā saharozes buferī. Elūcijas frakcijā ir novērojamas vairākas gaišas zonas, kuras varētu veidot šī proteīna potenciālie mijiedarbības partneri. Labi saskatāms, ka jau pēc trešās mazgāšanas reizes nav novērojami vairs nekādi piemaisījumi. Šīs sešas zonas atrodas tieši pretīm labi saskatāmām zonām otrajā mazgāšanas frakcijā. Tas varētu norādīt uz to, ka šīs zonas redzamas eluātā tikai tāpēc, ka lizātā tās ir sevišķi augstā koncentrācijā, un tāpēc zonas veidojošie proteīni nespecifiski piesaistījušies pie izmantotā nesēja, tomēr, šādā gadījumā, šie proteīniem būtu jābūt redzamiem visās mazgāšanas reizēs, kā arī kontroles variantā, kur netika izmantots ēsmas proteīns (17. Attēls). Tā kā kontroles variantā nav novērojama šāda piesaiste, ir iespējams izdarīt secinājumus, ka

novērotās proteīnu joslas ir specifiskas konkrētajam ēsmas proteīnam (šajā gadījumā rBBA73). Vairākas redzamās joslas var liecināt par to, ka ja mijiedarbība star mērķa un ēsmas proteīniem ir balstīta uz piesaisti kādam kopējam šiem proteīniem esošam proteīnu domēnam. Nevar izslēgt iespēju, ka mazie mērķa proteīna daudzumi varētu tikt izskaidrot arī ar to, ka izmantotās antivielas ar ēsmas proteīnu var būt daļēji saistījušās vai kā citādi ietekmējušas piekļuvi tā aktīvajam centram, kas, iespējams, varētu būt ietekmējis tā spēju veidot stabilu mijiedarbību ar mērķa proteīnu. Diemžēl arī šajā gadījumā rBBA73 potenciālos mijiedarbības partnerus nav izdevies identificēt, visticamāk, pārmērīgi mazās proteīnu koncentrācijas dēļ.

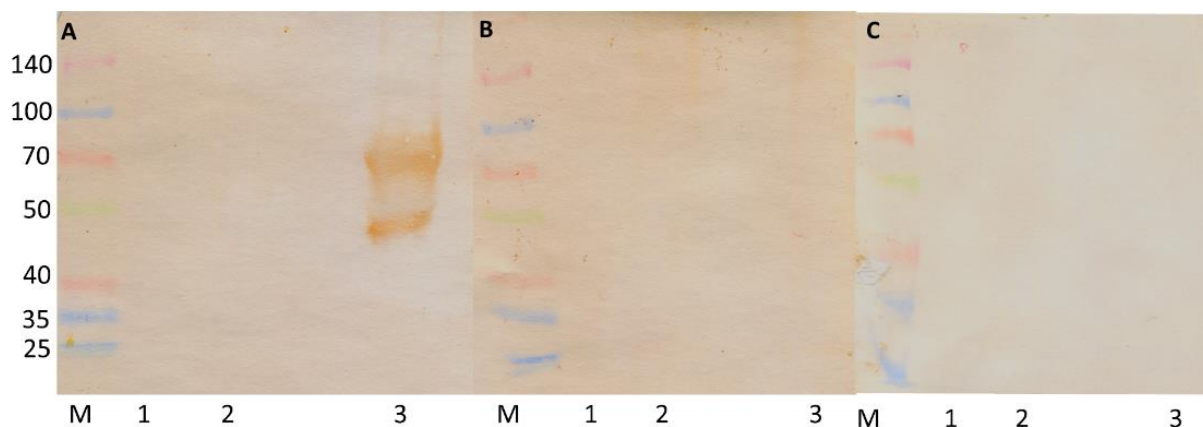


17. Attēls Co-IP kontroles variants izmantojot žurkas smadzeņu saharozes bufera lizātu. Apzīmējumi: M – marķieris kDa, 1-5 mazgāšanas frakcijas, 6 – eluāts

Figure 17 Control Co-IP using rat brain lysate in sucrose buffer. M – molecular weight marker, kDa, 1-5 – wash fractions, 6 – Eluate.

Proteīnu mijiedarbības analīze ar attālinātā Western blotu.

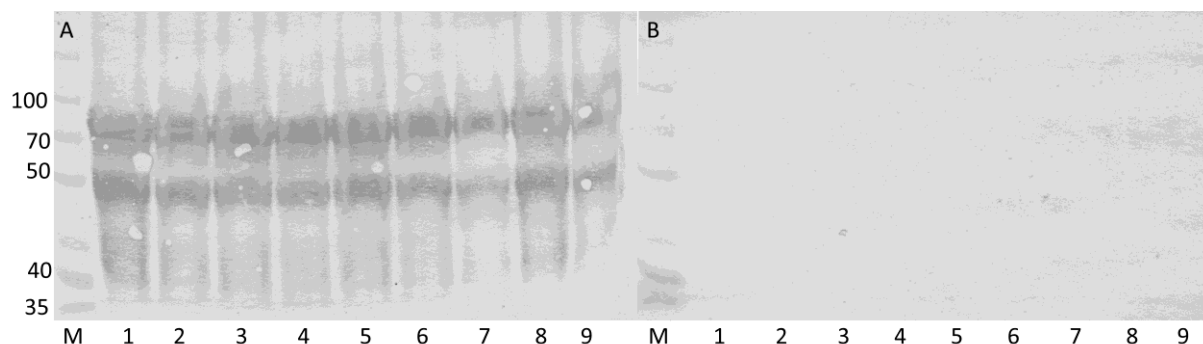
Ņemot vērā, ka vienam no Pfam54 ģimenes locekļiem BBA68 ir zināma mijiedarbība ar asins serumā esošo komplementa faktoru H, tika veikta rBBA73 potenciāla proteīnu mijiedarbības analīze ar zīdītāju seruma proteīniem. Paralēli tika izmantots arī rBB0689 proteīns un negatīvās kontroles variants bez borēliju proteīniem. Veicot attālināto Western blotu izmantojot cilvēka, suņa un kaķa serumus un borēliju ēsmas proteīnus, tika novērota proteīna rBB0689 saistība ar kaķu serumā sastopamiem proteīniem, uz ko norādīja 2 izteiktas joslas aptuveni 70 un 50 kDa. Savukārt rBBA73 saistība ar seruma proteīniem netika novērota (18. Attēls)



18. Attēls. Attālinātais Western blots ar zīdītāju serumiem. A) rBB689 B) rBBA73 C) Negatīvā kontrole. Apzīmējumi: M – marķieris, kDa, 1 – cilvēka serums, 2 – suņa serums, 3 – kaķa serums.

