



INSTYTUT CHEMII BIOORGANICZNEJ

Polskiej Akademii Nauk

Pracownia Inżynierii Białek

mgr inż. Paulina Bierwagen

**Strukturalne i funkcjonalne badania białek kluczowych
dla oddziaływań pomiędzy kleszczem, ssakiem i patogenem
na przykładzie białka OspC z krętka *Borrelia***

**Structural and functional studies of key proteins involved in the
interaction between ticks, mammals, and pathogens, with a focus
on the OspC protein from *Borrelia***

Rozprawa doktorska

Promotor:

dr hab. Anna Urbanowicz,
prof. IChB PAN

Poznań, 2024 r.

Pragnę wyrazić serdeczne podziękowania

dr hab. Annie Urbanowicz, prof. IChB PAN, za jej nieocenioną pomoc, wsparcie oraz cierpliwość okazywaną mi przez cały okres przygotowywania niniejszej pracy.

prof. dr hab. Mariuszowi Jaskólskiemu, prof. dr hab. Michałowi Sikorskiemu oraz dr hab. Miłoszowi Ruszkowskiemu, prof. IChB PAN, z którymi miałam przyjemność współpracować. Ich wiedza, pasja do nauki oraz zaangażowanie były dla mnie nieocenionym źródłem inspiracji.

dr Joannie Śliwiak oraz dr. Kamilowi Szpotkowskiemu za pomoc w przeprowadzeniu pomiarów oraz wykonane analizy w ramach badań strukturalnych.

Wszystkim współpracownikom IChB PAN, z którymi miałam zaszczyt współpracować podczas realizacji mojej pracy doktorskiej. Wasza współpraca, zaangażowanie oraz wsparcie były dla mnie niezwykle cenne.

Na koniec chciałabym wyrazić moją najgłębszą wdzięczność moim Rodzicom, Violettcie i Krzysztofowi, oraz Przyjaciółom Marcie i Marcinowi, którzy towarzyszyli mi na każdym etapie tej podróży. Dziękuję Wam za nieustanne wsparcie, pomoc oraz obecność.

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	7
1. WSTĘP	11
1.1. Borelioza – wprowadzenie.....	11
1.2. Kleszcz – wektor krętka <i>Borrelia</i>	14
1.2.1. Kleszcze z rodzaju <i>Ixodes</i> – charakterystyka	14
1.2.2. Cykl rozwojowy kleszcza <i>Ixodes</i> a cykl enzoptyczny <i>Borrelia</i>	15
1.2.3. Przystosowanie kleszcza do żerowania	16
1.3. Krętek <i>Borrelia</i> – czynnik sprawczy boreliozy	22
1.3.1. Ogólna charakterystyka krętka <i>Borrelia</i>	22
1.3.2. Genom oraz regulacja ekspresji genów <i>Borrelia</i>	25
1.3.3. Białka powierzchniowe – wyjątkowa cecha <i>Borrelia</i>	27
1.4. Lipoproteina powierzchniowa OspC	31
1.5. Oddziaływanie białka OspC z przykładowymi ligandami białkowymi	36
1.5.1. Plazminogen.....	36
1.5.2. Białko układu dopełniacza C4b	37
1.5.3. Białko śliny kleszcza – Salp15	38
2. CEL PRACY	41
3. MATERIAŁY I METODY	43
3.1. Materiały.....	43
3.1.1. Lista odczynników chemicznych.....	43
3.1.2. Bufory i roztwory.....	45
3.1.3. Pożywki	52
3.1.4. Żele	53
3.1.5. Markery masy	54
3.1.6. Złoża/kolumny do chromatografii białek	54
3.1.7. Startery.....	55
3.1.8. Plazmidy	56
3.1.9. Szczepy bakteryjne	58
3.1.10. Enzymy	58
3.1.11. Zestawy odczynników	59

3.2. Metody	60
3.2.1. Konstrukcja wektorów plazmidowych	60
3.2.1.1. Synteza cDNA metodą PCR do konstrukcji wektorów ekspresyjnych .	60
3.2.1.2. Oczyszczanie DNA metodą fenol-chloroform	63
3.2.1.3. Amplifikacja wektorów ekspresyjnych z serii pMCSG48	64
3.2.1.4. Trawienie enzymatyczne wektorów ekspresyjnych z serii pMCSG endonukleazą restrykcyjną SspI.....	64
3.2.1.5. Niezależne od ligacji klonowanie do wektorów ekspresyjnych z serii pMCSG	65
3.2.1.6. Ligacja do wektora pCR [®] 2.1-TOPO [®]	66
3.2.2. Transformacja szczepu bakteryjnego One Shot TOP10 <i>E. coli</i> oraz BL21 Star [™] (DE3) <i>E. coli</i>	67
3.2.3. Izolacja plazmidów w małej skali metodą lizy alkalicznej.....	67
3.2.4. Analiza jakości konstruktów DNA z wykorzystaniem reakcji PCR	69
3.2.5. Analiza jakości konstruktów DNA metodą sekwencjonowania.....	70
3.2.6. Otrzymywanie białek	70
3.2.6.1. Przygotowanie ekspresyjnych szczepów bakteryjnych	70
3.2.6.2. Produkcja białka w bakterii One Shot BL21 Star (DE3) <i>E. coli</i> w małej skali	71
3.2.6.3. Analiza rozpuszczalności białek produkowanych w bakterii One Shot BL21 Star (DE3) <i>E. coli</i>	71
3.2.6.4. Produkcja białka w bakterii One Shot BL21 Star (DE3) <i>E. coli</i> w dużej skali	72
3.2.6.5. Izolacja i oczyszczanie białek w warunkach natywnych.....	72
3.2.6.6. Izolacja i oczyszczanie białek w warunkach denaturujących.....	74
3.2.7. Przygotowanie fibrynogenu pełnej długości oraz fragmentów E i D.....	76
3.2.8. Pomiar stężenia białek	77
3.2.8.1. Pomiar absorbancji przy długości fali λ_{260}	77
3.2.8.2. Metoda biuretowa	77
3.2.9. Pomiar dynamicznego rozpraszania światła (DLS).....	78
3.2.10. Badanie oddziaływań metodą termoforezy w skali mikro (MST).....	79
3.2.11. Pomiar małokątowego rozpraszania promieni rentgenowskich (SAXS) .	81
3.2.12. Przesiewowe testy krystalizacyjne.....	82
3.2.13. Rozdział elektroforetyczny DNA	84

3.2.14. Rozdział elektroforetyczny białek w warunkach denaturujących (SDS-PAGE).....	84
3.2.15. Analizy wykonane za pomocą narzędzi bioinformatycznych	85
4. WYNIKI	86
4.1. Analiza bioinformatyczna białek OspC	86
4.1.1. Charakterystyka białek OspC_NΔ19	86
4.1.2. Charakterystyka białek OspC_NΔ35-37.....	90
4.1.3. Charakterystyka białek Iric_NΔ19	91
4.2. Wybór sekwencji DNA do produkcji rekombinowanych białek OspC i Iric	93
4.2.1. Klonowanie sekwencji kodującej pełnej długości białko BS.OspC do wektora pCR [®] 2.1-TOPO [®]	94
4.2.2. Klonowanie TOPO TA Cloning do wektora pCR [®] 2.1-TOPO [®]	95
4.3. Opracowanie strategii produkcji białek OspC na przykładzie BA.OspC_NΔ19	97
4.3.1. Amplifikacja sekwencji kodującej białko BA.OspC_NΔ19.....	97
4.3.2. Amplifikacja wektorów ekspresyjnych z serii pMCSG	98
4.3.3. Niezależne od ligacji klonowanie do wektorów ekspresyjnych z serii pMCSG	99
4.3.4. Optymalizacja protokołu produkcji białek OspC_NΔ19 w małej skali na przykładzie BA.OspC_NΔ19.....	101
4.3.5. Zwiększenie skali produkcji i oczyszczania białek OspC_NΔ19 na przykładzie BA.OspC_NΔ19	104
4.4. Konstrukcja wektorów do produkcji białek OspC_NΔ19 oraz OspC_NΔ35-37 w bakteryjnym systemie ekspresyjnym	108
4.4.1. Amplifikacja sekwencji kodującej białka OspC_NΔ19 metodą PCR	108
4.4.2. Niezależne od ligacji klonowanie do wektora ekspresyjnego pMCSG48..	109
4.4.3. Przygotowanie konstruktów pMCSG48-OspC_N Δ35-37 do badań krystalograficznych.....	113
4.5. Produkcja białek OspC w systemie bakteryjnym	120
4.5.1. Produkcja i oczyszczanie białek OspC_NΔ19 według standardowej procedury	120
4.5.2. Analiza ilościowa i jakościowa otrzymanych białek OspC_NΔ19	123
4.5.3. Produkcja i oczyszczanie białek OspC_NΔ35-37 w dużej skali	126
4.6. Produkcja i oczyszczanie homologów białka Salp15	132

4.7. Analiza jakości fibrynogeny pełnej długości oraz fragmentów E i D fibrynogeny	137
4.8. Badanie oddziaływań białek OspC_NΔ19 z fibrynogenem	139
4.9. Analiza struktury białka OspC_NΔ19 oraz kompleksu OspC_NΔ19-fibrynogen metodą małokątowego rozpraszania promieni rentgenowskich (SAXS)	143
4.10. Badanie oddziaływań białek OspC_NΔ19 z homologami białka Salp15	145
4.11. Przesiewowe testy krystalizacyjne	150
5. DYSKUSJA	152
6. PODSUMOWANIE	161
7. STRESZCZENIE	163
8. SUMMARY	165
9. WYKAZ PUBLIKACJI	167
10. FINANSOWANIE	167
11. LITERATURA	168
SPIS RYCIN	186
SPIS TABEL	189

WYKAZ SKRÓTÓW

A₂₈₀ – (ang. *absorbance value at 280 nm*) wartość absorbancji przy długości fali wynoszącej 280 nm

aa – aminokwasy

APS – (ang. *ammonium persulfate*) nadsiarczan amonu

BA, *B. afzelii* – *Borrelia afzelii*

***B. burgdorferi* s. l.** – *Borrelia burgdorferi* sensu lato

BB, *B. burgdorferi* s. s. – *Borrelia burgdorferi* sensu stricto

BG, *B. garinii* – *Borrelia garinii*

BS, *B. spielmanii* – *Borrelia spielmanii*

BLI – (ang. *biolayer interferometry*) interferometria warstwowa

BosR – (ang. *Borrelia oxidative stress regulator*)

BSA – (ang. *bovine serum albumin*) albumina surowicy wołowej

CDC – (ang. *Centers for Disease Control and Prevention*)

cDNA – (ang. *complementary DNA*) DNA komplementarny

c-di-GMP – cykliczny dimeryczny guanozyno-5'-monofosforan

DbpA – (ang. *decorin - binding protein A*) lipoproteina powierzchniowa A, wiążąca dekorynę, pochodzącą z bakterii *B. burgdorferi* s. l.

DbpB – (ang. *decorin - binding protein B*) lipoproteina powierzchniowa B wiążąca dekorynę, pochodzącą z bakterii *B. burgdorferi* s. l.

DLS – (ang. *dynamic light scattering*) dynamiczne rozpraszanie światła

DNA – (ang. *deoxyribonucleic acid*) kwas deoksyrybonukleinowy

DsbA – (ang. *disulfide bond formation protein A*) bakteryjna oksydoreduktaza tiolowosiarczkowa

DsbC – (ang. *disulfide bond formation protein C*) bakteryjna oksydoreduktaza tiolowosiarczkowa

DksA – (ang. *DnaK suppressor protein A*) białko supresorowe DnaK A

E. coli – *Escherichia coli*

ECDC – (ang. *European Centre for Disease Prevention and Control*) Europejskie Centrum ds. Zapobiegania i Kontroli Chorób

EDTA – (ang. *ethylenediaminetetraacetic acid*) kwas etylenodiaminotetraoctowy

ELISA – (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*) test immunoenzymatyczny

EMBL – (ang. *European Molecular Biology Laboratory*) Europejskie Laboratorium Biologii Molekularnej

IL – (ang. *interleukin*) interleukina

INiAC – (ang. *immobilized nickel affinity chromatography*) chromatografia powinowactwa do złoża z unieruchomionymi jonami niklu

IPTG – (ang. *isopropyl β -D-thiogalactopyranoside*) izopropyl- β -D-tiogalaktopiranozyd

K_a – (ang. *dissociation constant*) stała dysocjacji

LB – pożywka Lurii-Bertaniego

LBD – (ang. *ligand binding domain*) domena wiążąca ligand

LD – (ang. *Lyme disease*) choroba z Lyme, borelioza

LIC – (ang. *ligation independent cloning*) niezależne od ligacji klonowanie

MBP – (ang. *maltose binding protein*) białko wiążące maltozę

MCP – (ang. *methyl-accepting chemotaxis proteins*) białka chemotaksji akceptujące metyl

MST – (ang. *microscale thermophoresis*) termoforeza w skali mikro

NHS – (ang. *N-hydroxysuccinimide*) N-hydroksysukcynimid

nt – nukleotydy

NusA – (ang. *N utilization substance protein A*) białko uczestniczące w regulacji transkrypcji *E. coli*

OD₆₀₀ – (ang. *optical density*) gęstość optyczna próby mierzona przy długości fali wynoszącej 600 nm

OspA – (ang. *outer surface protein A*) lipoproteina powierzchniowa A pochodząca z bakterii *B. burgdorferi* s. l.

OspB – (ang. *outer surface protein B*) lipoproteina powierzchniowa B pochodząca z bakterii *B. burgdorferi* s. l.

OspC – (ang. *outer surface protein C*) lipoproteina powierzchniowa C pochodząca z bakterii *B. burgdorferi* s. l.

OspD – (ang. *outer surface protein D*) lipoproteina powierzchniowa D pochodząca z bakterii *B. burgdorferi* s. l.

PAA – (ang. *polyacrylamide gel*) żel poliakrylamidowy

PBS – (ang. *phosphate buffered saline*) bufor fosforanowy

PCR – (ang. *polymerase chain reaction*) łańcuchowa reakcja polimerazy

PDB – *Protein Data Bank*

pZ – para zasad

R_g – (ang. *radius of gyration*) promień żyrcji

R_h – (ang. *hydrodynamic radius*) promień hydrodynamiczny

RF – (ang. *relapsing fever*) gorączka powrotna przenoszona przez kleszcze

Salp15 – (ang. *15 kDa salivary gland protein*) białko ze śliny kleszcza o masie molekularnej 15 kDa

SAT – (ang. *saliva-assisted transmission*) transmisja wspomagana śliną

SAXS – (ang. *small angle X-ray scattering*) małokątowe rozpraszanie promieni rentgenowskich

SDS – (ang. *sodium dodecyl sulfate*) dodecylosiarczan sodu

SDS-PAGE – (ang. *sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis*) elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących

TB – pożywka Terrific Broth

TCEP – (ang. *tris(2-carboxyethyl)phosphine*) chlorowoderek tris(2-karboksyetylo)fosfiny

TEV – (ang. *tobacco etch virus*) wirus mozaiki wżerkowej tytoniu

T_m – (ang. *melting temperature*) temperatura topnienia

Tris – (ang. *tris(hydroxymethyl)aminomethane*) 2-amino-2-(hydroksymetylo)-1,3-propanodiol

WHO – (ang. *World Human Organisation*) Światowa Organizacja Zdrowia

1. WSTĘP

1.1. Borelioza – wprowadzenie

Pierwsze doniesienia związane z chorobą z Lyme pojawiły się w 1977 roku. Opisano wówczas przypadki pacjentów, u których zdiagnozowano zapalenie stawów; każdy z tych pacjentów relacjonował także pojawienie się specyficznej, czerwonej pierścieniowatej zmiany skórnej – rumienia wędrującego (ang. *erythema migrans*). Początkowo nie skojarzono współwystępowania tych objawów, ale analiza wywiadów lekarskich doprowadziła naukowców do wysnucia wniosku, że pojawienie się rumienia wędrującego prawdopodobnie związane jest z ukąszeniem przez kleszcza. Cztery lata później amerykański bakteriolog i parazytolog Wilhelm Burgdorfer odkrył obecność krętków *Borrelia* w kleszczach *Ixodes dammini* (gatunek kleszcza został następnie przeklasyfikowany na *Ixodes scapularis*) i zasugerował, że to właśnie one mogą być czynnikiem chorobotwórczym powodującym wyżej opisane objawy (Barbour i Benach, 2019). Hipoteza ta została wkrótce potwierdzona poprzez analizy surowicy krwi pacjentów, które pokazały, że immunoglobuliny obecne w tych surowicach wiązały wcześniej wyizolowane krętki. Wynik ten wskazał jednoznacznie na pojawienie się przeciwciał w odpowiedzi na patogen. Burgdorfer wraz z liczną grupą naukowców wykazali, że nowo odkryty krętek *Borrelia* jest zaangażowany w etiologię choroby nazwanej chorobą z Lyme, czyli boreliozą (Snyder, 2015; Sternbach i Dibble, 1996).

Borelioza jest złożoną, wielonarządową chorobą odzwierzęcą – zoonozą wywoływaną przez bakterie należące do krętków z rodzaju *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.) przenoszone przez kleszcze z rodzaju *Ixodes* (Mead, 2015). Niezwykle zróżnicowana charakterystyka symptomów stanowi ogromne wyzwanie diagnostyczne dla lekarzy. U około 80 - 90% chorych w ciągu kilku dni (3-14 dni) od ukąszenia kleszcza pojawia się charakterystyczny rumień, który wyglądem przypomina tarczę strzelniczą (Nadelman, 2015; Stanek i Strle, 2018; Steere i in., 2016). Dodatkowo na wczesnych etapach infekcji mogą współwystępować objawy pseudogrypowe, takie jak: ból głowy, sztywność karku, złe samopoczucie, przemęczenie, ból mięśni czy gorączka (Steere, 2001). Błędna diagnoza, a w konsekwencji brak wdrożenia odpowiedniego leczenia na wczesnym etapie boreliozy, może prowadzić do rozwoju choroby w późną postać, która obejmuje wieloukładowe stany zapalne organizmu (Caine i in., 2017; Stanek i Strle, 2018). Pomimo intensywnych badań prowadzonych przez środowiska naukowe i medyczne, choroba z Lyme nadal stanowi złożony problem i pozostaje ona najbardziej

rozpowszechnioną chorobą odkleszczową, zwłaszcza na terenach półkuli północnej (Stanek i Strle, 2003; Steere i in., 2016).

W Stanach Zjednoczonych do agencji CDC (*Centers for Disease Control*) rządu federalnego oficjalnie raportowanych jest rocznie około 30 000 - 40 000 przypadków zachorowań na boreliozę (Kugeler i in., 2021; Mead, 2015). Niestety, aktualne badania dotyczące zapadalności na boreliozę wyraźnie sugerują, że nowe przypadki choroby są rzadko zgłaszane, co może znacznie zaniżać dane w całym kraju. Ze względu na nieprecyzyjny system oceny ilości przypadków zachorowań wśród ludzi sporządzono nową strategię oszacowania liczby tych przypadków. Wykonano analizy statystyczne baz danych zawierające informacje na temat świadczeń medycznych, które związane były z roszczeniami ubezpieczeniowymi oraz wystawionymi receptami. Na podstawie tych informacji oszacowano, że w Stanach Zjednoczonych w latach 2010-2018 rocznie mogło wystąpić nawet 476 000 przypadków zachorowań na boreliozę, co oznacza istotny wpływ tej choroby na zdrowie publiczne (Kugeler i in., 2021).

Warto podkreślić, że w Europie zachorowania na boreliozę są również powszechne. Już w 2006 roku Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Human Organisation, WHO*) opracowała raport, w którym oszacowano, że rocznie obserwuje się około 85 000 zachorowań (Lindgren i Jaensen, 2006; Schotthoefer i Frost, 2015). Należy jednak wziąć pod uwagę, że brak jednolitego systemu zgłaszania zachorowań na boreliozę znacznie utrudnia śledzenie częstości przypadków zapadalności. Podobnie jak w przypadku statystyk dotyczących zachorowań na boreliozę w Stanach Zjednoczonych, wysoce prawdopodobne jest, że dane europejskie mogą być także niedoszacowane (Madison-Antenucci i in., 2020). Potwierdzają to także najnowsze analizy statystyczne Burn'a i in. (2023) dotyczące liczby zachorowań na boreliozę w Europie w latach 2005-2020. Na podstawie dostępnych danych obliczono zapadalność na boreliozę (liczba zgłoszonych przypadków na 100 000 mieszkańców rocznie) oraz wskazano obszary wysokiego ryzyka infekcji krętka *Borrelia*. Okazało się, że z 25 krajów, tylko 4 kraje (Bułgaria, Francja, Polska i Rumunia) stosowały standardowe procedury dotyczące rejestrowania przypadków zachorowań, zalecane przez europejskie instytucje zdrowia publicznego. Wyrażna niejednorodność systemów nadzoru zachorowań na boreliozę, definiowania przypadków czy też metod diagnostycznych, ogranicza możliwość przeprowadzenia analiz porównawczych między krajami europejskimi. Niemniej jednak wykazano, że najwyższe poziomy zapadalności odnotowano w poszczególnych krajach Europy: Estonia, Litwa, Słowenia, Szwajcaria,

Francja i Polska. Średnia liczba przypadków zachorowań na boreliozę rocznie wynosi 128 888 mieszkańców Europy (Burn i in., 2023).

Dane epidemiologiczne przedstawione przez Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego w Polsce (Rycina 1.1) wskazują jednoznacznie, że problem rosnącej liczby zachorowań na boreliozę na obszarze Polski jest alarmujący, a ilość zgłaszanych przypadków wynosi około 20 000 zachorowań rocznie.



Rycina 1.1. Zgłoszone przypadki zachorowań na boreliozę w latach 2010-2023 w Polsce (wg Narodowego Instytut Zdrowia Publicznego)

Powyższe dane pokazują wysoką liczbę zachorowań na boreliozę w Stanach Zjednoczonych i Europie. Dodatkowo częstość zachorowań na boreliozę zdaje się stale rosnać na całym świecie, co spowodowane jest różnorodnymi czynnikami demograficznymi oraz środowiskowymi, a w tym zmianami klimatu (Semenza i Suk, 2017). Biorąc pod uwagę złożoność choroby oraz światową rangę problemu, ważne jest ciągle pogłębianie wiedzy na temat czynnika sprawczego – krętka *Borrelia*. Multidyscyplinarne podejście do zagadnienia boreliozy, łączące wyniki badań naukowych oraz wiedzę specjalistów chorób zakaźnych może przynieść pożądane skutki zarówno w zakresie opracowania innowacyjnych strategii profilaktyki, diagnostyki, jak i opieki nad pacjentami (Rochlin i in., 2019).

1.2. Kleszcz – wektor krętka *Borrelia*

1.2.1. Kleszcze z rodzaju *Ixodes* – charakterystyka

Kleszcze są obligatoryjnymi ektopasożytami – pasożytami zewnętrznymi należącymi do gromady pajęczaków (*Arachnida*), podgromady roztoczy (*Acari*). Ze względu na ich szczególny udział w transmisji czynników chorobotwórczych wśród ludzi, a także zwierząt, zostały one powszechnie uznane za wektory patogenów. W dodatku kleszcze, zaraz po komarach, są stawonogami o największym udziale w etiologii chorób wektorowych na całym świecie (Nava i in., 2009).

Rodzina kleszczy twardych *Ixodidae* składa się z ponad 700 gatunków, które zostały podzielone na dwie główne grupy morfologiczne i filogenetyczne: *Prostriata* oraz *Metastriata*. Pierwsza z nich reprezentowana jest przez podrodzinę *Ixodinae*, która obejmuje wyłącznie gatunki z rodzaju *Ixodes*. Druga grupa jest bardziej zróżnicowana i obejmuje około 14 rodzajów kleszczy, do których należą m.in. *Dermacentor*, *Hyalomma* czy *Rhipicephalus* (Anderson i in., 2004; Guglielmone i Robbins, 2018). Kleszcze z rodzaju *Ixodes* są wektorami szerokiego spektrum patogenów należących do wirusów, bakterii czy protistów, powodujących choroby takie jak: kleszczowe zapalenie mózgu, borelioza, anaplazmoza, riketsjoza czy babeszjoza (Kotal i in., 2015). Jednak spośród wymienionych chorób to borelioza jest najczęściej występującą zoonozą diagnozowaną wśród ludzi (Sonenshine i Roe, 2014).

W zależności od rejonu geograficznego, w jakim występują kleszcze z rodzaju *Ixodes*, wyróżnić można następujące gatunki: *Ixodes scapularis* i *Ixodes pacificus* w Ameryce Północnej, *Ixodes ricinus* w Europie oraz północnej Afryce, a także *Ixodes persulcatus* we wschodniej Europie i Azji (CDC, 2024; ECDC, 2023; Radolf i in., 2012). Wymienione powyżej gatunki kleszczy są uważane za główne wektory krętków *Borrelia*, które biorą szczególny udział w transmisji tej bakterii wśród ludzi, co zwiększa ryzyko zachorowania na boreliozę (Kilpatrick i in., 2017). Pomimo że naturalnym środowiskiem występowania kleszczy są tereny leśne oraz łąki, to obecność kleszczy *Ixodes* jest coraz częściej obserwowana na terenach zurbanizowanych, takich jak podmiejskie lasy i parki miejskie, co zwiększa ryzyko infekcji odkleszczowej (Kowalec, 2017).

1.2.2. Cykl rozwojowy kleszcza *Ixodes* a cykl enzoptyczny *Borrelia*

Ciągłość występowania oraz obiegu krętka *Borrelia* w środowisku jest ściśle związana z cyklem rozwojowym kleszcza, który składa się z trzech następujących po sobie aktywnych stadiów rozwojowych: larwa, nimfa i postać dorosła. Długość cyklu życiowego kleszcza wynosi średnio 2 do 3 lat. Aby doszło do przeobrażenia kleszcza w kolejne stadium musi on odbyć jednokrotny żer, w trakcie którego przez kilka dni żywi się krwią żywiciela (Rochlin i in., 2019). Na populację kleszczy w środowisku wpływają czynniki abiotyczne, w szczególności temperatura i względna wilgotność (Kilpatrick i in., 2017; Kurtenbach i in., 2006). Z kolei do czynników biotycznych, regulujących liczebność kleszczy, można zaliczyć zagęszczenie populacji gatunków żywicieli (Kilpatrick i in., 2017).

Cykl enzoptyczny *Borrelia* jest częścią naturalnego cyklu transmisji patogenu i związany jest z krążeniem krętków w populacjach dzikich zwierząt. Za pierwotny rezerwuuar krętków *Borrelia*, który stanowi źródło infekcji tym patogenem, uznano małe kręgowce takie jak: myszy, wiewiórki czy ptaki. W trakcie żerowania kleszcza na organizmie rezerwuuarowym, *Borrelia* przenoszona jest wraz z pobieraną krwią i zasiedla ciało stawonoga, pozostając w nim niezależnie od stadium rozwojowego (ang. *transstadial transmission*). Wykazano, że niektóre krętki z rodzaju *Borrelia* powodujące gorączkę powrotną (ang. *relapsing fever*) mogą być przenoszone z samicy kleszcza na potomstwo drogą transowarialną (ang. *transovarial transmission*). Jednak w przypadku krętków *Borrelia burgdorferi* s. l. nie zaobserwowano takiego zjawiska, a każde nowe pokolenie kleszcza musi zostać *de novo* zakażone krętkiem *B. burgdorferi* s.l. (Breuner i in., 2018; Radolf i in., 2012). Larwy i nimfy żywią się krwią podobnej grupy żywicieli (gryzonie, ptaki), uczestnicząc w utrwalaniu cyklu enzoptycznego krętków poprzez przenoszenie bakterii do kolejnych osobników. Warto zwrócić uwagę na zróżnicowane nisze ekologiczne dla poszczególnych gatunków *Borrelia*. Zaobserwowano, że ptaki są ważnym rezerwuarem *B. garinii* i mogą mieć istotne znaczenie w kontekście ekspansji krętków *Borrelia* na nowych terenach, podczas gdy rezerwuarem *B. afzelii* są gryzonie (Piesman i Gern, 2004). Natomiast myszak białostopy jest uważany za główny rezerwuuar *B. burgdorferi* s.s. w Stanach Zjednoczonych (Brisson i in., 2008).

Dorosłe kleszcze żywią się głównie krwią dużych zwierząt, które ważne są dla utrzymania populacji kleszczy (Eisen i Esien, 2018). Szczególną rolę odgrywają

jeleniowate, które, pomimo że nie są żywicielami kompetentnymi *Borrelia*, to są powszechnie uznawane za najważniejszych żywicieli dorosłych kleszczy zarówno na terenach Stanów Zjednoczonych, jak i Europy. Siedliska, w których występuje niewiele jeleni, charakteryzują się mniejszą liczebnością kleszczy niż te, w których zagęszczenie tych zwierząt jest umiarkowane lub wysokie (Gern, 2009; Kilpatrick i in., 2017). Pomimo że kleszcze we wszystkich stadiach rozwojowych mogą żywić się krwią człowieka, to przede wszystkim nimfy są odpowiedzialne za przenoszenie patogenów na ludzi. Spowodowane jest to niewielkimi rozmiarami nimf (około 1,5-2 mm), dzięki którym mogą one żerować na ciele ludzkim pozostając niezauważone, co sprzyja transmisji *Borrelia* oraz infekcji patogenami (Rochlin i in., 2019; Tilly i in., 2008). Należy jednak podkreślić, że ludzie są uważani za żywicieli przypadkowych, nie mających znaczenia dla cyklu enzoptycznego krętków *Borrelia* (Radolf i in., 2012). Nie odnotowano żadnych doniesień o przenoszeniu krętków na larwy kleszcza karmiące się krwią zarażonych ludzi lub przenoszeniu krętków *Borrelia* między ludźmi poprzez transfuzję krwi, kontakty seksualne, nasienie, mocz czy mleko matki (Steere i in., 2016). Udokumentowano jednak nieliczne przypadki transmisji krętków *Borrelia* przez łożysko zainfekowanej matki na rozwijający się płód. Chociaż niewiele wiadomo na temat szkodliwych skutków infekcji *Borrelia* kobiet w ciąży, to zaobserwowano, że infekcja *Borrelia* może mieć katastrofalne skutki dla życia noworodków. W 1988 roku odnotowano przypadek transmisji krętków z matki na płód pomimo zastosowanej antybiotykoterapii po wystąpieniu rumienia wędrującego. Noworodek zmarł w ciągu 23 godzin po urodzeniu w następstwie okołoporodowego uszkodzenia mózgu. Badania histopatologiczne potwierdziły obecność *Borrelia* w mózgu oraz wątrobie noworodka, a w pozostałych narządach wykazano znaczną reakcję zapalną. Prawdopodobnie ryzyko zakażenia drogą przezłożyskową jest wyższe na początku ciąży niż w jej pozostałym okresie, chociaż zagadnienia te nie zostały dotychczas jednoznacznie rozstrzygnięte (Mylonas, 2011; Weber i in., 1988).

1.2.3. Przystosowanie kleszcza do żerowania

Kleszcze z rodzaju *Ixodes* należą do grupy pasożytów zewnętrznych (hematofagów) żywiących się wyłącznie krwią gospodarzy. Większość ektopasożytów, takich jak wszy, pchły czy komary, przebywa na ciele żywiciela bardzo krótko – od kilku sekund do kilku minut. Kleszcze, jako jedne z nielicznych ektopasożytów, mogą żerować

nawet do dwóch tygodni. Aby umożliwić sobie tak długotrwałe żerowanie, kleszcze wykształciły w toku ewolucji szereg adaptacji na różnych poziomach: molekularnym, anatomicznym, fizjologicznym i behawioralnym. Te adaptacje pozwalają kleszczom na aktywne poszukiwanie żywicieli, przebijanie ich powłok skórnych, a następnie długotrwałe utrzymywanie się w ciele żywiciela i pobieranie krwi (Francischetti i in., 2009; Schön, 2022; Steen i in., 2006).

Poszukiwanie żywiciela

Efektywne poszukiwanie żywiciela jest kluczowe dla kleszczy, ponieważ umożliwia im zdobycie pokarmu niezbędnego do przechodzenia kolejnych stadiów rozwojowych. Kleszcze wykorzystują do tego narząd Hallera, znajdujący się na dystalnych odcinkach przednich odnóży i pełniący funkcję narządu zmysłów. Jego komórki czuciowe reagują na różne substancje chemiczne, takie jak dwutlenek węgla, amoniak, siarkowodór, feromony, kwas masłowy oraz pochodne fenolu i laktonu. Ponadto narząd Hallera umożliwia wykrywanie promieniowania podczerwonego i wilgotności. Badania wykazały, że narząd Hallera odgrywa kluczową rolę nie tylko w poszukiwaniu żywiciela, ale także partnerów do prokreacji oraz w odbiorze sygnałów środowiskowych (Carr i in., 2017; Jasek i in., 2017; Mitchell i in., 2017).

Przebicie powłok skórnych żywiciela

Przedstawiciele rodzaju *Ixodes* posiadają długi, kolczasty aparat gębowy (hypostom), który przypomina ostrą rurkę. Hypostom umożliwia penetrację powłok skórnych i mocne zakotwiczenie kleszcza w skórze żywiciela. Przebicie powłok skórnych żywiciela przez hypostom prowadzi do uszkodzenia naskórka i skóry właściwej, co powoduje miejscowe pęknięcie naczyń krwionośnych i napływanie krwi do miejsca ugryzienia (Francischetti i in., 2009; Steen i in., 2006).

Żerowanie kleszcza

Aparat gębowy kleszczy z rodzaju *Ixodes* nie wnika bezpośrednio do naczyń krwionośnych żywiciela. Zamiast tego, stale gromadząca się krew oraz płyn tkankowy w miejscu ugryzienia umożliwiają kleszczowi dostęp do pokarmu. Pobieranie krwi przez te pasożyty odbywa się na przemian ze wstrzykiwaniem śliny. Najpierw krew jest zasysana do gardła kleszcza, a następnie, dzięki skurczom gardła, przemieszcza się w kierunku jelita środkowego. Po tym kleszcz wydziela ślinę, która poprzez aparat

gębowy trafia do organizmu żywiciela. Proces ten wywołuje reakcje obronne gospodarza. Aby przeciwdziałać tym reakcjom i umożliwić długotrwałe żerowanie, kleszcze przystosowały się do ich tłumienia. Liczne doniesienia naukowe wykazały, że ślina kleszczy jest bogata w substancje, które pozwalają przezwyciężyć reakcje obronne gospodarza i ułatwiają aktywne pobieranie pokarmu (Nuttall, 2019b; Schön, 2022).

Przeprowadzono wiele badań proteomicznych i transkryptomicznych w celu analizy składu wydzieliny gruczołów ślinowych różnych gatunków kleszczy. Oprócz wody, wydzielina ta zawiera bogatą mieszaninę białkowych i niebiałkowych cząsteczek, które pochodzą z krwi żywiciela lub są syntetyzowane przez gruczoły ślinowe kleszcza. Objętość i skład śliny kleszcza zmieniają się w trakcie żerowania, przy czym największe zmiany obserwuje się między 24 a 48 godziną pobierania krwi (Nuttall, 2019a; Nuttall, 2019b). U jednego z gatunków kleszczy, *Dermacentor andersoni* (rodzina: *Ixodidae*), po 2-5 dniach od rozpoczęcia karmienia, w ślinie stwierdzono obecność ponad 700 różnych czynników białkowych (Mudenda i in., 2014). Produkcja tak bogatej w biologicznie czynne składniki śliny pozwala pasożytowi przezwycięzać reakcje obronne żywiciela, co zapobiega odrzuceniu kleszcza lub jego śmierci w trakcie żerowania (Kim i in., 2016; Ribeiro i Francischetti, 2003; Steen i in., 2006).

Interakcja kleszcz – żywiciel

Kleszcze stosują szereg efektywnych strategii, aby kontrolować reakcje obronne gospodarza, blokując odpowiedź immunologiczną na wielu poziomach. Dzięki temu mogą długo i skutecznie żerować na organizmie żywiciela, co wiąże się z koniecznością przeciwdziałania jego naturalnym reakcjom obronnym. W tym celu kleszcze wykorzystują substancje zawarte w ślinie, które cechują się wysokim powinowactwem i selektywnością wobec składników krwi żywiciela, uczestniczących w kaskadowych reakcjach układu immunologicznego (Nuttall, 2019a).

Przebite powłok skórnych przez kleszcza w ciągu kilku sekund wyzwala mechanizmy obronne gospodarza. Pierwszą reakcją obronną na uszkodzenie skóry jest ból, zaczerwienienie, odczucie ciepła oraz swędzenie w miejscu ugryzienia. Te objawy zwiększają szansę na zauważenie pasożyta i jego usunięcie. Choć ból wydaje się prymitywnym mechanizmem obronnym, ilość czynników biorących w nim udział i ich wzajemne zależności są wysoce skomplikowane. Główne czynniki biologiczne biorące udział w reakcji bólowej to ATP, serotonina i histamina, uwalniane przez płytki krwi (Julius i Basbaum, 2001; Ribeiro i Francischetti, 2003). Ponadto aktywacja neutrofilii

proceeds to the production of prostaglandins, which intensify pain (Julius and Basbaum, 2001). Pain is also induced by inflammatory proteins (chemokines), such as interleukin-1 (IL-1) and bradykinin (Millan, 1999). Although the pain response is complex, ticks are able to neutralize it, which allows them to remain unnoticed during feeding (Nuttall, 2019a). For this purpose, they utilize components produced by salivary glands, which degrade ATP and bradykinin (Ribeiro et al., 1985; Schmelz, 2010). In ticks of the genus *Dermacentor*, the presence of the SHBP protein (ang. *serotonin and histamine binding protein*), which binds and inactivates serotonin and histamine (Sangamnatdej et al., 2002). Ticks also modulate the activity of chemokines and cytokines, which causes the loss of the ability of neutrophils to accumulate at the site of infection, responsible among others for the killing of microorganisms (Kazimirova and Stibraniova, 2013).

Another barrier that ticks must overcome are processes related to blood clotting by the host. These processes occur in three stages: vasoconstriction of blood vessels, platelet aggregation and formation of a fibrin clot. Parasitic strategies of ticks enable the dilation of blood vessels, inhibition of platelet aggregation and delay or inhibition of blood clotting in the host (Francischetti et al., 2009; Mans, 2011; Kazimirova and Stibraniova, 2013). During blood vessel damage, activation of platelets occurs through agonists of platelets, such as ADP, collagen, thrombin, and PAF (ang. *platelet-activating factor*) and thromboxan TXA₂ (Ribeiro and Francischetti, 2003). Agonists, recognizing specific receptors, trigger the aggregation process of platelets. In addition to clot formation, there is a strong and long-lasting vasoconstriction of blood vessels as a result of the action of serotonin and thromboxan TXA₂, which prevents excessive blood flow. *In vitro* studies have shown that tick saliva inhibits platelet aggregation, preventing clot formation. This is possible due to the presence of platelet agonist inhibitors, such as the enzyme apyrase, responsible for ADP hydrolysis and direct platelet inhibitors, such as prostacyclin (PGI₂) and deintegrin, which block the binding of fibrinogen to platelets. Other salivary proteins of ticks, characterized by anticoagulant properties, are Salp9 and Salp14 from *I. scapularis*, proteins that bind thrombin and factor Xa, as well as protease inhibitors of the Kunitz type (Das et al., 2001; Narasimhan et al., 2002).

Kleszcze wykształciły reakcje immunomodulujące, które umożliwiają im przeciwdziałanie głównym mechanizmom obronnym żywiciela, obejmującym zarówno wrodzoną, jak i adaptacyjną odpowiedź immunologiczną. W ślinie kleszcza obecne są składniki blokujące układ dopełniacza, zwłaszcza jego alternatywną ścieżkę (Cabezas-Cruz i Valdes, 2014; Ricklin i in., 2010). Ekstrakty ślinowe *I. scapularis* i *I. ricinus* skutecznie hamują działanie czynnika C3b oraz uwalnianie anafilatoksyny C3a, co blokuje dalsze reakcje kaskadowe szlaku alternatywnego układu dopełniacza (Lawrie i in., 1999). Kontakt z antygenem aktywuje komórki dendrytyczne, tuczne i makrofagi, co prowadzi do intensywnej produkcji cytokin i chemokin zapalnych (np. interferonu). W wyniku tych reakcji dochodzi do produkcji TNF- α (ang. *tumor necrosis factor α*) oraz IL-1 (interleukiny 1) i IL-8 (interleukiny 8), które są mediatorami reakcji bólowej i mają szerokie działanie w odpowiedzi na obce antygeny. Na tym etapie także zaobserwowano strategie obronne kleszczy, polegające na hamowaniu różnicowania komórek dendrytycznych czy produkcji cytokin (IL-1, IL-2, IL-12, TNF- α) (Ribeiro i Francischetti, 2003; Wikel, 2013).

Komponenty obecne w ślinie kleszcza umożliwiają modulację działania układu odpornościowego ssaka, a tym samym torują drogę dla patogenów obecnych w kleszczu, w tym krętka *Borrelia* (tzw. transmisja wspomagana śliną, ang. *saliva-assisted transmission*, SAT) (Liu i Bonnet, 2014; Nuttall, 2019b). Ukierunkowane hamowanie ścieżki alternatywnej dopełniacza ma znaczący wpływ na przeżycie patogenów przenoszonych przez kleszcze (Wikel, 2013). Jednym z kluczowych czynników kleszczowych SAT jest białko Salp15, które nie tylko wpływa na układ odpornościowy organizmu żywiciela, ale wiążąc się do powierzchni krętka, chroni *Borrelia* przed zabiciem przez przeciwciała. Badania naukowe dostarczają bezpośrednich dowodów, że właśnie to białko sprzyja transmisji *B. burgdorferi* przez kleszcze do organizmu ssaka, a jego brak znacząco zmniejsza przeżywalność *Borrelia* w organizmie ssaka (Nuttall, 2019b).

Interesujący jest fakt, że niektóre zwierzęta rozwijają odporność na kleszcze. U świnek morskich i niektórych ras bydła, po kilku ukąszeniach przez te pasożyty, zaobserwowano, że kolejne kleszcze żerują mniej skutecznie lub umierają w miejscu ukąszenia (Narasimhan i in., 2018). Oznacza to, że powtarzające się ukąszenia indukują odporność immunologiczną na te pasożyty, choć nie jest to zjawisko powszechne u wszystkich gatunków zwierząt. U niektórych zwierząt odporność na kleszcze wiąże się także z ograniczonym przenoszeniem patogenów odkleszczowych (Jones i Nuttall, 1990;

Narasimhan i in., 2007; Wikel, 2013). Podobne obserwacje zanotowano również u ludzi. Mimo częstego kontaktu z kleszczami w regionach endemicznych boreliozy, stosunkowo niewielu z nich zostaje zakażonych przez krętka *Borrelia*. Powtarzające się ukąszenia mogą prowadzić do rozwoju nadwrażliwości skórnej, objawiającej się silnym świądem i obrzękiem w miejscu ugryzienia. Badania epidemiologiczne przeprowadzone na mieszkańcach Block Island (wyspa amerykańska), uznanej właśnie za tereny endemiczne, wykazały, że osoby doświadczające objawów takich jak nadwrażliwość skóry, ból czy świąd po ukąszeniu kleszcza, rzadziej miały diagnozę infekcji *B. burgdorferi*. Te obserwacje potwierdzają, że wcześniejsza ekspozycja na kleszcze może chronić ludzi przed zachorowaniem na boreliozę (Burke i in, 2005).

1.3. Krętek *Borrelia* – czynnik sprawczy boreliozy

1.3.1. Ogólna charakterystyka krętka *Borrelia*

Rodzaj *Borrelia* obejmuje około 37 gatunków krętków, które mogą charakteryzować się różną patogennością u ssaków. Gatunki te ze względu na profil patogenności zostały podzielone na dwie grupy filogenetyczne. Pierwsza grupa zawiera krętki należące do kompleksu *Borrelia burgdorferi* sensu lato, które odpowiedzialne są za wywoływanie boreliozy (ang. *Lyme disease*, LD). Podczas gdy druga grupa zawiera krętki *Borrelia* wywołujące gorączkę powrotną (ang. *relapsing fever*, RF) (Adeolu i Gupta, 2014; Franke i in., 2013). Aby ułatwić rozróżnienie powyższych grup, w 2014 roku zaproponowano nowy rodzaj *Borrelia* – zawierający wszystkie gatunki należące do kompleksu krętków powodujących boreliozę (*B. burgdorferi* s.l.) (Adeolu i Gupta, 2014). Pomimo wyraźnych różnic filogenetycznych pomiędzy grupami *Borrelia*, w środowiskach naukowych uważa się, że wydzielenie nowego rodzaju *Borrelia* nie jest zasadne i nowe nazewnictwo nie zostało powszechnie uznane (Margos i in., 2018). W niniejszej pracy nazewnictwo krętków należących do kompleksu *B. burgdorferi* s.l. przedstawione jest według tradycyjnej taksonomii krętków.

Obecnie wyróżnia się ponad 20 gatunków krętków *Borrelia* wywołujących boreliozę, a ich głównymi wektorami są różne gatunki kleszczy z rodzaju *Ixodes* w zależności od regionu geograficznego. Spośród tej grupy krętków, 12 gatunków zostało wyizolowanych od pacjentów prezentujących objawy boreliozy. Najczęściej występującymi patogenami wśród ludzi są: *B. burgdorferi* sensu stricto (s.s.) w Stanach Zjednoczonych i Europie Zachodniej, *B. mayonii* głównie w Stanach Zjednoczonych, oraz *B. garinii*, *B. bavariensis* i *B. afzelii* w Eurazji (Margos i in., 2013; Mead, 2022; Parise i in., 2020). Pozostałe gatunki, takie jak: *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. spielmanii*, *B. kurtenbachii*, *B. andersonii*, *B. americana* i *B. bissettii*, również zostały wyizolowane lub wykryte metodą PCR w próbkach pobranych od pacjentów, jednak ich udział w etiologii boreliozy jest uznawany za znacznie mniejszy (Radolf i in., 2012; Strnad i in., 2023). Ta zauważalna heterogeniczność szczepów *B. burgdorferi* s. l. prawdopodobnie jest najważniejszym czynnikiem powodującym regionalne różnice klinicznych postaci choroby. Dlatego zaobserwować można, że *B. burgdorferi* s. s. w głównej mierze odpowiada za objawy związane z zapaleniem stawów, podczas gdy *B. afzelii* wywołuje

infekcje skórne, a *B. garinii* prowadzi do infekcji układu nerwowego (neuroborelioza) (Steere, 2001; Strnad i in., 2023).

Krętek *Borrelia* należy do grupy mikroaerofilnych bakterii o kształcie skręconego cylindra charakterystycznego dla krętków, którego średnica wynosi 0,2-0,5 μm oraz długość 20-30 μm . *Borrelia* zakwalifikowana jest do grupy bakterii Gram-ujemnych i jej komórki otoczone są dwiema błonami komórkowymi, jednak struktura, skład i właściwości błon znacząco różnią się od właściwości błon komórkowych charakterystycznych dla typowych bakterii Gram-ujemnych, takich jak *Escherichia coli* (Radolf i in., 2012). Zewnętrzna błona *Borrelia* jest dwuwarstwą pozbawioną liposacharydu (LPS), który stanowi integralny składnik zewnętrznej błony większości bakterii Gram-ujemnych. Głównymi składnikami lipidowymi zewnętrznej błony komórkowej *Borrelia* są między innymi: fosfatydylocholina, fosfatydyloglicerol oraz glikolipidy, takie jak 6-O-acylo- β -D-galaktopiranozyd cholesterolu i β -d-galaktopiranozyd cholesterolu (LaRocca i in., 2010). *Borrelia* syntetyzuje galaktozylotransferazy modyfikujące cholesterol pochodzący od gospodarza (lub z pożywki hodowlanej) i włącza go do swoich błon komórkowych. Podobny mechanizm włączania pochodnych cholesterolu do błon występuje u *Helicobacter pylori*, a jego funkcją jest ochrona bakterii przed układem odpornościowym gospodarza, co może wskazywać na podobną funkcję u *Borrelia* (Stübs i in., 2009). Dodatkowo glikolipidy cholesterolu mogą tworzyć w zewnętrznej błonie mikrodomeny, tzw. tratwy lipidowe (ang. *lipid rafts*, LR). U organizmów eukariotycznych tratwy lipidowe są uporządkowanymi, sztywnymi, bogatymi w cholesterol obszarami błony, w których znajdują się zakotwiczone w lipidach białka. Wykazano, że obecność tych mikrodomen wpływa, między innymi, na dynamikę oraz polaryzację błony komórkowej w procesach adhezji i migracji komórek czy aktywację komórek w procesach immunologicznych. W przypadku *Borrelia* organizacja tratw lipidowych zmienia się w zależności od warunków temperaturowych, co wskazuje, że mogą one pełnić funkcję sygnalizacyjną w różnicowaniu ekspresji genów kodujących odpowiednie lipoproteiny w trakcie transmisji krętka z kleszcza do organizmu gospodarza (LaRocca i in., 2010).

Jednakże najbardziej unikatową cechą krętka *Borrelia* jest obecność na powierzchni błony zewnętrznej dużej ilości zróżnicowanych lipoprotein, niezwykle istotnych dla wirulencji *B. burgdorferi* s.l., interakcji między patogenem a organizmem gospodarza oraz utrzymania enzootycznego cyklu krętka (Caine i Coburn, 2016) (Rozdział 1.3.3).

Zdolność do ruchu zapewnia krętkom około 7-11 wici, które znajdują się w przestrzeni peryplazmatycznej i są zakotwiczone na dwóch przeciwległych biegunach komórki bakteryjnej. Każda z wici składa się z ciałka podstawy (kinetosomu) zakotwiczonego w wewnętrznej błonie komórkowej, haka oraz włókna zbudowanego z dwóch głównych białek: mniejszej flageliny A (FlaA) oraz większej flageliny B (FlaB). *Borrelia*, poprzez ruch wici, zostaje wprowadzona w ruch obrotowy, który umożliwia sprawne poruszanie się krętka nawet w gęstych i lepkich przestrzeniach, co prawdopodobnie umożliwia bakterii penetrację różnych tkanek (Sal i in., 2008, Strnad i in., 2024). Obok zakotwiczonych na biegunach bakterii wici znajdują się białka MCP (z ang. *methyl-accepting chemotaxis proteins*) biorące udział w chemotaksji, pozwalającej na ukierunkowany ruch bakterii do składników odżywczych (chemoatraktanty) oraz odwrotną reakcję – ruch w przeciwną stronę, np. ucieczkę od etanolu bądź butanolu (Xu i in., 2011). Wśród chemoatraktantów wykorzystywanych przez *Borrelia* wyodrębniono między innymi glutaminian czy glukozaminę, ale również bogate w różne składniki kompleksy, takie jak ślina kleszcza czy królicza surowica. Można spekulować, że chemotaksja w kierunku glutaminianu, który jest głównym neuroprzekaźnikiem układu nerwowego oraz glukozaminy, głównego składnika tkanki łącznej w stawach, odgrywa istotną rolę w migracji krętka *Borrelia* do poszczególnych tkanek (Bakker i in., 2006).

Ze względu na pasożytniczy tryb życia bakterii, zdolności metaboliczne *B. burgdorferii* s.l. są bardzo ograniczone i są w dużym stopniu zależne od organizmów kleszcza oraz ssaka. Krętki *Borrelia* są auksotrofami, co oznacza, że nie potrafią samodzielnie syntetyzować niezbędnych do funkcjonowania związków organicznych, takich jak aminokwasy, nukleotydy czy kwasy tłuszczowe, które muszą pozyskać z otoczenia (Fraser i in., 1997; von Lackum i Stevenson, 2005). Ze względu na brak genów kodujących enzymy odpowiedzialnych za cykl Krebsa oraz fosforylację oksydacyjną, krętki czerpią energię z fermentacji cukrów do kwasu mlekowego w szlaku Embdena-Meyerhofa-Parnasa (glikoliza), wykorzystując glukozę pochodzącą z organizmu gospodarza jako podstawowe źródło energii (Corona i Schwartz, 2015; Fraser i in., 1997).

1.3.2. Genom oraz regulacja ekspresji genów *Borrelia*

Krętki z rodzaju *Borrelia* posiadają najbardziej niezwykły i złożony genom spośród wszystkich znanych bakterii, który składa się z jednego chromosomu liniowego o długości 900 kbp oraz 9 liniowych i 12 kolistych niestabilnych genetycznie plazmidów o łącznej długości 600 kbp (Fraser i in., 1997; Casjens i in., 2002). Chromosom zawiera większość genów metabolizmu podstawowego i ma stosunkowo stałą, konserwatywną organizację oraz zawartość. Natomiast plazmidy wykazują wysoki stopień zmienności genów, które nie są jednakowo reprezentowane we wszystkich szczepach *Borrelia*. Dostępne dane wskazują, że w materiale genetycznym *B. garinii* i *B. afzelii* brakuje niektórych plazmidów, które obecne są u *B. burgdorferi* s.s. To właśnie ta zmienność materiału genetycznego *Borrelia*, dotycząca kompozycji plazmidów, uważana jest za główną przyczynę różnorodności objawów klinicznych boreliozy w różnych regionach geograficznych (Steere i in., 2016).

Ze względu na zróżnicowane warunki bytowania krętka *Borrelia*, konieczne jest wykorzystywanie rozmaitych strategii związanych z regulacją ekspresji różnych genów w celu możliwości przetrwania bakterii zarówno w organizmie wektorowym - kleszcza, jak i organizmie gospodarza – ssaka (Samuels, 2011; Radolf i in., 2012). Zmiany temperatury, pH, dostępność tlenu czy różnych składników odżywczych podczas żerowania kleszcza, stymulują krętka *Borrelia* do zmiany miejsca bytowania z kleszcza na organizm gospodarza, co wiąże się z początkowym stadium infekcji. Ta zmiana podyktowana jest obecnością alternatywnych czynników transkrypcyjnych, które obejmują czynnik σ^S - RpoS (ang. *RNA polymerase factor S*) oraz czynnik σ^N (σ^{54}) - RpoN (ang. *RNA polymerase factor N*). Wykazano, że pod wpływem zmian środowiskowych dochodzi do aktywacji czynnika transkrypcyjnego σ^N (σ^{54}) - RpoN, który wraz z białkiem Rrp2 (ang. *respons regulatory protein 2*) aktywuje ekspresję genu *rpoS*, tym samym umożliwiając syntezę czynnika σ^S - RpoS (Hubner i in., 2001). Z tego względu, że czynnik σ^S - RpoS pełni funkcję regulatora genów odpowiedzialnych za wirulencję bakterii (między innymi: *ospC*, *dbpA*, *ospF*, *bbk32*), można przypuszczać, że właśnie ścieżka regulacyjna Rrp2-RpoN-RpoS pełni kluczową rolę dla syntezy poszczególnych lipoprotein powierzchniowych umożliwiających zainicjowanie infekcji gospodarza (Caimano i in., 2019). Należy podkreślić, że mutanty *Borrelia* pozbawione możliwości syntezy czynników RpoN oraz RpoS mogły z powodzeniem kolonizować jelito kleszcza, ale były pozbawione możliwości zasiedlania ślinianek kleszcza oraz

infekowania organizmu żywiciela (kręgowca) (Fisher i in., 2005; Dunham-Ems i in., 2012).

Warto również zwrócić uwagę na grupę białek Fur (ang. *ferric uptake regulator*) w komórkach prokariotycznych pełniących rolę ważnych regulatorów transkrypcji, których główną funkcją jest represja ekspresji różnych genów (Sevilla i in., 2021). Również genom *Borrelia* koduje jeden z homologów białka Fur - BosR (ang. *Borrelia oxidative stress regulator*), które współdziałając z czynnikiem RpoS promuje adaptację *Borrelia* do środowiska organizmu gospodarza (ssaka). RpoS powoduje aktywację transkrypcji genów wirulencji, specyficznych dla wczesnych etapów infekcji ssaka (np. genu *ospC*), a BosR - represję genów specyficznych dla bytowania krętka w organizmie wektorowym (np. genu *ospA*) (Hyde i in., 2009). Regulacja ekspresji genów *ospA* i *ospC* jest odwrotnie skorelowana. Gdy krętek przebywa w jelicie kleszcza, poziom ekspresji genu *ospA* jest wysoki, a poziom ekspresji genu *ospC* bardzo niski. Następnie, podczas żerowania kleszcza oraz związanych z tym zmian środowiskowych, dochodzi do odwrócenia profilu ekspresji - rośnie poziom ekspresji genu *ospC*, a maleje poziom ekspresji genu *ospA*. Obserwacje te są zgodne z hipotezą, że strategią *Borrelia*, umożliwiającą ochronę przed wrodzoną odpornością organizmu wektora i gospodarza, jest produkcja określonych lipoprotein w zależności od miejsca bytowania bakterii. Oprócz genów *ospA* i *ospC* w genomie *Borrelia* istnieje całe spektrum genów odpowiedzialnych za produkcję wielu zróżnicowanych białek powierzchniowych, których poziom ekspresji zmienia się w trakcie cyklu enzoptycznego bakterii (Sevilla i in., 2021).

Podkreśla się rolę dwóch wewnątrzkomórkowych czynników: tetrafosforanu i pentafosforanu guanozyny, określanych wspólnie jako (p)ppGpp, oraz cyklicznego dimerycznego guanozyno-5'-monofosforanu (c-di-GMP). Uważa się, że te kluczowe cząsteczki sygnałowe przyczyniają się do globalnych zmian ekspresji genów bakterii, co umożliwia jej adaptację oraz możliwość przeżycia w niesprzyjających warunkach (Drecktrah i in., 2015). Poziomy (p)ppGpp są regulowane przez dwufunkcyjny enzym Rel_{Bbu}, który działa zarówno jako syntetaza, jak i hydrolaza cząsteczek (p)ppGpp, a regulacja ta następuje w wyniku odpowiedzi bakterii na stresory środowiskowe. Wykazano, że obecność (p)ppGpp wpływa na zwiększenie ekspresji genów, które sprzyjają przetrwaniu *Borrelia* w organizmie kleszcza *Ixodes*. Ponadto jako dodatkowy regulator transkrypcji wymienia się również DksA (ang. *DnaK suppressor protein A*), który prowadzi do zmiany ekspresji genów pod wpływem niesprzyjających czynników

środowiskowych (Boyle i in., 2019). Współdziałanie Rel_{Bbu} oraz DskA umożliwia taką regulację ekspresji genów *Borrelia*, dzięki której bakteria przystosowuje się do warunków panujących w organizmie kleszcza (Boyle i in., 2019; Pal i in., 2020). Wspomniany powyżej c-di-GMP pełni rolę regulatora, który wpływa na poziom ekspresji genów, ruchliwość czy przeżycie *Borrelia* w organizmie kleszcza (Kostick i in., 2011; Kostick-Dunn i in., 2018). Synteza c-di-GMP jest możliwa dzięki obecności cyklazy guanylowej Rrp1, która jest składnikiem kolejnego systemu regulatorowego *Borrelia* Hk1-Rrp1. Okazuje się również, że mutanty rrp1 są niezdolne do syntezy c-di-GMP, co uniemożliwia przetrwanie *Borrelia* w organizmie kleszcza, będącego w trakcie żerowania. Podsumowując, aby dostosować się do zmiennego środowiska i w nim przetrwać, bakteria uruchamia wiele alternatywnych ścieżek regulacji ekspresji genów (Caimano i in., 2015).

1.3.3. Białka powierzchniowe – wyjątkowa cecha *Borrelia*

Bakterie należące do rodzaju *Borrelia burgdorferi* s. l. zasiedlają zarówno organizm kleszcza, jak i organizm kręgowca, co podkreśla ich ogromny adaptacyjny potencjał. Badania *in vitro* wskazują, że *Borrelia* reaguje na zmiany środowiska zewnętrznego (pH czy temperatura), a reakcje te są głównie związane ze zmianami poziomu produkcji różnych białek powierzchniowych – Osp (ang. *outer surface proteins*). Są to białka podlegające potranslacyjnej modyfikacji lipidowej, należące do grupy lipoprotein (Caine i Coburn, 2016). Krętek *Borrelia* produkuje około 150 lipoprotein (których sekwencje kodujące stanowią 8% genomu krętka), a około dwie trzecie tej grupy stanowią białka eksportowane na powierzchnię komórki (lipoproteiny powierzchniowe), podczas gdy pozostałe białka są zatrzymywane w przestrzeni peryplazmatycznej (lipoproteiny peryplazmatyczne) (Dowdell i in., 2017; Pal i in., 2020; Setubal i in., 2006).

Sekwencjonowanie genomu *Borrelia* potwierdziło obecność genów kodujących białka, które wchodzi w skład bakteryjnych systemów sekrecji. W skład tych systemów wchodzi sekwencje sygnałowe, których funkcją jest kierowanie niedojrzałych form białek na powierzchnię komórki bakteryjnej. Sekwencje sygnałowe (około 20 aa) znajdują się na końcu aminowym białka i są rozpoznawane przez kompleks wydzielniczy SecY, który wchodzi w interakcję z sekwencją sygnałową, kierując łańcuch polipeptydowy do kompleksu translokazy w błonie cytoplazmatycznej. Następnie białko

SecA wiąże peptyd sygnałowy niedojrzałego białka, umożliwiając jego eksport przez błonę cytoplazmatyczną krętka za pośrednictwem kanału transbłonowego (Haake i Zückert, 2017). Podczas translokacji białek przez wewnętrzną błonę komórki bakteryjnej ulegają one konwersji do lipoprotein z udziałem trzech enzymów. Pierwszy enzym, transferaza diacyloglicerolowa, rozpoznaje sekwencję sygnałową i przyłącza dwie cząsteczki lipidów do reszty tiolowej N-końcowej cysteiny. Następnie sekwencja ta jest ponownie rozpoznawana przez kolejny enzym, peptydazę sygnałową, która usuwa peptyd sygnałowy poprzedzający modyfikowaną cysteinę. Natomiast trzeci enzym, N-acetylotransferaza, wiąże trzecią cząsteczkę lipidu z N-końcową cysteiną. Przyłączone kwasy tłuszczowe na końcu aminowym lipoproteiny służą jako „kotwice”, umożliwiające przymocowanie białka w błonie komórkowej bakterii (Haake, 2000; Haake i Zückert, 2017).

Produkcja białek powierzchniowych przez *Borrelia* jest indukowana zależnie od aktualnego etapu cyklu życiowego. Mechanizmy regulacji ekspresji genów *Borrelia* opisano w Rozdziale 1.3.2. Pojawienie się określonych zestawów lipoprotein na powierzchni krętka jest niezbędne, aby bakteria mogła zasiedlać przewód pokarmowy kleszcza, migrować i kolonizować gruczoły ślinowe wektora, wnikać do krwiobiegu żywiciela, unikać ataku immunologicznego ze strony żywiciela czy zasiedlać docelowe tkanki (Caine i Coburn, 2016).

Pierwsze zidentyfikowane białka powierzchniowe *Borrelia* to OspA oraz OspB, których geny *ospA* i *ospB* ulegają ekspresji z tego samego liniowego plazmidu lp54. Dodatkowo białka OspA oraz OspB charakteryzują się wysokim poziomem podobieństwa zarówno w przypadku sekwencji aminokwasowych (identyczność sekwencji na poziomie około 50%), jak i struktur poszczególnych białek (Becker i in., 2005). Z przeprowadzonych badań *in vitro* wynika, że rekombinowane OspA i OspB wiążą białka wyizolowane z tkanek jelita środkowego kleszczy (Fikrig i in., 2004; Pal i in., 2000). Opisano między innymi oddziaływanie pomiędzy białkami OspA - TROSPA (ang. *the tick receptor for outer surface protein A*) pochodzącego z nabłonka jelita kleszcza, dzięki któremu *Borrelia* skutecznie zasiedla jelito stawonoga (Urbanowicz i in., 2016). Kolejne badania z udziałem genetycznych mutantów krętka pozbawionych możliwości syntezy białek OspA i OspB pokazały natomiast, że brak tych białek wpływa na upośledzenie zdolności kolonizacji jelita przez *Borrelia* (Pal i in., 2004). Pomimo że obecność samego białka OspA na powierzchni krętka jest wystarczająca, aby bakteria kolonizowała tkanki jelita środkowego kleszcza, to udział obu tych białek wzmacnia ten

efekt (Yang i in., 2004). W przeciągu 36-48 godzin od rozpoczęcia żerowania kleszcza poziom ekspresji genu *ospA* obniża się, natomiast ekspresja genu *ospC* ulega zwiększeniu. Dlatego po tym czasie to lipoproteina OspC jest licznie reprezentowana na powierzchni krętka. Na tym etapie rola białek OspA i OspB zmniejsza się, a OspC umożliwia migrację krętka z jelita do ślinianek kleszcza oraz kolonizację *Borrelia* organizmu ssaczego na wczesnych etapach infekcji (Kenedy i in., 2012).

Przykładem innej lipoproteiny powierzchniowej jest białko OspD, którego gen ulega ekspresji z plazmidu liniowego lp38. Wykazano, że ekspresja genu *ospD* znacznie zmienia się w odpowiedzi na bodźce środowiskowe, a zmiana temperatury z 23°C na 35°C powoduje aż 13-krotne obniżenie poziomu ekspresji tego genu (Ojaimi i in., 2003). Dodatkowo na zmniejszenie ekspresji genu mają także wpływ inne bliżej nieznanne sygnały specyficzne ze strony organizmu ssaczego, co wskazuje, że białko OspD prawdopodobnie nie pełni istotnych funkcji w trakcie infekcji organizmu ssaczego przez krętka (Li i in., 2013). Inne doniesienia naukowe pokazują, że różnica między najwyższym oraz najniższym poziomem ekspresji genu *ospD* jest nawet 500-krotna. Najwyższy poziom ekspresji tego genu zaobserwowano u krętka *Borrelia* wkrótce po zakończeniu żeru przez kleszcza, z kolei najniższy poziom ekspresji obserwowano podczas kolonizacji różnych tkanek organizmu mysiego. Ponadto nie zaobserwowano istotnych zmian w skuteczności infekowania organizmu mysiego między mutantami krętki *Borrelia* pozbawionych genu *ospD*, odpowiedzialnego za produkcję białka OspD, a typem dzikim krętki (Li i in., 2007). Ze względu na wyraźnie wyższą produkcję białka OspD w temperaturze 23°C oraz brak wpływu OspD na wirulencję krętki *Borrelia*, można przypuszczać, że białko to pełni główne funkcje związane z kolonizacją krętki w organizmie kleszcza (Tokarz i in., 2004).

Na powierzchni krętki zaobserwowano również adhezyny DbpA (ang. *decorin-binding protein A*) oraz DbpB (ang. *decorin-binding protein B*), które wiążą dekorynę – białko gospodarza, a ich geny zlokalizowane są na liniowym plazmidzie lp54 *Borrelia*. Poziom ekspresji genów kodujących *dbpA* i *dbpB* rośnie wraz ze zmianą temperatury z 23°C do 37°C. Dekoryna jest proteoglikanem, który stanowi składnik tkanki łącznej, wiąże się również z włóknami kolagenowymi oraz odgrywa ważną rolę w tworzeniu struktury macierzy zewnątrzkomórkowej (Salo i in., 2011). Wiązanie dekoryny przez białka DbpA i DbpB odgrywa istotną rolę w rozprzestrzenianiu się *Borrelia* i prawdopodobnie umożliwia kolonizację organizmu ssaczego przez bakterie. Zasugerowano również, że tkanki bogate w dekorynę mogą stanowić pewnego rodzaju

miejsca ochronne dla *Borrelia* (Liang i in., 2004). Wyniki eksperymentów wskazują, że białka DbpA i DbpB odgrywają kluczową rolę w późniejszych stadiach infekcji, podczas rozprzestrzeniania się krętka w organizmie czy zasiedlania tkanek szczególnie bogatych w dekorynę. Prawdopodobnie białka te nie są istotne podczas inicjowania infekcji u organizmów ssaków na początkowym jej stadium. Przeprowadzone badania mutantów *Borrelia*, pozbawionych możliwości syntezy tych białek, pokazały, że pomimo braku obecności DbpA i DbpB krętek był w stanie infekować myszy (choć mniej wydajnie), ale kolonizacja odległych narządów była mniej wydajna niż w przypadku szczepu dzikiego (Imai i in., 2013; Salo i in., 2011). Podobne funkcje pełnią również inne dobrze poznane adhezyny wiążące fibronektynę: BBK32 oraz Rev2. Badania mutantów wskazały, że krętki z niedoborem białka powierzchniowego Rev2 charakteryzują się mniejszą możliwością rozprzestrzeniania w organizmie gospodarza, a te z niedoborem BBK32 wykazują znaczny spadek kolonizacji organizmu myszy w porównaniu ze szczepami dzikimi *Borrelia* (Byram i in., 2015; Seshu i in., 2006).

Powyżej przedstawiono zaledwie kilka przykładów białek powierzchniowych *Borrelia*, aby zobrazować niezwykle złożoność i funkcje tej grupy białek. Zależność ekspresji genów kodujących lipoproteiny od warunków środowiskowych daje krętkowi niezwykle możliwości przystosowawcze, dzięki którym zasiedla on dwa zróżnicowane środowiska, mianowicie organizm wektorowy (stawonogi) oraz ssaczy organizm gospodarza.

1.4. Lipoproteina powierzchniowa OspC

Lipoproteina powierzchniowa OspC (ang. *Outer surface protein C*) należy do najbardziej zróżnicowanej grupy białek powierzchniowych produkowanych przez *Borrelia burgdorferi* s.l. Polimorfizm białek OspC jest obserwowalny nawet w obrębie szczepów należących do jednego gatunku czy zebranych z jednego obszaru geograficznego. Gen *ospC* zlokalizowany jest na kolistym plazmidzie cp26 i koduje białko o masie około 22 kDa (Marconi i in., 1993).

Na podstawie analiz porównawczych genów *ospC* udowodniono, że cechuje je wyjątkowo duża zmienność genetyczna, którą również obserwuje się na poziomie sekwencji aminokwasowej. Te analizy pozwoliły na wyodrębnienie 21 grup (wariantów) genotypów *ospC* wśród *B. burgdorferi* s.s. Wykazano, że grupy te różnią się pod względem ekologicznym i epidemiologicznym, co sugeruje, że klasyfikacja genotypów w obrębie *B. burgdorferi* s.s. jest istotna dla rozumienia podstawowej biologii krętka (Seinost i in., 1999; Wang i in., 1999). Dalsze badania wykazały, że spośród tych 21 grup, niektóre genotypy charakteryzują się wysokim poziomem infekcyjności u człowieka, co wiąże się z wieloukładowym przebiegiem choroby. U ponad 80% pacjentów ze zdiagnozowaną postacią rozsianą boreliozy identyfikowano genotypy *ospC* *B. burgdorferi* s.s. należące w szczególności do grup A, B, I lub K. Uznano zatem, że wymienione warianty genów *ospC* *Borrelia* odgrywają kluczową rolę w etiologii choroby (Seinost i in., 1999; Wang i in., 1999; Wormser i in., 2008). Późniejsze analizy sekwencji nukleotydowych genu *ospC* *B. burgdorferi* s. s. wskazały, że należy wyodrębnić jeszcze genotyp H, który również manifestuje objawy boreliozy, choć jego udział w etiologii choroby jest stosunkowo rzadki (Wormser i in., 2008). Podział na powyższe grupy *ospC* stał się uniwersalnym systemem typowania szczepów *B. burgdorferi* s. s., jednak dotyczy on tylko tego gatunku. Kolejne badania mające na celu wyodrębnianie genotypów *Borrelia*, uwzględniające także gatunki takie jak *B. afzelii* i *B. garinii*, pozwoliły na poszerzenie liczby wariantów do 69, choć zdaje się liczba ta będzie w dalszym ciągu rosła (Lagal i in., 2003).

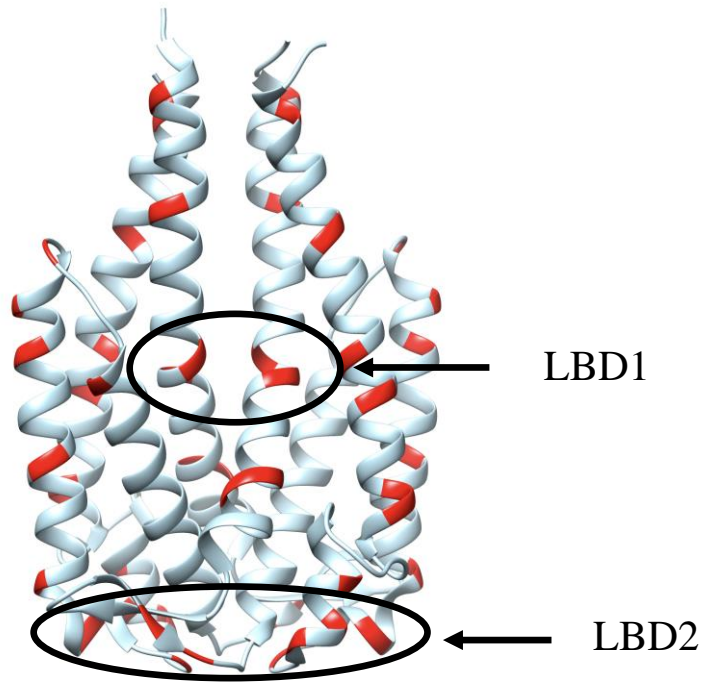
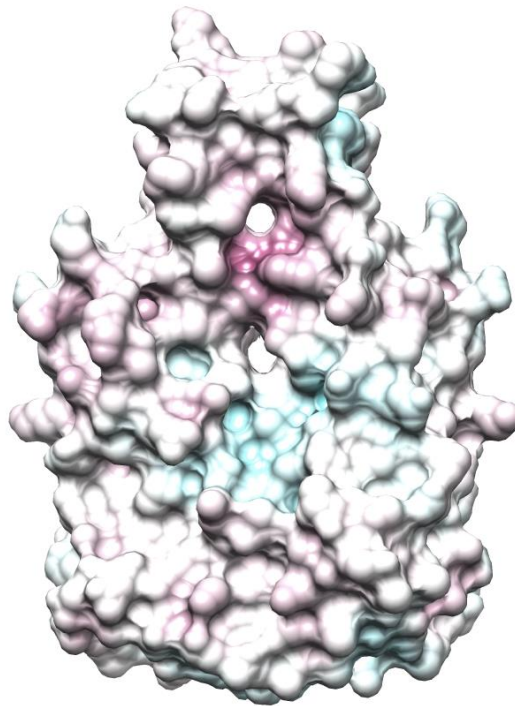
Sekwencje aminokwasowe białka OspC pochodzące z różnych gatunków *Borrelia* mogą różnić się nawet o 20-45%, ale mimo tej zmienności, ich struktury charakteryzują się bardzo wysokim podobieństwem (Eicken i in., 2001; Kumaran i in., 2001b). Na podstawie badań krystalograficznych udowodniono, że pojedyncza cząsteczka białka OspC (monomer) jest zbudowana prawie w całości z helis alfa –

zawiera cztery długie helisy ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$) oraz piątą, krótką ($\alpha 4$) (Rycina 1.2.). Z wyjątkiem helisy $\alpha 4$ i $\alpha 5$, pozostałe helisy ułożone są względem siebie antyrównolegle. W natywnych warunkach białko OspC tworzy homodimer, zbudowany z dwóch identycznych monomerów, co sugeruje, że pełni funkcje biologiczne właśnie jako dimer. Interakcje, które prowadzą do powstania dimeru, zachodzą pomiędzy helisami $\alpha 1$ i $\alpha 1'$ monomerów, które są względem siebie równoległe. Dodatkowo można również zaobserwować interakcje między helisami $\alpha 1$ i $\alpha 2'$ oraz pętlą łączącą helisy $\alpha 1$ i $\alpha 2$ a helisą $\alpha 3'$. Kluczowe interakcje dla utworzenia dimeru są prawie całkowicie hydrofobowe. Koniec aminowy i karboksylowy białka OspC znajdują się blisko siebie, co może wskazywać, że koniec karboksylowy ułożony jest w pobliżu błony zewnętrznej, w której zakotwiczony jest koniec aminowy białka (Eicken i in., 2001; Kumaran i in., 2001a; Kumaran i in., 2001b). W obrębie aktywnego dimeru białka OspC zlokalizowano dwa charakterystyczne miejsca, które prawdopodobnie są ważnymi domenami wiążącymi ligandy: LBD1 (ang. *ligand binding domain 1*) oraz LBD2 (ang. *ligand binding domain 2*). Domenę LBD1 tworzą dwie helisy $\alpha 1$ i $\alpha 1'$ sąsiadujących monomerów (Rycina 1.2). W tej domenie zaobserwowano konserwatywny region składający się z poszczególnych aminokwasów: K60, E61 i E63, które prawdopodobnie biorą udział w wiązaniu ligandu, albo wpływają na właściwości fizykochemiczne domeny, umożliwiając to wiązanie. Wykazano, że szczep B31 *Borrelia*, w którym przeprowadzono substytucję aminokwasów E61Q oraz E63Q, tracił zdolność infekowania myszy. Warto zauważyć, że wystarczyła mutacja tylko w obrębie aminokwasu E61, aby bakteria całkowicie utraciła zdolność infekowania, co podkreśla istotną i krytyczną rolę tego aminokwasu. Natomiast domena LBD2, zlokalizowana w „koronie” dimeru białka OspC, wykazuje większe zróżnicowanie pod względem sekwencji aminokwasowych, choć jej potencjalna funkcja pozostaje nieznana (Earnhart i in., 2010).