Figure 18 Far western blot using mammalian sera. A) rBB689 B) rBBA73 C) Negative control. M – molecular weight marker, kDa, 1 – human sera, 2 – canine sera, 3 – feline sera.

Lai pārlicinātos par to, vai novērotie rezultāti nebūtu nejauši, tika atkārtots attālinātais Western blots šoreiz izmantojot vairāku kaķu serumus. Arī šoreiz tik novērota rBB0689 piesaiste pie diviem kaķu serumā esošiem proteīniem katrā paraugā (19. Attēls).



19. Attēls. Attālinātais Western blots ar kaķu serumiem un borēlijas proteīniem. A) rBB0689 B) rBBA73. Apzīmējumi: M – marķieris, kDa. 1-9 – serumi no dažādiem kaķiem

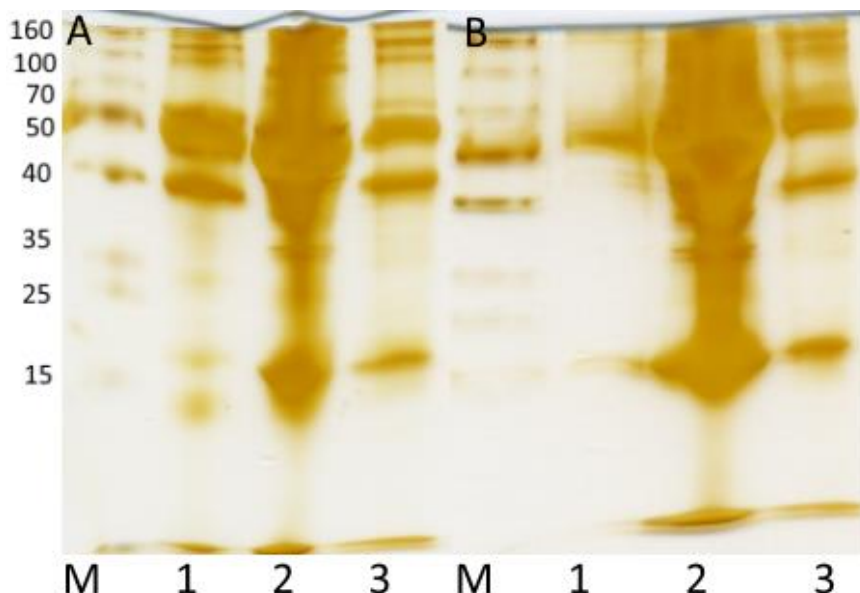
Figure 19 Far western blot using feline sera and borelial proteins. A) rBB0689 B) rBBA73. M – molecular weight marker, kDa 1-9 – sera from different feline

Iegūtie rezultāti liecina par to, ka borēlijas ēsmas proteīns rBB0689 saistās ar dažiem proteīniem, kas ir sastopami kaķu serumā, bet ne suņu vai cilvēku serumos. Diemžēl attālinātais Western blots sniedz tikai informāciju par mijiedarbības faktu, tāpēc konkrētā proteīna identifikācijai ir jāparedz darba turpinājums. Tomēr iespējams izvirzīt minējumus, kas varētu izraisīt novēroto parādību. Kā viena no iespējām ir tāda, ka novērotās varētu būt antivielas pret pētamajiem proteīniem, kas izstrādājušās šiem kaķiem pēc inficētās ērces kodiena. Diemžēl, darba gaitā nebija iespējams iegūt datus par kaķu veselības stāvokli, taču

tas, ka visi no eksperimentā iesaistītajiem kaķiem pirms tam būtu bijuši inficējušies ar *B. burgdorferi* ir ticams, ņemot vērā lielu *B. burgdorferi* inficēto ērcu daudzumu Latvijā. Literatūrā ir manāmas viedokļu atšķirības jautājumā par laimboreliozī kaķos. Daļa autoru uzskata, ka kaķi mums nezināmā veidā ir spēj izvairīties no borēliju infekcijas, citi savukārt uzskata, ka kaķu borelioze notiek asimptomātiski (Krupka, Straubinger 2010). Tādējādi pastāv iespēja, ka novērotie rezultāti tik tiešām norāda uz mehānismu, kas kaķiem vai nu ļauj izvairīties no boreliozes, vai arī ļauj tai notikt vieglā, asimptomātiskā formā.

Co-IP ar zīdītāju serumiem

Balstoties uz iepriekš iegūtajiem rezultātiem ar attālināto Western blotu tika nolemts pārbaudīt, vai līdzīgi rezultāti būtu novērojami izmantojot citu proteīnu mijiedarbības pētījumu metodi, tāpēc tika veikta Co-IP izmantojot iepriekšējā eksperimentā lietotos dažādu sugu zīdītāju serumus (20. Attēls).

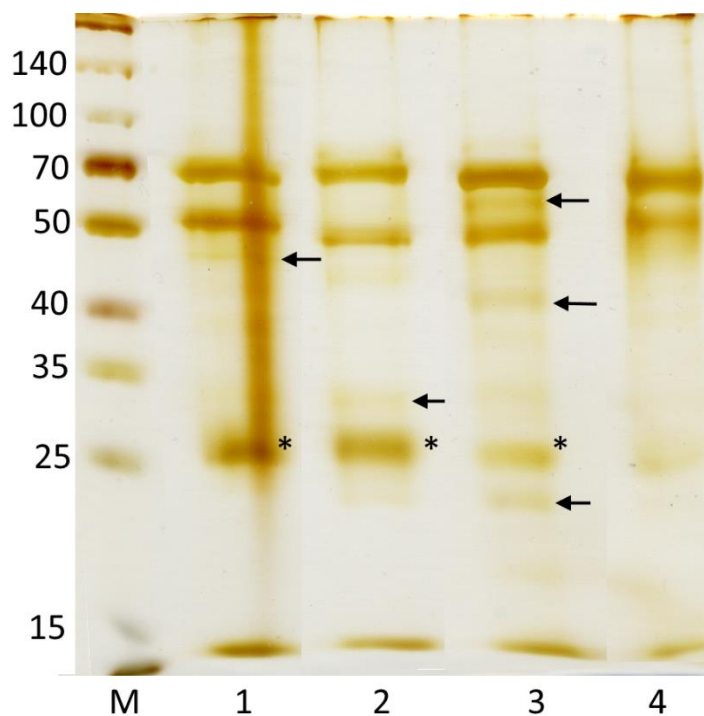


20. Attēls. Co-IP ar kaķa serumu un rBB0689 A)rBB0689 B)Negatīvā Kontrolē
Apzīmējumi: M – marķieris, kDa, 1-2 – mazgāšanas frakcijas, 3 – eluāts.