Mapowanie epitopów białka OspC ujawniło kluczowe regiony, takie jak pętla L5, obejmującą helisę $\alpha 3$ (130 - 150 aa), oraz region H5, obejmujący helisę $\alpha 5$. Warto podkreślić, że wspomniane epitopy charakteryzują się znacznym polimorfizmem, więc ich sekwencje różnią się u poszczególnych typów infekcyjnych *Borrelia*. Wykazano, że te fragmenty białka ekspozowane są na jego powierzchni i mogą być rozpoznawane przez przeciwciała układu odpornościowego gospodarza. Ze względu na immunoreaktywny charakter, epitopy L5 i H5, stanowią potencjalne miejsce wiązania ligandów (Buckles i in., 2006; Earnhart i in., 2005). Dzięki wysokiej immunogenności

epitopy L5 i H5 zostały wybrane jako główne składniki szczepionki przeciwko boreliozie. Przykładem jest szczepionka dla psów VANGUARD, która skutecznie chroni przed infekcją *Borrelia burgdorferi* s.s. Szczepionka ta oparta jest na bazie 7 różnych epitopów L5 i H5 oraz białka OspA (Marconi i in., 2020).

Zróżnicowana dystrybucja ładunków na powierzchni białek OspC pochodzących z różnych grup *B. burgdorferi* s.s. jest interesującym zagadnieniem. Obserwacje wskazują, że szczepy infekcyjne, takie jak HB19 (grupa I) i B31 (grupa A), posiadają na powierzchni białka OspC wysoce ujemny region. Taki region nie występuje w białku OspC szczepu nieinwazyjnego 212 (grupa Q). To sugeruje, że różnice w ładunkach powierzchniowych OspC mogą mieć istotne znaczenie w mechanizmie infekcji powodowanej przez *Borrelia* (Kumaran i in., 2001b).

A**B**

Rycina 1.2. Białko OspC ze szczepu B31 *B. burgdorferi* s.s. (PDB:1GGQ). **A** – Struktura krystalograficzna białka OspC. **Kolorem czerwonym** zaznaczono aminokwasy o ładunku ujemnym (Glu i Asp), **czarnymi okręgami** oznaczono domeny wiążące LBD1 i LBD2 (Earnhart i in., 2010). **B** – Przewidywana dystrybucja ładunków na powierzchni białka OspC. **Kolorem różowym** oznaczono ładunek dodatni, a **kolorem turkusowym** oznaczono ładunek ujemny.

Białko OspC jest jednym z dominujących antygenów na powierzchni krętka *B. burgdorferi* s. l. i jest uważane za ważny czynnik wirulencji *Borrelia* (Wilske i in., 1993). Chociaż rola OspC w dalszym ciągu jest tylko częściowo poznana, wykazano, że jest ono niezbędne na wczesnych etapach infekcji, wspomaga rozprzestrzenianie się krętka oraz może chronić *Borrelia* przed fagocytozą przez makrofagi (Carrasco i in., 2015).

Ekspresja ospC jest indukowana w ciągu 36-48 godzin od rozpoczęcia żerowania kleszcza na organizmie żywiciela, a osiąga szczytowe wartości na wczesnych etapach infekcji organizmu ssaka (Caimano i in., 2019; Xiang i in., 2017). Dodatkowo stwierdzono, że synteza białka OspC jest indukowana w temperaturze 32-37°C, ale nie przy 24°C (Schwan i in., 1995; Xiang i in., 2017). Warto także zaznaczyć, że mutanty *Borrelia* pozbawione możliwości syntezy białka OspC, tracą zdolność infekowania organizmu myszy, a w ciągu 20-30 minut od zaszczepienia myszy delecyjnym szczepem *Borrelia* jest on usuwany z organizmu, w przeciwieństwie do typu dzikiego (Caine i Coburn, 2015; Caine i in., 2017).

Na wczesnych stadiach infekcji, krętki obecne we krwi ssaka muszą przeciwstawiać się reakcjom nieswoistej odpowiedzi odpornościowej gospodarza. *B. burgdorferi* jest w stanie wiązać na swojej powierzchni wiele czynników pochodzących z organizmu żywiciela, tworząc „płaszcz” ochronny przed działaniem układu immunologicznego ssaka. Ponadto wykazano, że gatunki *Borrelia* charakteryzują się różną wrażliwością na ludzką surowicę. W szczególności *B. burgdorferi* ujawnia znacznie mniejszą wrażliwość na reakcje układu immunologicznego gospodarza w porównaniu do *B. garinii* (Caine i in., 2017; Kurtenbach i in., 2002; van Dam i in., 1997).

Badania sugerują, że lipoproteina OspC jest białkiem wielofunkcyjnym. Potwierdzono, że OspC może wiązać różne ligandy pochodzące z organizmu kleszcza oraz ssaka. Przykładami takich białek są Salp15 (białko śliny kleszcza), plazminogen czy białko układu dopełniacza C4b. Możliwość wiązania tych ligandów przez OspC może ułatwiać *Borrelia* inwazję tkanek, zakłócać działanie limfocytów czy hamować klasyczną oraz lektynową drogę układu dopełniacza (Lin i in., 2020; O'Bier i in., 2021). OspC, podobnie jak większość białek powierzchniowych *Borrelia*, ma charakter plejotropowy i pełni kilka funkcji podczas infekowania organizmu gospodarza. Taka różnorodność funkcji OspC może istotnie zwiększać szansę przeżycia bakterii w organizmie gospodarza oraz przeciwstawić się tak różnym mechanizmom obronnym.

1.5. Oddziaływanie białka OspC z przykładowymi ligandami białkowymi

1.5.1. Plazminogen

Jednym ze składników osocza kręgowców jest plazminogen, będący prekursorem enzymu proteolitycznego – plazminy. Kluczową rolą tych składników krwi jest między innymi degradacja macierzy pozakomórkowej (ang. *extracellular matrix*, *ECM*), która umożliwia migrację komórek eukariotycznych w organizmie (Plow i in., 1999). Okazuje się, że składniki te mogą być wykorzystywane przez wiele patogennych gatunków bakterii podczas infekowania organizmów kręgowców (Sun, 2004). Wykorzystanie enzymu proteolitycznego pochodzącego od gospodarza pozwala bakteriom na skuteczną migrację w obrębie organizmu, jednocześnie nie wywołując ostrej odpowiedzi zapalnej na wczesnych etapach infekcji (Önder i in., 2012). Wykazano, że bakterie zakaźne takie jak *Yersinia pestis*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus* czy *Streptococcus pyogenes* wykorzystują plazminę pochodzącą od organizmu gospodarza w celu migracji wymienionych bakterii oraz penetracji właściwych tkanek, a tym samym skutecznej infekcji organizmu (Sanderson-Smith i in., 2012).

B. burgdorferi s.l. z łatwością przenika przez błony podstawne oraz macierz pozakomórkową. Dzięki czemu *Borrelia* swobodnie przemieszcza się z organizmu kleszcza do skóry właściwej organizmu kręgowca, a następnie przedostaje się do jego układu krwionośnego. Za pośrednictwem naczyń krwionośnych dociera do odległych tkanek, powodując rozległe stany zapalne organizmu (Floden i in., 2011). Badania eksperymentalne z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych wykazały, że związanie plazminogenu na powierzchni krętka jest niezbędne do skutecznej transmisji *Borrelia* z kleszcza do organizmu żywiciela (Coleman i in., 1997). Potwierdzono, że białko OspC jest biologicznie istotnym receptorem plazminogenu, które zarówno wiąże plazminogen (nieaktywny prekursor plazminy), jak i promuje jego konwersję do aktywnej formy enzymu – plazminy. Warto podkreślić, że plazmina zlokalizowana na powierzchni *Borrelia* zamienia bakterię w proteolitycznie aktywny organizm zdolny do degradacji barier tkankowych i nasila rozprzestrzenianie się krętka (Önder i in., 2012). Ponadto zaobserwowano zmniejszenie możliwości infekcyjnych *Borrelia* u zwierząt z niedoborem plazminogenu, co podkreśla jego istotną rolę w zwiększaniu skuteczności cyklu infekcyjnego bakterii (Coleman i in., 1997; Floden i in., 2011).

Ciekawym zjawiskiem jest zróżnicowanie powinowactwa białka OspC do plazminogenu, które związane jest z pochodzeniem białka OspC z różnych grup

infekcyjnych *B. burgdorferii* s.s. Potwierdzono, że białka OspC pochodzące z inwazyjnych szczepów *Borrelia* – A i B, wykazują większe powinowactwo do plazminogenu w porównaniu do białka OspC pochodzącego z nieinwazyjnego szczepu – F (Lagal i in., 2006).

1.5.2. Białko układu dopełniacza C4b

Jak już wspomiano, *Borrelia* może rozprzestrzeniać się do odległych tkanek, powodując rozległe i wieloukładowe infekcje, a jednym z mechanizmów wykorzystywanym przez te bakterie jest unikanie oddziaływań ze strony układu dopełniacza organizmu gospodarza (Lin i in., 2020). Układ dopełniacza to zespół wielu glikoprotein stale obecnych we krwi i płynach ustrojowych człowieka, które współdziałając z licznymi receptorami i regulatorami, aktywują reakcję kaskadową. Obejmuje ona szereg procesów proteolitycznych, w wyniku których utworzony zostaje kompleks lityczny atakujący błonę bakteryjną (ang. *membrane attack complex, MAC*). Do głównych zadań powyższego układu zaliczamy między innymi lizę komórek bakteryjnych, co stanowi jedną z możliwości usuwania patogennych czynników przez organizm. Warto podkreślić, że układ dopełniacza jest pierwszą linią obrony immunologicznej człowieka i działa w sposób ciągły w całym organizmie (Zipfel i Skerka, 2009; Zipfel i in., 2013). Reakcja kaskadowa układu dopełniacza może być aktywowana różnymi drogami: klasyczną, lektynową lub alternatywną. Istnieje również wiele mechanizmów regulacyjnych, które kontrolują te reakcje w celu minimalizacji ryzyka uszkodzenia zdrowych tkanek. Obecność białek takich jak czynnik H hamuje alternatywną ścieżkę układu dopełniacza, a białko wiążące czynnik C4b (ang. *C4b-binding protein, C4BP*) oraz inhibitor czynnika C1 odpowiedzialne są za inhibicję ścieżki klasycznej oraz lektynowej, gdy w aktualnym czasie nie jest konieczne uruchomienie reakcji kaskadowej (np. brak zagrażających czynników patogennych w organizmie) (Zipfel i Skerka, 2009).

Na podstawie badań *in vitro* zidentyfikowano silne wiązanie białka OspC oraz białka układu dopełniacza C4b (stała wiązania K_d dla kompleksu OspC-C4b wynosiła około 414 nM), a dalsze eksperymenty wskazały, że interakcja tych dwóch białek może prowadzić do równoczesnego zahamowania ścieżki klasycznej oraz lektynowej układu dopełniacza. Dodatkowo, zaobserwowano, że białko OspC konkuruje z czynnikiem dopełniacza C2 o miejsce wiązania białka C4b, skutecznie obniżając efektywność

tej interakcji. Wyniki te pozwoliły postawić śmiałą hipotezę, że białko OspC skutecznie wchodzi w interakcję z białkiem C4b, tym samym blokując możliwość wiązania natywnego partnera C2, co powoduje przerwanie reakcji kaskadowej układu dopełniacza, umożliwiając przeżycie *B. burgdorferi* w krwiobiegu organizmu gospodarza (Caine i in., 2017; Lin i in., 2020).

Wykazano także interesujące różnice w możliwości wiązania czynnika C4b przez OspC pochodzące z różnych gatunków *Borrelia*. Mianowicie specyficzne wiązanie OspC-C4b zostało co prawda odnotowane dla białka OspC pochodzącego z *B. burgdorferii* s.s., lecz w przypadku OspC z *B. garinii* nie uzyskano wiarygodnych danych potwierdzających utworzenie specyficznego wiązania z czynnikiem C4b (Caine i in., 2017). Powyższa obserwacja potwierdza poprzednie hipotezy dotyczące różnej wrażliwości na białka ludzkiej surowicy poszczególnych gatunków *Borrelia*. W serii testów *in vitro* potwierdzono, że gatunek *B. burgdorferi* s.s. jest odporny na bakteriobójczą aktywność ludzkiej surowicy (ang. *serum bactericidal activity*, SBA), której działanie zależne jest od układu dopełniacza. Z kolei w przypadku gatunku *B. garinii* okazało się, że charakteryzuje się on większą wrażliwością na reakcje ze strony układu odpornościowego gospodarza, ponieważ w kontakcie z białkami ludzkiej surowicy krętki te były zabijane. Może to świadczyć o wykorzystywaniu odmiennych strategii obronnych przez krętki należące do różnych gatunków *Borrelia* (van Dam i in., 1997).

1.5.3. Białko śliny kleszcza – Salp15

Kleszcze podczas długotrwałych żerów (nawet od 4 do 10 dni) na organizmie gospodarza muszą przeciwdziałać licznym reakcjom obronnym organizmu, takim jak skurcz naczyń krwionośnych, aktywacja układu dopełniacza czy swoista odpowiedź immunologiczna (Das i in., 2001; Juncadella i Anguita, 2009). W tym celu kleszcze produkują w śliniankach wydzielinę bogatą w wiele czynników bioaktywnych, które pełnią różnorodne funkcje: przeciwzapalne, przeciwbólowe, rozkurczające naczynia krwionośne, immunomodulujące oraz przeciwzakrzepowe, umożliwiając przeciwdziałanie mechanizmom obronnym żywiciela (Das i in., 2001; Wen i in., 2020). Dotychczas scharakteryzowano niewiele z tych czynników, choć jednym z najlepiej poznanych jest białko śliny kleszcza – Salp15 (ang. *salivary gland protein*) pochodzące z kleszcza *Ixodes scapularis*. Białko Salp15 jest glikoproteiną bogatą w reszty cysteiny,

którego masa molekularna wynosi około 15 kDa. Początkowo przedstawiono, że Salp15 charakteryzuje się częściową homologią do dwóch aktywnych regionów inhibiny A, która należy do większej grupy białek tzw. nadrodziny transformującego czynnika wzrostu beta (ang. *transforming growth factor* β , TGF- β). Z tego względu, że TGF- β jest odpowiedzialne za hamowanie proliferacji limfocytów T oraz produkcji cytokin, zasugerowano, że może to być również jedna z funkcji białka Salp15. Następnie wykazano, że Salp15 wiążąc się z cząsteczkami CD4 na powierzchni limfocytów T wywiera hamujący wpływ na aktywację i proliferację limfocytów T oraz obniża produkcję cytokin, takich jak interleukina 2 (IL-2), która jest również ważnym aktywatorem wzrostu limfocytów. Ponadto udokumentowano, że reakcja białek Salp15 i CD4 jest stosunkowo trwała, dzięki czemu białko Salp15 przez dłuższy czas może wywierać działanie immunosupresyjne, co może podtrzymywać cykl życiowy krętka *Borrelia* w organizmie człowieka (Anguita i in., 2002; Juncadella i Anguita, 2009).

Stwierdzono także obecność homologów białka Salp15 u kleszczy z rodzaju *Ixodes ricinus*. Przykładem takiego białka homologicznego jest Iric-1, który wykazuje około 76% identyczności sekwencji z Salp15. Opisano również dwa kolejne homologi pochodzące z *I. ricinus*: Iric-2 oraz Iric-3, chociaż ich rola nie została dostatecznie scharakteryzowana. Wykazano, że homologi Salp15 na końcu karboksylowym zawierają konserwatywny rejon składający się z 20 aminokwasów, który zaangażowany jest w wiązanie białka CD4 (Hovius i in., 2008). Oprócz powyższych białek opisano także homologi Salp15 pochodzące z innych gatunków kleszczy należących do rodzaju *Ixodes*: *I. persulcatus*, *I. sinensis* czy *I. pacificus*. Wszystkie te białka zawierają konserwatywne domeny na końcu karboksylowym, co sugeruje, że należą one do dużej rodziny Salp15. Jednakże wysoki poziom zmienności sekwencji wśród wymienionych homologów może wskazywać na różne funkcje tych białek. Pokazuje to, jak ważna jest dalsza weryfikacja tych białek i odkrywanie roli, jaką pełnią w kontekście cyklu enzoptycznego *Borrelia* (Wang i in., 2014).

Potwierdzono, że białko OspC specyficznie wiąże białko Salp15, co umożliwia utworzenie na powierzchni krętka *Borrelia* pewnego rodzaju powłoki ochronnej przed wrodzoną i swoistą odpowiedzią immunologiczną organizmu gospodarza, zwiększając jednocześnie szanse na rozprzestrzenienie się bakterii w organizmie (Chmelar i in., 2016; Ramamoorthi i in., 2005). Badania *in vivo* potwierdziły, że białko Salp15 chroni *B. burgdorferi* s.s. przed negatywnymi skutkami działania przeciwciał w organizmie gospodarza, a ponadto umożliwia utrzymywanie krętka w organizmie w późniejszych

stadiach infekcji. Podobne wiązanie białka OspC wykryto z białkiem Iric-1, co może wskazywać na analogiczną rolę tego homologa (Schuijt i in., 2008). Jednakże w przypadku tych interakcji zaobserwowano pewne różnice wynikające z zastosowanego szczepu *Borrelia*, z którego pochodziło białko OspC. Okazało się, że białko OspC pochodzące z *B. burgdorferi* s.s. wchodzi w silniejsze i bardziej specyficzne interakcje z białkiem Salp15, niż Iric-1. Ponadto w przypadku białka Iric-1 wykazano oddziaływania z białkami OspC pochodzącymi z *B. afzelii*, *B. burgdorferi* s.s. oraz *B. garinii*. Jednakże w przypadku białka Salp15 nie wykazano interakcji z białkami OspC pochodzącymi z *B. afzelii* i *B. garinii*, co potwierdza zależności występujące w środowisku naturalnym, gdzie *I. scapularis* pełni rolę wektora jedynie dla *B. burgdorferi* s.s, a nie dla *B. afzelii* i *B. garinii*. (Hovius i in., 2008; Kolb i in., 2015).

Co ciekawe, tylko interakcja białek Salp15 i Iric-1 z białkiem OspC pochodzącego z *B. burgdorferi* s.s chroni ten szczep bakteryjny przed działaniem przeciwciał organizmu gospodarza, a w konsekwencji skutkuje to znacznie wyższą liczbą krętków *B. burgdorferii* s.s. i cięższym przebiegiem infekcji w modelach mysich w porównaniu z pozostałymi szczepami (*B. afzelii* i *B. garinii*). To zróżnicowanie może wskazywać na przewagę zdolności infekcyjnych szczepu *B. burgdorferi* s.s. nad pozostałymi gatunkami *Borrelia* w naturalnym środowisku oraz na możliwość stosowania innych strategii umożliwiających przetrwanie różnym gatunkom krętków *Borrelia* w organizmie gospodarza. Podkreśla to ogromną złożoność interakcji kleszcz-ssak-patogen oraz trudności związane z poznawaniem mechanizmów stosowanych przez *Borrelia* podczas infekcji (Schuijt i in., 2008).

2. CEL PRACY

Wysoka zapadalność na boreliozę jest jedną z kluczowych przyczyn wzrostu zainteresowania tą chorobą wśród naukowców. Brak skutecznych środków zaradczych, takich jak np. szczepionka, podkreśla konieczność kontynuowania badań nad tym zagadnieniem. Krętek *Borrelia* jako czynnik sprawczy boreliozy, posiada wyjątkową i unikatową cechę, jaką jest zdolność do produkcji ogromnej liczby białek powierzchniowych. Białka te umożliwiają *Borrelia* przystosowanie się do dwóch odmiennych środowisk – organizmu kleszcza (wektora) oraz kręgowca (żywiciela). Odgrywają one szczególnie istotną rolę w skutecznym infekowaniu organizmu żywiciela przez *Borrelia* oraz zwalczaniu reakcji układu odpornościowego. Kluczowe znaczenie na wczesnych etapach inwazji organizmu ssaka przez *Borrelia* ma jedna z lipoprotein powierzchniowych – OspC (ang. *outer surface protein C*).

Pomimo że badania dotyczące OspC trwają od lat 90-tych, to większość doniesień literaturowych koncentruje się wokół białek OspC pochodzących z *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. Natomiast białka OspC pochodzące z innych gatunków *Borrelia* cieszą się mniejszym zainteresowaniem środowisk naukowych. Ponadto dostępne doniesienia literaturowe wskazują na plejotropowy charakter OspC, przy czym dotychczas poznano jedynie niektóre z jego funkcji. Dlatego głównym celem niniejszej pracy było pogłębienie wiedzy na temat białek OspC oraz ich roli w oddziaływaniach z czynnikami wektora i żywiciela, a także poszerzenie zakresu badań również o gatunki *Borrelia*, które mają istotny udział w etiologii boreliozy na terenach europejskich.

Poniżej przedstawiono zadania szczegółowe, które zaplanowano i wykonano w trakcie realizacji eksperymentalnej części pracy doktorskiej.

Zadania szczegółowe:

1. Porównanie sekwencji aminokwasowych, struktur i parametrów fizykochemicznych białek OspC pochodzących z czterech różnych gatunków należących do grupy *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* oraz *Borrelia spielmanii*) oraz wyodrębnienie występujących między nimi różnic (tj. masa cząsteczkowa, teoretyczny punkt izoelektryczny, skład aminokwasowy, dystrybucja ładunków na powierzchni białek).
2. Zaprojektowanie i przygotowanie konstruktów genetycznych do produkcji rekombinowanych białek OspC.

3. Opracowanie optymalnego protokołu produkcji rekombinowanego białka OspC pochodzącego z poszczególnych gatunków *Borrelia*.
4. Opracowanie optymalnego protokołu produkcji rekombinowanych homologów białka śliny kleszcza Salp15 (Iric1, Iric2 oraz Iric3) – ligandów OspC.
5. Zaprojektowanie oraz wykonanie badań interakcji białek OspC z ligandami: ludzkim fibrynogenem oraz białkami śliny kleszcza *I. ricinus*: Iric1, Iric2 oraz Iric3.
6. Badania strukturalne kompleksów OspC z ligandami (Iric1 oraz fibrynogen).

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Materiały

3.1.1. Lista odczynników chemicznych

Odczynnik	Producent
Agar	<i>BioShop</i>
Agaroza	<i>BioShop</i>
Akrylamid/bis-akrylamid (37,5:1)	<i>Roth</i>
Ampicylina	<i>Sigma</i>
Barwnik do żelu agarozowego SimplySafe™	<i>EURx</i>
Bio-trypton	<i>BioShop</i>
Błękit bromofenolowy	<i>Sigma</i>
BSA	<i>BioShop</i>
Bufor fosforanowy (10x PBS)	<i>BioShop</i>
CellLytic 10x	<i>Sigma</i>
Chlorek magnezu	<i>Sigma</i>
Chlorek sodu	<i>BioShop</i>
Chloroform	<i>Sigma</i>
Chlorowodorek tris(2-karboksyetylo)fosfiny (TCEP)	<i>BioShop</i>
Cyjan ksylenu	<i>BioShop</i>
Dekstroza	<i>BioShop</i>
Dimetylosulfotlenek (DMSO)	<i>Thermo Scientific</i>
Diwodorofosforan potasu	<i>BioShop</i>
Diwodorofosforan sodu	<i>BioShop</i>
dNTPs	<i>Merck Millipore</i>
Dodecylosiarczan sodu (SDS)	<i>BioShop</i>
Etanol	<i>Sigma</i>
Fenol	<i>Sigma</i>
Ficoll	<i>Sigma</i>
Fluorek sodu	<i>BioShop</i>
Glicerol	<i>BioShop</i>
Glicyna	<i>BioShop</i>
Imidazol	<i>Molecula</i>
Inhibitor proteaz (cOmplete ULTRA tablets, EDTA free)	<i>Roche</i>

Odczynnik	Producent
Izopropyl- β -D-tiogalaktopiranozyd (IPTG)	<i>Merck Millipore</i>
Kwas borowy	<i>BioShop</i>
Kwas etylenodiamino-tetraoctowy (EDTA)	<i>BioShop</i>
Kwas solny	<i>BioShop</i>
Nadsiarczan amonu (APS)	<i>Biorad</i>
Octan amonu	<i>BioShop</i>
Octan sodu	<i>BioShop</i>
Pożywka LB (Luria Broth)	<i>BioShop</i>
Roztwór do wybarwiania żeli (Page Blue Staining)	<i>Fermentas</i>
Tetrametyloetylenodiamina (TEMED)	<i>Serva</i>
Tris	<i>BioShop</i>
Tween20	<i>BioShop</i>
Wodorofosforan potasu	<i>BioShop</i>
Wyciąg drożdżowy	<i>BioShop</i>
β -mercaptoetanol	<i>Sigma</i>

3.1.2. Bufory i roztwory

- Roztwory do izolacji plazmidów w małej skali

Roztwór ALM1 (500 ml)

50 mM dekstroza	4,5 g
10 mM EDTA	1,46 g
25 mM Tris	1,51 g

Dopełniono wodą do 500 ml.

Roztwór ALM2 (10 ml)

1% SDS	1 ml (10% SDS)
0,2 M NaOH	1 ml (2M NaOH)

Dopełniono wodą do 10 ml. Roztwór ALM2 sporządzano bezpośrednio przed użyciem.

- Bufor do rozdzielania elektroforetycznego kwasów nukleinowych

Bufor 10x (1000 ml)

0,89 M Tris	108 g
0,89 M kwas borowy	55 g
0,02 M EDTA	5,84 g

Dopełniono wodą do 1000 ml.

- Bufor do rozdzielania elektroforetycznego białek w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)

Bufor 10x (1000 ml)

0,25 M Tris	30,3 g
1,92 M glicyna	144,1 g
1% SDS	10 g

Dopełniono wodą do 1000 ml.

- Bufory obciążające

Bufor obciążający do rozdzielania elektroforetycznego kwasów nukleinowych

Bufor 6x (10 ml)	
10 mM Tris-HCl, pH 7,5	0,1 ml (1 M Tris)
50 mM EDTA	1 ml (0,5 M EDTA)
10% Ficoll400	1 g
0,25% błękit bromofenolowy	25 mg
0,25% cyjan ksylenu	25 mg

Dopełniono wodą do 10 ml.

Bufor obciążający do rozdzielania elektroforetycznego białek w warunkach denaturujących

Bufor 4x (10 ml)	
250 mM Tris-HCl, pH 6,8	2,5 ml (1 M Tris)
20% β -merkaptoetanol	2 ml
8% SDS	0,8 g
0,15% błękit bromofenolowy	15 mg
40% glicerol	4 ml

Dopełniono wodą do 10 ml.

- Bufor do lizy komórek bakteryjnych *E. coli*

Izolacja białek *OspC*

Do izolacji białek *OspC*_{N Δ 19} wykorzystywanych w celu badania oddziaływań z ligandami metodą MST wykorzystywano bufory na bazie roztworu Tris-HCl pH 7,5. W przypadku izolacji białek *OspC*_{N Δ 35-37} wykorzystywanych do badań strukturalnych dostosowywano pH roztworu Tris-HCl w zależności od właściwości danego białka (pI).

Bufor do lizy (1000 ml)

50 mM Tris-HCl	50 ml (1 M Tris-HCl)
500 mM NaCl	125 ml (4 M NaCl)
20 mM imidazol	10 ml (2 M imidazol)
1 mM TCEP	2 ml (0,5 M TCEP)

Dopełniono wodą do 1000 ml. Po zawieszeniu bakterii w buforze do lizy dodawano 1 µl nukleazy (250 U) oraz 0,2 mg/ml lizozymu.

Izolacja białek Iric 1, 2, 3 w warunkach natywnych

Bufor do lizy (1000 ml)

50 mM Tris-HCl	50 ml (1 M Tris-HCl)
1 M NaCl	250 ml (4 M NaCl)
20 mM imidazol	10 ml (2 M imidazol)

Dopełniono wodą do 1000 ml. Do przygotowanego buforu dodawano komercyjny inhibitor proteaz cOmplete ULTRA tablets, EDTA free (Roche), 1 tabletkę do 50 ml buforu. Następnie, po zawieszeniu bakterii w buforze do lizy, dodawano 1 µl nukleazy (250 U).

Izolacja białek Iric 1, 2, 3 w warunkach denaturujących

Bufor pluczący 1 (1000 ml)

50 mM Tris-HCl	50 ml (1 M Tris-HCl)
500 mM NaCl	125 ml (4 M NaCl)
1 M mocznik	125 ml (8 M mocznik)
1% Tween 20	1 ml
1 mM EDTA	2 ml (0,5 M EDTA)

Dopełniono wodą do 1000 ml.

Bufor pluczący 2 (1000 ml)

50 mM Tris-HCl	50 ml (1 M Tris-HCl)
500 mM NaCl	125 ml (4 M NaCl)

Dopełniono wodą do 1000 ml.

Bufor ekstrakcyjny (1000 ml)

50 mM Tris-HCl	50 ml (1 M Tris-HCl)
7,6 M mocznik	950 ml (8 M mocznik)
5 mM β -merkaptoetanol	0,350 ml (14,3 M β -merkaptoetanol)

Bufor dializacyjny 1 – renaturacja (1000 ml)

25 mM Tris-HCl	25 ml (1 M Tris-HCl)
100 mM NaCl	25 ml (4 M NaCl)
2,5% M glicerol	50 ml (50% glicerol)
1 mM TCEP	2 ml (0,5M TCEP)
0,5 mM EDTA	1 ml (0,5 M EDTA)

Dopełniono wodą do 1000 ml.

- Bufory stosowane w chromatografii powinowactwa białek do złoża z immobilizowanymi jonami niklu

Bufor płuczący w warunkach natywnych

Bufor płuczący (1000 ml)

50 mM Tris-HCl	50 ml (1 M Tris-HCl)
500 mM NaCl	125 ml (4 M NaCl)
20 mM imidazol	10 ml (2 M imidazol)

Dopełniono wodą do 1000 ml.

Bufor płuczący (1000 ml)

1x PBS	100 ml (10x PBS)
20 mM imidazol	10 ml (2 M imidazol)

Dopełniono wodą do 1000 ml.

Bufor płuczący w warunkach denaturujących

Bufor płuczący 3 (1000 ml)

50 mM Tris-HCl	50 ml (1 M Tris-HCl)
7 M mocznik	420,42 g
500 mM NaCl	125 ml (4 M NaCl)
20 mM imidazol	10 ml (2 M imidazol)
1 mM TCEP	2 ml (0,5M TCEP)

Dopełniono wodą do 1000 ml.

Bufor wmywający w warunkach natywnych

Bufor wmywający (1000 ml)

50 mM Tris-HCl	50 ml (1 M Tris-HCl)
500 mM NaCl	125 ml (4 M NaCl)
400 mM imidazol	200 ml (2 M imidazol)

Dopełniono wodą do 1000 ml.

Bufor wmywający (1000 ml)

1x PBS	100 ml (10x PBS)
400 mM imidazol	200 ml (2 M imidazol)

Dopełniono wodą do 1000 ml.

Bufor wmywający w warunkach denaturujących

Bufor wmywający (1000 ml)

50 mM Tris-HCl	50 ml (1 M Tris-HCl)
7 M mocznik	420,42 g
500 mM NaCl	125 ml (4 M NaCl)
400 mM imidazol	200 ml (2 M imidazol)
1 mM TCEP	2 ml (0,5M TCEP)

Dopełniono wodą do 1000 ml.

- Bufory dializacyjne

Bufor dializacyjny (1000 ml)

50 mM Tris-HCl	50 ml (1 M Tris-HCl)
500 mM NaCl	125 ml (4 M NaCl)

Dopełniono wodą do 1000 ml.

Bufor dializacyjny (1000 ml)

1x PBS	100 ml (10x PBS)
--------	------------------

Dopełniono wodą do 1000 ml.

Bufor dializacyjny 2 (1000 ml)

50 mM Tris-HCl	50 ml (1 M Tris-HCl)
200 mM NaCl	50 ml (4 M NaCl)
20 mM imidazol	10 ml (2 M imidazol)
5% glicerol	100 ml (50% glicerol)

Dopełniono wodą do 1000 ml.

- Bufor do sączenia molekularnego

Przed przystąpieniem do rozdzielania białek wszystkie bufor przefiltrowano wykorzystując filtr membranowy o średnicy porów 0,22 μm oraz odgazowano stosując zestaw do filtracji próżniowej.

W zależności od przeznaczenia oraz rodzaju białka stosowano odpowiednie pH roztworu Tris-HCl.

Bufor (1000 ml)

50 mM Tris-HCl	50 ml (1 M Tris-HCl)
150 mM NaCl	37,5 ml (4 M NaCl)

Dopełniono wodą do 1000 ml.

W przypadku białek wykorzystywanych do małokątowego rozpraszania promieni rentgenowskich (SAXS) rozdzielanie białek prowadzono w buforze fosforanowym (BioShop).

Bufor 1x PBS (1000 ml)

1x PBS	100 ml (10x PBS)
--------	------------------

Dopełniono wodą do 1000 ml.

- Bufor reakcyjny do termoforezy w skali mikro (MST)

Bufor reakcyjny (1000 ml)

50 mM Tris-HCl, pH 7,5	50 ml (1 M Tris-HCl)
------------------------	----------------------

150 mM NaCl	37,5 ml (4 M NaCl)
-------------	--------------------

10 mM MgCl ₂	10 ml (1 M MgCl ₂)
-------------------------	--------------------------------

0,05% Tween-20	0,5 ml
----------------	--------

Dopełniono wodą do 1000 ml.

3.1.3. Pożywki

Pożywka płynna LB-Lennox (1000 ml)

Bio-trypton	10 g
Wyciąg drożdżowy	5 g
NaCl	5 g

Dopełniono wodą do 1000 ml i sterylizowano w autoklawie. Do schłodzonej pożywki dodawano odpowiedni antybiotyk do stężenia końcowego 100 µg/ml.

Pożywka stała LB (1000 ml)

Bio-trypton	2,5 g
Wyciąg drożdżowy	1,25 g
NaCl	1,25 g
Agar	3,75 g

Dopełniono wodą do 250 ml i sterylizowano w autoklawie. Otrzymaną pożywkę schładzano do temperatury 60°C, dodawano odpowiedni antybiotyk do stężenia końcowego 100 µg/ml. Pożywkę z antybiotykiem wylewano na sterylne szalki i pozostawiano do zastygnięcia.

Pożywka płynna TB (1000 ml)

Bio-trypton	12 g
Wyciąg drożdżowy	24 g
100% Glicerol	4 ml
KH ₂ PO ₄	2,31 g
K ₂ HPO ₄	12,54 g

Dopełniono wodą do 1000 ml i sterylizowano w autoklawie. Do schłodzonej pożywki dodawano odpowiedni antybiotyk do stężenia końcowego 100 µg/ml.

Pożywka płynna SOC (100 ml)

Bio-trypton	2 g
Wyciąg drożdżowy	0,5 g
5 M NaCl	200 µl
2 M MgCl ₂ x 6H ₂ O	500 µl
20% Glukoza	2 ml

Dopełniono wodą do 100 ml. Sterylizowano przez filtrację – filtr strzykawkowy 0,22 µm Millex GP (Merck Millipore).

3.1.4. Żele

- 1% żel agarozowy do rozdziału elektroforetycznego w stałym polu elektrycznym

Składnik	g/50 ml buforu TBE (0,5x)
Agaroza	0,5

Podgrzano w kuchence mikrofalowej, następnie dodano 0,5 µl barwnika SimplySafe™ (EURx) służącego do barwienia kwasów nukleinowych.

- Żel poliakrylamidowy (PAA) do rozdziału elektroforetycznego w warunkach denaturujących

5% żel zagęszczający

Składniki	Stężenie wyjściowe	ml/8 ml	Stężenie końcowe
Tris, pH 6,8	1 M	1,0	0,125 M
akrylamid/bis-akrylamid	40%	1,0	5%
SDS	10%	0,08	0,1%
APS	10%	0,08	0,1%
TEMED	-	0,008	-
Woda	-	5,832	-

15% żel zagęszczający

Składniki	Stężenie wyjściowe	ml/8 ml	Stężenie końcowe
Tris, pH 8,8	1,5 M	5,0	0,42 M
akrylamid/bis-amid	40%	6,75	15%
SDS	10%	0,2	0,1%
APS	10%	0,2	0,1%
TEMED	-	0,012	-
Woda	-	5,832	-

3.1.5. Markery masy

Markery masy kwasów nukleinowych

Perfect™ Plus 1kb DNA Ladder (EURx)

GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher)

GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher)

Markery masy białek

Perfect™ Tricolor Protein Ladder (EURx)

3.1.6. Złoża/kolumny do chromatografii białek

Chromatografia powinowactwa białek do złoża z immobilizowanymi jonami niklu

Złoże z immobilizowanymi jonami niklu WorkBeads™ 40 Ni-NTA High Performance Agarose Beads (Bio-Works)

Kolumna do chromatografii cieczowej Luer lock, Non-jacket, bed volume 49 ml (Sigma)

Sączenie molekularne

Kolumna HiLoad™ 16/60 Superdex™ 75 prep grade (GE Healthcare)

Kolumna HiLoad™ 16/60 Superdex™ 200 prep grade (GE Healthcare)

3.1.7. Startery

Tabela 3.1. Stosowane startery

Nazwa startera	Sekwencja (5'-3')	T _m	Długość
<i>Startery wykorzystywane do kontroli poprawności konstruktów oraz sekwencjonowania</i>			
M13 5'	GTAAAACGACGGCCAGT	47,1°C	17 nt
M13 3'	CAGGAAACAGCTATGAC	44,6°C	17 nt
T7 5'	TAATACGACTCACTATAGGG	47,7°C	20 nt
T7 3'	TAGTTATTGCTCAGCGGTGG	51,8°C	20 nt
OspC 5'	TTTGGTCTCAAGGTATGAAAAAGAATACATTAAGTGC	60,0°C	37 nt
OspC 3'	ATCTGCAGTTAAGGTTTTTTTTGGACTTTCTGC	59,4°C	32 nt
<i>Startery wykorzystywane do niezależnego od ligacji klonowania (LIC) do wektorów z serii pMCSG*</i>			
BA.OspC_N37 5'	<u>TACTTCCAATCCAATGCC</u> AAAGGACCTAATCTTACA GAAATAAGCAAAAAAATTACA	66,1°C	57 nt
BA.OspC_N19 5'	<u>TACTTCCAATCCAATGCC</u> AAATAATTCAGGGAAAGGT GGGATATTG	67,2°C	46 nt
BA.OspC 3'	<u>TTATCCACTTCCAATGTTA</u> TTAAGGTTTTTTTTGGACT TTCTGCTACAACAG	65,4°C	51 nt
BB.OspC_N37 5'	<u>TACTTCCAATCCAATGCC</u> AAAGGGCCTAATCTTACA GAAATAAGTAAAAAAATTAC	66,1°C	56 nt
BB.OspC_N19 5'	<u>TACTTCCAATCCAATGCC</u> AAATAATTCAGGAAAAGAT GGGAATACATCTGCAA	67,0°C	52 nt
BB.OspC 3'	<u>TTATCCACTTCCAATGTTA</u> TTAAGGTTTTTTTTGGACT TTCTGCCACAACA	65,4°C	50 nt
BG.OspC_N35 5'	<u>TACTTCCAATCCAATGCC</u> AAAGGGCCTAATCTTACA GAAATAAGCAAAAAA	67,0°C	52 nt
BG.OspC_N19 5'	<u>TACTTCCAATCCAATGCC</u> AAATAATTCAGGTGGGGAT ACTGCATCTA	67,2°C	46 nt
BG.OspC 3'	<u>TTATCCACTTCCAATGTTA</u> TTAAGGTTTTTTTTGGACT TTCTGCCACAACA	65,4°C	50 nt
BG1.OspC_N35 5'	<u>TACTTCCAATCCAATGCC</u> AAAGGACCTGATCTTACA GTAATAAGCAAAAAAATTA	66,1°C	55 nt
BG1.OspC_N19 5'	<u>TACTTCCAATCCAATGCC</u> AAATAATTCAGGTGGAGAT TCTGCATCTACTAAT	67,0°C	51 nt

Nazwa startera	Sekwencja (5'-3')	T _m	Długość
BG1.OspC 3'	<u>TTATCCA</u> CTTCCAATGTTA TTAAGGTTTTTTTTGGATT TTCTGCCACAACAG	65,4°C	51 nt
BS.OspC_N36 5'	<u>TACTTCCA</u> ATCCAATGCC AAGGGACCTAATCTTGCA GAAATAAGTAAAAAATTA	66,1°C	55 nt
BS.OspC_N19 5'	<u>TACTTCCA</u> ATCCAATGCC AATAATTCAGGTGGGGAT TCTACATCTACTAA	67,0°C	50 nt
BS.OspC 3'	<u>TTATCCA</u> CTTCCAATGTTA TTAAGGTTTTTTTTGGACT TTCTGCCGCAA	65,4°C	48 nt

*startery do klonowania typu LIC zostały zaprojektowane przy użyciu narzędzia bioinformatycznego *Primer Desing* (https://bioinformatics.anl.gov/cgi-bin/tools/primer_design.pl).

Kolorem zielonym oznaczono sekwencje flankujące umożliwiające niezależne od ligacji klonowanie (LIC) do wektorów ekspresyjnych z serii pMCSG.

3.1.8. Plazmidy

Sekwencje kodujące białka OspC pochodzące z *B. afzelii*, *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* oraz *B. spielmanii* otrzymano dzięki uprzejmości dr hab. Beaty Wodeckiej, prof. US z Katedry Genetyki na Wydziale Biologii Uniwersytetu Szczecińskiego.

Wektory ekspresyjne pET200 umożliwiające produkcję białek OspC pochodzące z *B. afzelii*, *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* oraz *B. spielmanii* zostały utworzone w Zakładzie Biologii Molekularnej i Systemowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu przez dr hab. Annę Urbanowicz.

Wektory pET-39b(+) i pET-40b(+) umożliwiające produkcję homologów białek Salp15 (Iric1, Iric2 oraz Iric3) zostały utworzone w Pracowni Inżynierii Białek Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu przez dr hab. Annę Urbanowicz.

Wektory pMCSG9, pMCSG48 oraz pMCSG68 umożliwiające wydajną produkcję białek otrzymano z Midwest Center for Structural Genomics (Argonne National Laboratory, Lemont, USA).

Tabela 3.2. Stosowane plazmidy

Nazwa	Oporność na antybiotyki	Wybrane cechy
pCR [®] 2.1-TOPO [®] Vector (Invitrogen)	Kanamycyna	- wydajna i szybka ligacja dzięki topoiomerazie I związanej kowalencyjnie z końcem 3' wektora
pET200/D-TOPO (Invitrogen)	Kanamycyna	- wydajna i szybka ligacja dzięki topoiomerazie I związanej kowalencyjnie z końcem 3' wektora
pMCSG9 ¹	Ampicylina	- klonowanie niezależne od ligacji - rekombinowane białko zawiera dodatkowo na końcu aminowym znacznik histydynowy (6xHis), białko fuzyjne MPB oraz miejsce rozpoznawane przez proteazę TEV
pMCSG48 ¹	Ampicylina	- klonowanie niezależne od ligacji - rekombinowane białko zawiera dodatkowo na końcu aminowym znacznik histydynowy (8xHis), białko fuzyjne NusA oraz miejsce rozpoznawane przez proteazę TEV
pMCSG68 ¹	Ampicylina	- klonowanie niezależne od ligacji - rekombinowane białko zawiera dodatkowo na końcu aminowym znacznik histydynowy (6xHis) oraz miejsce rozpoznawane przez proteazę TEV
pET-39b(+)	Kanamycyna	- rekombinowane białko zawiera dodatkowo na końcu aminowym znacznik histydynowy (8xHis) oraz białko fuzyjne DsbA
pET-40b(+)	Kanamycyna	- rekombinowane białko zawiera dodatkowo na końcu aminowym znacznik histydynowy (8xHis) oraz białko fuzyjne DsbC

¹ wektory otrzymane z Midwest Center for Structural Genomics, Argonne National Laboratory, USA

3.1.9. Szczepy bakteryjne

- One Shot TOP10 *E. coli* (Invitrogen) – szczep wykorzystywano do klonowania cDNA oraz amplifikacji plazmidów
- One Shot BL21-Star (DE3) *E. coli* (Invitrogen) – szczep wykorzystywano do produkcji białka rekombinowanego

3.1.10. Enzymy

- Polimeraza ALLin™ Hot Start Taq Polymerase (highQu)
- Polimeraza Pfu ALLin™ HiFi DNA Polymerase (highQu)
- Polimeraza Taq DNA Polymerase (EURx)
- Polimeraza DNA T4 (NEB)
- Endonukleaza restrykcyjna SspI (EURx)
- Nukleaza OMNI Nuclease (EURx)
- Lizozym (BioShop)

3.1.11. Zestawy odczynników

- Plazmid Miniprep DNA Purification KIT (EURx) – zestaw do izolacji plazmidów bakteryjnych w małej skali
- PCR/DNA Clean-Up Purification Kit (EURx) – zestaw do oczyszczania DNA
- Monolith NT™ Protein Labeling Kit RED – MALEIMIDE oraz NHS (NanoTemper) – zestaw do znakowania białek barwnikami fluorescencyjnymi używanych w reakcji termoforezy w skali mikro
- Alkaline Phosphatase Substrate Kit (Bio-Rad) – zestaw do detekcji kolorymetrycznej alkalicznej fosfatazy w metodzie ELISA
- Zestawy buforów do krystalizacji białka (Crystallization Screens):
 - Index (Hampton Research)
 - Crystal Screen (Hampton Research)
 - PEG/Ion (Hampton Research)
 - PACT premier™ (Molecular Dimension)
 - JCSG-plus™ (Molecular Dimension)
 - ProPlex™ (Molecular Dimension)
 - MIDAS (Molecular Dimension)

3.2. Metody

3.2.1. Konstrukcja wektorów plazmidowych

3.2.1.1. Synteza cDNA metodą PCR do konstrukcji wektorów ekspresyjnych

Do przeprowadzenia wydajnej syntezy cDNA za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR), zastosowano polimerazę ALLin™ Hot Start Taq Polymerase lub ALLin™ HiFi DNA Polymerase – na bazie polimerazy Pfu (highQu). Do reakcji przygotowano również odpowiednie startery (Rozdział 3.1.7) zawierające sekwencje flankujące, komplementarne do wektorów z grupy pMCSG, co umożliwiło wykonanie niezależnego od ligacji klonowania (LIC). Matrycę stanowiły otrzymane wcześniej w IChB PAN plazmidy: pET200-BA.OspC, pET200-BB.OspC, pET200-BG.OspC, pET200-BG1.OspC oraz pCR™2.1-TOPO®-BS.OspC kodujące pełnej długości białko OspC pochodzące z różnych gatunków *Borrelia*. Schemat przygotowania mieszaniny reakcyjnej oraz warunki reakcji PCR dla wyżej wymienionych polimeraz przedstawiono w poniższych tabelach. Po reakcji PCR otrzymane preparaty cDNA oczyszczono przy użyciu komercyjnego zestawu PCR/DNA Clean-Up Purification Kit (EURx), zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta lub przy użyciu metody fenol-chloroform (Rozdział 3.2.1.2). Następnie mierzono stężenie preparatu metodą pomiaru absorpcji światła o długości fali $\lambda=260$ nm, wykorzystując spektrofotometr NanoPhotometer® N60 (Implen) oraz przeprowadzono rozdział elektroforetyczny w 1% żelu agarozowym (Rozdział 3.2.13) w celu oceny jakości otrzymanego cDNA.

Reakcja PCR z wykorzystaniem polimerazy ALLin™ Hot Start Taq Polymerase (highQu)

Tabela 3.3. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR- ALLin™ Hot Start Taq Polymerase

Odczynnik	Ilość
Matryca	50 ng
Starter 5'	0,1 µM
Starter 3'	0,1 µM
5x ALLin™ PCR Buffer	10 µl
Polimeraza ALLin™ Hot Star Taq (5 U/µl)	0,25 µl
H ₂ O	do 50 µl

Tabela 3.4. Warunki reakcji PCR- ALLin™ Hot Start Taq Polymerase

Etapy	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Wstępna denaturacja	95°C	2 min.	1
Denaturacja	95°C	15 sek.	
Hybrydyzacja	58-68°C*	15 sek.	40
Elongacja	72°C	10 sek.	
Elongacja**	72°C	7 min.	1

*po wykonaniu reakcji PCR z gradientowym rozkładem temperatur etapu przyłączania starterów (hybrydyzacji), jako optymalną wybrano temperaturę 62°C

**dodatkowy etap elongacji wprowadzono w przypadku przygotowywania insertu do klonowania TOPO TA (Rozdział 3.2.1.6)

Reakcja PCR z wykorzystaniem polimerazy ALLin™ HiFi DNA Polymerase (highQu)

Tabela 3.5. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR-ALLin™ HiFi DNA Polymerase

Odczynnik	Ilość
Matryca	50 ng
Starter 5'	0,1 µM
Starter 3'	0,1 µM
5x ALLin™HiFi Buffer	10 µl
Polimeraza ALLin™HiFi (2 U/µl)	0,5 µl
H ₂ O	do 50 µl

Tabela 3.6. Warunki reakcji PCR-ALLin™ HiFi DNA Polymerase

Etapy	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Wstępna denaturacja	95°C	1 min.	1
Denaturacja	95°C	15 sek.	
Hybrydyzacja	62°C	15 sek.	35
Elongacja	72°C	15 sek.	

3.2.1.2. Oczyszczanie DNA metodą fenol-chloroform

Oczyszczanie dsDNA uzyskanego w wyniku reakcji PCR przeprowadzono przy użyciu komercyjnego zestawu PCR/DNA Clean-Up Purification Kit (EURx), zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta lub za pomocą metody fenol-chloroform. Schemat tej metody przedstawiono poniżej. Po zakończeniu procedury stężenie oczyszczonego DNA oraz jakość preparatu oceniono poprzez pomiar absorpcji światła o długości fali $\lambda=260$ nm, wykorzystując spektrofotometr NanoPhotometer[®] N60 (Implen).

- 1) Mieszaninę reakcyjną dopełniono wodą do 100 μ l.
- 2) Dodano 50 μ l fenolu i 50 μ l chloroformu, wytrząsano i wirowano z prędkością 14 000 rpm przez 2 minuty.
- 3) Górną fazę przeniesiono do nowej probówki i dodano 100 μ l chloroformu, wytrząsano i wirowano z prędkością 14 000 rpm przez 2 minuty (czynność powtórzono dwukrotnie).
- 4) Górną fazę przeniesiono do nowej probówki i wytrącono z niej DNA poprzez dodanie: 0,1 objętości 3 M octanu sodu o pH 5,0 i 3 objętości 96% etanolu. Próbkę inkubowano przez godzinę w 4°C.
- 5) Mieszaninę wirowano z prędkością 14 000 rpm w 4°C przez 30 minut.
- 6) Roztwór dekantowano, a osad przemywano 1 ml 70% etanolu.
- 7) Wirowano z prędkością 14 000 rpm w 4°C przez 5 minut.
- 8) Roztwór dekantowano, a zawierający DNA osad suszono.
- 9) Osad rozpuszczano w wodzie.
- 10) Mierzono stężenie produktu.
- 11) Przeprowadzono rozdział elektroforetyczny w 1% żelu agarozowym.
- 12) Produkt przechowywano w -20°C.

3.2.1.3. Amplifikacja wektorów ekspresyjnych z serii pMCSG48

Wektory z serii pMCSG48 powielano poprzez namnażanie komórek bakteryjnych zawierających odpowiedni plazmid (pMCSG), hodowanych w płynnej pożywce LB z dodatkiem antybiotyku selekcyjnego. Schemat postępowania przedstawiono poniżej.

- 1) Transformacja szczepu bakteryjnego One Shot™ TOP10 Chemically Competent *E. coli* wektorem z serii pMCSG (Rozdział 3.2.2).
- 2) Izolacja plazmidowego DNA w małej skali przy użyciu komercyjnego zestawu Plasmid Miniprep DNA Purification Kit (EURx), zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta lub przy użyciu metody lizy alkalicznej (Rozdział 3.2.3).
- 3) Ocena stężenia preparatu poprzez pomiar absorpcji światła o długości fali $\lambda=260$ nm, wykorzystując spektrofotometr NanoPhotometer® N60 (Implen).
- 4) Trawienie wektora endonukleazą restrykcyjną SspI w celu uzyskania liniowej formy wektora pMCSG i umożliwienia dalszej procedury klonowania (Rozdział 3.2.1.4).

3.2.1.4. Trawienie enzymatyczne wektorów ekspresyjnych z serii pMCSG endonukleazą restrykcyjną SspI

Do amplifikacji wektorów z serii pMCSG48 wykorzystano naturalną zdolność bakterii One Shot™ TOP10 Chemically Competent *E. coli* do namnażania się w odpowiednich warunkach hodowlanych. W ramach tej procedury dodatkowo przeprowadzono trawienie endonukleazą restrykcyjną SspI (EURx) w celu przekształcenia wektorów z serii pMCSG w formę liniową. Trawieniu enzymatycznemu poddano 1 μ g oczyszczonego plazmidu pMCSG48. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz schemat reakcji przedstawiono poniżej.

Tabela 3.7. Skład mieszaniny reakcyjnej trawienia endonukleazą SspI

Odczynnik	Ilość
Wektor pMCSG	1 µg
10x ONE Buffer	5 µl
100x BSA with Triton X-100	0,5 µl
SspI (10 U/µl)	1 U/µg DNA
H ₂ O	do 50 µl

- 1) Przygotowano mieszaninę reakcyjną według schematu przedstawionego w Tabeli 3.7.
- 2) Mieszaninę reakcyjną inkubowano w 37°C przez 1 godzinę.
- 3) Następnie inaktywowano enzym w 65°C przez 20 minut.

Po przeprowadzeniu reakcji trawienia enzymatycznego próby zostały oczyszczone przy użyciu komercyjnego zestawu PCR/DNA Clean-Up Purification Kit (EURx), zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. Stężenie oczyszczonego DNA oraz jakość preparatu oceniano poprzez pomiar absorpcji światła o długości fali $\lambda=260$ nm wykorzystując spektrofotometr NanoPhotometer[®] N60 (Implen).

3.2.1.5. Niezależne od ligacji klonowanie do wektorów ekspresyjnych z serii pMCSG

Niezależne od ligacji klonowanie (LIC) umożliwia efektywne i szybkie wprowadzanie fragmentu DNA kodującego białko (insert) do wektora z serii pMCSG. Aby uzyskać „lepkie” końce zarówno w wektorach jak i insertach, wytrawiano końce z użyciem polimerazy DNA T4 w obecności dGTP (dla wektora) i dCTP (dla insertu) według schematu przedstawionego w Tabeli 3.8. Do przygotowania mieszaniny reakcyjnej posłużono się poniższym wzorem na podstawie, którego obliczono ilość wektora oraz insertu. Stosunek wektora do insertu wynosił 1:3.

$$insert[ng] = \frac{wektor[ng] \times insert[kpz]}{wektor[kpz]} \times stosunek\ molowy \frac{insert}{wektor}$$

Tabela 3.8. Skład mieszanin reakcyjnych do tworzenia jednoniciowych końców dsDNA za pomocą polimerazy T4

Mieszanina reakcyjna dla wektora	Ilość	Mieszanina reakcyjna dla insertu	Ilość
Matryca DNA – wektor	X*	Matryca DNA – insert	X*
dGTP (C _p = 100 mM, C _k = 5 mM)	0,75 µl	dCTP (C _p = 100 mM, C _k = 5 mM)	0,75 µl
BSA 100x	0,15 µl	BSA (100x)	0,15 µl
DTT (C _p = 40 mM, C _k = 4 mM)	1,5 µl	DTT (C _p = 40 mM, C _k = 4 mM)	1,5 µl
Bufor NEB2 10x (NEB)	1,5 µl	Bufor NEB2 10x (NEB)	1,5 µl
Polimeraza DNA T4 (NEB)	0,15 µl	Polimeraza DNA T4 (NEB)	0,15 µl
H ₂ O	do 15 µl	H ₂ O	do 15 µl

*około 40-50 ng insertu oraz 150 ng wektora

- 1) Przygotowane mieszaniny inkubowano w 22°C przez 40 minut, następnie inaktywowano enzym (polimeraza DNA T4) w 75°C przez 20 minut.
- 2) Dodano 5 µl mieszaniny zawierającej wektor do 15 µl mieszaniny zawierającej insert, następnie inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej.
- 3) Dodano 5 µl 25 mM EDTA i inkubowano kolejne 5 minut w temperaturze pokojowej.
- 4) Używano 5 µl mieszaniny do transformacji komórek bakteryjnych One Shot™ TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Rozdział 3.2.2)

3.2.1.6. Ligacja do wektora pCR®2.1-TOPO®

W celu uzyskania konstruktów na bazie plazmidów pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen) przeprowadzono reakcję ligacji wektora i cDNA zgodnie z protokołem producenta (TOPO TA Cloning - Invitrogen). W pierwszym etapie przeprowadzono reakcję PCR na matrycy cDNA (insertu) z użyciem polimerazy ALLin™ Hot Start Taq Polymerase (Tabela 3.3 oraz Tabela 3.4). Wykorzystano naturalną zdolność polimerazy Taq do dodawania pojedynczej reszty adeninowej na 3' końcu, dlatego należało wprowadzić dodatkowy etap elongacji (**Tabela 3.4). Obecność adeniny na 3' końcu insertu jest kluczowa dla przeprowadzenia skutecznej i szybkiej ligacji do wektora pCR®2.1-TOPO®, który zawiera pojedyncze reszty tyminy na 3' końcu. Mieszaninę wektora i insertu przygotowano w stosunku molowym 3:1. Inkubowano przez 5 minut w 22°C, a następnie 5 µl tej mieszaniny zastosowano do transformacji komórek bakteryjnych One Shot™ TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Rozdział 3.2.2).

3.2.2. Transformacja szczepu bakteryjnego One Shot TOP10 *E. coli* oraz BL21

Star™ (DE3) *E. coli*

- 1) Rozmrożono odpowiednie komórki bakteryjne na lodzie.
 - 2) Do 50 μ l komórek bakteryjnych dodano 5 μ l materiału DNA i delikatnie wymieszano.
 - 3) Inkubowano zawiesinę bakteryjną 30 minut w 4°C.
 - 4) Bakterie poddano szokowi termicznemu poprzez inkubację w 42°C przez 30 sekund, a następnie inkubowano w 4°C przez 2 minuty.
 - 5) W aseptycznych warunkach dodano do zawiesiny 250 μ l medium SOC (Rozdział 3.1.3).
 - 6) Bakterie wytrząsano przez 1 godzinę w 37°C z prędkością 225 rpm w pozycji horyzontalnej.
 - 7) Bakterie rozprowadzono na szalkach ze stałą pożywką LB z odpowiednim antybiotykiem*.
- *ampicylina o końcowym stężeniu 100 μ g/ml lub kanamycyna o końcowym stężeniu 50 μ g/ml
- 8) Szalki inkubowano przez 12-16 godzin w 37°C.

3.2.3. Izolacja plazmidów w małej skali metodą lizy alkalicznej

Izolację plazmidów w małej skali przeprowadzono za pomocą komercyjnego zestawu Plasmid Miniprep DNA Purification Kit (EURx) zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. Alternatywnie stosowano metodę lizy alkalicznej, której schemat przedstawiono poniżej. Po wykonaniu izolacji plazmidów metodą lizy alkalicznej, uzyskany preparat DNA oczyszczono przy użyciu metody fenol-chloroform (Rozdział 3.2.1.2) celem uzyskania preparatu o najwyższej jakości. Stężenie oraz jakość DNA plazmidowego określano poprzez pomiar absorpcji światła o długości fali $\lambda=260$ nm, wykorzystując spektrofotometr NanoPhotometer® N60 (Implen).

- 1) Pojedyncze kolonie bakterii wyhodowane na stałej pożywce LB z antybiotykiem* przeniesiono do 2 ml płynnej pożywki LB.
*ampicylina o końcowym stężeniu 100 µg/ml lub kanamycyna o końcowym stężeniu 50 µg/ml
- 2) Zawiesiny bakterii wytrząsano przez 12-16 godzin w 37°C z prędkością 300 rpm.
- 3) Pobrano 1,5 ml każdej hodowli i wirowano 1 minutę z prędkością 14 000 rpm.
- 4) Roztwór dekantowano, a osad zawierający bakterie zawieszono w 100 µl roztworu ALM1 (Rozdział 3.1.2).
- 5) Dodano 200 µl świeżo przygotowanego roztworu ALM2 (Rozdział 3.1.2), delikatnie mieszano i inkubowano 5 minut w 4°C.
- 6) Dodano 150 µl 7,5 M roztworu CH₃COONH₄ (Rozdział 3.1.2), intensywnie mieszano i inkubowano 20 minut w 4°C.
- 7) Wirowano 15 minut w temperaturze pokojowej z prędkością 14 000 rpm.
- 8) Supernatant przeniesiono do nowych probówek i dodano 1 ml 96% etanolu.
- 9) Inkubowano 20 minut w 4°C.
- 10) Wirowano 15 minut w 4°C z prędkością 14 000 rpm.
- 11) Roztwór dekantowano, a osad przemyto 1 ml 70% etanolu.
- 12) Wirowano 5 minut w 4°C z prędkością 14 000 rpm.
- 13) Roztwór dekantowano, a zawierający DNA osad suszono w temperaturze pokojowej przez 10 minut.
- 14) Osad zawieszono w 50 µl wodnego roztworu RNazy o stężeniu końcowym 0,1 µg/µl.
- 15) Mierzono stężenie produktu.
- 16) Produkt przechowywano w -20°C.

3.2.4. Analiza jakości konstruktów DNA z wykorzystaniem reakcji PCR

Obecność prawidłowego insertu w utworzonych konstruktach na bazie wektorów pCR[®]2.1-TOPO[®] oraz pMCSG wstępnie weryfikowano za pomocą reakcji PCR z użyciem polimerazy Taq DNA Polymerase (EurX). Do reakcji PCR zastosowano parę starterów T7 lub parę starterów komplementarnych do sekwencji kodującej białko OspC (Tabela 3.1). Pojedyncze kolonie bakterii, które wyrosły na stałej pożywce LB zawierającej odpowiedni antybiotyk, zostały pobrane i zawieszono w 25 µl wody. Przygotowaną zawiesinę denaturowano w 98°C przez 10 minut. Następnie próbki wirowano w 4°C przez 10 minut z maksymalną prędkością. Uzyskany supernatant wykorzystano jako matrycę DNA do reakcji PCR, którą przeprowadzono zgodnie z parametrami opisanymi w Tabeli 3.9 i Tabeli 3.10:

Tabela 3.9. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR-Taq DNA Polymerase (EurX)

Odczynnik	Ilość
Matryca DNA	1 µl
Starter 5'	0,1 µM
Starter 3'	0,1 µM
Mieszanina dNTP (C _p = 2,5 mM, C _k = 0,2 mM)	2 µl
MgCl ₂ (C _p = 25 mM, C _k = 1,5 mM)	1,5 µl
Pol Bufor C* (10x)	2,5 µl
Polimeraza Taq (5 U/µl)	0,25 µl
H ₂ O	do 25 µl

*Do analizy poprawności uzyskanych konstruktów wykorzystano komercyjny bufor C umożliwiający bezpośrednią analizę prób na żelu agarozowym.

Tabela 3.10. Warunki reakcji PCR-Taq DNA Polymerase (EurX)

Etapy	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Wstępna denaturacja	95°C	5 min.	1
Denaturacja	95°C	30 sek.	
Hybrydyzacja	62°C	30 sek.	30
Elongacja	72°C	10 sek.	

Produkty reakcji PCR analizowano za pomocą elektroforezy w 1% żelu agarozowym (Rozdział 3.2.13). W kolejnym etapie wybrano potencjalne kolonie zawierające insert, a następnie przeprowadzono hodowlę bakterii w małej skali. Z komórek bakteryjnych wyizolowano i oczyszczono plazmidowe DNA (Rozdział 3.2.3).

3.2.5. Analiza jakości konstruktów DNA metodą sekwencjonowania

W celu weryfikacji poprawności sekwencji nukleotydowych utworzonych konstruktów zlecono firmie Genomed przeprowadzenie reakcji sekwencjonowania wybranych prób. W ramach przygotowań do sekwencjonowania wyizolowano i oczyszczono plazmidowe DNA (Rozdział 3.2.3) z wybranych kolonii oraz przygotowano odpowiednie stężenia DNA (około 50 ng/μl). Preparaty, które spełniały kryteria jakościowe oraz ilościowe, zostały przekazane firmie Genomed celem realizacji procesu sekwencjonowania. Otrzymane wyniki sekwencjonowania poddano analizie za pomocą programu BioEdit Sequence Alignment Editor.

3.2.6. Otrzymywanie białek

3.2.6.1. Przygotowanie ekspresyjnych szczepów bakteryjnych

Komórki bakteryjne używane do produkcji rekombinowanych białek przygotowano z wykorzystaniem szczepów BL21 Star™ (DE3) *E. coli* (Rozdział 3.1.9). Bakterie te zostały poddane transformacji metodą szoku termicznego (Rozdział 3.2.2). Wybrano pojedynczą kolonię bakteryjną i zaszczepiono 10 ml płynnej pożywki LB z odpowiednim antybiotykiem. Bakterie inkubowano przez 16 godzin w 37°C przy prędkości wytrząsania 225 rpm, co pozwoliło uzyskać zawiesinę bakterii w stacjonarnej fazie wzrostu. Otrzymaną zawiesinę wykorzystano do zaszczepienia świeżej pożywki LB z antybiotykiem, w której prowadzono produkcję białka heterologicznego.

W celu przygotowania stoków bakteryjnych, z hodowli znajdującej się w fazie logarytmicznego wzrostu (wartość OD₆₀₀ wynosząca 0,6-0,8), pobrano 1 ml zawiesiny bakteryjnej. Do tej zawiesiny dodawano 1 ml 50% roztworu glicerolu, delikatnie mieszano, zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C. Aby wznowić hodowlę bakterii, zaszczepiano płynną pożywkę LB z antybiotykiem niewielką ilością zamrożonego preparatu (stoku bakteryjnego). Następnie bakterie inkubowano przez 16 godzin w 37°C, przy prędkości wytrząsania 225 rpm, otrzymując zawiesinę bakterii w stacjonarnej fazie wzrostu.

3.2.6.2. Produkcja białka w bakterjach One Shot BL21 Star (DE3) *E. coli* w małej skali

W pierwszym etapie produkcji białka heterologicznego przeprowadzano hodowlę bakterii One Shot BL21 Star (DE3) *E. coli* (Rozdział 3.1.9) w małej skali celem monitorowania dynamiki nadprodukcji białka w czasie. Ekspresję genów odpowiedzialnych za produkcję określonych białek indukowano przez dodanie roztworu izopropylu- β -D-tiogalaktopiranozydu (IPTG) do stężenia końcowego 0,5 mM. Dodatkowo przeprowadzono analizę rozpuszczalności białek, aby ocenić czy białko nie ulega nadprodukcji w ciałkach inkluzyjnych (frakcja nierozpuszczalna). W celu zminimalizowania tego zjawiska, hodowlę bakterii prowadzono również w temperaturze 18°C przez noc. Obniżenie temperatury hodowli miało miejsce dopiero po osiągnięciu przez bakterie fazy logarytmicznego wzrostu (wartość OD₆₀₀ w przedziale 0,6-0,8). Poniżej przedstawiono schemat przeprowadzonej hodowli.

- 1) Pobrano 200 μ l hodowli bakteryjnej i przeniesiono do 20 ml płynnej pożywki LB z ampicyliną o końcowym stężeniu 0,1 mg/ml.
- 2) Wytrząsano zawiesinę bakteryjną w temperaturze 37°C z prędkością 225 rpm do momentu uzyskania wartości absorbancji OD₆₀₀ w przedziale 0,6-0,8.
- 3) Po uzyskaniu odpowiedniego OD₆₀₀, pobrano 1 ml hodowli oznaczonej jako próba kontrolna (próba 0).
- 4) Rozdzielono pozostałą ilość hodowli do 2 kolb po 8 ml. Do jednej z hodowli dodano IPTG (indukowana) o stężeniu końcowym 0,5 mM, a druga hodowla stanowiła próbę kontrolną (nieindukowana).
- 5) Inkubowano hodowle bakteryjne przez 4 godziny w 37°C. W trakcie inkubacji co 1 godzinę pobierano próby (1h, 2h, 3h, 4h).
- 6) Po upływie 4 godzin z każdej hodowli pobrano dwie próby po 1 ml do analizy rozpuszczalności białek.

3.2.6.3. Analiza rozpuszczalności białek produkowanych w bakterjach One Shot BL21 Star (DE3) *E. coli*

- 1) Osad bakteryjny otrzymany z 1 ml hodowli zawieszano w 150 μ l buforu do lizy bakterii (Rozdział 3.1.2) poprzez wytrząsanie 10 minut w temperaturze pokojowej z prędkością 350 rpm.
- 2) Wirowano 5 minut w temperaturze pokojowej z prędkością 14 000 rpm.

- 3) Do 75 μ l supernatantu zawierającego rozpuszczalną frakcję białka dodano 25 μ l buforu obciążającego do rozdzału elektroforetycznego białek (Rozdział 3.1.2).
- 4) Do osadu zawierającego nierozpuszczalną frakcję białka dodano 75 μ l H₂O i 25 μ l buforu obciążającego do rozdzału elektroforetycznego białek (Rozdział 3.1.2).
- 5) Próby denaturowano w 95°C przez 5 minut.
- 6) Próby poddano analizie w 15% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (Rozdział 3.2.14).

3.2.6.4. Produkcja białka w bakterjach One Shot BL21 Star (DE3) *E. coli* w dużej skali

- 1) Zaszczepiono 100 ml płynnej pożywki LB z ampicyliną o końcowym stężeniu 0,1 mg/ml stokiem bakteryjnym.
- 2) Bakterie hodowano 12-16 godzin w 37°C wytrząsając z prędkością 225 rpm.
- 3) Zaszczepiono hodowlą bakteryjną 1 litr świeżej pożywki LB z ampicyliną o końcowym stężeniu 0,1 mg/ml.
- 4) Bakterie hodowano w 37°C wytrząsając z prędkością 225 rpm, do momentu uzyskania wartości absorbancji OD₆₀₀ w przedziale 0,6-0,8.
- 5) Do 1 litra hodowli bakteryjnej dodano 0,5 ml IPTG o stężeniu końcowym 0,5 mM. i prowadzono hodowlę 16 godzin w 18°C przy prędkości wytrząsania 200 rpm.
- 6) Hodowlę bakteryjną wirowano 6 minut w 4°C z prędkością 6000 rpm.
- 7) Pożywkę dekantowano, a uzyskany osad bakteryjny zamrożono i przechowywano w -20°C.

3.2.6.5. Izolacja i oczyszczanie białek w warunkach natywnych

Etap 1: Chromatografia powinowactwa do złoża immobilizowanymi jonami niklu INiAC

Warunkiem zastosowania tego typu chromatografii było zaprojektowanie konstruktów genetycznych na bazie wektorów pMCSG, który umożliwia syntezę białek wyposażonych w znacznik histydynowy. Znacznik ten wykazuje wysokie powinowactwo do złoża z immobilizowanymi jonami niklu. Zastosowana metoda pozwoliła na efektywne otrzymanie preparatów białkowych, dlatego została wprowadzona jako standardowa procedura oczyszczania białek.

- 1) Uzyskany osad bakteryjny (Rozdział 3.2.6.4) zawieszono w 35 ml buforu do lizy (Rozdział 3.1.2).
- 2) Do preparatu dodano 0,5 ml lizozymu o stężeniu 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, a następnie inkubowano 15 minut w 4°C.
- 3) Preparat sonikowano w cyklach 2 sekundy sonikacji / 12 sekund przerwy przez 4 minuty i 30 sekund przy amplitudzie drgań 70% w 4°C.
- 4) Wirowano 30 minut w 4°C z prędkością 16 000 rpm.
- 5) Supernatant nanoszono na 7,5 ml złoża WorkBeads™ 40 Ni-NTA (Bio-Works), umieszczonego w kolumnie o średnicy 3 cm i zrównoważonego wcześniej odpowiednim buforem płuczającym (Rozdział 3.1.2).
- 6) Białko związane ze złożem przemywano pięciokrotnie 50 ml buforu płuczającego (Rozdział 3.1.2).
- 7) Oczyszczone białko eluowano grawitacyjnie w 20 ml buforu wymywającego zawierającego 400 mM imidazolu (Rozdział 3.1.2).
- 8) Analizowano frakcje po elucji metodą rozdzielania elektroforetycznego w 15% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (Rozdział 3.2.14).

Etap 2: Usuwanie partnera fuzyjnego

- 1) Do 20 ml roztworu białka fuzyjnego uzyskanego po chromatografii powinowactwa dodano 2 mg proteazy TEV w celu oddzielenia właściwego białka od partnera fuzyjnego.
- 2) Roztwór białka fuzyjnego w obecności proteazy TEV umieszczono w worku dializacyjnym SnakeSkin™ Dialysis Tubing o punkcie odcięcia (MWCO, ang. *molecular weight cut-off*) 3 500 lub 10 000 Da.
- 3) Dializę prowadzono w buforze niezawierającym imidazolu, a objętość buforu dializacyjnego ustalano tak, aby stężenie końcowe imidazolu wynosiło 20 mM.
- 4) Dializę prowadzono przez noc w 4°C.
- 5) Następnie preparat nakładano ponownie na zrównoważone złożo WorkBeads™ 40 Ni-NTA (Bio-Works) w celu usunięcia z roztworu proteazy TEV oraz partnera fuzyjnego.
- 6) Oczyszczone białko zebrano grawitacyjnie do nowej probówki.
- 7) Analizowano jakość uzyskanego preparatu metodą rozdzielania elektroforetycznego w 15% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (Rozdział 3.2.14).

Etap 3: Sączenie molekularne

Preparat zawierający oczyszczone białko został zagęszczony do objętości 5 ml poprzez ultrafiltrację z zastosowaniem filtra Amicon Ultra-15 (Merck Millipore) o punkcie odcięcia 3 000 lub 10 000 Da (4000 x g, 4°C). Zagęszczony preparat poddano dalszej analizie poprzez chromatografię żelową na kolumnach HiLoad 16/60 Superdex™ 75 lub HiLoad 16/60 Superdex™ 200, które były wcześniej zrównoważone odpowiednim buforem (Rozdział 3.1.2). Rozdział prowadzono w warunkach natywnych w temperaturze 4°C, za pomocą systemu ÄKTAprime Plus. Zebrane frakcje poddano analizie przy użyciu elektroforezy w 15% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (Rozdział 3.2.14).

3.2.6.6. Izolacja i oczyszczanie białek w warunkach denaturujących

Izolacja białka w warunkach denaturujących została wdrożona jako uzupełniająca metoda, wspierająca standardową procedurę izolacji i oczyszczania białka opisaną w Rozdziale 3.2.6.5. Metoda ta została zastosowana, gdy synteza białka była mniej wydajna, a podczas nadekspresji i produkcji białka w systemie heterologicznym, część białka pozostawała we frakcji nierozpuszczalnej, tworząc ciała inkluzyjne, na przykład w przypadku białek Iric.

Etap 1: Chromatografia powinowactwa do złoża immobilizowanymi jonami niklu INiAC

Pierwsze etapy izolacji białka w warunkach denaturujących pokrywają się z izolacją białek w warunkach natywnych.

- 1) Uzyskany osad bakteryjny (Rozdział 3.2.6.4) zawieszono w 35 ml buforu do lizy (Rozdział 3.1.2).
- 2) Do preparatu dodano 0,5 ml lizozymu o stężeniu 10 µg/µl, a następnie inkubowano 15 minut w 4°C.
- 3) Preparat sonikowano w cyklach 2 sekundy sonikacji / 12 sekund przerwy przez 4 minuty i 30 sekund przy amplitudzie drgań 70% w 4°C.
- 4) Wirowano 30 minut w 4°C z prędkością 16 000 rpm.
- 5) Na tym etapie supernatant wykorzystano zgodnie z procedurą standardową (Rozdział 3.2.6.5, punkt 5), natomiast osad pozostały po wirowaniu (punkt 4) posłużył do dalszych etapów tej procedury.

- 6) Osad poddano płukaniu buforem płuczącym 1 (Rozdział 3.1.2), dokładnie zawieszano osad w tym buforze, a następnie wirowano 30 minut w 4°C z prędkością 16 000 rpm.
- 7) Roztwór dekantowano, a osad ponownie poddano płukaniu buforem płuczącym 2 (Rozdział 3.1.2), dokładnie zawieszano osad w tym buforze, a następnie wirowano 30 minut w 4°C z prędkością 16 000 rpm.
- 8) Roztwór ponownie dekantowano, a pozostały osad rozpuszczano w buforze ekstrakcyjnym poprzez delikatne mieszanie i inkubację w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę.
- 9) Wirowano 30 minut w 4°C z prędkością 16 000 rpm.
- 10) Supernatant наносono na 7,5 ml złoża WorkBeads™ 40 Ni-NTA (Bio-Works), umieszczonego w kolumnie o średnicy 3 cm i zrównoważonego wcześniej buforem płuczącym 3 (Rozdział 3.1.2).
- 11) Białko związane ze złożem przemywano pięciokrotnie 50 ml buforu płuczącego 3 (Rozdział 3.1.2).
- 12) Oczyszczone białko eluowano grawitacyjnie w 20 ml buforu wymywającego zawierającego 400 mM imidazolu (Rozdział 3.1.2).
- 13) Analizowano frakcje po elucji metodą rozdzielania elektroforetycznego w 15% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (Rozdział 3.2.14).