Figure 20 Co-IP using feline sera and rBB0689 A)rBB0689 B)Negative control M – molecular weight marker, kDa, 1-2 – Wash fractions, 3 – Eluate

Lai veiktu identificētu potenciālos proteīnu mijiedarbības partnerus elūcijas frakcijas tika vēlreiz uznestas uz kopīga gēla un veikta paraugu sagatavošana MS. Diemžēl, proteīnu joslu identifikācija ar masas spektrometrijas palīdzību nebija veiksmīga, kā rezultātā ir atliek tikai izteikt pieņēmumus par joslām kas redzamas 21. Attēlā.

Joslas, kas redzamas pie 50 un 70 kDa atzīmes, visticamāk, veidotas no serumā antivielām, kas varēja nepilnīgi saistīties pie agarozes matricā un elūcijas laikā no tā atdalīties. Pie 25 kDa atzīmes redzams ēsmas proteīns rBB0689. Attēlā redzamas arī vairākas joslas, kurās, iespējams, redzami potenciālie rBB0689 mijiedarbības partneri, tomēr to daudzums gēlā izrādījies par mazu, lai varētu veikt sekmīgu to identifikāciju ar masas spektrometru. Tas, ka partneru joslas atšķiras gan pēc intensitātes, gan pēc izvietojuma dažādām sugām, varētu liecināt par to, ka rBB0689 proteīns ir spējīgs saistīties ar dažādiem zīdītāju seruma proteīniem, iespējams, atpazīstot konkrētu kopīgu domēnu, kas ir sastopams visās šajās sugās (cilvēks, suns, kaķis). Šajā gadījumā svarīgs fakts ir arī procesā izmantoto paraugu natīvais stāvoklis, kas atšķir šo metodi no attālinātā Western blota, kur proteīni SDS-PAGE laikā ir denaturēti. Līdz ar to tas var norādīt uz proteīnu mijiedarbību tikai natīvos apstākļos. Atšķirīgā joslu intensitāte, visticamāk, skaidrojama ar konkrētā proteīna daudzumu serumā. Kā vēl vienu no skaidrojumiem var izvirzīt pieņēmumu, ka joslu intensitāte ir saistīta ar mijiedarbības stiprumu starp borēlijas proteīnu rBB0689 un attiecīgo zīdītāju proteīnu.



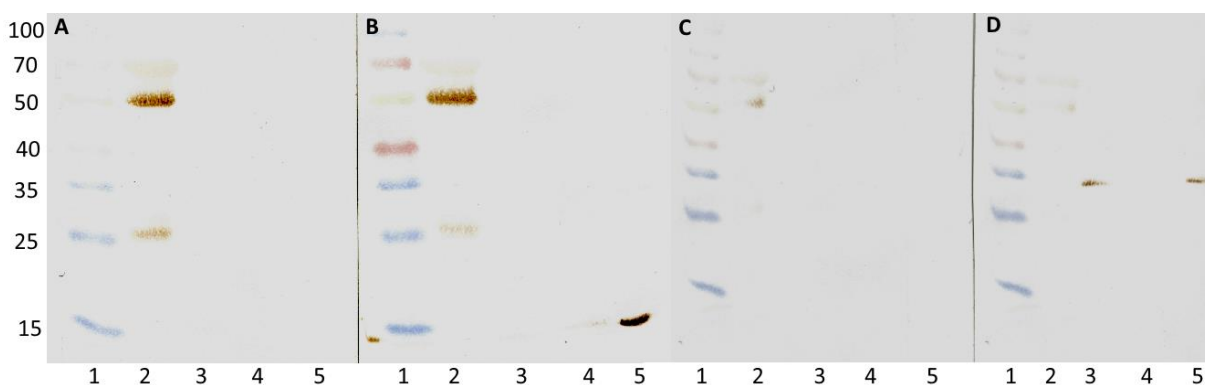
21. Attēls Co-IP zīdītāju seruma elūcijas frakcijas. Apzīmējumi: M – marķieris, kDa, 1 – kaķa serums, 2 – suņa serums, 3 – cilvēka serums, 4 – negatīvā kontrole, * borēlijas ēsmas proteīns rBB0689, bultiņas norāda potenciālos mijiedarbības partnerus.

Figure 21 Mammalian sera Co-IP fractions. M – molecular weight marker, kDa, 1 – feline sera, 2 – canine sera, 3 – human sera, 4 – negative control. * - bait protein rBB0689. Arrows indicate potential interaction partners.

Attālinātais Western blots ar Co-IP elūcijas frakcijām

Lai gūtu priekšstatu, kuras no Co-IP attēlā redzamām joslām ir antivielas, kas nespecifiski piesaistījās nesējam, tika veikts attālinātais Western blots izmantojot Co-IP iegūtās elūcijas frakcijas un dažādu ēsmas proteīnu un poliklonālo antivielu kombinācijas. Ar katru no ēsmas proteīniem (rBB0689 vai rBBA73) tika apstrādāta 2 membrānas, no kurām viena tika izmantota kā kontrole, apstrādājot to ar antivielām pret otru darbā izmatoto proteīnu

(attiecīgi, anti rBB0689 vai anti rBBA73). Iepriekš tika noskaidrots, ka darbā lietotām poliklonālām peļu antivielām nav novērojama krusteniskā reaktivitāte. Attēla B un D sadaļās labi redzams, ka eluātā atrodas ēsmas proteīns rBB0689, kas veido pozitīvo signālu ar anti rBB0689 antivielām, kas ārliecinoši apstiprina Co-IP metodei nepieciešamā kompleksa veiksmīgo izveidi. Kā bija sagaidāms, rezultātos ir novērojama 70 kDa un 50 kDa joslu krusteniskā reaktivitāte ar dažādām antivielām, kas norāda, ka tās ir imunoglobulīna molekulas. Attēlā B redzams, ka trešajā mazgāšanas reizē ir novērojama arī daļēja proteīna un antivielu kompleksa disociācija, kā rezultātā daļa no piesaistītā proteīna ir atdalījies no nesēja. Līdzīga situācija ir novērojama D sadaļā, kur rBBA73 no nesēja ir atdalījies otrajā mazgāšanas reizē 22. Attēls.



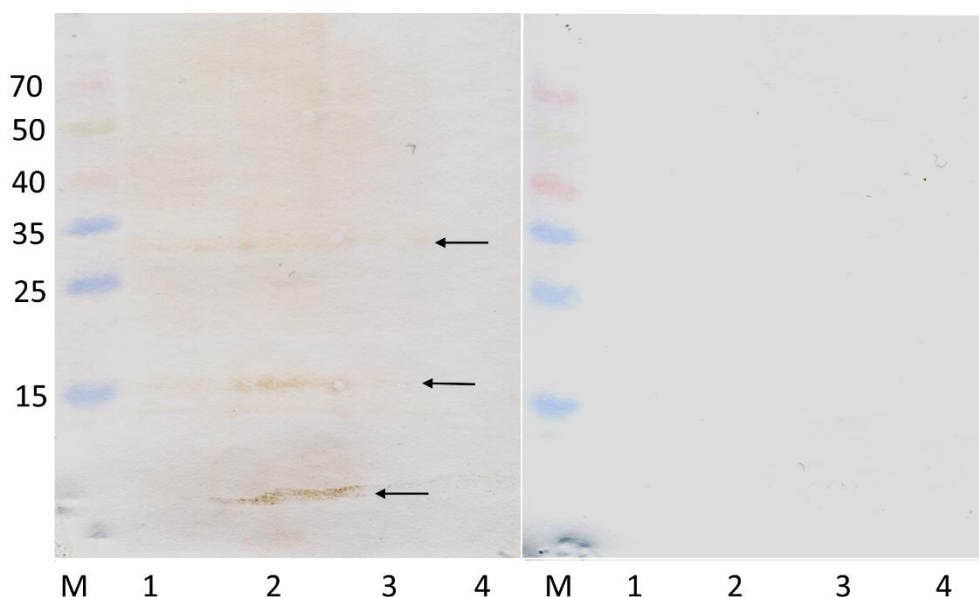
22. Attēls Co-IP frakciju Attālinātais Western blots. Apzīmējumi: 1 – Marķieris, kDa, 2-4 –mazgāšanas frakcijas, 5 – Eluāts. A) Membrāna, kas apstrādāta ar proteīnu rBB0689 un Antivielām pret rBBA73, B) rBB0689 un AntiBB0689, C) rBBA73 un AntiBB0689, D) rBBA73 un AntiBBA73

Figure 22 Far western blot of Co-IP fractions. 1 - molecular weight marker, kDa, 2-4 – wash fractions, 5 – eluate. A) Membrane treated with protein rBB0689 and antibodies against BBA73, B) rBB0689 and AntiBB0689, C) rBBA73 and AntiBB0689, D) rBBA73 and AntiBBA73

Veikts attālinātais western blots ar ērcu lizātiem.

Veicot attālināto Western blotu izmantojot ērcu lizātus un borēlijas ārējās virsmas proteīnus tika novērots, ka rBBA73, iespējams, saistās ar ērcu proteīniem. 23. Attēlā novērojama proteīna rBBA73 saistīšanās ar ērcu lizātiem. Visintensīvākais signāls ir vērojams ar *Ixodes persulcatus* ērcu mātīšu audu lizātu, savukārt visvājākā piesaiste novērojama ar *Ixodes ricinus* mātīšu lizātiem. Par negatīvo kontroli šajā eksperimentā tika izmantota identiski sagatavotā ērcu lizātu proteīnu Western blota membrāna, kurai apstrādes laikā netika pievienots rBBA73, bet tā tika apstrādāta ar anti-rBBA73 antivielām. Negatīvajā kontrolē nav

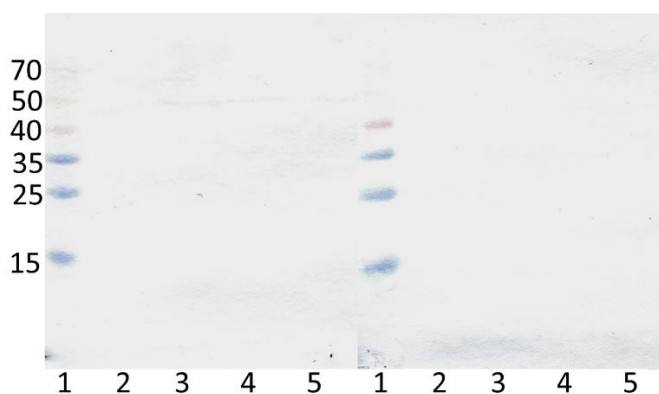
novērojama antivielu piesaiste membrānai, kas vedina uz domām par to, ka rBBA73 tik tiešām šajā eksperimentā ir saistījies ar ērces proteīniem.



23. Attēls. Attālinātais Western blots ar ērcu lizātiem un rBBA73. Apzīmējumi: M – marķieris, 1 - *Ixodes persulcatus* tēviņi, 2 - *Ixodes persulcatus* mātītes, 3 - *Ixodes ricinus* tēviņi, 4 - *Ixodes ricinus* mātītes. Bultiņas norāda uz spēcīgāk izteiktajām joslām

Figure 23 Far Western blot using tick lysates and rBBA73. M - molecular weight marker, kDa, 1 - *Ixodes persulcatus* males, 2 - *Ixodes persulcatus* females, 3 - *Ixodes ricinus* males, 4 - *Ixodes ricinus* females. Arows indicate darker zones

Atkārtojot eksperimentu izmantojot rBB0689 netika novērota proteīna mijiedarbība ar ērcu proteīniem (24. Attēls).



24. Attēls. Attālinātais Western blots ar ērcu lizātiem un rBB0689. Apzīmējumi: 1 – marķieris, kDa, 2 - *Ixodes persulcatus* tēviņi, 3 - *Ixodes persulcatus* mātītes, 4 - *Ixodes ricinus* tēviņi, 5 - *Ixodes ricinus* mātītes.

Figure 24 Far Western blot using tick lysates and rBB0689. M - molecular weight marker, kDa, 1 - *Ixodes persulcatus* males, 2 - *Ixodes persulcatus* females, 3 - *Ixodes ricinus* males, 4 - *Ixodes ricinus* females.

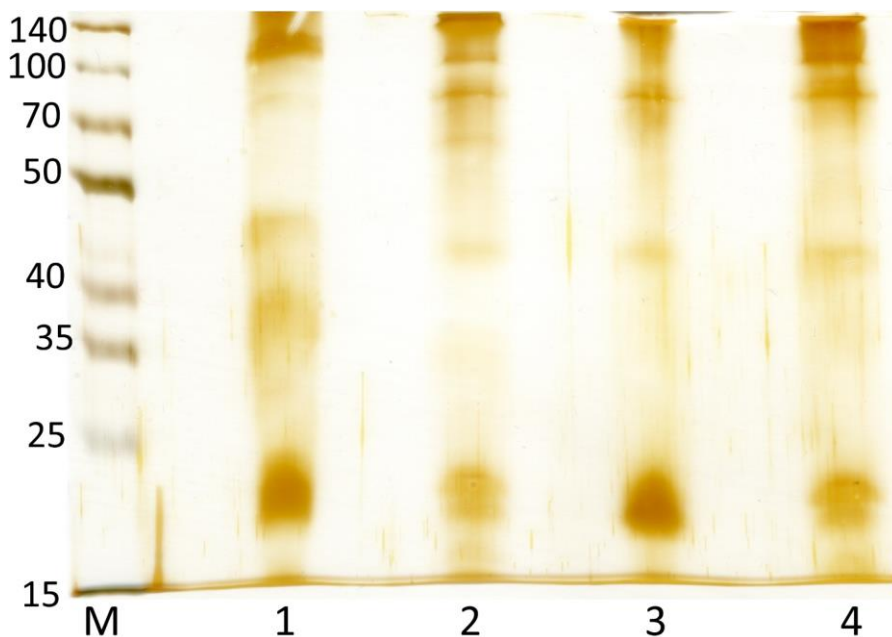
Lai gan literatūrā vairākkārt minēta un eksperimentāli pierādīta abu borēlijas proteīnu rBB0689 un rBBA73 ekspresija siltasiņu dzīvnieku iekšējai videi atbilstošos apstākļos, šajā darbā ir novērota rBBA73 iespējama saistību ar *Ixodes* ērcu proteīniem. Western blota