Etap 2: Renaturacja białka oraz usuwanie partnera fuzyjnego

- 1) Roztwór białka fuzyjnego umieszczono w worku dializacyjnym SnakeSkin™ Dialysis Tubing o punkcie odcięcia (MWCO, ang. *molecular weight cut-off*) 3 500 lub 10 000 Da.
- 2) Dializę prowadzono w buforze (bufor dializacyjny 1) o końcowym stężeniu mocznika 4M w celu obniżenia stężenia mocznika oraz zainicjowania procesu renaturacji białka i przywrócenia jego natywnej struktury. Dializę prowadzono w 4°C przez 2 godziny.
- 3) Następnie do roztworu białka fuzyjnego dodano 2 mg proteazy TEV w celu oddzielenia właściwego białka od partnera fuzyjnego.
- 4) Roztwór białka fuzyjnego w obecności proteazy TEV ponownie umieszczono w worku dializacyjnym SnakeSkin™ Dialysis Tubing o punkcie odcięcia (MWCO, ang. *molecular weight cut-off*) 3 500 lub 10 000 Da.

- 5) Dializę prowadzono w buforze (bufor dializacyjny 2) niezawierającym mocznika, o stężeniu końcowym imidazolu 20 mM.
- 6) Dializę prowadzono przez noc w 4°C.
Kolejne etapy oczyszczania prowadzono w warunkach natywnych z użyciem buforów dedykowanych tym warunkom
- 7) Następnie preparat nakładano ponownie na zrównoważone złożo WorkBeads™ 40 Ni-NTA (Bio-Works) w celu usunięcia z roztworu proteazy TEV oraz partnera fuzyjnego.
- 8) Oczyszczone białko zebrano grawitacyjnie do nowej probówki.
- 9) Analizowano jakość uzyskanego preparatu metodą rozdzału elektroforetycznego w 15% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (Rozdział 3.2.14).

Etap 3: Sączenie molekularne – prowadzono analogicznie jak opisano w Rozdziale 3.2.6.5.

3.2.7. Przygotowanie fibrynogenu pełnej długości oraz fragmentów E i D

Białko fibrynogen oraz jego fragmenty, tj. domena E i D, zostały zakupione w formie komercyjnie dostępnych preparatów od firmy Sigma Aldrich. Ze względu na zliofilizowaną postać białek, konieczne było ich rozpuszczenie w odpowiednich buforach, zgodnie z poniższymi wytycznymi:

- 1) *Fibrynogen pełnej długości*: Graniczne stężenie umożliwiające uzyskanie rozpuszczalnej formy pełnej długości fibrynogenu wynosi 10 mg/ml. Dlatego do przygotowania roztworu białka wykorzystano maksymalnie 10 mg fibrynogenu, który rozpuszczano w 1 ml odpowiedniego buforu (bufor PBS, MST lub komercyjny bufor do znakowania znacznikiem MALEIMIDE). Proces rozpuszczania białka w buforze przeprowadzono poprzez delikatne pipetowanie, a następnie inkubowano próbkę przez około 16 godzin w temperaturze 4°C. Po tym czasie zawiesinę ponownie delikatnie wymieszano poprzez pipetowanie, a następnie usunięto pęcherzyki powietrza i agregaty białkowe poprzez wirowanie próbki przez 10 minut z prędkością 10 000 g w 4°C. Aby uzyskać preparat o najwyższej jakości, roztwór białka filtrowano przez filtr strzykawkowy o porowatości 0,22 µm Millex GP (Merck Millipore).

- 2) *Fragment D fibrynogenu (200 μg białka)*: rozpuszczano w 100 μl buforu do MST, co pozwoliło uzyskać stężenie końcowe roztworu białka około 24 μM . Podobnie jak w przypadku pełnej długości fibrynogenu, białko zawieszano w buforze poprzez delikatne pipetowanie i inkubowano przez około 16 godzin w temperaturze 4°C. Po tym czasie zawiesinę ponownie delikatnie wymieszano i usunięto pęcherzyki powietrza oraz agregaty białkowe poprzez wirowanie przez 10 minut z prędkością 10 000 g w 4°C.
- 3) *Fragment E fibrynogenu (100 μg białka)*: rozpuszczano w 200 μl buforu do MST, co pozwoliło uzyskać stężenie końcowe roztworu białka około 10 μM . Analogicznie do procedur opisanych w poprzednich punktach, białko to zawieszano w buforze poprzez delikatne pipetowanie i inkubowano przez około 16 godzin w temperaturze 4°C. Po upływie tego czasu zawiesinę ponownie delikatnie wymieszano, a następnie usunięto pęcherzyki powietrza oraz agregaty białkowe poprzez wirowanie przez 10 minut z prędkością 10 000 g w 4°C.
- 4) Jakość powyższych preparatów oceniono metodą rozdziału elektroforetycznego w 15% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (Rozdział 3.2.14).

3.2.8. Pomiar stężenia białek

3.2.8.1. Pomiar absorbancji przy długości fali λ_{260}

Stężenia białek określano za pomocą spektrofotometru NanoPhotometer[®] (IMPLEN). W celu wyznaczenia stężenia białek mierzono absorbancję uzyskanych preparatów przy długości fali 280 nm uwzględniając masę molową białka oraz molowy współczynnik ekstynkcji. Współczynnik ekstynkcji wyznaczano przy użyciu programu Protein Calculator v3.4.

3.2.8.2. Metoda biuretowa

W celu oszacowania stężeń białek OspC zastosowano metodę biuretową wykorzystując komercyjny odczynnik Total Protein Reagent (Sigma Aldrich). Wybór tej metody wynika z faktu, że skład aminokwasowy białek OspC uniemożliwia wiarygodny pomiar absorbancji przy długości fali 280 nm. Metoda biuretowa opiera się na tworzeniu kompleksu pomiędzy jonami miedzi a wiązaniami peptydowymi,

co pozwala na dokładne określenie stężeń białek o analizowanym składzie. Próbkę przygotowano zgodnie z poniższym schematem:

- 1) Przygotowano serię probówek o objętości 1,5 ml oznaczonych jako próba kontrolna oraz próby testowe, które zawierały preparaty białkowe.
- 2) Do każdej probówki dodano 1 ml odczynnika Total Protein Reagent.
- 3) Dodano 20 μ l buforu (identycznego, w którym zawieszono jest białko) do probówki kontrolnej oraz 20 μ l każdego z preparatów białkowych do probówek testowych. Próby wymieszano poprzez delikatne odwracanie probówki.
- 4) Próby (kontrolne oraz testowe) inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej.
- 5) Pomiar absorbancji wykonano przy długości fali 540 nm za pomocą spektrofotometru (Agilent 8453 UV-visible Spectroscopy System), porównując wartości z próbą kontrolną jako odniesieniem. Odczynnik jest stabilny przez 1 godzinę od inkubacji.
- 6) Aby określić całkowite stężenie białka (mg/ml) należało przeprowadzić obliczenia według określonego wzoru:

$$\text{stężenie białka} = \frac{A_{540}(\text{próbkka}) \times 10 \text{ mg/ml}}{0,06}$$

3.2.9. Pomiary dynamicznego rozpraszania światła (DLS)

W celu oszacowania masy oraz oceny jakości preparatów białkowych uzyskanych w poprzednich etapach prac laboratoryjnych, zastosowano spektroskop Zetasizer μ V (Malvern Instruments), który wykorzystuje między innymi takie techniki pomiarowe jak dynamiczne rozpraszanie światła (ang. dynamic light scattering, DLS) oraz statyczne rozpraszanie światła (ang. static light scattering, SLS).

DLS jest powszechnie stosowaną metodą umożliwiającą oszacowanie wielkości cząsteczek zdyspergowanych w cieczy. Cząsteczki te oświetlane są promieniem lasera, a rozproszenie światła (zmiana kierunku jego rozchodzenia się) jest rejestrowane przez detektor. Z uwagi na to, że analizowane cząsteczki są w ciągłym ruchu (ruchy Browna), sygnał na detektorze ulega ciągłym zmianom. Instrument ten pozwala na pomiar szybkości ruchu cząsteczek na skutek ruchów Browna, który następnie przeliczany jest na rozkład wielkości cząstek przy użyciu równania Stokes'a - Einstein'a. Pomiary DLS umożliwiają wyznaczenie promienia hydrodynamicznego (R_h) białek, na podstawie

którego oszacowana jest masa białka (kDa) przy użyciu oprogramowania Zetasizer 7.11 (Malvern Instruments). Do pomiarów wykorzystano 10 μ l preparatu przygotowanego w odpowiednim buforze o stężeniu około 1 mg/ml, umieszczonego w kuwecie kwarcowej o długości drogi optycznej 1 cm (Hellma QS 105.231). Każdorazowo wykonano 13 pomiarów w temperaturze pokojowej.

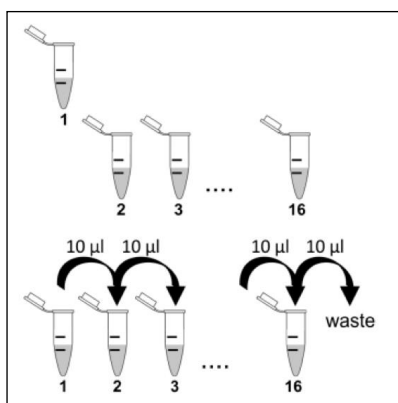
3.2.10. Badanie oddziaływań metodą termoforezy w skali mikro (MST)

Termoforeza w skali mikro (MST) jest techniką pozwalającą na detekcję zmian w otocze hydratacyjnej, ładunku lub rozmiarze cząsteczek poprzez pomiar zmian ruchu cząsteczek w gradiencie temperatury. Technika ta umożliwia badanie szerokiego zakresu interakcji między różnymi cząsteczkami, w tym analizę oddziaływań białek oraz ocenę siły tych interakcji. W celu oceny zdolności wiązania różnych białek OspC_N Δ 19 z ligandami białkowymi, takich jak fibrynogen czy Iric1-3, przeprowadzono szereg analiz za pomocą metody MST (Tabela 3.11). Przygotowanie prób oraz analiz metodą MST realizowano zgodnie z poniższym schematem:

- 1) Przygotowanie znakowanego białka: oczyszczone i homogenne preparaty białkowe o stężeniu 20 μ M znakowano zgodnie z instrukcjami producenta (NanoTemper Technology) stosując odpowiednie zestawy: Monolith NT™ Protein Labeling Kit RED-MALEIMIDE (dla fibrynogenu i BSA) oraz Monolith NT™ Protein Labeling Kit RED-NHS (dla białek OspA_N Δ 19 i OspC_N Δ 19). Po znakowaniu białka rozcieńczano do zakresu stężeń 50-200 nM. Aby ocenić jakość znakowania białek znacznikiem fluorescencyjnym, przeprowadzono testy kontrolne. Pobrano frakcje wyznakowanych białek o objętości 5 μ l do kapilar i wykonano kontrolne skanowanie za pomocą instrumentu Monolith NT.115 w celu oceny intensywności sygnału fluorescencji. Do dalszych analiz wybrano preparaty, których zakres fluorescencji wynosił 200-2000 jednostek.
- 2) Przygotowanie nieznakowanego białka: wykonano serię rozcieńczeń nieznakowanego ligandu według schematu przedstawionego na Rycinie 3.1. Przygotowano 16 próbek o objętości 200 μ l oznaczonych numerami 1-16. Do próbki nr 1 dodano 20 μ l nieznakowanego białka o najwyższym stężeniu*, podczas gdy do pozostałych próbek (nr 2-16) dodano po 10 μ l buforu reakcyjnego. Następnie z próbki nr 1 przeniesiono 10 μ l białka do próbki nr 2 i dokładnie wymieszano przez pipetowanie. Z próbki nr 2 przeniesiono

10 μ l białka do probówki nr 3, mieszając również przez pipetowanie. Proces ten kontynuowano, aż do uzyskania ostatniego rozcieńczenia w probówce nr 16.

*wyjściowe stężenia dla poszczególnych białek: 20 μ M fibrynogen, 50 μ M OspC_N Δ 19 (BA, BB, BG oraz BS), 10 μ M Iric1, 2, 3.



Rycina 3.1. Schemat serii rozcieńczeń niewyznakowanego białka (ligandu)

3) Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej: dodano 10 μ l wyznakowanego fluorescencyjne białka do każdej probówki zawierającej 10 μ l nieznakowanego białka (ligandu) z przygotowanej uprzednio serii rozcieńczeń. Mieszano delikatnie poprzez pipetowanie. Próby inkubowano 5 minut w temperaturze pokojowej bez dostępu do światła. Aby uniknąć powstawania pęcherzyków powietrza, próby wirowano przez 5 minut z prędkością 10 000 g, bezpośrednio przed pomiarem MST. Następnie pobrano 5 μ l przygotowanych prób do 16 kapilar MO-K022 znajdujących się w zestawie producenta (Monolith™ NT.115 Series – Capillaries). Pomiarów MST dokonano przy użyciu instrumentu Monolith NT.115, a wyniki pomiarów analizowano za pomocą oprogramowania MO.AFFINITY ANALYSIS.

Tabela 3.11. Schemat analizy wiązań poszczególnych kompleksów białek metodą MST

Białko znakowane* NHS	Białko znakowane* Maleimide	Analiza wiązania kompleksu
-	Fibrynogen	Fibrynogen*-OspC_N Δ 19BA
-	Fibrynogen	Fibrynogen*-OspC_N Δ 19BB
-	Fibrynogen	Fibrynogen*-OspC_N Δ 19BG
-	Fibrynogen	Fibrynogen*-OspC_N Δ 19BS

Białko znakowane* NHS	Białko znakowane* Maleimide	Analiza wiązania kompleksu
OspC_NΔ19BB	-	OspC_NΔ19BB*-Fibrynogen
OspC_NΔ19BB	-	OspC_NΔ19BB*-Fibrynogen (fragment D)
OspC_NΔ19BB	-	OspC_NΔ19BB*-Fibrynogen (fragment E)
OspC_NΔ19BA	-	OspC_NΔ19BA*-Iric1
OspC_NΔ19BA	-	OspC_NΔ19BA*-Iric2
OspC_NΔ19BA	-	OspC_NΔ19BA*-Iric3
OspC_NΔ19BB	-	OspC_NΔ19BB*-Iric1
OspC_NΔ19BB	-	OspC_NΔ19BB*-Iric2
OspC_NΔ19BB	-	OspC_NΔ19BB*-Iric3
OspC_NΔ19BG	-	OspC_NΔ19BG*-Iric1
OspC_NΔ19BG	-	OspC_NΔ19BG*-Iric2
OspC_NΔ19BG	-	OspC_NΔ19BG*-Iric3
OspC_NΔ19BS	-	OspC_NΔ19BS*-Iric1
OspC_NΔ19BS	-	OspC_NΔ19BS*-Iric2
OspC_NΔ19BS	-	OspC_NΔ19BS*-Iric3
Eksperymenty kontrolne		
-	BSA	BSA*-OspC_NΔ19BB
OspA_NΔ19BB	-	OspA_NΔ19BB*-Iric1
OspA_NΔ19BB	-	OspA_NΔ19BB*-Iric2
OspA_NΔ19BB	-	OspA_NΔ19BB*-Iric3

3.2.11. Pomiary małokątowego rozpraszania promieni rentgenowskich (SAXS)

Wstępny etap mający na celu przygotowanie preparatów białkowych do dalszych pomiarów małokątowego rozpraszania promieniowania rentgenowskiego (SAXS) obejmował uzyskanie najwyższej jakości homogennych preparatów białkowych (Rozdział 3.2.6.5) oraz ich analizę jakościową (Rozdział 3.2.8 oraz 3.2.14). Po uzyskaniu odpowiednich preparatów białek przygotowano próbki, których zakresy stężeń wynosiły odpowiednio 50-200 μM (dla OspC_NΔ19BB) i 15-30 μM (dla fibrynogenu) oraz przygotowano mieszaniny białek OspC_NΔ19BB i fibrynogenu w odpowiednich stosunkach molowych (Tabela 3.12).

Tabela 3.12. Stężenia molowe białek OspC_NΔ19BB i fibrynogenu oraz stosunki molowe przygotowanych mieszanin

Stężenie OspC_NΔ19BB	Stężenie Fibrynogenu	Stosunek molowy
15 μM	15 μM	1:1
15 μM	7,5 μM	2:1
15 μM	5 μM	3:1
7,5 μM	15 μM	1:2
45 μM	15 μM	3:1

Dane małokątowego rozpraszania promieniowania rentgenowskiego (SAXS) zostały zebrane w centrum synchrotronowym EMBL/DESY w Hamburgu na linii wiązki P12 akceleratora PETRA III. Bezpośrednio przed pomiarem SAXS próbki zostały zwirowane przez 10 minut z prędkością 10 000 rpm w temperaturze 4°C w celu usunięcia pęcherzyków powietrza oraz agregatów białek. Następnie próbki białka o objętości 20 μl umieszczano w kapilarze za pomocą robota.

Zbiór danych SAXS oraz opracowanie wyników za pomocą pakietu programów PRIMUS 3.2, a także modelowanie z użyciem oprogramowania SASREF zostały wykonane przez dr. Kamila Szpotkowskiego. Na podstawie uzyskanych danych dr Szpotkowski przeprowadził modelowanie czwartorzędowej struktury białka OspC_NΔ19BB oraz kompleksu białek OspC_NΔ19BB-fibrynogen. W tym celu wykorzystano struktury krystalograficzne białek: OspC ze szczepu B31 *B. burgdorferi* (kod PDB 1GGQ) oraz fibrynogenu (kod PDB 3 GHG).

3.2.12. Przesiewowe testy krystalizacyjne

Przed przystąpieniem do testów krystalizacyjnych konieczne było uzyskanie najwyższej jakości, homogennych preparatów białek OspC_NΔ19, OspC_NΔ35-37 oraz Iric1_NΔ19 (Rozdziały 3.2.6.5 i 3.2.6.6). Jakość tych preparatów została oceniona poprzez analizę wybranych frakcji białek za pomocą elektroforezy w 15% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (Rozdział 3.2.14) oraz pomiary dynamicznego rozpraszania światła (DLS) (Rozdział 3.2.9). Oczyszczone preparaty białkowe zagęszczono metodą ultrafiltracji przy użyciu filtra Amicon Ultra-15 (Merck Millipore) o punkcie odcięcia 3 000 (dla białka Iric1_NΔ19) lub 10 000 Da (dla białek OspC) (4000 x g, 4°C) do stężenia końcowego wynoszącego 10-30 mg/ml. Przesiewowe

testy krystalizacyjne białek przeprowadzono metodą kropli siedzącej wykorzystując płytki 96-dołkowe (INTELLI-PLATE 96-3 Low Volume Reservoir, ARI) oraz komercyjne zestawy buforów do krystalizacji białek (Rozdział 3.1.11).

Wstępne, przesiewowe testy krystalizacyjne dla białek OspC_NΔ19 przeprowadzono przy użyciu robota krystalizacyjnego Gryphon (Art Robbins Instruments) oraz komercyjnych zestawów do krystalizacji (Index, Crystal Screen, PEG/Ion). Do krystalizacji użyto płytek 96-dołkowych, na które наносzono 0,4 μl preparatu białka (o stężeniu końcowym 10 mg/ml), który mieszano z buforem krystalizacyjnym (rezerwuarem) w stosunkach 1:1 oraz 2:1. Płytki inkubowano w temperaturze 19°C. Oprócz krystalizacji robotowych, wykonano również szereg krystalizacji ręcznych. Wówczas na jedną płytkę 96-dołkową wykorzystano około 100 μl białka (o stężeniu końcowym 10-30 mg/ml) zawieszonego w odpowiednim buforze. Poniżej przedstawiono schemat przygotowania płytki do przeprowadzenia testów krystalizacyjnych:

- 1) Pipetą wielokanałową pobrano 70 μl odpowiednich buforów z komercyjnych zestawów do krystalizacji białek (Rozdział 3.1.11) i nałożono na płytkę 96-dołkową.
- 2) Następnie na płytkę 96-dołkową nałożono po 1 μl preparatu białkowego o stężeniu 10-30 mg/ml.
- 3) Kroplę białka mieszano z buforem krystalizacyjnym w stosunku 1:1.
- 4) Płytki inkubowano w temperaturach 4°C oraz 19°C.

Analogicznie przeprowadzono również próby współkrystalizacji białek OspC_NΔ35-37 z Iric1_NΔ19. Przed przystąpieniem do testów krystalizacyjnych inkubowano pary białek w stosunku molowym 1:1 (OspC:Iric1) przy stężeniach 500 μM dla obu białek. Inkubację prowadzono w temperaturze 4°C przez 1 godzinę, a dalsze czynności wykonywano zgodnie z powyższym schematem. Do prób współkrystalizacji wykorzystano komercyjne zestawy dedykowane krystalizacji kompleksów białkowych, które promują oddziaływania międzycząsteczkowe (ProPlex, MIDAS).

Pierwsze kryształy białek BB.OspC_NΔ37 i BG1.OspC_NΔ35 obserwowano po 1 tygodniu inkubacji płytek krystalizacyjnych w temperaturze 4°C. Następnie kryształy zbierano przy użyciu 0,4 nm pętli nylonowej (Hampton Research), nasączano roztworem krioprotektanta i zamrażano w ciekłym azocie.

Kolejne etapy związane z uzyskaniem struktur powyższych białek zostały przeprowadzone przez dr Joannę Śliwiak. Obejmowały one następujące czynności:

- 1) Pomiary dyfrakcyjne w centrum synchrotronowym EMBL/Desy w Hamburgu.
- 2) Przetwarzanie zebranych danych dyfrakcyjnych za pomocą programu XDS.
- 3) Rozwiązanie i udokładnienie struktur oraz zdeponowanie ich w bazie PDP: BB.OspC_NΔ37 (PDB: 7BML) oraz BG1.OspC_NΔ35(PDB: 7NEN).

3.2.13. Rozdział elektroforetyczny DNA

- 1) Do 20 µl badanej próby dodano 4 µl buforu obciążającego (bufor 6x) i dokładnie wymieszano (Rozdział 3.1.2).
- 2) Próby nałożono na 1% żel agarozowy (Rozdział 3.1.4). Rozdział elektroforetyczny prowadzono w buforze 0,5x TBE w stałym polu elektrycznym (100V).
- 3) Obserwację prążków prowadzono w świetle UV przy użyciu zestawu do dokumentacji żeli GelLogic 200 (Kodak).

Rozdział prowadzono w obecności markera masy DNA Perfect Plus™ 1 kb DNA Ladder (EURx).

3.2.14. Rozdział elektroforetyczny białek w warunkach denaturujących

(SDS-PAGE)

Do rozdziału elektroforetycznego białek w warunkach denaturujących zastosowano aparat Mini-PROTEAN® Tetra System (Bio-Rad). Przygotowano żełe poliakrylamidowe (PAA) składające się z górnej warstwy zagęszczającej o stężeniu 5% oraz dolnej warstwy rozdzielającej o stężeniu 15% (Rozdział 3.1.4). Poniżej przedstawiono schemat obejmujący przygotowanie prób, warunki rozdziału oraz procedurę barwienia żelu. Rozdział prowadzono w obecności markera masy Perfect™ Tricolor Protein Ladder (EURx).

Przygotowanie prób oraz warunki przeprowadzonej elektroforezy

- 1) Do 18 µl badanej próby dodano 6 µl buforu obciążającego (bufor 4x) i wytrząsano (Rozdział 3.1.2).
- 2) Denaturowano próby przez 5 minut w 95°C.
- 3) Próby nałożono na żel PAA (Rozdział 3.1.4). Rozdział w żelu zagęszczającym prowadzono w warunkach 80V a w żelu rozdzielającym w warunkach 175-200V.

Wybarwianie białek rozdzielonych w żelu

- 1) Umieszczono żel w wodzie destylowanej i podgrzano w kuchence mikrofalowej przez 1 minutę, nie doprowadzając do wrzenia. Czynność powtórzono trzykrotnie.
- 2) Żel umieszczono w roztworze do wybarwiania białek BlueStain Sensitive (EURx), ponownie podgrzano w kuchence mikrofalowej przez 0,5 minuty, nie doprowadzając roztworu do wrzenia.
- 3) Pozostawiono żel w roztworze przez 1 godzinę.
- 4) Wyplukano niezwiązany barwnik w wodzie i obserwowano prążki.

3.2.15. Analizy wykonane za pomocą narzędzi bioinformatycznych

Wykorzystano następujące narzędzia bioinformatyczne:

- 1) BioEdit – analiza wyników sekwencjonowania oraz porównywanie sekwencji nukleotydowych i aminokwasowych badanych białek.
- 2) ProtParam/Protein Calculator – obliczanie parametrów białka: liczba aminokwasów, masa białka (Da), teoretyczny punkt izoelektryczny (pI), całkowita liczba dodatnio oraz ujemnie naładowanych aminokwasów oraz współczynnik ekstynkcji.
- 3) ClustalW – porównywanie sekwencji aminokwasowych białek oraz obliczanie ich podobieństwa/identyczności.
- 4) SWISS-MODEL – modelowanie białek na podstawie występujących w bazie Protein Data Bank (PDB) białek homologicznych.
- 5) Translate Tool (Expasy) – przepisanie sekwencji nukleotydowych na sekwencje aminokwasowe.
- 6) APBS & PDB2PQR (Software for biomolecular electrostatics and solvation) – określanie oddziaływań elektrostatycznych i sposób dystrybucji ładunku na powierzchni białka.
- 7) UCSF Chimera – interaktywna wizualizacja i analiza białek.

4. WYNIKI

4.1. Analiza bioinformatyczna białek OspC

4.1.1. Charakterystyka białek OspC_NΔ19

Głównym obiektem badawczym pracy doktorskiej było białko OspC, pochodzące z różnych gatunków *Borrelia*: *B. afzelii*, *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* oraz *B. spielmanii*. Dane literaturowe oraz analiza bioinformatyczna wykazały, że pierwszych 19 aminokwasów z końca aminowego białka OspC stanowi sekwencję sygnałową, która jest usuwana w procesie dojrzewania białka (Kumaran i in., 2001 a,b). Do badań w ramach niniejszej pracy zaprojektowano sekwencje kodujące dojrzałe białka OspC, nazwane dalej OspC_NΔ19. Korzystając z narzędzi bioinformatycznych wykonano obliczenia parametrów fizyko-chemicznych, aby uzyskać podstawowe informacje dotyczące białek OspC_NΔ19 pochodzących z różnych gatunków *Borrelia*, takich jak masa cząsteczkowa białka (kDa), teoretyczny punkt izoelektryczny (pI), skład aminokwasów, współczynnik ekstynkcji czy dystrybucja ładunków na powierzchni białka. W tym celu przepisano sekwencje nukleotydowe kodujące białka OspC_NΔ19 na sekwencje aminokwasowe (Tabela 4.1) przy użyciu programu *Translate tool* (<https://web.expasy.org/translate/>) (Rozdział 3.2.15). Aby określić podstawowe właściwości białek OspC_NΔ19 przeanalizowano uzyskane sekwencje aminokwasowe używając programu *Protein Calculator v3.4* (<http://protcalc.sourceforge.net>) oraz *ProtParam* (<https://web.expasy.org/protparam/>) (Rozdział 3.2.15) (Tabela 4.1). Ponadto przy użyciu narzędzia *ClustalW* (<https://clustal.org/clustal2/>) przeprowadzono porównania sekwencji aminokwasowych OspC_NΔ19 oraz oznaczono fragmenty wspólne dla białek OspC_NΔ19 (Tabela 4.3). Wykonano także analizę podobieństwa tych sekwencji, a uzyskane wyniki przedstawiono w Tabeli 4.4. Poziom podobieństwa analizowanych sekwencji aminokwasowych OspC_NΔ19 wynosi od 60 do 73% (Tabela 4.4).

Według danych literaturowych białka OspC znacznie różnią się w rozmieszczeniu ładunków na ich powierzchni, co prawdopodobnie ma zasadniczy wpływ na oddziaływania tych białek z ligandami czy na zdolności infekcyjne *Borrelia*. Aby poznać rozkład ładunku na powierzchni badanych białek, zostały wygenerowane *in silico* modele białek OspC_NΔ19 (BA.OspC_NΔ19, BB.OspC_NΔ19, BG.OspC_NΔ19, BS.OspC_NΔ19) z przewidywanym położeniem ładunków powierzchniowych na podstawie struktury krystalograficznej białka OspC pochodzącego

B. burgdorferi (PDB:1GGQ) przy użyciu programu SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org>) (Rozdział 3.2.15). Wygenerowane modele OspC_Δ19 zostały przedstawione w Tabeli 4.2. Wyniki *in silico* wskazują też, że białko OspC_Δ19 z gatunków *B. afzelii*, *B. burgdorferi* s.s. oraz *B. garinii* posiada w obojętnym pH całkowity ładunek ujemny, w przeciwieństwie do OspC_Δ19 z *B. spielmanii* o ładunku dodatnim (Tabela 4.2). Uzyskane wyniki powyższych analiz (Tabela 4.1 i Tabela 4.2) wskazały na znaczne zróżnicowanie właściwości fizyko-chemicznych białek OspC_Δ19 z różnych gatunków *Borrelia*.

Tabela 4.1. Sekwencje aminokwasowe białek OspC_Δ19 wraz z podstawowymi parametrami (pI oraz masa cząsteczkowa)

Rodzaj białka OspC_Δ19	Sekwencje aminokwasowe białek OspC_Δ19	Teoretyczny pI	Masa cząsteczkowa [kDa]
BA.OspC_Δ19 (190 aa)*	NNSGKGGDIASNPDES AKGPNL TEISKKIT DSNAVVLAVKEVEALLSSIDELAKTIGKKIE ANGLGNEADKNGSLLAGAYAISTLIKQKLD GLKGLEGLNKEIAEAKKCEAFTKKLQDSN ADLGKHNATDADSKEAILKTNGTKTKGAK ELEELFKSVESLSKAAKEALSNSVKELTSPV VAESPCKP	7,19	19,82
BB.OspC_Δ19 (192 aa)*	NNSGKDGNTSANSADSVKGP NL TEISKKIT DSNAVLLAVKEVEALLSSIDELAKAIGKKIK NDGSLGDEANHNESLLAGAYTISTLITQKLS KLN GSEGLKEKIAAAKKCEEFSTKLKDNH AQLGIQGVTDENAKKAILKANAAGKDKGV EELEKLSGSLESLSKAAKEMLANSVKELTSP VVAESPCKP	7,28	20,06
BG.OspC_Δ19 (190 aa)*	NNSGGDTASTNPDES VKGP NL TEISKKITDS NAFVLAVKEVEALISSIDELAKAIGQRIQQN GLVADAGHNSALLAGAHEISILITQKLDGLK GLEGLKAEIAEAKKYSEAFTKKLKDHAQL GIQNGASLDDEAKKAILKTNDKTKGAEEL EKLFKSVESLSKAAQEAL TNSVKELTNPVV AESPCKP	5,97	20,07
BS.OspC_Δ19 (193 aa)*	NNSGGDSTSTKPVDKPAKGP NL AEISKKITD SNTFVLAVKEVETLVSSIDELAKKAIGQKID QNSGLGALQSQNGSLLAGVYAISTLITDKLS KLKNSEELKAEIAKAKKCESEDFTNKLKLSH ADLGAVNGATTDDHAKAAAILKT NAPDDKG AKEFKGLFESVESLSKAAKAAALANSVKELT SPVAAESPCKP	8,73	20,09

* w nawiasach podano długość sekwencji aminokwasowych (aa)

Tabela 4.2. Przewidywana dystrybucja ładunków na powierzchni białka OspC_NΔ19 pochodzącego z czterech różnych gatunków *Borrelia*. Kolorem różowym oznaczono ładunek dodatni, a kolorem turkusowym ładunek ujemny.

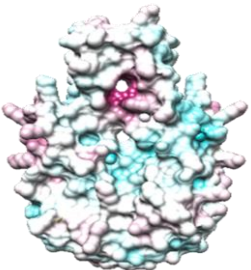
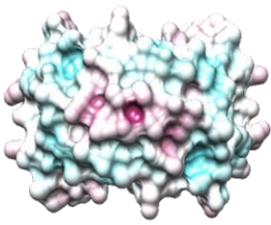
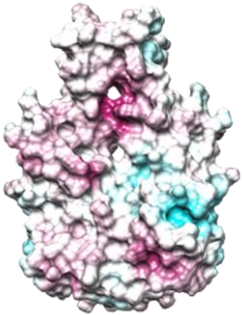
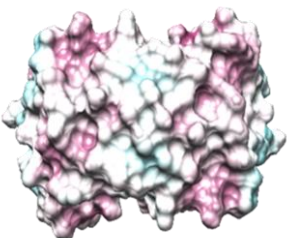
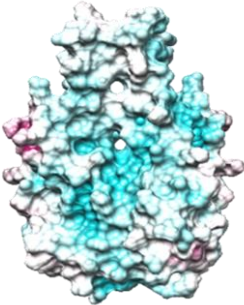
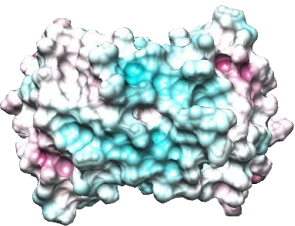
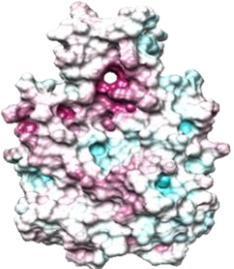
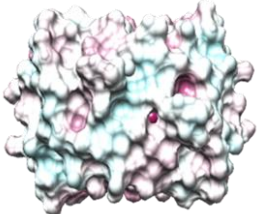
Rodzaj białka OspC_NΔ19	Orientacja 1 białek OspC_NΔ19	Orientacja 2 białek OspC_NΔ19	Ładunek (pH 7,5)
BA.OspC_NΔ19 (VS461)			-0,3
BB.OspC_NΔ19 (PBre)			-0,2
BG.OspC_NΔ19 (20047 CIP103362)			-3,0
BS.OspC_NΔ19 (PC-Eq17)			2,8

Tabela 4.3. Porównanie sekwencji aminokwasowych białek OspC_NA19 pochodzących z różnych gatunków *Borrelia*. Kolorem zielonym oznaczono fragmenty konserwatywne. Pojedyncza linia ciągła wskazuje obszary sekwencji obejmujące epitop L5, natomiast podwójna linia ciągła oznacza sekwencje zawierające epitop H5 (Buckles i in., 2006).

<i>B. afzelii</i>	NNSGKGGDIAS TNP DESAK GP N L TE I SK K ITDSNAV V LAVKEVEALL SSI
<i>B. burgdorferi</i>	NNSGKDGNTSANSAD ESV K GP N L TE I SK K ITDSNAV L LAVKEVEALL SSI
<i>B. garinii</i>	NNS--GGDTASTNP DES V KGP N L TE I SK K ITDSNAF V LAVKEVEAL ISSI
<i>B. spielmanii</i>	NNSG-GDSTSTK PV D KPA K GP N L AE I SK K ITDSNT FV LAVKEVE TLVSSI
<i>B. afzelii</i>	DELA- KTIG KK IE ANG- LG NEADK NGS LLAGAY AI ST LI Q K LDGL K GLE
<i>B. burgdorferi</i>	DELA- KAIG KK I KNDGS LG DEAN H NE S LLAGAY T IS TLI TQ KL SK L NG SE
<i>B. garinii</i>	DELA- KAIG Q RI Q Q NG- LV ADAG H NSALLAGAE I S I L I TQ K LDGL K GLE
<i>B. spielmanii</i>	DE LAK KA IG Q K IDQNS GL ALQ S Q NGS LLAG V Y AI ST LI TD KL SK L KN SE
<i>B. afzelii</i>	GLNKE IAE AK K SEAF TK KLQDS NA DLG K H N --ATD AD S KE AIL K T NG T-
<i>B. burgdorferi</i>	GLKEK IAA AK K SEEF ST KLKDN HA Q L GI Q G--VT D EN AK AIL K NA AG
<i>B. garinii</i>	GLKAE IAE AK K YSEAF TK KLKDN HA Q L GI Q NGAS L D EA AK AIL K T N V D-
<i>B. spielmanii</i>	ELKAE IA K AK K SE DF TN KL KL SH AD LGAV NG AT TD H AK AIL K T N AP-
	L5
<i>B. afzelii</i>	KT KG AK E LEEL FK SV ES LS KAA KEAL S NS V KEL TS P V VA ES P K K P
<i>B. burgdorferi</i>	KD KG VE E LE KL SG S LE S LS KAA KE M L AN SV KEL TS P V VA ES P K K P
<i>B. garinii</i>	KT KG AE E LE KL FK S VE S LS KAA Q E AL T NS V KEL T NP V VA ES P K K P
<i>B. spielmanii</i>	DD KG AK E FK L FE S VE S LS KAA KAAL AN SV KEL TS P V VA ES P K K P
	H5

Tabela 4.4. Podobieństwo sekwencji aminokwasowych białek OspC_NA19 pochodzących z różnych gatunków *Borrelia*. Informacje zawarte w tabeli zostały obliczone z wykorzystaniem sekwencji przedstawionych w Tabeli 4.1.

Pary porównywanych białek OspC_NA19 pochodzących z różnych gatunków <i>Borrelia</i>	Podobieństwo sekwencji aminokwasowych [%]
<i>Borrelia afzelii</i> i <i>Borrelia burgdorferi</i>	67,9%
<i>Borrelia afzelii</i> i <i>Borrelia garinii</i>	73,7%
<i>Borrelia afzelii</i> i <i>Borrelia spielmanii</i>	63,2%
<i>Borrelia burgdorferi</i> i <i>Borrelia garinii</i>	65,8%
<i>Borrelia burgdorferi</i> i <i>Borrelia spielmanii</i>	59,9%
<i>Borrelia garinii</i> i <i>Borrelia spielmanii</i>	65,8%

4.1.2. Charakterystyka białek OspC_NΔ35-37

Na podstawie sekwencji aminokwasowych białek OspC, które zostały wykrywane przez Kumaran i in. (2001b), zaprojektowano nowe konstrukty delecyjne (NΔ35-37). Głównym celem utworzenia tych konstruktyw było zwiększenie szans na uzyskanie białek w formie krystalicznej, co było kluczowe dla dalszych badań strukturalnych. Za pomocą narzędzi bioinformatycznych przeprowadzono analizę parametrów fizyko-chemicznych w celu uzyskania podstawowych informacji dotyczących białek OspC_NΔ35-37 pochodzących z badanych gatunków *Borrelia* (BA.OspC_NΔ37, BB.OspC_NΔ37, BG.OspC_NΔ35, BG1.OspC_NΔ35 BS.OspC_NΔ16) (Rozdział 3.2.15). W pierwszym etapie, korzystając z programu Translate tool, przepisano sekwencje nukleotydowe kodujące badane białka na sekwencje aminokwasowe (Tabela 4.5). Następnie, aby określić podstawowe właściwości białek OspC_NΔ35-37, takie jak teoretyczny punkt izoelektryczny (pI) oraz masa cząsteczkowa, przeanalizowano uzyskane sekwencje aminokwasowe przy użyciu programu Protein Calculator v3.4 oraz ProtParam (Rozdział 3.2.15) (Tabela 4.5).