rezultātos netika novērota rBBA73 saistība ar konkrētu ērces proteīnu, veidojot vienu izteiktu joslu, tomēr neskaidri iezīmējušās vairākās joslas. Novērojumu pastiprina apstākļi, ka ērcu lizāti tika pagatavoti izmantojot neēdušas, pieaugušas ērces no veģetācijas, līdz ar to ievākšanas brīdī, kā arī līdz fiksēšanai ar etanolu, ērcēm nav bijusi piekļuve pie zīdītāju izcelsmes proteīniem. Neskaidri sakaitamās joslas varētu daļēji izskaidrot arī ar iespējamo ērcu proteīnu degradāciju ilgstošas uzglabāšanas laikā. Kā vēl vienu, bet maz ticamu izskaidrojumu novērotajām zonām Western blotā var minēt to, ka ērces bijušas inficētas ar borēlijām, kā rezultātā antivielas pret rBBA73 saistījušās pie ērcēs esošajiem borēliju proteīniem. Tomēr šī versija ir mazticama, jo rBBA73 gēna ekspresija neēdušās ērcēs ir niecīga, turklāt tādā gadījumā redzamām zonām būtu jāparādās arī negatīvajā kontrolē, kura netika apstrādāta ar borēlijas proteīniem, bet tikai ar antivielām pret šiem proteīniem.

Veikts Ni-NTA afinitātes hromatogrāfija ar ērcu lizātiem.

Vadoties no āttālinātā Western blota iegūtajiem rezultātiem tika veikta Ni-NTA afinitātes hromatogrāfija izmantojot uz agarozes bumbiņām imobilizētu rBBA73 un apstrādājos tos ar ērcu lizātiem (25. Attēls). Šajā eksperimentā kontroles variantā ir novērojamas vairāk joslas, nekā gadījumos, kad pie agarozes bumbiņām tika piesaistīts ēsmas proteīns. Tāpat vērojamas atšķirības starp *Ixodes* tēviņiem un mātītēm, ērcu tēviņu gadījumā novērojamas vairāk un izteiktākas joslas, kas nesakrīt ar blotā novēroto.

Pastāv iespēja, ka ērcu lizātu pagatavošanai izmantotie buferi ir saturējuši komponentus, kas traucējuši Ni-NTA afinitātes hromatogrāfijas norisei. Tas izskaidrotu gandrīz identiskos novērojumus starp kontroles un eksperimenta grupām, ēsmas proteīnu reprezentējošo zonu neatbilstību to teorētiskajai molekulmasai, kā arī neveiksmīgo mēģinājumu identificēt ēsmas proteīnu.



25. Attēls Ni-NTA afinitātes hromatogrāfija ar ērcu lizātiem un BBA73. Apzīmējumi: M – Marķieris. kDa, 1 - *Ixodes* tēviņi, 2 - *Ixodes* mātītes, 3 - *Ixodes* tēviņi negatīvā kontrole, 4 - *Ixodes* mātītes negatīvā kontrole

Figure 25 Ni-NTA pulldown using tick lysates and rBBA73. M - molecular weight marker, kDa, 1 - *Ixodes* males, 2 - *Ixodes* females, 3 - *Ixodes* males negative control, 4 - *Ixodes* females negative control.

Diemžēl nav izdevies identificēt nevienu no vizualizētajiem proteīniem. Kā iespējamo cēloni var minēt mazu proteīna daudzumu, kas rezultējies neizteiktā masas spektrā. Tomēr, diezgan labi ir novērojamas atšķirības starp ērcu dzimumiem, kā arī kontroles variantiem, kas varētu norādīt uz to, ka borēlijas, iespējams, ar šī proteīna palīdzību varētu nodrošināt ko līdzīgu selektīvai ērcu atlasei, priekšroku dodot mātītēm. *Ixodes* ērcu mātītes ir šķietami labāks mērķis, jo tās barojas daudz ilgāk par tēviņiem tādējādi sniedzot iespēju baktērijai nokļūt no ērces uz siltasiņu saimnieku ērces nākošajā barošanās reizē.

rBBA73 saistība ar ērcu proteīniem vedina uz domām, ka tā funkcija ir saistīta ar baktērijas nokļūšanu no siltasiņu dzīvnieka uz ērci, tādējādi nodrošinot tās izplatīšanos tālāk no inficēta dzīvnieka uz neinficētu ērci, nimfu vai kāpuru. Šo pieņēmumu daļēji apstiprina (Gilmore et al., 2008) veiktais pētījums, kurā veidots BBA73 ekspresijas profils dažādos orgānos, tostarp arī ausī, kas ir viegli pieejama ērcēm barošanās laikā.

SECINĀJUMI

BBA73 un BB0689 ir novērojamas atšķirīgas mijiedarbības veids ar zīdītāju un artropodu proteīniem, norādot uz to atšķirīgo lomu *Borrelia burgdorferi* patogēnes mehānismos.

Novērojumi liecina, ka BB0689 ir iesaistīts procesos, kas saistīti ar siltasiņu dzīvniekiem.

BBA73 loma neskatoties uz literatūra aprakstīto paaugstināto ekspresiju zīdītāju organisma iekšējā vidē, varētu būt iesaistīts mijiedarbībā ar ērcēm.

BB0689 un BBA73 potenciālie mijiedarbības partneri audos var būt pārstāvēti necīga koncentrācijā. Pastāv iespēja, ka šie proteīni saistās ar ne-proteīnu makromolekulām.

PUBLIKĀCIJAS UN ZIŅOJUMI KONFERENCĒS

Maģistra darba izstrādes laikā sniegts ieguldījums šādu rakstu tapšanā:

Prevalence of tick-borne pathogens in ticks collected from migratory birds in Latvia. Capligina, V., Salmane, I., Keišs, O., **Vilks, K.**, Japina, K., Baumanis, V., & Ranka, R., Ticks and tick-borne diseases 5(1), 75-81. 2014

Analysis of the seroreactivity to recombinant *B. burgdorferi* antigens BBA65 and BBA73. Renate Ranka, Galina Muzje, Kalvis Brangulis, Ivars Petrovskis, **Karlis Vilks**, Valentina Capligina, Dace Bandere. RSU 2014. gada Zinātnisko Rakstu krājums,

Par maģistra darbā iegūtajiem novērojumiem ir ticis ziņots sekojošās konferencēs:

Association of borrelia burgdorferi outer surface proteins BB0689 and BBA73 with mammalian extracellular matrix, **K Vilks**, A Urķe, R Ranka, 1st Baltic Conference IMMUNOLOGICAL MODELLING: Theory and Practice, Rīga Stradiņš University, Riga, Latvia 2015

Exploring functions of borrelia proteins by protein-protein interaction approach. A Urķe, **K Vilks**, D Bandere, R Ranka, RSU International Student Conference Health and Social Sciences 2015, Riga, Latvia, 2015

Characterisation of antigenic properties of recombinant *B. burgdorferi* outer surface proteins from Pfam54 family. Galina Muzje, Ivars Petrovskis, **Karlis Vilks**, Valentina Capligina, Dace Bandere, Renate Ranka. 2nd Congress of Baltic microbiologists, 16.10-19.10.2014. Tartu, Estonia. Stenda referāts.

Study of *B. burgdorferi* outer membraneproteins by protein-protein interaction approach. R Ranka, **K Vilks**, K Brangulis, I Petrovskis, V Čapligina, V Baumanis , 38th FEBS Congress, St. Petersburg, Russia., 2013

PATEICĪBAS

Vēlos izteikt pateicību sekošošiem cilvēkiem:

Dr. biol. Renātei Rankai - par darba vadīšanu

Aijai Urķei - par palīdzību datu ieguvē

Dr. pharm Reinim Vilšķērstam – par žurkas audu iegūšanu

Dr. biol Dacei Skrastiņai – Par poliklonālo antivielu iegūšanu

Dr med. Vet. Inesai Bērziņai – par dzīvnieku serumu piešķiršanai

Dr. biol. Kalvim Brangulim – par rekombināto proteīnu iegūšanu

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

- Aberer, E., & Duray, P. H. (1991). Morphology of *Borrelia burgdorferi*: structural patterns of cultured borreliae in relation to staining methods. *J. Clin. Microbiol.*, 29(4), 764–772.
- Angel, T. E., Luft, B. J., Yang, X., Nicora, C. D., Camp, D. G., Jacobs, J. M., & Smith, R. D. (2010). Proteome analysis of *Borrelia burgdorferi* response to environmental change. *PLoS One*, 5(11), e13800. doi:10.1371/journal.pone.0013800
- Auwaerter, P. G. (2011). *Borrelia*: Molecular Biology, Host Interaction and Pathogenesis. In *Clinical Infectious Diseases* (Vol. 52, pp. 965–965). doi:10.1093/cid/cir083
- Balmelli, T., & Piffaretti, J.-C. (1995). Association between different clinical manifestations of Lyme disease and different species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Research in Microbiology*, 146(4), 329–340. doi:10.1016/0923-2508(96)81056-4
- Baranton, G., Postic, D., Saint Girons, I., Boerlin, P., Piffaretti, J.-C., Assous, M., & Grimont, P. A. D. (1992). Delineation of *Borrelia burgdorferi* Sensu Stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and Group VS461 Associated with Lyme Borreliosis. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42(3), 378–383. doi:10.1099/00207713-42-3-378
- Baumeister, H., Müller, D., Rehbein, M., & Richter, D. (1993). The rat insulin-degrading enzyme. *FEBS Letters*, 317(3), 250–254. doi:10.1016/0014-5793(93)81286-9
- Berende, A., Oosting, M., Kullberg, B.-J., Netea, M. G., & Joosten, L. A. B. (2010). Activation of innate host defense mechanisms by *Borrelia*. *European Cytokine Network*, 21(1), 7–18. doi:10.1684/ecn.2009.0179
- Berglund, J., Eitrem, R., Ornstein, K., Lindberg, A., Ringér, A., Elmrud, H., ... Norrby, R. (1995). An epidemiologic study of Lyme disease in southern Sweden. *The New England Journal of Medicine*, 333(20), 1319–27. doi:10.1056/NEJM199511163332004
- Bhate, C., & Schwartz, R. A. (2011). Lyme disease: Part I. Advances and perspectives. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 64(4), 619–36; quiz 637–8. doi:10.1016/j.jaad.2010.03.046
- Biškup, U. G., Strle, F., & Ružić-Sabljić, E. (2011). Loss of plasmids of *Borrelia burgdorferi* sensu lato during prolonged in vitro cultivation. *Plasmid*, 66, 1–6. doi:10.1016/j.plasmid.2011.02.006
- Brangulis, K., Petrovskis, I., Kazaks, A., Baumanis, V., & Tars, K. (2013). Structural characterization of the *Borrelia burgdorferi* outer surface protein BBA73 implicates dimerization as a functional mechanism. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 434(4), 848–853. doi:10.1016/j.bbrc.2013.04.028