Tabela 4.5. Sekwencje aminokwasowe poszczególnych białek OspC_NΔ35-37 wraz z podstawowymi parametrami (pI oraz masa cząsteczkowa)

Rodzaj białka OspC__NΔ35-37	Sekwencje aminokwasowe białek OspC_ NΔ35-37	Teoretyczny pI	Masa cząsteczkowa [kDa]
BA.OspC_NΔ37 (172 aa)*	KGPNLTEISKKITDSNAVVLAVKEVEALLSSID ELAKTIGKKIEANGLGNEADKNGSLLAGAYAI STLIKQKLDGLKGLEGLNKEIAEAKKCSEAF KKLQDSNADLGKHNATDADSKEAILKTNGTK TKGAKELEELFKSVESLSKAAKEALSNSVKEL TSPVVAESPCKP	8,45	18,1
BB.OspC_NΔ37 (174 aa)*	KGPNLTEISKKITDSNAVLLAVKEVEALLSSID ELAKAIGKKIKNDGSLGDEANHNESLLAGAYT ISTLITQKLSKLNGLSEGLKEKIAAAKCCSEEFST KLDNHAQLGIQGVTDENAKKAILKANAAGK DKGVEELEKLSGSLESLSKAAKEMLANSVKEL TSPVVAESPCKP	8,45	18,31

Rodzaj białka OspC__NΔ35-37	Sekwencje aminokwasowe białek OspC_ NΔ35-37	Teoretyczny pI	Masa cząsteczkowa [kDa]
BG.OspC_NΔ35 (174 aa)*	KGPNLTEISKKITDSNAFVLAVKEVEALISSIDE LAKAIGQRIQQNGLVADAGHNSALLAGAHEIS ILITQKLDGLKGLEGLKAEIAEAKKYSEAFKK LKDNHAQLGIQNGASLDDEAKKAILKTNVDK TKGAELEKLFKSVESLSKAAQEALTNSVKEL TNPVVAESPCKP	7,47	18,52
BG1.OspC_NΔ35 (176 aa)*	KGPDLTVISKKITDSNAVVLAVKEVEALLSSID ELAKAIGQKIDRNNGLAVEANFNTSLLAGAYT ISTLITKKLDELIKNSGELKGEVEKAKNCSEAF TNKLKEKTQELAVAAGAATDIDAKKAILKTN RDKDLGADELGKLFKSVESLSKAAQEASANS VKELTSPVVAENPKKP	8,03	18,62
BS.OspC_NΔ36 (176 aa)*	KGPNLAEISKKITDSNTFVLAVKEVETLVSSID ELAKKAIGQKIDQNSGLGALQSQNGSLLAGV YAISTLITDKLSKLNSEELKAEIAKAKKCSSED FTNKLKLSHADLGAVNGATTDDHAKAAILKT NAPDDKGAKEFKGLFESVESLSKAAKAALAN SVKELTSPVVAESPCKP	8,78	18,43

* w nawiasach podano długość sekwencji aminokwasowych (aa)

4.1.3. Charakterystyka białek Iric_NΔ19

Białka z grupy Salp15 również posiadają sekwencję sygnałową na końcu aminowym białka, która także jest usuwana podczas procesu dojrzewania białka. Aby uzyskać dojrzałe formy białka, zaprojektowano konstrukty delecyjne NΔ19 (Hovius i in., 2006; Kolb i in., 2015). W celu określenia podstawowych właściwości białek Iric_NΔ19 (Iric1_NΔ19, Iric2_NΔ19, Iric3_NΔ19), przeanalizowano ich sekwencje aminokwasowe używając programu Protein Calculator v3.4 oraz ProtParam (Rozdział 3.2.15). Otrzymane wyniki przedstawiono w Tabeli 4.6. Następnie za pomocą narzędzia ClustalW, przeprowadzono porównanie sekwencji aminokwasowych Iric_NΔ19 oraz zidentyfikowano wspólne fragmenty sekwencji dla powyższych białek (Tabela 4.7). Analizy podobieństwa i identyczności tych sekwencji, których procentowe wyniki przedstawiono w Tabeli 4.8, ujawniły znaczne różnice w teoretycznym punkcie izoelektrycznym między białkami Iric1_NΔ19 i Iric2_NΔ19 a białkiem Iric3_NΔ19 (Tabela 4.8). Różnice te zostały uwzględnione przy planowaniu eksperymentów, co wpłynęło na wybór odpowiednich warunków buforowych i pH podczas izolacji białek. Obliczone poziomy identyczności analizowanych sekwencji aminokwasowych Iric_NΔ19 znajdują się w zakresie 43-50% (Tabela 4.8).

Tabela 4.6. Sekwencje aminokwasowe białek Iric_NΔ19 wraz z podstawowymi parametrami (pI oraz masa cząsteczkowa)

Rodzaj białka Iric_NΔ19	Sekwencje aminokwasowe białek Iric_NΔ19	Teoretyczny pI	Masa cząsteczkowa [kDa]
Iric1 (115 aa)*	AVNESATSEARTSSAAKETKKKNVTLHFPSYI RNPQKLALLELLEICKNNKSRNSLPSTNYSAIN KYVDFKNCTFLCKHAEDRNVTLDLPPNTLCG PNG ETCAEKSKCVGHIPGC	8,37	12,64
Iric2 (117 aa)*	AEAASTGKNPVG DAPNGKKNITFNFPYVPN HHAFASLWKLCEE STPKPEMKIVDSRTTYTR RINDLQVNFKDCTFLCKRRFDNVTLDLPKNTP CGPKNQTCENKDQCVPHIPGC	8,38	13,12
Iric3 (105 aa)*	AEAESINEKSDVEPSKGGKNSGLQFKFPPYVP NHKAFALRLLSLCEQGIYGTKINDLKVDFKNC TFLCIRKYENLTLPLPEDTPCGPNNQTCHKKD ECV GYIPGC	7,09	11,74

* w nawiasach podano długość sekwencji aminokwasowych (aa)

Tabela 4.7. Porównanie sekwencji aminokwasowych białek Iric_NΔ19: I1 dla Iric1_NΔ19, I2 dla Iric2_NΔ19 oraz I13 dla Iric3_NΔ19. Kolorem zielonym oznaczono konserwatywne fragmenty sekwencji. Podkreślono i pogrubiono fragment sekwencji obejmujący obszar 48-67 aminokwasu, który zaproponowano u Iric1, jako potencjalne miejsce wiązania białka OspC (Kolb i in., 2015).

I1	AVNESATSEARTSSAAKETKKKNVTLHF PSYIRNPQKLALLELLEICKN NKSRNSLPSTNYSAIN
I2	A-EAASTG-KNPVG DAPNGKKNITFN FPYVPNHAFASLWKLCEE STPKPEMKIVDSRTTYTR
I3	A-EAESINEKSDVEPSKGGKNSGLQFK FPYVNHKAFALRLLSLCEQ GIYGTKINDLKVDFKNC
I1	--TNYSA INDKYVDFKNCTFLCK HAEDRNV TLDLPPNTLCG PN ETCAEKSKCVGHIPGC
I2	RTTYTRR INDLQVNFKDCTFLCK RRFDNV TLDLPPNTPCG PKNQ TCENKDQCVPHIPGC
I3	--IYGTK INDLKVDFKNCTFLC IRKY-ENL TLPLPEDTPCG PNNQ TCHKKDECVGYIPGC

Tabela 4.8. Podobieństwo oraz identyczność sekwencji aminokwasowych białek Iric_NΔ19. Informacje zawarte w tabeli zostały obliczone z wykorzystaniem sekwencji przedstawionych w Tabeli 4.6.

Pary porównywanych białek Iric_NΔ19	Podobieństwo sekwencji aminokwasowych [%]	Identyczność sekwencji aminokwasowych [%]
Iric1_NΔ19 i Iric2_NΔ19	57%	43%
Iric1_NΔ19 i Iric3_NΔ19	54%	40%
Iric2_NΔ19 i Iric3_NΔ19	64%	50%

4.2. Wybór sekwencji DNA do produkcji rekombinowanych białek OspC

i Iric

Prace laboratoryjne przeprowadzone w ramach niniejszej pracy doktorskiej rozpoczęto korzystając z materiału DNA zgromadzonego wcześniej w Pracowni Inżynierii Białek w IChB PAN. Posłużył on do przygotowania wektorów do produkcji rekombinowanych białek. Skrócony opis prac związanych z otrzymaniem wektorów ekspresyjnych przedstawiono poniżej w celu łatwiejszego odbioru kolejnych, bardziej szczegółowych części rozdziału Wyniki.

Wektory plazmidowe kodujące białko OspC

Sekwencje kodujące pełnej długości białka OspC pochodzące z powyższych gatunków *Borrelia*, pozyskano i zamplifikowano w plazmidach w trakcie wcześniejszych badań prowadzonych w IChB PAN, z wyjątkiem sekwencji *B. spielmianii*. Ze względu na dostępność tej sekwencji jedynie w postaci liniowego produktu PCR, postanowiono wklonować insert kodujący BS.OspC do wektora pCR[®]2.1-TOPO[®] w celu zabezpieczenia otrzymanego materiału. Etapy uzyskania tego konstruktów zostały opisane poniżej w Rozdziałach 4.2.1 oraz 4.2.2, a procedura w Rozdziale 3.2.1.5.

Kolejnym etapem było utworzenie konstruktów genetycznych w oparciu o wektory ekspresyjne z serii pMCSG, które umożliwiają wydajną produkcję heterologicznych białek, a obecność znacznika HisTag wspomaga proces ich oczyszczania z zastosowaniem technik chromatograficznych (Rozdział 4.3.5). Uzyskano konstrukty delecyjne N Δ 19, pozbawione sekwencji nukleotydowych kodujących pierwsze 19 aminokwasów z końca aminowego białka, stanowiących sekwencję sygnałową (Kumaran i in., 2001 a,b). Następnie przeprowadzono optymalizację związaną z wyborem odpowiedniego wektora ekspresyjnego z serii pMCSG (pMCSG9, pMCSG48 oraz pMCSG68) (Tabela 3.2). W wyniku tych działań utworzono konstrukty pMCSG9-BA.OspC_N Δ 19, pMCSG48-BA.OspC_N Δ 19 oraz pMCSG68-BA.OspC_N Δ 19, bazujące na sekwencji kodującej białko BA.OspC_N Δ 19, zgodnie z procedurą opisaną w Rozdziale 3.2.1.6. Po potwierdzeniu poprawności otrzymanych konstruktów, przeprowadzono wstępną kontrolę ekspresji genu kodującego białko BA.OspC_N Δ 19. W tym celu wykonano porównawcze testowe hodowle bakterii w małej skali (Rozdział 3.2.6.2). Wyniki tych eksperymentów potwierdziły, że wektor pMCSG48-BA.OspC_N Δ 19 umożliwia najbardziej wydajną produkcję białka OspC.

W związku z tym pozostałe sekwencje kodujące białka OspC (BB.OspC_NΔ19, BG.OspC_NΔ19, BS.OspC_NΔ19) wklonowano do tego wektora (Rozdział 3.2.1.5). Uzyskane białka BA.OspC_NΔ19, BB.OspC_NΔ19, BG.OspC_NΔ19 oraz BS.OspC_NΔ19 wykorzystano na dalszych etapach do badań interakcji z ligandami białkowymi (fibrynogen oraz białka Iric) (Rozdział 3.2.10).

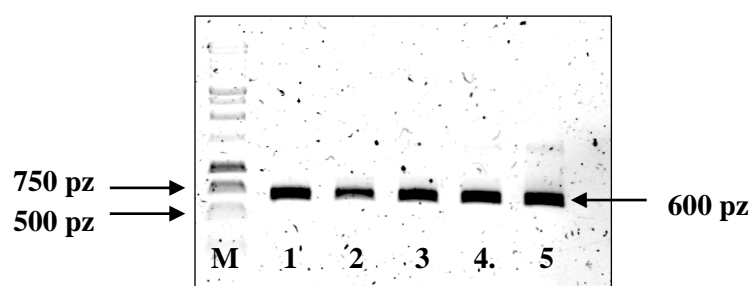
Aby zwiększyć szanse na uzyskanie białek w formie krystalicznej, opierając się na danych literaturowych skonstruowano nowe warianty delecyjne białka OspC: BA.OspC_NΔ37, BB.OspC_NΔ37, BG.OspC_NΔ35, BG1.OspC_NΔ35 oraz BS.OspC_NΔ36 (Kumaran i in., 2001b). Do ich utworzenia wykorzystano ponownie wektor pMCSG48. Białka OspC_NΔ35-37 uzyskane w wyniku nadekspresji w bakteriach, zostały poddane przesiewowym testom krystalizacyjnym.

Wektory plazmidowe kodujące białka Iric1, Iric2 oraz Iric3

Do uzyskania białek Iric1_NΔ19, Iric2_NΔ19 oraz Iric3_NΔ19 wykorzystano konstrukty na bazie wektora pET-39b(+), które zostały wcześniej utworzone w IChB PAN. Białka Iric, należące do homologów białka śliny kleszcza Salp15, są jednymi z ligandów białka OspC. W związku z tym przeprowadzono optymalizację procesu produkcji i oczyszczania tych białek w celu opracowania najbardziej wydajnego protokołu (Rozdział 4.6). Ponieważ są to białka eukariotyczne, można było przypuszczać, że ten etap będzie nastroczał najwięcej trudności.

4.2.1. Klonowanie sekwencji kodującej pełnej długości białko BS.OspC do wektora pCR[®]2.1-TOPO[®]

Przeprowadzono syntezę cDNA kodującego białko BS.OspC metodą łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. *PCR – polymerase chain reaction*) (Rozdział 3.2.1.1). Uzyskane produkty reakcji PCR analizowano poprzez rozdział elektroforetyczny (Rozdział 3.2.13). Obserwowano produkty wielkości około 600 pz – odpowiadające wielkości sekwencji kodującej białko BS.OspC (639 pz) (Rycina 4.1).



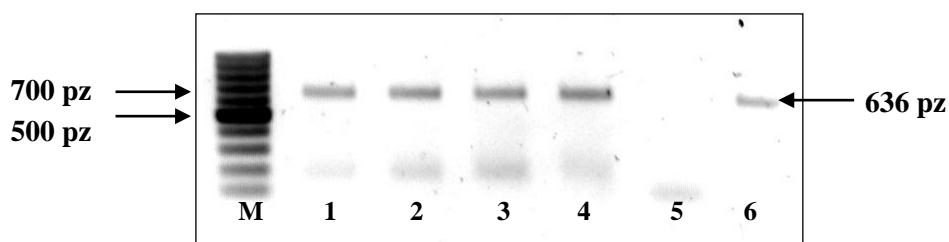
Rycina 4.1. Wynik rozdziału elektroforetycznego DNA zawierającego sekwencję kodującą (cDNA) białko BS.OspC namnożoną metodą PCR. Cyframi o numerach 1-5 oznaczono cDNA kodujące białko BS.OspC oraz M – wzorec masy DNA. Strzałkami oznaczono prążki wraz z odpowiadającymi im wielkościami (pz).

Produkty PCR oczyszczono, a następnie zmierzono stężenie. Otrzymano cDNA-BS.OspC o stężeniu 78,5 ng/ μ l. Uzyskane wartości stosunków $A_{260/280}=1,9$ oraz $A_{260/230}=2,3$ wskazywały na brak zanieczyszczeń (Rozdział 3.2.1.2).

4.2.2. Klonowanie TOPO TA Cloning do wektora pCR[®]2.1-TOPO[®]

Procedurę klonowania przeprowadzono zgodnie z protokołem i zaleceniami producenta (Rozdział 3.2.1.6), z wykorzystaniem świeżo przygotowanego insertu cDNA-BS.OspC. Otrzymanymi produktami ligacji transformowano bakterie *E. coli* (Rozdziały 3.1.9 oraz 3.2.2), a następnie izolowano i oczyszczano uzyskane plazmidy (Rozdział 3.2.3).

Obecność insertu w wyizolowanych plazmidach potwierdzono z wykorzystaniem reakcji PCR z użyciem odpowiednich starterów OspC5' oraz OspC3' (Tabela 3.1). Uzyskane produkty reakcji PCR analizowano poprzez rozdzielanie elektroforetyczne (Rycina 4.2). Obserwowano produkty wielkości około 600 pz – odpowiadające wielkości sekwencji kodującej białka BS.OspC (639 pz). Na podstawie uzyskanych wyników przeprowadzono selekcję poprawnie skonstruowanych plazmidów pCR[®]2.1-TOPO[®] zawierających właściwe inserty (Rycina 4.2).



Rycina 4.2. Wynik rozdziału elektroforetycznego DNA zawierającego sekwencję kodującą białko BS.OspC. Cyframi oznaczono: 1-6 – sekwencje kodujące białko BS.OspC oraz M – wzorec masy DNA. Strzałkami oznaczono prążki wraz z odpowiadającymi im wielkościami (pz).

Poprawność sekwencji nukleotydowych utworzonych konstruktów potwierdzono poprzez reakcję sekwencjonowania. Do wykonania reakcji sekwencjonowania konieczne było wyizolowanie i oczyszczenie plazmidowego DNA (Rozdział 3.2.1.2) z wybranych kolonii bakteryjnych, w których potwierdzono obecność insertu kodującego białka BS.OspC (Rycina 4.2). Następnie mierzono stężenie preparatów. Otrzymano plazmidowe DNA BS.OspC-pCR[®]2.1-TOPO[®] o stężeniu 246,6 ng/μl. Uzyskane wartości stosunków $A_{260/280}=1,9$ oraz $A_{260/230}=2,2$ wskazują na brak zanieczyszczeń.

Otrzymane wyniki reakcji sekwencjonowania analizowano przy użyciu programu BioEdit Sequence Alignment Editor, który umożliwił porównanie sekwencji nukleotydowych do sekwencji wyjściowych (referencyjnych). Wykonane analizy potwierdziły poprawność wklonowanej sekwencji kodującej białko BS.OspC do wektora pCR[®]2.1-TOPO[®]. Dlatego wykonany konstrukt wykorzystano jako matrycę do dalszych eksperymentów.

4.3. Opracowanie strategii produkcji białek OspC na przykładzie

BA.OspC_Δ19

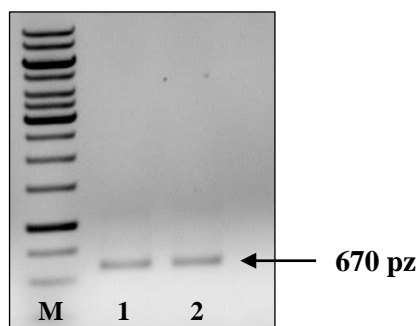
Opracowanie optymalnego protokołu produkcji białek OspC wykonano na przykładzie białka BA.OspC_Δ19. Proces ten był wieloetapowy i obejmował następujące kroki:

1. Konstrukcja wektorów do produkcji białka BA.OspC_Δ19 w oparciu o plazmidy pMCSG9, pMCSG48 oraz pMCSG68 (Tabela 3.2).
2. Optymalizacja produkcji białka BA.OspC_Δ19 w małej skali (Rozdział 3.2.6.2).
3. Produkcja i oczyszczanie białka białka BA.OspC_Δ19 w dużej skali (Rozdział 3.2.6.4).

Na podstawie uzyskanych wyników określono optymalne warunki, obejmujące wybór odpowiedniego plazmidu do produkcji białka (pMCSG48) oraz warunki produkcji i oczyszczania białek OspC. Procedury te zostały następnie zastosowane do otrzymania pozostałych form delecyjnych białek OspC (OspC_Δ19 oraz OspC_Δ35-37).

4.3.1. Amplifikacja sekwencji kodującej białko BA.OspC_Δ19

Przeprowadzono syntezę cDNA kodującego białko BA.OspC_Δ19 metodą PCR według opisu przedstawionego w Tabela 3.3 oraz Tabela 3.4 (Rozdział 3.2.1.1). Uzyskane produkty reakcji PCR analizowano poprzez rozdzielanie elektroforetyczne (Rozdział 3.2.13). Obserwowano produkty wielkości około 600 pz – odpowiadające wielkości sekwencji kodującej białko BA.OspC_Δ19 (670 pz). (Rycina 4.3).



Rycina 4.3. Wynik rozdzielania DNA zawierającego sekwencję kodującą (cDNA) białko BA.OspC_Δ19 namnożonej metodą PCR. Cyframi o numerach 1-2 oznaczono cDNA kodujące białko BA.OspC_Δ19 oraz M – wzorzec masy DNA. Strzałką oznaczono prążki wraz z odpowiadającymi im wielkościami (pz).

Produkty PCR oczyszczono (Rozdział 3.2.1.2), a następnie zmierzono stężenie. Otrzymano cDNA-BA.OspC_NΔ19 o stężeniu 145,5 ng/μl. Uzyskane wartości stosunków $A_{260/280}=1,7$ oraz $A_{260/230}=2,3$ wskazywały na brak zanieczyszczeń.

4.3.2. Amplifikacja wektorów ekspresyjnych z serii pMCSG

Na tym etapie badań wybrano trzy wektory z serii pMCSG: pMCSG9, pMCSG48 oraz pMCSG68, różniące się obecnością sekwencji kodujących białka wspierających proces produkcji białek (Tabela 3.2). Wektor pMCSG9 zawiera gen kodujący białko MBP (z ang. *mannose-binding protein*), a wektor pMCSG – gen kodujący białko NusA, natomiast pMCSG68 nie zawiera dodatkowych genów wspierających powyższy proces. Każdy z tych wektorów ekspresyjnych jest wyposażony w sekwencję kodującą znacznik HisTag, który odgrywa kluczową rolę w dalszych etapach oczyszczania białek oraz sekwencje umożliwiające klonowanie oparte o technikę klonowania niezależnego od ligacji (ang. *Ligation Independent Cloning*, LIC).

Aby uzyskać odpowiednią ilość wektorów ekspresyjnych pMCSG przeprowadzono transformację i hodowlę bakterii *E. coli* oraz wykonano izolację plazmidów (Rozdział 3.2.3). W wyniku izolacji uzyskano wektory z serii pMCSG, a stężenia oraz stosunki $A_{260/280}$ i $A_{260/230}$ przedstawiono w Tabela 4.9. Uzyskane pomiary potwierdziły dobrą jakość preparatów.

Tabela 4.9 Wyniki pomiarów stężeń DNA oraz ich oceny jakości metodą absorpcji światła o długości fali 260 nm

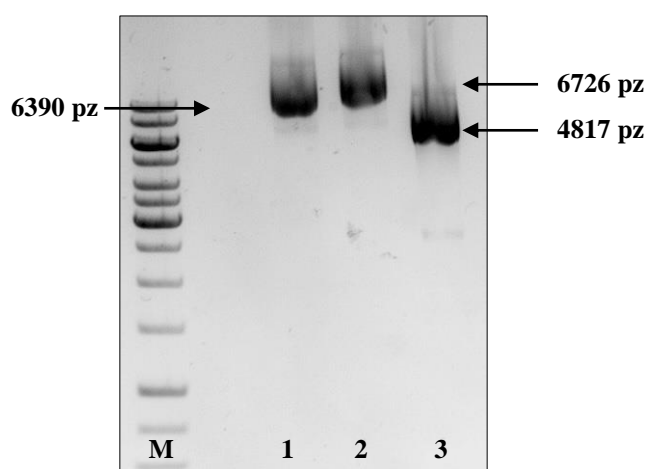
Produkt izolacji DNA	Stężenie DNA [ng/μl]	Stosunek $A_{260/280}$	Stosunek $A_{260/230}$
pMCSG9	291	1,7	2,32
pMCSG48	314	1,71	2,31
pMCSG68	281	1,69	2,29

Do przeprowadzenia LIC należało uzyskać liniową formę wektorów pMCSG poprzez trawienie enzymem restrykcyjnym SspI (Rozdział 3.2.1.4). W wyniku oczyszczania preparatów po trawieniu uzyskano wektory pMCSG, a stężenia oraz stosunki $A_{260/280}$ i $A_{260/230}$ przedstawiono w Tabela 4.10. Uzyskane pomiary potwierdziły dobrą jakość preparatów.

Tabela 4.10 Wyniki pomiarów stężeń DNA oraz ich oceny jakości metodą absorpcji światła o długości fali 260 nm

Produkt izolacji DNA	Stężenie DNA [ng/ μ l]	Stosunek $A_{260/280}$	Stosunek $A_{260/230}$
pMCSG9	190	1,78	2,1
pMCSG48	222,5	1,81	2,1
pMCSG68	180,5	1,8	1,9

Uzyskany produkt analizowano dodatkowo poprzez rozdział elektroforetyczny (Rozdział 3.2.13) (Rycina 4.4).

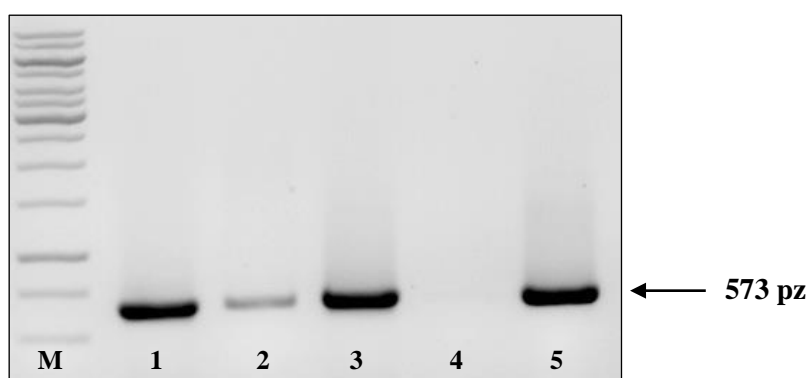


Rycina 4.4. Wynik rozdziału elektroforetycznego DNA zawierającego liniowe formy wektorów z serii pMCSG uzyskanych w wyniku trawienia enzymem restrykcyjnym SspI. Cyframi oznaczono: 1 – liniowa forma wektora pMCSG9 (6390 pz); 2 – liniowa forma wektora pMCSG48 (6726 pz), 3 – liniowa forma wektora pMCSG68 (4817 pz) oraz M – wzorzec masy DNA. Strzałkami oznaczono prążki wraz z odpowiadającymi im wielkościami (pz).

4.3.3. Niezależne od ligacji klonowanie do wektorów ekspresyjnych z serii pMCSG

Wykonano hybrydyzację insertów zawierających sekwencję kodującą białko BA.OspC_N Δ 19 do wektorów pMCSG9, pMCSG48 oraz pMCSG68 według opisu przedstawionego w Rozdziale 3.2.1.5. Schemat przygotowania mieszanin reakcyjnych przedstawiono w Tabeli 3.8. Otrzymane produkty LIC wykorzystywano do transformacji bakterii *E. coli* (Rozdział 3.2.2). Następnie wykonano posiewy stransformowanych komórek bakteryjnych na szalki z zestaloną pożywką LB zawierającą antybiotyk selekcyjny (ampicylinę).

Wstępną weryfikację otrzymanych plazmidów przeprowadzono z wykorzystaniem reakcji PCR (Rozdział 3.2.4) Uzyskane produkty reakcji PCR analizowano poprzez rozdział elektroforetyczny (Rozdział 3.2.13) (Rycina 4.5). Obserwowano produkty wielkości około 600 pz – odpowiadające wielkości sekwencji kodującej białko BA.OspC_NΔ19 (573 pz). Na podstawie uzyskanych wyników przeprowadzono selekcję poprawnie skonstruowanych plazmidów: pMCSG9-BA.OspC_NΔ19, pMCSG48-BA.OspC_NΔ19 oraz pMCSG68-BA.OspC_NΔ19 zawierających właściwe inserty.



Rycina 4.5. Wynik rozdziału elektroforetycznego DNA zawierającego sekwencję kodującą białko BA.OspC_NΔ19. Cyframi oznaczono: 1-2 – sekwencje kodujące białko BA.OspC_NΔ19 w wektorze pMCSG9, 3-4 – sekwencje kodujące białko BA.OspC_NΔ19 w wektorze pMCSG48, 5 – sekwencja kodująca białko BA.OspC_NΔ19 w wektorze pMCSG68 oraz M – wzorzec masy DNA. Strzałkami oznaczono prążki wraz z odpowiadającymi im wielkościami (pz).

Poprawność sekwencji nukleotydowych utworzonych konstruktów potwierdzono poprzez reakcję sekwencjonowania. Do wykonania reakcji sekwencjonowania konieczne było wyizolowanie i oczyszczenie plazmidowego DNA (Rozdział 3.2.3) z wybranych kolonii bakteryjnych, w których potwierdzono obecność insertu kodującego białka BA.OspC_NΔ19 (Rycina 4.5). Następnie zmierzono stężenia preparatów, a wyniki stężeń oraz wartości stosunków $A_{260/280}$ oraz $A_{260/230}$ przedstawiono w Tabeli 4.11. Uzyskane pomiary potwierdziły dobrą jakość preparatów.

Tabela 4.11. Wyniki pomiarów stężeń plazmidowego DNA oraz ich oceny jakości metodą absorpcji światła o długości fali 260 nm

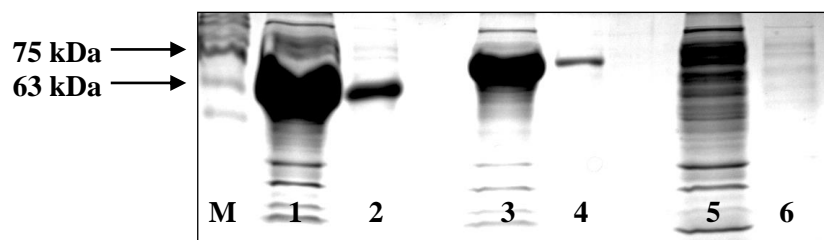
Produkt izolacji plazmidowego DNA	Stężenie DNA [ng/μl]	Stosunek A _{260/280}	Stosunek A _{260/230}
pMCSG9 - BA.OspC_NΔ19	76	1,78	1,97
pMCSG48 - BA.OspC_NΔ19	89	1,81	2,11
pMCSG68 - BA.OspC_NΔ19	87	1,79	2,1

Otrzymane wyniki reakcji sekwencjonowania analizowano przy użyciu programu BioEdit Sequence Alignment Editor, który umożliwił porównanie sekwencji nukleotydowych do sekwencji wyjściowej (referencyjnej). Wykonane analizy potwierdziły poprawność wklonowanych sekwencji kodujących białko BA.OspC_NΔ19 do wektorów pMCSG. Uzyskane konstrukty ekspresyjne wykorzystano do dalszych eksperymentów związanych z optymalizacją produkcji białka BA.OspC_NΔ19.

4.3.4. Optymalizacja protokołu produkcji białek OspC_NΔ19 w małej skali na przykładzie BA.OspC_NΔ19

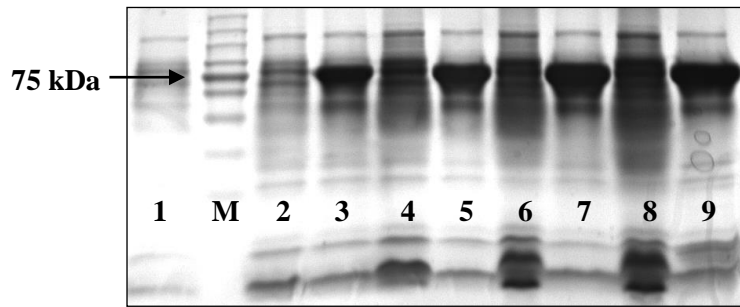
W celu doboru odpowiednich warunków produkcji białek OspC_NΔ19 wykonano szereg prac związanych z wyborem odpowiedniego wektora ekspresyjnego z serii pMCSG (pMCSG9, pMCSG48 oraz pMCSG68) (Tabela 3.2) oraz oszacowaniu wydajności ekspresji genu kodującego białko BA.OspC_NΔ19.

Białka OspC_NΔ19 produkowano w ekspresyjnym szczepie bakteryjnym One Shot BL21-Star (DE3) *E. coli*, który został transformowany plazmidami pMCSG9-BA.OspC_NΔ19, pMCSG48-BA.OspC_NΔ19 oraz pMCSG68-BA.OspC_NΔ19 (Rozdział 3.2.2). W pierwszym etapie produkcji białka heterologicznego wykonano testowe hodowle bakterii w małej skali (Rozdział 3.2.6.2). Aby utworzyć profil ekspresji genów kodujących białko BA.OspC_NΔ19 wyodrębniono dwie grupy hodowli bakterii: jedna poddana indukcji IPTG, druga kontrolna nieindukowana. Hodowle bakteryjne (indukowana i nieindukowana) prowadzono w tych samych warunkach temperaturowych (37°C) oraz czasowych (4 godziny). Dodatkowo po zakończeniu hodowli analizowano frakcje białek rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych (Rozdział 3.2.6.3).



Rycina 4.6. Wynik rozdzielania elektroforetycznego białek BA.OspC_NΔ19 wyprodukowanych z wykorzystaniem różnych wektorów ekspresyjnych z serii pMCSG. Cyframi oznaczono: 1 – Rozpuszczalna frakcja białka fuzyjnego BA.OspC_NΔ19-MBP-HisTag, 2 – nierozpuszczalna frakcja białka fuzyjnego BA.OspC_NΔ19-MBP-HisTag, 3 – Rozpuszczalna frakcja białka fuzyjnego BA.OspC_NΔ19-NusA-HisTag, 4 – nierozpuszczalna frakcja białka fuzyjnego BA.OspC_NΔ19-NusA-HisTag, 5 – Rozpuszczalna frakcja białka fuzyjnego BA.OspC_NΔ19-HisTag, 6 – nierozpuszczalna frakcja białka fuzyjnego BA.OspC_NΔ19-HisTag oraz M – wzorzec masy. Strzałkami oznaczono określone prążki wraz z odpowiadającymi im wielkościami (kDa).

W celu zobrazowania wyników analizy rozpuszczalności białek fuzyjnych BA.OspC_NΔ19-MBP-HisTag, BA.OspC_NΔ19-NusA-HisTag oraz BA.OspC_NΔ19-HisTag, przeprowadzono rozdzielanie elektroforetyczne (Rozdział 3.2.14). Wyniki analiz (Rycina 4.6) wskazały, że w trakcie eksperymentu powstały rozpuszczalne białka fuzyjne: BA.OspC_NΔ19-MBP-HisTag oraz BA.OspC_NΔ19-NusA-HisTag. Dodatkowo zaobserwowano, że nieznaczna część białek fuzyjnych BA.OspC_NΔ19-MBP-HisTag oraz BA.OspC_NΔ19-NusA-HisTag produkowana jest we frakcji nierozpuszczalnej. Natomiast plazmid pMCSG68 nie pozwala na wydajną ekspresję sekwencji kodującej białko BA.OspC_NΔ19.



Rycina 4.7. Wynik rozdziału elektroforetycznego białka fuzyjnego OspC_NΔ19BA-NusA-HisTag produkowanego w bakteriach *E. coli* poddawanych indukcji IPTG oraz niepoddawanych indukcji IPTG (warunki kontrolne). Cyframi oznaczono próby badane oraz kontrolne: 1 – próba kontrolna – analiza hodowli bakterii *E. coli* po osiągnięciu OD₆₀₀ przed indukcją i właściwą hodowlą 4-godzinną, 2 – analiza po 1 godzinie hodowli bakterii nieindukowanych IPTG (kontrola), 3 – analiza po 1 godzinie hodowli bakterii indukowanych IPTG, 4 – analiza po 2 godzinach hodowli bakterii indukowanych IPTG, 5 – analiza po 2 godzinach hodowli bakterii indukowanych IPTG, 6 – analiza po 3 godzinach hodowli bakterii indukowanych IPTG, 7 – analiza po 3 godzinach hodowli bakterii indukowanych IPTG, 8 – analiza po 4 godzinach hodowli bakterii indukowanych IPTG, 9 – analiza po 4 godzinach hodowli bakterii indukowanych IPTG oraz M – wzorzec masy. Strzałką oznaczono prążek wraz z odpowiadającą mu wielkością (kDa).

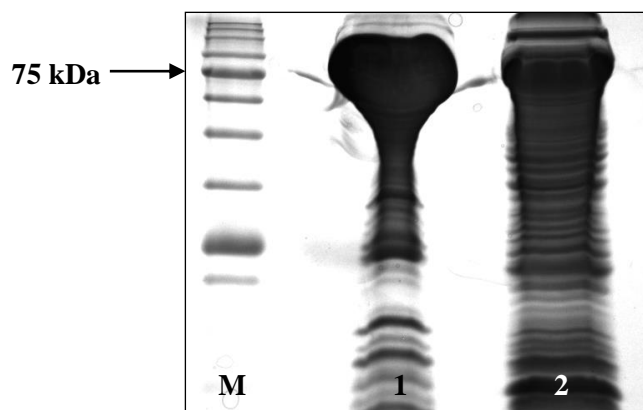
Na podstawie uzyskanych wyników zdecydowano, że dalsze prace będą prowadzone z zastosowaniem wektora pMCSG48, który umożliwia wydajną produkcję białka fuzyjnego BA.OspC_NΔ19-NusA-HisTag we frakcji rozpuszczalnej. Choć wektor pMCSG9 również pozwalał na produkcję białka BA.OspC_NΔ19, to jednak w porównaniu do wektora pMCSG48 większa część białka była obecna we frakcji nierozpuszczalnej.

W celu zobrazowania profilu ekspresji sekwencji kodującej białko BA.OspC_NΔ19-NusA-HisTag w czasie, przeprowadzono rozdzielanie elektroforetyczne otrzymanych białek po 1-, 2-, 3- i 4-godzinnej hodowli bakterii (Rozdział 3.2.14). Stwierdzono, że w wyniku indukcji hodowli bakteryjnych czynnikiem IPTG dochodzi do produkcji białka fuzyjnego BA.OspC_NΔ19-NusA-HisTag, a wraz z upływem czasu ilość produkowanego białka ulega zwiększeniu (Rycina 4.7). W przypadku prób pochodzących z nieindukowanych hodowli bakteryjnych, nie zaobserwowano charakterystycznego produktu, który wskazywałby na obecność badanego białka. W dodatku próby nieindukowane charakteryzowały się wysokim podobieństwem do próby kontrolnej (bakterie przed indukcją).