- Brooks, C. S., Hefty, P. S., Jolliff, S. E., & Akins, D. R. (2003). Global Analysis of *Borrelia burgdorferi* Genes Regulated by Mammalian Host-Specific Signals. *Infection and Immunity*, *71*(6), 3371–3383. doi:10.1128/IAI.71.6.3371-3383.2003
- Brooks, C. S., Vuppala, S. R., Jett, A. M., & Akins, D. R. (2006). Identification of *Borrelia burgdorferi* outer surface proteins. *Infection and Immunity*, *74*(1), 296–304. doi:10.1128/IAI.74.1.296-304.2006
- Burgdorfer, W., Barbour, A., Hayes, S., Benach, J., Grunwaldt, E., & Davis, J. (1982). Lyme disease—a tick-borne spirochetosis? *Science*, *216*(4552), 1317–1319. doi:10.1126/science.7043737
- Caimano, M. J., Iyer, R., Eggers, C. H., Gonzalez, C., Morton, E. A., Gilbert, M. A., ... Radolf, J. D. (2007). Analysis of the RpoS regulon in *Borrelia burgdorferi* in response to mammalian host signals provides insight into RpoS function during the enzootic cycle. *Molecular Microbiology*, *65*(5), 1193–217. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05860.x
- Canica, M. M., Nato, F., Merle, L. du, Mazie, J. C., Baranton, G., & Postic, D. (1993). Monoclonal Antibodies for Identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. Associated with Late Cutaneous Manifestations of Lyme Borreliosis.
- Carroll, J. A., Cordova, R. M., & Garon, C. F. (2000). Identification of 11 pH-regulated genes in *Borrelia burgdorferi* localizing to linear plasmids. *Infection and Immunity*, *68*(12), 6677–84.
- Casjens, S. (2000). *Borrelia* genomes in the year 2000. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, *2*(4), 401–410.
- Casjens, S., Palmer, N., Van Vugt, R., Huang, W. M., Stevenson, B., Rosa, P., ... Fraser, C. M. (2000). A bacterial genome in flux: The twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Molecular Microbiology*, *35*, 490–516. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.01698.x
- Casjens, S. R., Mongodin, E. F., Qiu, W. G., Luft, B. J., Schutzer, S. E., Gilcrease, E. B., ... Fraser, C. M. (2012). Genome stability of lyme disease spirochetes: Comparative genomics of *borrelia burgdorferi* plasmids. *PLoS ONE*, *7*(3). doi:10.1371/journal.pone.0033280
- Clifton, D. R., Nolder, C. L., Hughes, J. L., Nowalk, A. J., & Carroll, J. A. (2006). Regulation and expression of bba66 encoding an immunogenic infection-associated lipoprotein in *Borrelia burgdorferi*. *Molecular Microbiology*, *61*(1), 243–58. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05224.x
- Dattwyler, R. J., & Luft, B. J. (1991). Overview of the clinical manifestations of *Borrelia burgdorferi* infection. *The Canadian Journal of Infectious Diseases = Journal Canadien Des Maladies Infectieuses*, *2*(2), 61–3.
- Di, L., Pagan, P. E., Packer, D., Martin, C. L., Akther, S., Ramrattan, G., ... Qiu, W.-G. (2014). *BorreliaBase*: a phylogeny-centered browser of *Borrelia* genomes. *BMC Bioinformatics*, *15*(1), 233. doi:10.1186/1471-2105-15-233

- Fikrig, E., Pal, U., Chen, M., Anderson, J. F., & Flavell, R. A. (2004). OspB antibody prevents *Borrelia burgdorferi* colonization of *Ixodes scapularis*. *Infection and Immunity*, 72(3), 1755–9.
- Fraser, C. M., Casjens, S., Huang, W. M., Sutton, G. G., Clayton, R., Lathigra, R., ... Venter, J. C. (1997). Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature*, 390(6660), 580–6. doi:10.1038/37551
- Gesslbauer, B., Poljak, A., Handwerker, C., Schüler, W., Schwendenwein, D., Weber, C., ... Kungl, A. J. (2012). Comparative membrane proteome analysis of three *Borrelia* species. *Proteomics*, 12(6), 845–58. doi:10.1002/pmic.201100211
- Gilmore, R. D., Howison, R. R., Schmit, V. L., & Carroll, J. A. (2008). *Borrelia burgdorferi* expression of the bba64, bba65, bba66, and bba73 genes in tissues during persistent infection in mice. *Microbial Pathogenesis*, 45(5-6), 355–60. doi:10.1016/j.micpath.2008.08.006
- Glöckner, G., Lehmann, R., Romualdi, A., Pradella, S., Schulte-Spechtel, U., Schilhabel, M., ... Platzer, M. (2004). Comparative analysis of the *Borrelia garinii* genome. *Nucleic Acids Research*, 32(20), 6038–46. doi:10.1093/nar/gkh953
- Henikoff, S. (1997). Gene Families: The Taxonomy of Protein Paralogs and Chimeras. *Science*, 278(5338), 609–614. doi:10.1126/science.278.5338.609
- Heymann, W. R., & Ellis, D. L. (2012). *Borrelia burgdorferi* Infections in the United States. *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*, 5(8), 18–28.
- Hinnebusch, J., & Barbour, A. G. (1991). Linear plasmids of *Borrelia burgdorferi* have a telomeric structure and sequence similar to those of a eukaryotic virus. *J. Bacteriol.*, 173(22), 7233–7239.
- Hughes, J. L., Nolder, C. L., Nowalk, A. J., Clifton, D. R., Howison, R. R., Schmit, V. L., ... Carroll, J. A. (2008). *Borrelia burgdorferi* surface-localized proteins expressed during persistent murine infection are conserved among diverse *Borrelia* spp. *Infection and Immunity*, 76(6), 2498–511. doi:10.1128/IAI.01583-07
- Huppertz, H. I., Böhme, M., Standaert, S. M., Karch, H., & Plotkin, S. A. (1999). Incidence of Lyme borreliosis in the Würzburg region of Germany. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 18(10), 697–703.
- Jacobs, J. M., Yang, X., Luft, B. J., Dunn, J. J., Camp, D. G., & Smith, R. D. (2005). Proteomic analysis of Lyme disease: global protein comparison of three strains of *Borrelia burgdorferi*. *Proteomics*, 5(5), 1446–53. doi:10.1002/pmic.200401052
- Jewett M. W., Coburn J., L. J. (2012). Schaechter’s Mechanisms of Microbial Disease. In *Schaechter’s Mechanisms of Microbial Disease*.
- Keller, A., Graefen, A., Ball, M., Matzas, M., Boisguerin, V., Maixner, F., ... Zink, A. (2012). New insights into the Tyrolean Iceman’s origin and phenotype as inferred by whole-genome sequencing. *Nature Communications*, 3, 698. doi:10.1038/ncomms1701

- Kraiczy, P., Skerka, C., Brade, V., & Zipfel, P. F. (2001). Further characterization of complement regulator-acquiring surface proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Infection and Immunity*, *69*(12), 7800–9. doi:10.1128/IAI.69.12.7800-7809.2001
- Krupka, I., & Straubinger, R. K. (2010). Lyme borreliosis in dogs and cats: background, diagnosis, treatment and prevention of infections with *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, *40*(6), 1103–19. doi:10.1016/j.cvsm.2010.07.011
- Kurtenbach, K., De Michelis, S., Etti, S., Schäfer, S. M., Sewell, H.-S., Brade, V., & Kraiczy, P. (2002). Host association of *Borrelia burgdorferi sensu lato* – the key role of host complement. *Trends in Microbiology*, *10*(2), 74–79. doi:10.1016/S0966-842X(01)02298-3
- Kurtenbach, K., Peacey, M., Rijpkema, S. G. T., Hoodless, A. N., Nuttall, P. A., & Randolph, S. E. (1998). Differential Transmission of the Genospecies of *Borrelia burgdorferi Sensu Lato* by Game Birds and Small Rodents in England. *Appl. Envir. Microbiol.*, *64*(4), 1169–1174.
- Liang, F. T., Nelson, F. K., & Fikrig, E. (2002). DNA microarray assessment of putative *Borrelia burgdorferi* lipoprotein genes. *Infection and Immunity*, *70*(6), 3300–3303. doi:10.1128/IAI.70.6.3300-3303.2002
- Lin, Y.-P., Chen, Q., Ritchie, J. A., Dufour, N. P., Fischer, J. R., Coburn, J., & Leong, J. M. (2015). Glycosaminoglycan binding by *Borrelia burgdorferi* adhesin BBK32 specifically and uniquely promotes joint colonization. *Cellular Microbiology*, *17*(6), 860–75. doi:10.1111/cmi.12407
- Livengood, J. A., Schmit, V. L., & Gilmore, R. D. (2008). Global transcriptome analysis of *Borrelia burgdorferi* during association with human neuroglial cells. *Infection and Immunity*, *76*(1), 298–307. doi:10.1128/IAI.00866-07
- Noinaj, N., Bhasin, S. K., Song, E. S., Scoggin, K. E., Juliano, M. A., Juliano, L., ... Rodgers, D. W. (2011). Identification of the Allosteric Regulatory Site of Insulysin. *PLoS ONE*, *6*(6), e20864. doi:10.1371/journal.pone.0020864
- Norris, S. J. (2006). Antigenic variation with a twist--the *Borrelia* story. *Molecular Microbiology*, *60*(6), 1319–22. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05204.x
- Norris, S. J. (2012). How do lyme borrelia organisms cause disease? The quest for virulence determinants(). *The Open Neurology Journal*, *6*, 119–23. doi:10.2174/1874205X01206010119
- Nowalk, A. J., Gilmore, R. D., & Carroll, J. A. (2006). Serologic proteome analysis of *Borrelia burgdorferi* membrane-associated proteins. *Infection and Immunity*, *74*(7), 3864–73. doi:10.1128/IAI.00189-06
- Ogden, N. H., Artsob, H., Lindsay, L. R., & Sockett, P. N. (2008). Lyme disease: a zoonotic disease of increasing importance to Canadians. *Canadian Family Physician Médecin de Famille Canadien*, *54*(10), 1381–4.

- Ohnishi, J., Piesman, J., & de Silva, A. M. (2001). Antigenic and genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* populations transmitted by ticks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(2), 670–5. doi:10.1073/pnas.98.2.670
- Ojaimi, C., Brooks, C., Casjens, S., Rosa, P., Elias, A., Barbour, A., ... Schwartz, I. (2003). Profiling of temperature-induced changes in *Borrelia burgdorferi* gene expression by using whole genome arrays. *Infection and Immunity*, *71*(4), 1689–705.
- Piesman, J., & Gern, L. (2004). Lyme borreliosis in Europe and North America. *Parasitology*, *129 Suppl*, S191–220.
- Poljak, A., Comstedt, P., Hanner, M., Schüler, W., Meinke, A., Wizel, B., & Lundberg, U. (2012). Identification and characterization of *Borrelia* antigens as potential vaccine candidates against Lyme borreliosis. *Vaccine*, *30*(29), 4398–406. doi:10.1016/j.vaccine.2011.10.073
- Pulzova, L., Kovac, A., Mucha, R., Mlynarcik, P., Bencurova, E., Madar, M., ... Bhide, M. (2011). OspA-CD40 dyad: ligand-receptor interaction in the translocation of neuroinvasive *Borrelia* across the blood-brain barrier. *Scientific Reports*, *1*, 86. doi:10.1038/srep00086
- Revel, A. T., Talaat, A. M., & Norgard, M. V. (2002). DNA microarray analysis of differential gene expression in *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(3), 1562–7. doi:10.1073/pnas.032667699
- Rudenko, N., Golovchenko, M., Grubhoffer, L., & Oliver, J. H. (2011). Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, *2*(3), 123–8. doi:10.1016/j.ttbdis.2011.04.002
- Salo, J., Loimaranta, V., Lahdenne, P., Viljanen, M. K., & Hytönen, J. (2011). Decorin binding by DbpA and B of *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii*, and *Borrelia burgdorferi* sensu Stricto. *The Journal of Infectious Diseases*, *204*(1), 65–73. doi:10.1093/infdis/jir207
- Schwan, T. G., Burgdorfer, W., & Garon, C. F. (1988). Changes in infectivity and plasmid profile of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, as a result of in vitro cultivation. *Infect. Immun.*, *56*(8), 1831–1836.
- Shi, Y., Xu, Q., McShan, K., & Liang, F. T. (2008). Both decorin-binding proteins A and B are critical for the overall virulence of *Borrelia burgdorferi*. *Infection and Immunity*, *76*(3), 1239–46. doi:10.1128/IAI.00897-07
- Siegel, C., Hallström, T., Skerka, C., Eberhardt, H., Uzonyi, B., Beckhaus, T., ... Kraiczy, P. (2010). Complement factor H-related proteins CFHR2 and CFHR5 represent novel ligands for the infection-associated CRASP proteins of *Borrelia burgdorferi*. *PLoS One*, *5*(10), e13519. doi:10.1371/journal.pone.0013519
- Stanek, G., & Reiter, M. (2011). The expanding Lyme *Borrelia* complex--clinical significance of genomic species? *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of*

the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 17(4), 487–93.
doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03492.x

Steere, A. C., Broderick, T. F., & Malawista, S. E. (1978). Erythema chronicum migrans and lyme arthritis: epidemiologic evidence for a tick vector1. *Am. J. Epidemiol.*, 108(4), 312–321.

Stinco, G., Ruscio, M., Bergamo, S., Trotter, D., & Patrone, P. (2014). Clinical features of 705 *Borrelia burgdorferi* seropositive patients in an endemic area of northern Italy. *TheScientificWorldJournal*, 2014, 414505. doi:10.1155/2014/414505

Subramanian, G., Koonin, E. V., & Aravind, L. (2000). Comparative genome analysis of the pathogenic spirochetes *Borrelia burgdorferi* and *Treponema pallidum*. *Infection and Immunity*, 68(3), 1633–48.

Todar K. (2006). *Todar's online textbook of bacteriology*. Retrieved April 13, 2015, from <http://www.textbookofbacteriology.net/>

Wang, G., Ojaimi, C., Wu, H., Saksenberg, V., Iyer, R., Liveris, D., ... Schwartz, I. (2002). Disease severity in a murine model of lyme borreliosis is associated with the genotype of the infecting *Borrelia burgdorferi sensu stricto* strain. *The Journal of Infectious Diseases*, 186(6), 782–91. doi:10.1086/343043

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. *The Journal of Experimental Medicine*, 199(5), 641–8. doi:10.1084/jem.20031960