4.3.5. Zwiększenie skali produkcji i oczyszczania białek OspC_NΔ19 na przykładzie BA.OspC_NΔ19

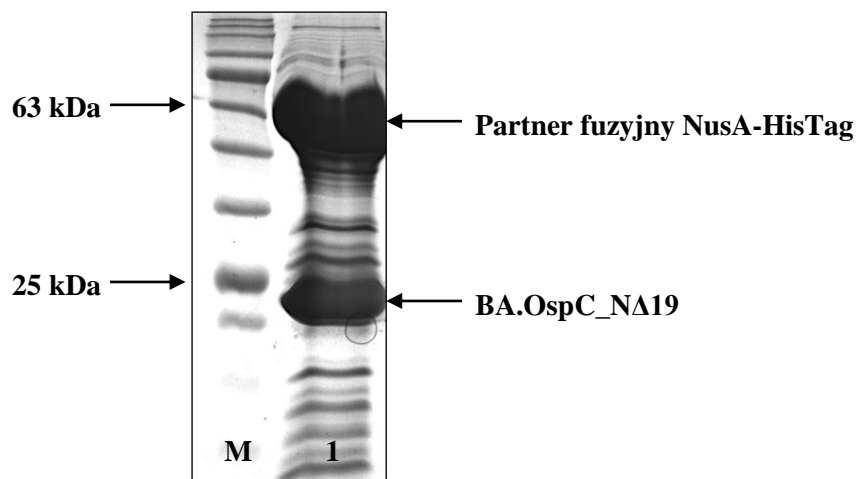
Po wstępnej optymalizacji warunków hodowli bakterii One Shot BL21-Star (DE3) *E. coli* transformowanych plazmidem pMCSG48-BA.OspC_NΔ19 w małej skali, zwiększono skalę hodowli bakterii, aby zintensyfikować produkcję białka BA.OspC_NΔ19. Hodowle bakteryjne przeprowadzono w 1 litrze pożywki, stosując dwie różne strategie. Początkowo hodowlę bakterii prowadzono w temperaturze 37°C, aż do osiągnięcia logarytmicznej fazy wzrostu (wartość OD₆₀₀ pomiędzy 0,6-0,8). Następnie dodawano IPTG jako czynnik indukujący ekspresję i kontynuowano hodowlę przez 4 godziny w temperaturze 37°C. W alternatywnej strategii, przed indukcją IPTG schładzano hodowlę do 18°C, następnie dodawano IPTG i kontynuowano hodowlę przez 16 godzin w temperaturze 18°C. Po zakończeniu obu typów hodowli zawiesinę bakterii odwirowano, a pożywkę dekantowano. Analiza rozpuszczalności białek (Rozdział 3.2.6.3) wykazała, że najwydajniejsza produkcja białka BA.OspC_NΔ19 miała miejsce przy zastosowaniu drugiej strategii: hodowla przez 16 godzin w 18°C. Wyselekcjonowane powyżej warunki hodowli zostały następnie zastosowane w kolejnych etapach badań, obejmujących produkcję białek OspC_NΔ19 pochodzących z pozostałych szczepów *Borrelia* (BB.OspC_NΔ19, BG.OspC_NΔ19, BS.OspC_NΔ19).

Aby wyizolować białka OspC_NΔ19 postępowano zgodnie z procedurą opisaną w Rozdziale 3.2.6.5. Proces oczyszczania preparatów białkowych prowadzono metodą chromatografii powinowactwa do złoża z unieruchomionymi jonami niklu (INiAC), której kluczowym etapem było związanie białka wyposażonego w znacznik HisTag do złoża niklowego Ni-NTA. W celu zmaksymalizowania wiązania białka do złoża, kilkukrotnie (dziewięciokrotnie) przepuszczano przez nie lizat bakteryjny. Jakość uzyskanego białka fuzyjnego (BA.OspC_NΔ19-NusA-HisTag) oceniono za pomocą rozdziału elektroforetycznego (Rozdział 3.2.14). We frakcji eluowanej 400 mM imidazolem (Rycina 4.8) zaobserwowano produkt o masie około 80 kDa, co potwierdziło obecność białka BA.OspC_NΔ19 połączonego z partnerem fuzyjnym (NusA oraz HisTag). Nie stwierdzono obecności znaczących ilości białka fuzyjnego we frakcji pochodzącej z przepłukiwania kolumny buforem, co sugeruje, że wielokrotne przepłukiwanie złoża niklowego lizatem skutecznie umożliwia związanie się białka fuzyjnego do złoża.



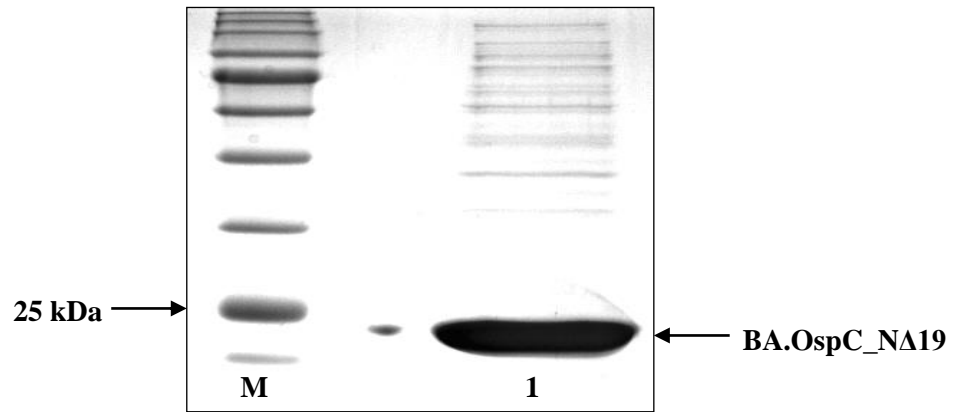
Rycina 4.8. Wynik rozdziału elektroforetycznego preparatów białkowych otrzymanych po oczyszczeniu białka fuzyjnego OspC_Δ19BA-NusA-HisTag metodą chromatografii powinowactwa INiAC. Cyframi oznaczono badane próby badane: 1 – białko fuzyjne OspC_Δ19BA-NusA eluowane 400 mM imidazolem, 2 – lizat zawierający ekstrakt białek (otrzymany po izolacji z komórek bakteryjnych) przesączony przez kolumnę chromatograficzną oraz M – wzorzec masy. Strzałką oznaczono określony prążek wraz z odpowiadającą mu wielkością (kDa).

Oddzielenie białka BA.OspC_Δ19 od partnera fuzyjnego NusA-HisTag wykonano poprzez trawienie proteolityczne z wykorzystaniem proteazy TEV (ang. *Tobacco Etch Virus*), która rozpoznaje specyficzną sekwencję aminokwasów ENLYFQS. Obecność tej sekwencji w białkach fuzyjnych umożliwia skuteczne odcięcie białka BA.OspC_Δ19 od NusA-HisTag. Trawienie proteolityczne prowadzono podczas dializy, której celem była wymiana buforu wymywającego o stężeniu imidazolu 400 mM na bufor o końcowym stężeniu imidazolu 20 mM (Rozdział 3.2.6.5). Po ukończonej dializie (16 godzin, 4°C), połączonej z trawieniem proteolitycznym, jakość preparatu oceniono za pomocą elektroforezy (Rozdział 3.2.14). Otrzymane wyniki potwierdziły obecność białka BA.OspC_Δ19 w badanej próbce (Rycina 4.9).



Rycina 4.9. Wynik rozdziału elektroforetycznego preparatu białkowego otrzymanego w wyniku hydrolizy proteolitycznej białka fuzyjnego OspC_NΔ19BA-NusA-HisTag proteazą TEV. Cyfrą oznaczono: 1 – białko fuzyjne OspC_NΔ19BA-NusA poddane trawieniu proteolitycznemu proteazą TEV oraz M – wzorzec masy. Strzałkami oznaczono określone prążki wraz z odpowiadającymi im wielkościami (kDa).

Po przeprowadzeniu trawienia proteolitycznego oraz dializy, zgodnie z wcześniejszymi etapami, konieczne było ponowne zastosowanie chromatografii powinowactwa INiAC w celu oczyszczenia białka BA.OspC_NΔ19 oraz oddzielenia go od proteazy TEV i partnera fuzyjnego (NusA i HisTag) (Rozdział 3.2.6.5). Jakość i homogenność uzyskanego preparatu oceniono za pomocą elektroforezy (Rozdział 3.2.14). Otrzymane wyniki potwierdziły obecność białka BA.OspC_NΔ19 w badanej próbce (Rycina 4.10). Ze względu na obecność niespecyficznych zanieczyszczeń białkowych w preparacie po chromatografii powinowactwa INiAC, wprowadzono dodatkowy etap oczyszczania preparatu poprzez sączenie molekularne. Etap ten umożliwił otrzymanie homogennego i rozpuszczalnego białka BA.OspC_NΔ19.

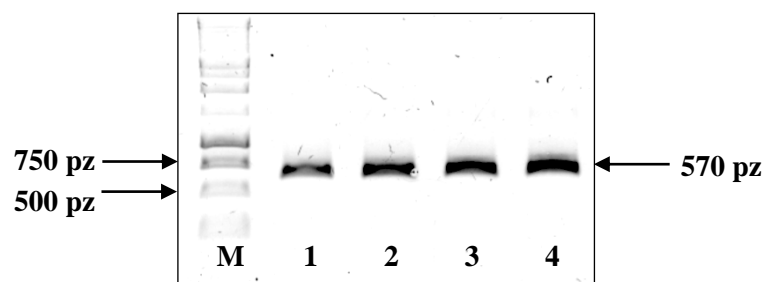


Rycina 4.10. Wynik rozdziału elektroforetycznego preparatu białkowego otrzymanego po oczyszczeniu białka BA.OspC_NΔ19 i oddzieleniu od frakcji białek fuzyjnych (NusA-HisTag) metodą chromatografii powinowactwa INiAC. Cyfrą oznaczono: 1 – białko fuzyjne OspC_NΔ19BA-NusA poddane trawieniu proteolitycznemu proteazą TEV oraz M – wzorzec masy. Strzałkami oznaczono określone prążki wraz z odpowiadającymi im wielkościami (kDa).

4.4. Konstrukcja wektorów do produkcji białek OspC_NΔ19 oraz OspC_NΔ35-37 w bakteryjnym systemie ekspresyjnym

4.4.1. Amplifikacja sekwencji kodującej białka OspC_NΔ19 metodą PCR

Kolejnym etapem badań eksperymentalnych było przygotowanie elementów składowych konstruktów genetycznych kodujących białka OspC_NΔ19 z poszczególnych gatunków *Borrelia* s.l.: *B. afzelii*, *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* oraz *B. spielmanii* (BA.OspC_NΔ19, BB.OspC_NΔ19, BG.OspC_NΔ19, BS.OspC_NΔ19). Przeprowadzono syntezę cDNA kodującego białka OspC_NΔ19 metodą PCR według opisu przedstawionego w Tabeli 3.3 oraz Tabeli 3.4. Jako matrycę wykorzystano wcześniej przygotowane wektory zawierające sekwencje kodujące pełnej długości białka OspC: pET200-BA.OspC, pET200-BB.OspC, pET200-BG.OspC oraz pCRTM2.1-TOPO[®]-BS.OspC. Za pomocą narzędzia bioinformatycznego *Primer Design* (https://bioinformatics.anl.gov/cgi-bin/tools/primer_design.pl) zaprojektowano startery (Tabela 3.1) zawierające sekwencje flankujące LIC do wektorów ekspresyjnych z serii pMCSG (Tabela 3.2). Aby określić optymalną temperaturę przyłączania starterów (hybrydyzacji) prowadzono ten etap reakcji PCR w gradiencie temperatury w zakresie 58-68°C. Wykazano, że odpowiednie warunki temperaturowe hybrydyzacji starterów to 62°C, dlatego kolejne reakcje PCR wykonywano w tych warunkach (Rozdział 3.2.1.1). Uzyskane produkty reakcji PCR analizowano poprzez rozdział elektroforetyczny DNA (Rozdział 3.2.13) (Rycina 4.11). Obserwowano produkty wielkości około 600 pz – odpowiadające wielkościom sekwencji kodujących białka OspC_NΔ19: 573 pz (BA.OspC_NΔ19 oraz BG.OspC_NΔ19), 579 pz (BB.OspC_NΔ19) oraz 582 pz (BS.OspC_NΔ19).



Rycina 4.11. Wynik rozdziału elektroforetycznego DNA zawierającego sekwencje kodujące (cDNA) białka OspC_NΔ19 namnożone metodą PCR. Cyframi oznaczono: 1 – cDNA kodujące białko BA.OspC_NΔ19, 2 – cDNA kodujące białko BB.OspC_NΔ19, 3 – cDNA kodujące białko BG.OspC_NΔ19, 4 – cDNA kodujące białko BS.OspC_NΔ19 oraz M – wzorzec masy DNA. Strzałkami oznaczono określone prążki wraz z odpowiadającymi im wielkościami (pz).

Po uzyskaniu produktów PCR charakteryzujących się prawidłową wielkością oraz brakiem zanieczyszczeń niespecyficznymi produktami wykonano oczyszczanie fragmentów DNA (Rozdział 3.2.1.2). Następnie mierzono stężenie preparatów, a wyniki tych pomiarów umieszczono w Tabeli 4.12.

Tabela 4.12. Wyniki pomiarów stężeń DNA oraz ich oceny jakości metodą absorpcji światła o długości fali 260 nm

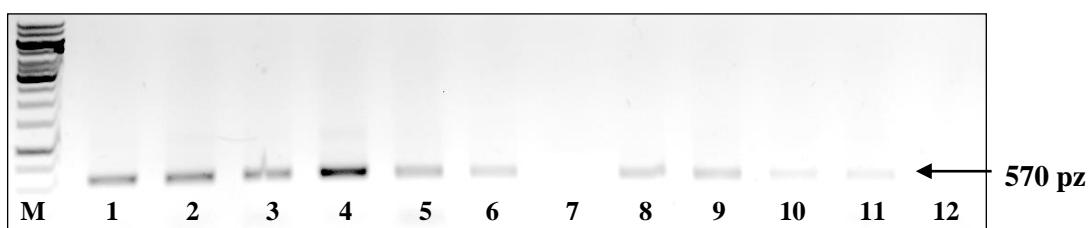
Produkt reakcji PCR	Stężenie DNA [ng/μl]	Stosunek A _{260/280}	Stosunek A _{260/230}
cDNA - BA.OspC_NΔ19	91,5	1,71	2,11
cDNA - BB.OspC_NΔ19	97	1,7	2,23
cDNA - BG.OspC_NΔ19	104	1,78	2,21
cDNA - BS.OspC_NΔ19	121,3	1,8	2,18

4.4.2. Niezależne od ligacji klonowanie do wektora ekspresyjnego pMCSG48

W celu uzyskania konstruktów genetycznych umożliwiających wydajną produkcję białek OspC_NΔ19 wykonano LIC, które umożliwiło wprowadzenie sekwencji kodujących badane warianty delecyjne białek OspC (BA.OspC_NΔ19, BB.OspC_NΔ19, BG.OspC_NΔ19, BS.OspC_NΔ19) do wektora pMCSG48. Schemat przygotowania mieszanin reakcyjnych przedstawiono w Tabeli 3.8, a reakcję LIC prowadzono według opisu przedstawionego w Rozdziale 3.2.1.5.

Otrzymane produkty ligacji wykorzystywano do transformacji bakterii *E. coli* (Rozdział 3.2.2). Następnie wykonano posiewy transformowanych komórek bakteryjnych na szalki z zestaloną pożywką LB zawierającą antybiotyk selekcyjny (ampicylinę).

Wstępną weryfikację otrzymanych plazmidów przeprowadzono z wykorzystaniem reakcji PCR (Rozdział 3.2.4). Uzyskane produkty reakcji PCR analizowano poprzez rozdział elektroforetyczny (Rozdział 3.2.13) (Rycina 4.12). Obserwowano produkty wielkości około 600 pz – odpowiadające wielkościom sekwencji kodujących białka OspC_NΔ19: 573 pz (BA.OspC_NΔ19 oraz BG.OspC_NΔ19), 579 pz (BB.OspC_NΔ19) oraz 582 pz (BS.OspC_NΔ19). Na podstawie uzyskanych wyników przeprowadzono selekcję poprawnie skonstruowanych plazmidów pMCSG48 zawierających właściwe inserty (Rycina 4.12).



Rycina 4.12. Wynik rozdziału elektroforetycznego DNA zawierającego sekwencje kodujące białka OspC_NΔ19. Cyframi oznaczono: 1-3 – sekwencje kodujące białko BA.OspC_NΔ19, 4-6 – sekwencje kodujące białko BB.OspC_NΔ19, 7-9 – sekwencje kodujące białko BG.OspC_NΔ19, 10-12 – sekwencje kodujące białko BS.OspC_NΔ19 oraz M – wzorzec masy DNA. Strzałką oznaczono prążek wraz z odpowiadającą mu wielkościami (pz).

Poprawność sekwencji nukleotydowych utworzonych konstruktów potwierdzono poprzez reakcję sekwencjonowania. Do wykonania reakcji sekwencjonowania konieczne było wyizolowanie i oczyszczenie plazmidowego DNA (Rozdział 3.2.3) z wybranych kolonii bakteryjnych, w których potwierdzono obecność insertu kodującego białka OspC_NΔ19 (Rycina 4.12). Następnie zmierzono stężenie preparatów, a otrzymane wyniki umieszczono w Tabeli 4.13. Uzyskane wartości stosunków $A_{260/280}$ oraz $A_{260/230}$ wskazują na dobrą jakość preparatów.

Tabela 4.13. Wyniki pomiarów stężeń plazmidowego DNA oraz ich oceny jakości metodą absorpcji światła o długości fali 260 nm

Produkt izolacji plazmidowego DNA	Stężenie DNA [ng/μl]	Stosunek A_{260/280}	Stosunek A_{260/230}
pMCSG48 - BA.OspC_NΔ19	82	1,9	2,2
pMCSG48 - BB.OspC_NΔ19	71	1,87	2,19
pMCSG48 - BG.OspC_NΔ19	74,5	1,91	2,1
pMCSG48 - BS.OspC_NΔ19	103,1	1,92	2,3

Otrzymane wyniki reakcji sekwencjonowania analizowano przy użyciu programu BioEdit Sequence Alignment Editor, który umożliwił porównanie sekwencji nukleotydowych do sekwencji wyjściowych (referencyjnych). Wykonane analizy potwierdziły poprawność wklonowanych sekwencji kodujących badane białka OspC_NΔ19 (Tabela 4.14) do wektora pMCSG48. Uzyskane konstrukty ekspresyjne wykorzystano do dalszych eksperymentów związanych z produkcją białek OspC_NΔ19.

Tabela 4.14. Sekwencje nukleotydowe kodujące białka OspC_NΔ19 uzyskane w wyniku sekwencjonowania 5' → 3'

Rodzaj białka OspC__NΔ19	Sekwencje nukleotydowe kodujące białka OspC_NΔ19
BA.OspC_NΔ19 (573 pz)*	<p>AATAATTCAGGGAAAGGTGGGGATATTGCATCTACTAATCCTGATGAG TCTGCGAAAGGACCTAATCTTACAGAAATAAGCAAAAAAATTACAGAT TCCAATGCAGTTGTAAGTACTAGCTGTGAAAGAAGTTGAGGCTTTGCTTTCAT CTATAGATGAACTTGCTAAAACCTATTGGTAAAAAATAGAGGCAAATG GTTTGGGTAACGAAGCGGATAAAAACGGATCATTATTAGCAGGAGCCT ATGCAATATCAACCCTAATAAAAACAAAAATTAGATGGATTGAAAGGTC TAGAAGGATTAATAAAGAAATTGCGGAGGCCAAGAAATGTTCCGAA GCATTTACTAAAAAGCTACAAGATAGTAACGCAGATCTTGAAAAACAT AATGCTACTGATGCTGATTTCGAAAGAAGCAATTTGAAAAACAAATGGG ACTAAAACCTAAGGGTGCTAAAGAAGCTTGAAGAGTTGTTTAAATCAGTA GAAAGCTTGTCAAAGCAGCTAAAGAAGCATTAAAGTAATTCAGTTAAA GAGCTTACAAGCCCTGTTGTAGCAGAAAGTCCAAAAAACCTTAA</p>
BB.OspC_NΔ19 (579 pz)*	<p>AATAATTCAGGAAAAGATGGGAATACATCTGCAAATTCTGCTGATGAG TCTGTAAAGGGCCTAATCTTACAGAAATAAGTAAAAAATTACGGAT TCTAATGCGGTTTTACTTGCTGTGAAAGAGGTTGAAGCGTTGCTGTGCAT CTATAGATGAGCTTGCTAAAAGCTATTGGTAAAAAATAAAAAACGATG GTAGTTTAGGTGATGAAGCAAATCACACGAGTCATTGTTAGCAGGAG CTTATACAATATCAACCTTAATAACACAAAAATTAAGTAAATTAACG GATCAGAAGGTTTAAAGGAAAAGATTGCCGCAGCTAAGAAATGCTCTG AAGAGTTTAGTACTAAACTAAAAGATAATCATGCACAGCTTGGTATAC AGGGCGTTACTGATGAAAATGCAAAAAAAGCTATTTTAAAAGCAAATG CAGCGGGTAAAGATAAGGGCGTTGAAGAAGCTTGAAGAAGTTGTCCGGAT CATTAGAAAGCTTATCAAAGCAGCTAAAGAGATGCTTGCTAATTCAG TTAAAGAGCTTACAAGTCCTGTTGTGGCAGAAAGTCCAAAAAACCTT AA</p>
BG.OspC_NΔ19 (573 pz)*	<p>AATAATTCAGGTGGGGATACTGCATCTACTAATCCTGATGAATCTGTTA AGGGGCCTAATCTTACAGAAATAAGCAAAAAAATTACAGATTCTAATG CATTTGTAAGTGGCTGTGAAAGAAGTTGAGGCTTTGATCTCATCTATAGA TGAACCTTGCTAAAGCTATTGGTCAAAGAATACAACAAAAATGGTTTAGT TGCTGATGCGGGTCACAACAGCGCATTTGTTAGCAGGAGCCCATGAAAT ATCAATCCTAATAACACAAAAATTAGATGGATTAAAAGGTTTAGAAGG ATTAAGCAGAGATTGCAGAAGCTAAGAAATATTCTGAAGCATTAC TAAAAACTAAAAGATAATCATGCACAGCTTGGTATACAGAATGGTGC TTCTCTTGATGATGAGGCAAAAAAAGCTATTTTAAAACAAATGTGGA CAAAACCAAGGGTGCTGAAGAGCTTGAAGAAGTTATTTAAATCAGTAGA AAGCTTGTCAAAGCAGCGCAAGAAGCACTAACTAATTCAGTTAAAGA GCTTACAAATCCTGTTGTGGCAGAAAGTCCAAAAAACCTTAA</p>
BS.OspC_NΔ19 (582 pz)*	<p>AATAATTCAGGTGGGGATTCTACATCTACTAAGCCTGTTGATAAGCCTG CTAAGGGACCTAATCTTGCAGAAATAAGTAAAAAATTACAGATTCTA ACACATTTGTAAGTGGCTGTGAAAGAAGTTGAGACTTTGGTTTCATCTAT AGATGAGCTTGCTAAGAAAGCTATTGGCCAAAAAATAGATCAAATAG TGGTTTAAAGTGGCTTTACAGAGTCAAACCGGATCATTGTTAGCAGGAGT CTATGCAATATCAACTCTAATAACAGATAAATTGAGTAAATTGAAAA TTCAGAAGAATTAAGGGCGAAATTGCAAAGGCTAAGAAATGTTCCGA AGACTTTACTAATAAACTAAAGCTTAGTCACGCTGATCTTGAGGCGGT AAATGGTGCTACTACTGATGATCATGCAAAAGCGGCTATTTTAAAAC AAATGCGCCTGACGACAAGGGTGCTAAAGAATTTAAAGGTTTATTTGA ATCAGTAGAAAGCTTGTCAAAGCAGCTAAAGCAGCATTAGCCAATTC AGTTAAAGAGCTTACAAGTCCTGTTGCGGCAGAAAGTCCAAAAAACCT TTAA</p>

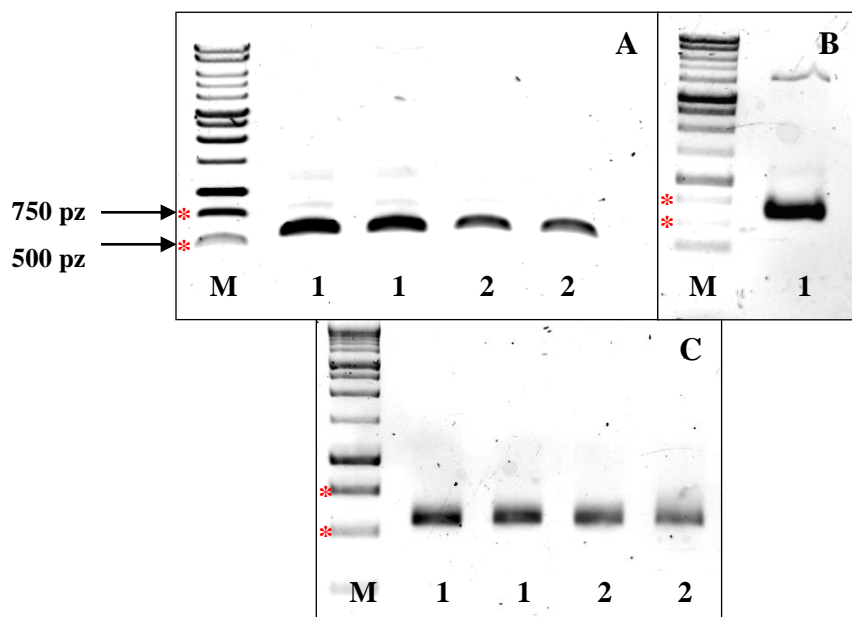
* w nawiasach podano długość sekwencji nukleotydowych (pz)

4.4.3. Przygotowanie konstruktów pMCSG48-OspC_N Δ35-37 do badań

krystalograficznych

Używając uzyskane białka OspC_NΔ19 przeprowadzono szereg testów krystalizacyjnych, które jednak nie przyniosły oczekiwanych rezultatów, ponieważ nie uzyskano białek w postaci krystalicznej. Opierając się na dostępnych danych w bazie PDB dotyczących dwóch struktur białka OspC z *B. burgdorferi* s. s. (PDB: 1GGQ i 1F1M) podjęto decyzję o utworzeniu kolejnych mutantów delecyjnych białek OspC pozbawionych 35-37 aminokwasów na końcu aminowym białka, w zależności od gatunku *Borrelia*.

Pierwszym krokiem było przygotowanie elementów składowych konstruktów genetycznych do produkcji białek OspC_NΔ35-37 z poszczególnych gatunków *Borrelia* s.l.: *B. afzelii*, *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* oraz *B. spielmanii* (BA.OspC_NΔ37, BB.OspC_NΔ37, BG.OspC_NΔ35, BG1.OspC_NΔ35, BS.OspC_NΔ36). W ramach tego etapu przeprowadzono syntezę sekwencji kodujących białka OspC_NΔ35-37 za pomocą reakcji PCR (Rozdział 3.1.1). Jako matrycę użyto wcześniej przygotowane wektory zawierające sekwencje kodujące pełnej długości białka OspC: pET200-BA.OspC, pET200-BB.OspC, pET200-BG.OspC, pCR[®]-XL-TOPO-BG1.OspC oraz pCR[™]2.1-TOPO[®]-BS.OspC. Za pomocą narzędzia bioinformatycznego Primer Desing zaprojektowano startery (Tabela 3.1) zawierające sekwencje flankujące umożliwiające niezależne od ligacji klonowania (LIC) do wektorów ekspresyjnych pMCSG48 (Tabela 3.2). Reakcje PCR prowadzono zgodnie z procedurą opisaną w Tabeli 3.3 oraz Tabeli 3.4. Podobnie jak w Rozdziale 4.4.1, wykazano, że optymalne warunki temperaturowe hybrydyzacji starterów to 62°C, dlatego kolejne reakcje PCR wykonywano w tych warunkach. Uzyskane produkty reakcji PCR analizowano poprzez rozdzielanie elektroforetyczne (Rozdział 3.2.13). Obserwowano produkty wielkości około 500 pz (Rycina 4.13) odpowiadające wielkościom sekwencji kodujących białka OspC_NΔ35-37.



Rycina 4.13. Wyniki rozdzielów elektroforetycznych DNA zawierającego sekwencje kodujące (cDNA) białka OspC_NΔ35-37 namnożone metodą PCR. A. Cyframi oznaczono: 1 – cDNA kodujące białko BA.OspC_NΔ37, 2 – cDNA kodujące białko BS.OspC_NΔ36. B. Cyfrą oznaczono: 1 – cDNA kodujące białko BB.OspC_NΔ37. C. Cyframi oznaczono: 1 – cDNA kodujące białko BG.OspC_NΔ35, 2 – cDNA kodujące białko BG1.OspC_NΔ35. M – wzorzec masy DNA. Strzałkami oraz czerwonymi gwiazdkami oznaczono określone prążki wraz z odpowiadającymi im wielkościami (pz).

Uzyskane produkty PCR oczyszczano (Rozdział 3.2.1.2), a następnie mierzono stężenie preparatów. Uzyskane wyniki przedstawiono w Tabeli 4.15. Analiza stosunków $A_{260/280}$ oraz $A_{260/230}$ wskazała na brak istotnych zanieczyszczeń.

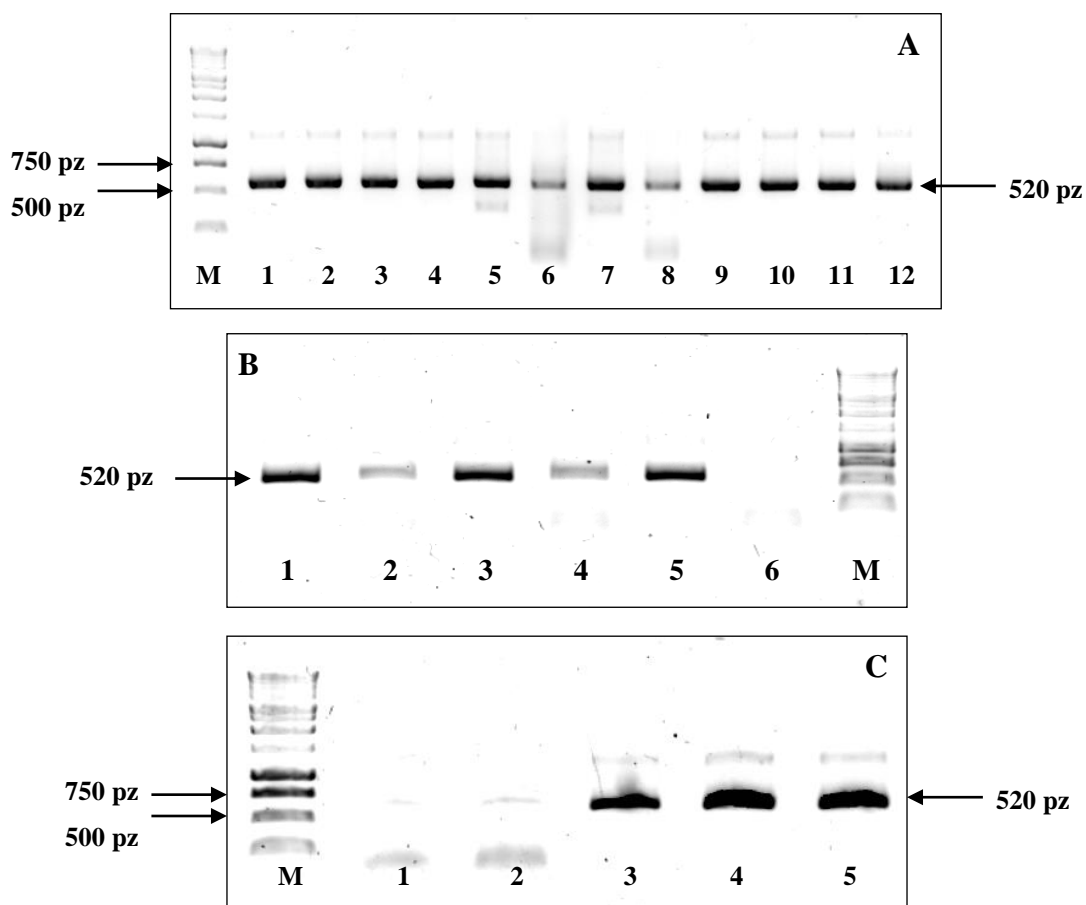
Tabela 4.15. Wyniki pomiarów stężeń cDNA oraz ich oceny jakości metodą absorpcji światła o długości fali 260 nm

Produkt reakcji PCR	Stężenie DNA [ng/μl]	Stosunek A _{260/280}	Stosunek A _{260/230}
cDNA - BA.OspC_NΔ37	110,5	1,91	2,5
cDNA - BB.OspC_NΔ37	89,5	1,86	2,3
cDNA - BG.OspC_NΔ35	79,9	1,9	2,2
cDNA - BG1.OspC_NΔ35	69,4	1,9	2,16
cDNA - BS.OspC_NΔ36	58,58	1,8	2,3

Na podstawie wcześniej opracowanego protokołu konstrukcji wektorów ekspresyjnych z serii pMCSG użytych do produkcji białek OspC_NΔ19 (Rozdział 4.3.3), przeprowadzono klonowanie LIC (Rozdział 3.2.1.6). Proces ten umożliwił wprowadzenie przygotowanych sekwencji kodujących białka OspC_NΔ35-37 do wektora pMCSG48.

Analogicznie do procedury opisanej w Rozdziale 4.3.5, otrzymane produkty ligacji wykorzystywano do transformacji bakterii *E. coli* (Rozdział 3.1.9). Następnie wykonano posiewy stransformowanych komórek bakteryjnych na szalki z zestaloną pożywką LB zawierającą antybiotyk selekcyjny (ampicylinę).

Wstępną weryfikację otrzymanych plazmidów przeprowadzono z wykorzystaniem reakcji PCR. Uzyskane produkty reakcji PCR analizowano poprzez rozdzielanie elektroforetyczne. Otrzymano produkty wielkości około 600 pz – odpowiadające analizowanym sekwencjom kodujących białka OspC_NΔ35-37. Na podstawie uzyskanych wyników przeprowadzono selekcję poprawnie skonstruowanych plazmidów pMCSG48 zawierających właściwe inserty. Poprawność sekwencji nukleotydowych utworzonych konstruktyw potwierdzono poprzez reakcję sekwencjonowania. Wyizolowano i oczyszczono plazmidowe DNA z wybranych klonów zawierających odpowiedni insert. Następnie mierzono stężenie preparatów, a otrzymane wyniki umieszczono w Tabeli 4.16. Uzyskane wartości stosunków A_{260/280} oraz A_{260/230} wskazują na dobrą jakość preparatów.



Rycina 4.14. Wyniki rozdzielów elektroforetycznych DNA zawierających sekwencje kodujące białka OspC_NΔ35-37. A. Cyframi oznaczono: 1-4 – sekwencje kodujące białko BA.OspC_NΔ37, 5-8 – sekwencje kodujące białko BB.OspC_NΔ37, 9-12 – sekwencje kodujące białko BG.OspC_NΔ35. **B.** Cyframi oznaczono: 1-6 – sekwencje kodujące białko BG1.OspC_NΔ35. **C.** Cyframi oznaczono: 1-5 – sekwencje kodujące białko BS.OspC_NΔ36. **M** – wzorzec masy DNA. Strzałkami oznaczono prążki wraz z odpowiadającymi im wielkościami (pz).

Tabela 4.16. Wyniki pomiarów stężeń plazmidowego DNA oraz ich oceny jakości metodą absorpcji światła o długości fali 260 nm

Produkt reakcji PCR	Stężenie DNA [ng/μl]	Stosunek A _{260/280}	Stosunek A _{260/230}
pMCSG48 - BA.OspC_Δ37	112	1,9	2,1
pMCSG48 - BB.OspC_Δ37	148,4	1,8	2,2
pMCSG48 - BG.OspC_Δ35	63	1,9	2,2
pMCSG48 - BG1.OspC_Δ35	62	1,85	2,1
pMCSG48 - BS.OspC_Δ36	193,6	1,89	2,3

Otrzymane wyniki reakcji sekwencjonowania analizowano za pomocą programu BioEdit Sequence Alignment Editor, co umożliwiło porównanie sekwencji nukleotydowych z sekwencjami referencyjnymi. Przeprowadzone analizy potwierdziły poprawność wklonowanych sekwencji kodujących białka OspC_Δ35-37 (Tabela 4.17) do wektora pMCSG48. W związku z tym wykonane konstrukty ekspresyjne zostały wykorzystane do dalszych eksperymentów związanych z produkcją białek OspC_Δ35-37.

Tabela 4.17. Sekwencje nukleotydowe kodujące białka OspC_NΔ35-37 uzyskane w wyniku sekwencjonowania 5' → 3'

Rodzaj białka OspC__NΔ35-37	Sekwencje nukleotydowe kodujące białka OspC_NΔ35-37
BA.OspC_NΔ37 (519 pz)*	AAAGGACCTAATCTTACAGAAATAAGCAAAAAAATTACAGATTCCAAT GCAGTTGACTAGCTGTGAAAGAAGTTGAGGCTTTGCTTTCATCTATAG ATGAACTTGCTAAAACCTATTGGTAAAAAAATAGAGGCAAATGGTTTGG GTAACGAAGCGGATAAAAACGGATCATTATTAGCAGGAGCCTATGCAA TATCAACCCTAATAAAAACAAAAATTAGATGGATTGAAAGGTCTAGAAG GATTAAATAAAGAAATTGCGGAGGCCAAGAAATGTTCCGAAGCATTTA CTAAAAAGCTACAAGATAGTAACGCAGATCTTGGAAAACATAATGCTA CTGATGCTGATTTCGAAAGAAGCAATTTTGAAAACAAATGGGACTAAAA CTAAGGGTGCTAAAGAACTTGAAGAGTTGTTTAAATCAGTAGAAAGCTT GTCAAAAGCAGCTAAAGAAGCATTAAAGTAATTCAGTTAAAGAGCTTAC AAGCCCTGTTGTAGCAGAAAGTCCAAAAAACCTTAA
BB.OspC_NΔ37 (525 pz)*	AAAGGGCCTAATCTTACAGAAATAAGTAAAAAAATTACGGATTCTAAT GCGGTTTACTTGCTGTGAAAGAGGTTGAAGCGTTGCTGTCATCTATAG ATGAGCTTGCTAAAGCTATTGGTAAAAAAATAAAAAACGATGGTAGTTT AGGTGATGAAGCAAATCACAACGAGTCATTGTTAGCAGGAGCTTATAC AATATCAACCTTAATAACACAAAAATTAAGTAAATTAACGGATCAGA AGGTTTAAAGGAAAAGATTGCCGCAGCTAAGAAATGCTCTGAAGAGTT TAGTACTAAACTAAAAGATAATCATGCACAGCTTGGTATACAGGGCGTT ACTGATGAAAATGCAAAAAAAGCTATTTTAAAAGCAAATGCAGCGGGT AAAGATAAGGGCGTTGAAGAAGTTGAAAAGTTGTCCGGATCATTAGAA AGCTTATCAAAAGCAGCTAAAGAGATGCTTGCTAATTCAGTTAAAGAGC TTACAAGTCCTGTTGTGGCAGAAAGTCCAAAAAACCTTAA
BG.OspC_NΔ35 (525 pz)*	AAGGGCCTAATCTTACAGAAATAAGCAAAAAAATTACAGATTCTAAT GCATTTGACTGGCTGTGAAAGAAGTTGAGGCTTTGATCTCATCTATAG ATGAACTTGCTAAAGCTATTGGTCAAAGAATACAACAAAATGGTTTAGT TGCTGATGCGGGTCACAACAGCGCATTGTTAGCAGGAGCCCATGAAATA TCAATCCTAATAACACAAAAATTAAGATGGATTAAGGTTTAGAAGGAT TAAAAGCAGAGATTGCAGAAGCTAAGAAATATTCTGAAGCATTACTA AAAACTAAAAGATAATCATGCACAGCTTGGTATACAGAATGGTGCTTC TCTTGATGATGAGGCAAAAAAAGCTATTTTAAAACAAATGTGGACAA AACCAAGGGTGCTGAAGAGCTTGAAGAAGTTATTTAAATCAGTAGAAAG CTTGTCAAAAGCAGCGCAAGAAGCACTAACTAATTCAGTTAAAGAGCTT ACAAATCCTGTTGTGGCAGAAAGTCCAAAAAACCTTAA

Rodzaj białka OspC_Δ35-37	Sekwencje nukleotydowe kodujące białka OspC_Δ35-37
BG1.OspC_Δ35 (531 pz)*	AAAGGACCTGATCTTACAGTAATAAGCAAAAAAATTACAGATTCTAATG CAGTTGACTGGCTGTGAAAGAAGTTGAAGCTTTGCTTTCATCTATAGA TGAAGCTTGCTAAAGCTATTGGTCAAAAAATAGATCGAAATAATGGTTTA GCTGTGCGAAGCGAATTTTAAACACCTCATTGTTAGCAGGAGCCTATACAA TATCAACCCTAATAACAAAAAAATTAGATGAATTGATCAAAAATTCAGG AGAATTAAGGAGAGAGTTGAAAAGGCTAAAACTGTTCTGAAGCATT TACTAATAAATTAAGAGAGACCCCAAGAAGCTTGCAGTGGCGGCTGG TGCTGCTACTGATATTGATGCAAAAAAAGCTATTTTAAAAACAAATAGG GACAAGGACCTAGGTGCTGATGAACTTGGCAAGTTATTTAAATCAGTAG AGAGCTTGTCAAAGCAGCGCAAGAAGCATCAGCTAATTCAGTTAAAG AGCTTACAAGCCCTGTTGTGGCAGAAAATCCAAAAAACCTTAA
BS.OspC_Δ36 (531 pz)*	AAGGGACCTAATCTTGCAGAAATAAGTAAAAAATTACAGATTCTAAC ACATTTGACTGGCTGTGAAAGAAGTTGAGACTTTGGTTTCATCTATAG ATGAGCTTGCTAAGAAAGCTATTGGCCAAAAAATAGATCAAAATAGTG GTTTAGGTGCTTTACAGAGTCAAACGGATCATTGTTAGCAGGAGTCTA TGCAATATCAACTCTAATAACAGATAAATTGAGTAAATTGAAAAATTCA GAAGAATTAAGGCGGAAATTGCAAAGGCTAAGAAATGTTCCGAAGAC TTTACTAATAAACTAAAGCTTAGTCACGCTGATCTTGGAGCGGTAAATG GTGCTACTACTGATGATCATGCAAAGCGGCTATTTAAAAACAAATGC GCCTGACGACAAGGGTGCTAAAGAATTTAAAGGTTTATTGAATCAGTA GAAAGCTTGTCAAAGCAGCTAAAGCAGCATTAGCCAATTCAGTTAAA GAGCTTACAAGTCCTGTTGCGGCAGAAAGTCCAAAAAACCTTAA

* w nawiasach podano długość sekwencji nukleotydowych (pz)

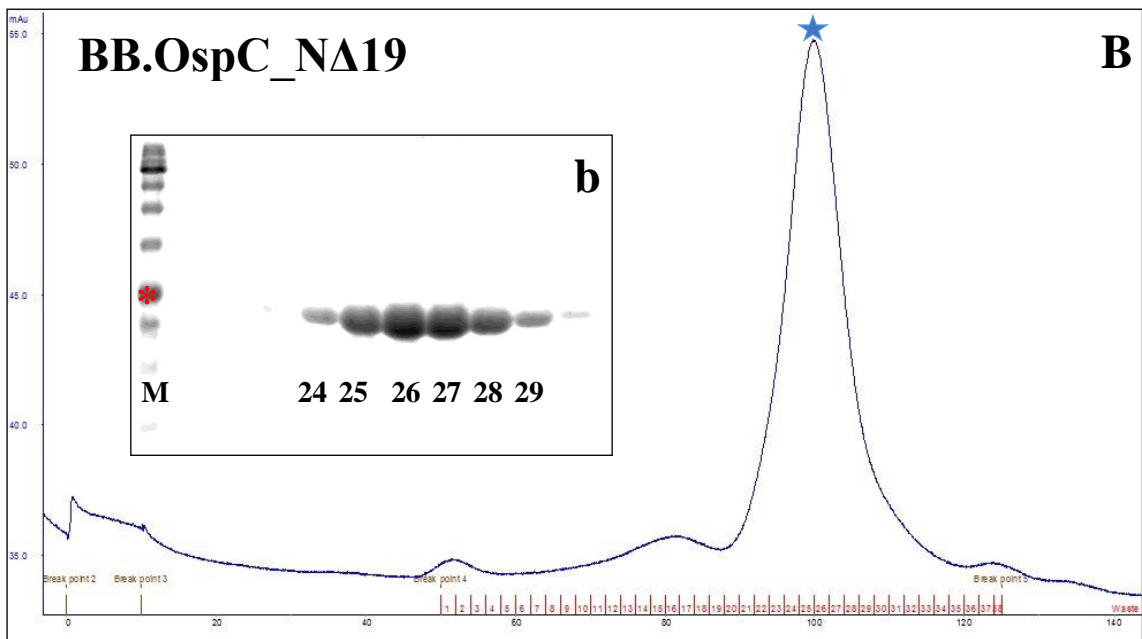
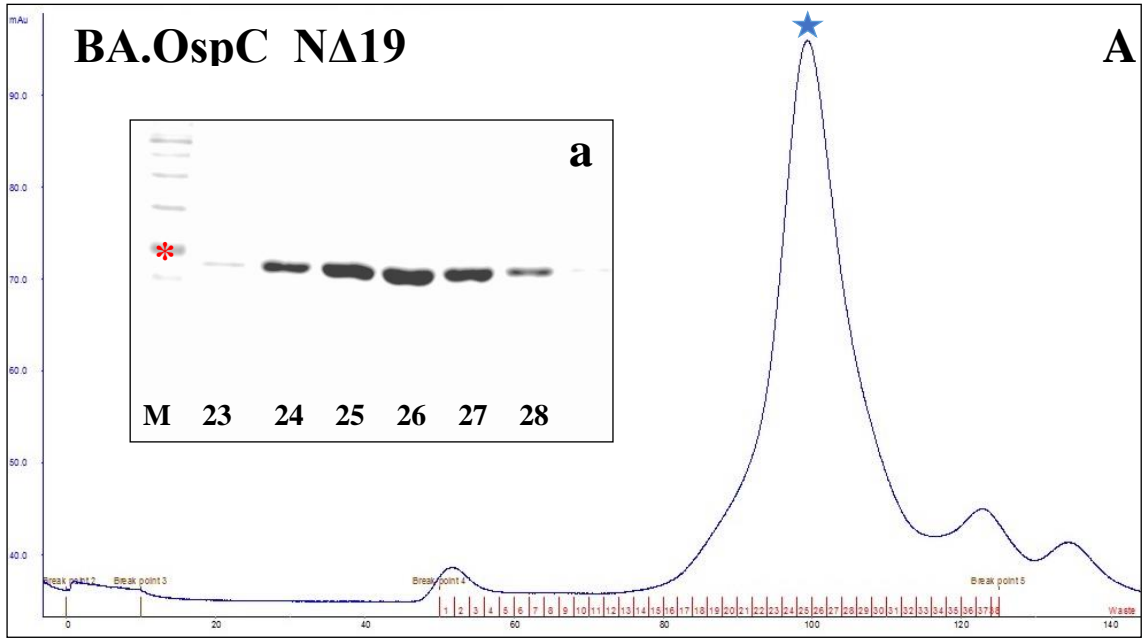
4.5. Produkcja białek OspC w systemie bakteryjnym

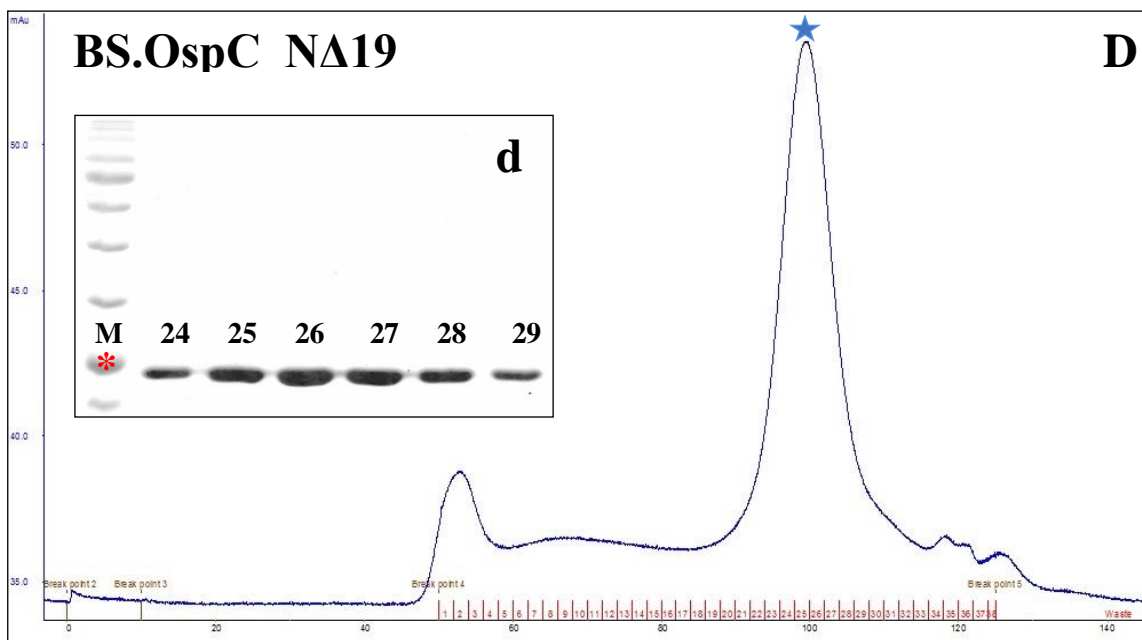
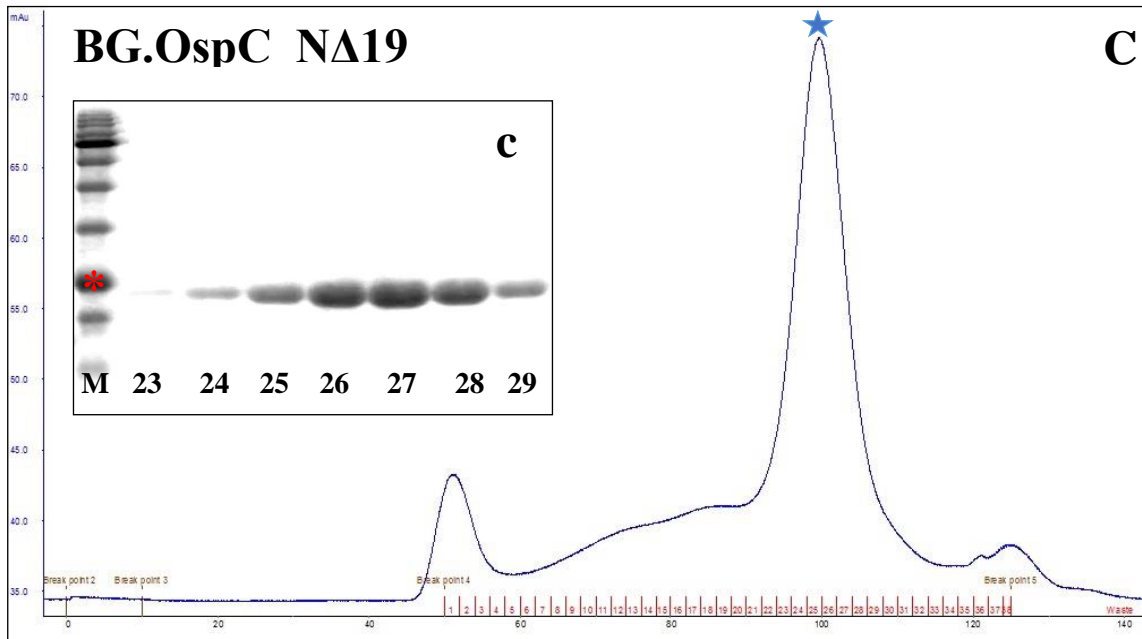
W poprzednich rozdziałach opisano wieloetapowy proces optymalizacji produkcji białka OspC_NΔ19 pochodzącego z *B. afzelii* (BA.OspC_NΔ19), na podstawie którego opracowano standardowy protokół produkcji wszystkich białek OspC (Rozdział 4.3). Dlatego w przypadku pozostałych wariantów białek OspC przedstawiono jedynie końcowe efekty otrzymywania preparatów białkowych na dużą skalę.

4.5.1. Produkcja i oczyszczanie białek OspC_NΔ19 według standardowej procedury

Hodowle bakterii One Shot BL21-Star (DE3) *E. coli* transformowanych plazmidami pMCSG48, kodującymi sekwencje białek BA.OspC_NΔ19, BB.OspC_NΔ19, BG.OspC_NΔ19 i BS.OspC_NΔ19, oraz proces oczyszczania tych białek przeprowadzono zgodnie z zoptymalizowanym protokołem opisanym powyżej (Rozdział 3.2.6.4).

Jakość uzyskanych preparatów białek OspC_NΔ19: BA.OspC_NΔ19, BB.OspC_NΔ19, BG.OspC_NΔ19 oraz BS.OspC_NΔ19, oceniono za pomocą rozdziałów elektroforetycznych (Rozdział 3.2.14). We frakcjach uzyskanych w wyniku sączenia molekularnego zaobserwowano produkty o masie około 20 kDa, co odpowiada przewidywanej masie badanych białek OspC_NΔ19. Ponadto brak niespecyficznych produktów wskazuje na wysoką jakość przygotowanych produktów białkowych (Rycina 4.15).

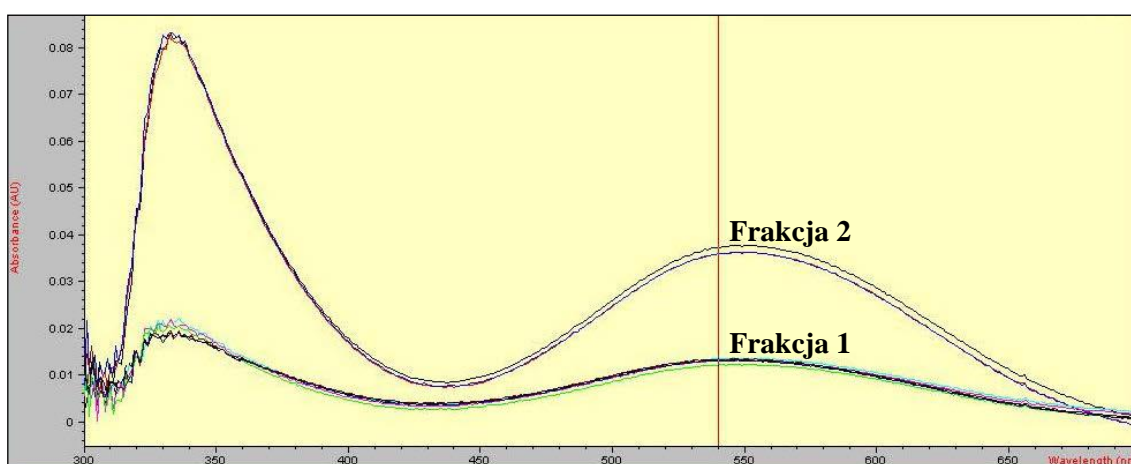




Rycina 4.15. Wyniki sączenia molekularnego (filtracji żelowej) białek OspC_ NΔ19. A-D. Chromatogramy badanych białek OspC_ NΔ19. **Niebieską gwiazdką** (na szczycie piku) oznaczono piki obejmujące frakcje, w których znajdują się białka OspC_ NΔ19. **a-d.** Analiza SDS-PAGE frakcji (nr 23-29) zawierających odpowiednie białka OspC_ NΔ19. **Czerwoną gwiazdką** oznaczono określone prążki wraz z odpowiadającą im wielkością (25 kDa). **M** – wzorec masy.

4.5.2. Analiza ilościowa i jakościowa otrzymanych białek OspC_NΔ19

Kolejnym etapem prac była analiza ilościowa preparatów białkowych w celu określenia ich stężenia. Ze względu na to, że białka OspC_NΔ19 zawierają niewielką ilość aminokwasów aromatycznych kluczowych dla pomiaru absorbancji przy długości fali 280 nm, konieczne było użycie metody biuretowej, która opiera się na detekcji wiązań peptydowych (Rozdział 3.2.8.2). Poniżej przedstawiono krzywe absorpcji (Rycina 4.16) uzyskane podczas pomiaru absorbancji przy długości fali 540 nm dla białka BA.OspC_NΔ19 oraz wartości absorbancji (Tabela 4.18), na podstawie których obliczano stężenie białka (Rozdział 3.2.8.2). Do pomiaru wykorzystano dwie frakcje białek BA.OspC_NΔ19 pobrane w różnych punktach czasowych w trakcie zagęszczania preparatów poprzez ultrafiltrację (Rozdział 3.2.8.2)



Rycina 4.16. Przykładowe krzywe absorpcji uzyskane w wyniku pomiaru absorbancji przy długości fali 540 nm dla dwóch frakcji białka BA.OspC_NΔ19. Frakcja nr 1 została pobrana po trzech 15-minutowych cyklach zagęszczania, a frakcja nr 2 po sześciu 15-minutowych cyklach zagęszczania.

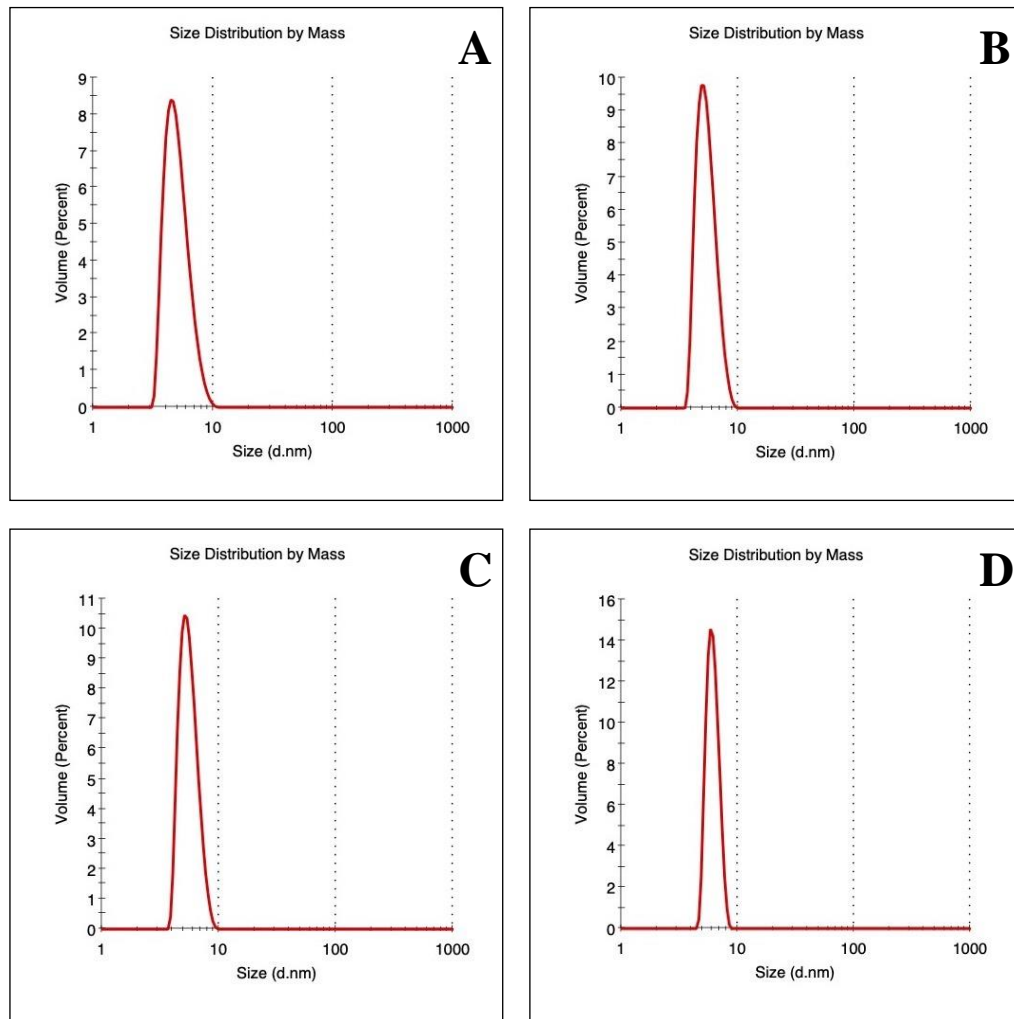
Tabela 4.18. Przykładowe wyniki pomiaru absorbancji przy długości fali 540 nm oraz obliczone stężenia białka dla wybranych frakcji BA.OspC_NΔ19. Dla każdej frakcji białka BA.OspC_NΔ19 wykonano trzy powtórzenia pomiaru absorbancji, a uzyskane wyniki uśredniono. Na ich podstawie obliczono stężenie preparatów.

Badana próba	Absorbancja (540 nm)	Stężenie białka (mg/ml)
1 frakcja - BA.OspC_NΔ19	0,0133	
1 frakcja - BA.OspC_NΔ19	0,0132	2,22 mg/ml
1 frakcja - BA.OspC_NΔ19	0,0134	
2 frakcja - BA.OspC_NΔ19	0,0358	
2 frakcja - BA.OspC_NΔ19	0,0357	6,2 mg/ml
2 frakcja - BA.OspC_NΔ19	0,0372	

Pomiary dynamicznego rozpraszania światła (DLS) umożliwiają wyznaczenie wymiarów hydrodynamicznych białek i wyznaczenie szacunkowej masy białka (kDa). Ponadto użycie tej techniki pozwala ocenić, czy w preparacie białkowym obecne są agregaty. Dlatego pomiary DLS zostały wprowadzone jako standardowa procedura oceny jakości preparatów białek OspC_NΔ19 uzyskanych w ostatnim etapie oczyszczania (Rozdział 3.2.9). Pomiary DLS wykazały, że białka OspC_NΔ19 nie tworzą agregatów, ponieważ uzyskana krzywa obrazująca rozkład cząsteczek w badanym roztworze (Rycina 4.17) charakteryzuje się pojedynczym ostrym pikiem wskazującym na dobrej jakości, homogeny preparat. Ponadto oszacowane masy badanych białek (kDa) odpowiadają spodziewanym parametrom (Tabela 4.19) oraz wskazują, że białka OspC_NΔ19 przyjmują formę dimeru w roztworze, co zgodne jest zarówno z wynikami badań strukturalnych białek OspC z innych szczepów, jak i analizami w warunkach natywnych (Kumaran i in., 2001 a,b).

Tabela 4.19. Oszacowane masy (kDa) białek OspC_NΔ19 na podstawie pomiarów DLS

Białko OspC_NΔ19	Oszacowana masa (kDa)
BA.OspC_NΔ19	42,9 +/- 10,2
BB.OspC_NΔ19	44,0 +/- 8,3
BG.OspC_NΔ19	45,8 +/- 8,1
BS.OspC_NΔ19	50,9 +/- 9,1



Rycina 4.17. Krzywe DLS. **A.** Analiza DLS dla białka BA.OspC_NΔ19. **B.** Analiza DLS dla białka BB.OspC_NΔ19. **C.** Analiza DLS dla białka BG.OspC_NΔ19. **D.** Analiza DLS dla białka BS.OspC_NΔ19.

4.5.3. Produkcja i oczyszczanie białek OspC_NΔ35-37 w dużej skali

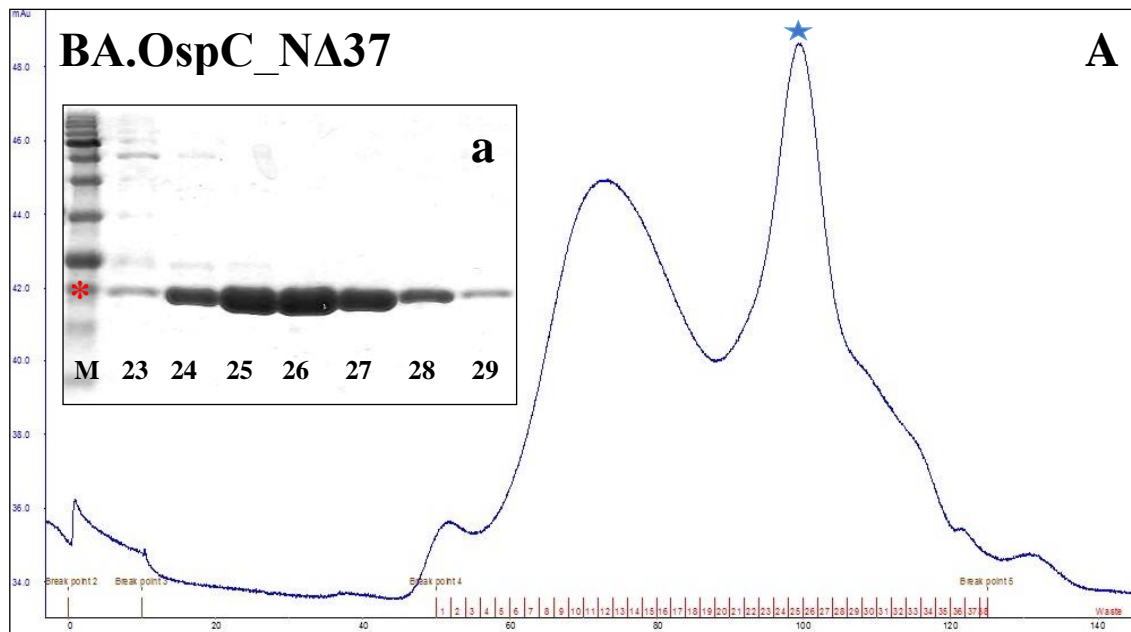
Do produkcji i oczyszczania białek BA.OspC_NΔ37, BB.OspC_NΔ37, BG.OspC_NΔ35 oraz BG1.OspC_NΔ35 wykorzystano zoptymalizowaną procedurę szczegółowo przedstawioną w Rozdziałach 3.2.6.4 oraz 3.2.6.5 dla białek OspC_NΔ19. Analogicznie wykorzystano opracowany schemat postępowania obejmujący:

- 1) Prowadzenie hodowli bakterii (indukowanej IPTG) w temperaturze 18°C przez 16 godzin przy prędkości wytrząsania 200 rpm.
- 2) Izolację białek z komórek bakteryjnych poprzez lizę komórek bakteryjnych przy użyciu lizozymu oraz sonikacji.
- 3) Oczyszczanie metodą chromatografii powinowactwa INiAC oraz proteolityczne trawienie białka fuzyjnego w celu oddzielenia białek z grupy OspC_NΔ35-37 od partnera fuzyjnego (NusA i HisTag).
- 4) Oczyszczanie metodą sączenia molekularnego w systemie AKTA Prime Plus FPLC w celu otrzymania homogennego białka OspC_NΔ35-37.

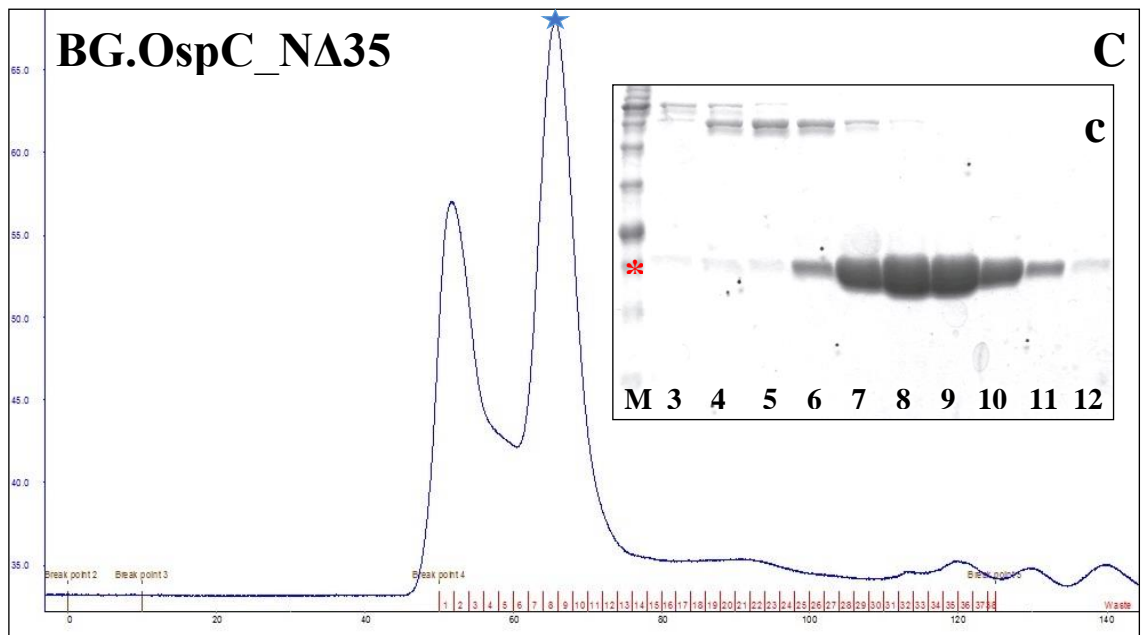
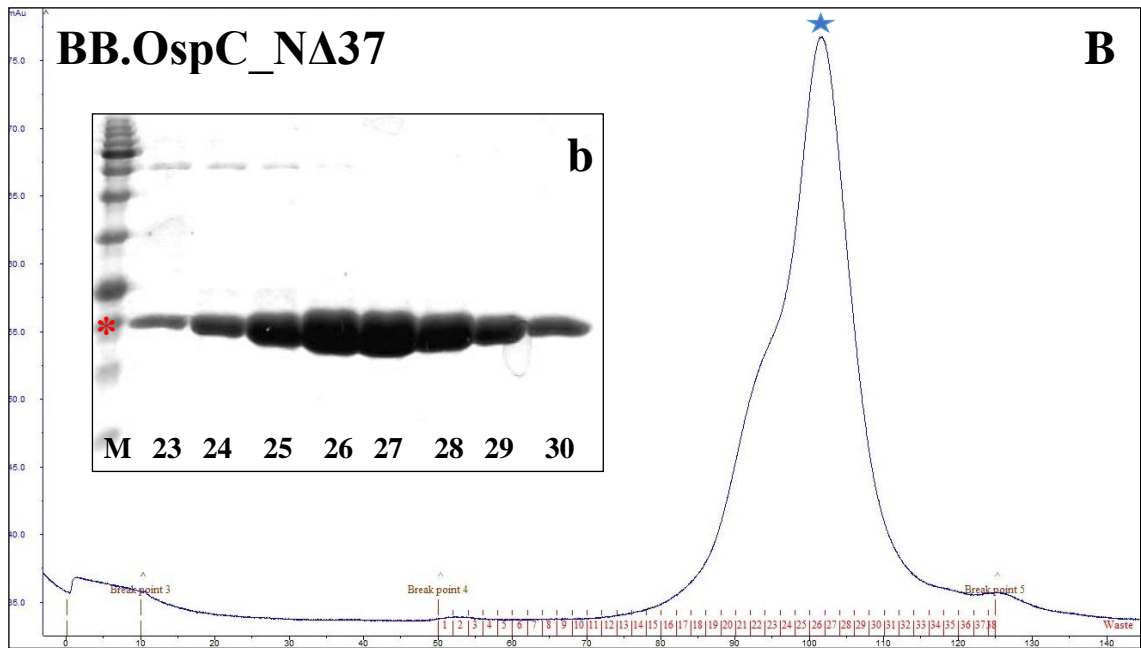
Sączenie molekularne dla białek OspC_NΔ35-37 początkowo prowadzono z wykorzystaniem kolumny GE HiLoad 16/60 Superdex 200. Na tym etapie stwierdzono, że dla białek BA.OspC_NΔ37 oraz BB.OspC_NΔ37 użycie tej kolumny pozwala na uzyskanie preparatów o wysokiej czystości, dlatego uznano, że kolumna ta będzie standardowo wykorzystywana w procedurze oczyszczania wspomnianych białek. Natomiast w przypadku białek BG.OspC_NΔ35 oraz BG1.OspC_NΔ35, kolumna GE HiLoad 16/60 Superdex 200 nie zapewniła satysfakcjonującej jakości preparatów z powodu obecności licznych zanieczyszczeń (o masie cząsteczkowej około 60 kDa), co sugerowało obecność białek fuzyjnych NusA, które nie zostały skutecznie oddzielone w poprzednich etapach oczyszczania. W związku z tym podjęto decyzję o zmianie kolumny na GE HiLoad 16/60 Superdex 75, która charakteryzuje się wyższym stopniem usieciowania złoża. Zastosowanie tej kolumny dla białek BG.OspC_NΔ35 oraz BG1.OspC_NΔ35 pozwoliło na uzyskanie preparatów dobrej jakości, przy jednoczesnym efektywnym rozdzieleniu białek fuzyjnych NusA, które wypłynęły we wcześniejszych frakcjach 1-6 (Rycina 4.19 i Rycina 4.20).

Obecność badanych białek BA.OspC_NΔ37, BB.OspC_NΔ37, BG.OspC_NΔ35 oraz BG1.OspC_NΔ35, otrzymanych w wyniku ostatniego etapu oczyszczania (sączenie

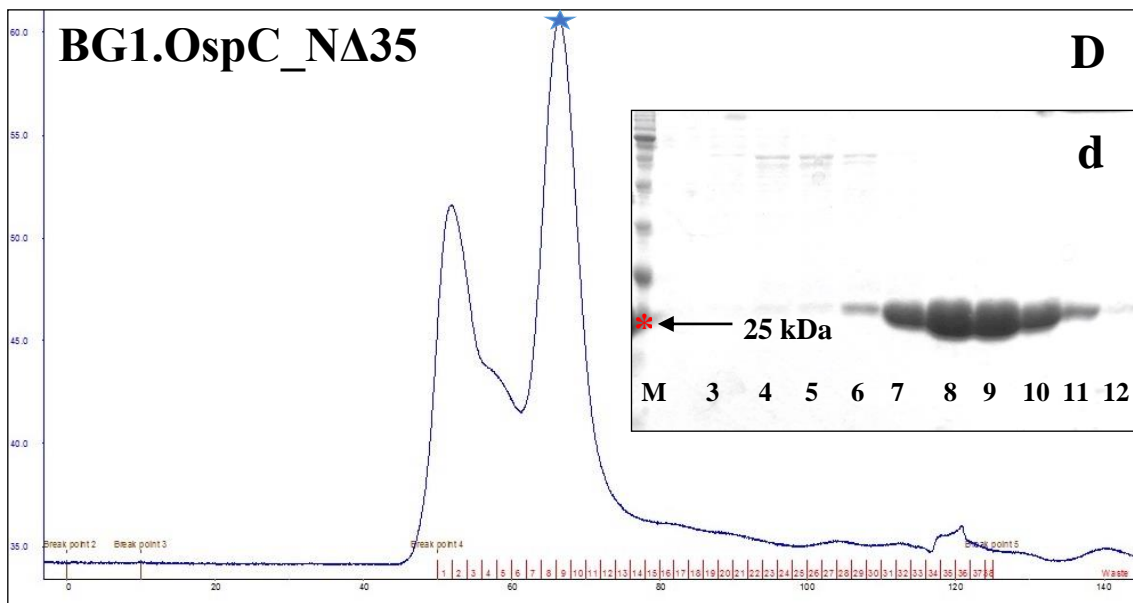
molekularne), potwierdzono poprzez rozdziały elektroforetyczne (Rozdział 3.2.14) (Rycina 4.18 - Rycina 4.20).



Rycina 4.18. Wyniki sączenia molekularnego białka BA.OspC_NΔ37. A. Chromatogram dla białka BA.OspC_NΔ37. **Niebieską gwiazdką** oznaczono pik obejmujący frakcje białka BA.OspC_NΔ37. **a.** Analiza SDS PAGE frakcji zawierających białko BA.OspC_NΔ37. **Czerwoną gwiazdką** oznaczono prążek o wielkości 25 kDa. **M** – wzorzec masy.



Rycina 4.19. Wyniki sączenia molekularnego białek OspC_{NΔ35-37}. **B-C.** Chromatogramy dla białek OspC_{NΔ35-37}. **Niebieską gwiazdką** oznaczono pik obejmujący frakcje, w których znajdują się analizowane białka OspC. **b-c.** Analiza SDS PAGE frakcji zawierających odpowiednie białka OspC_{NΔ35-37}. **Czerwoną gwiazdką** oznaczono prążki o wielkości 25 kDa. **M** – wzorzec masy.



Rycina 4.20. Wyniki sączenia molekularnego białka BG1.OspC_NΔ35. D. Chromatogram dla białka BG1.OspC_NΔ35. **Niebieską gwiazdką** oznaczono pik obejmujący frakcje białka BG1.OspC_NΔ35. **d.** Analiza SDS PAGE frakcji zawierających białko BG1.OspC_NΔ35. **Czerwoną gwiazdką** oraz strzałką oznaczono prążki o wielkości 25 kDa. **M** – wzorzec masy.

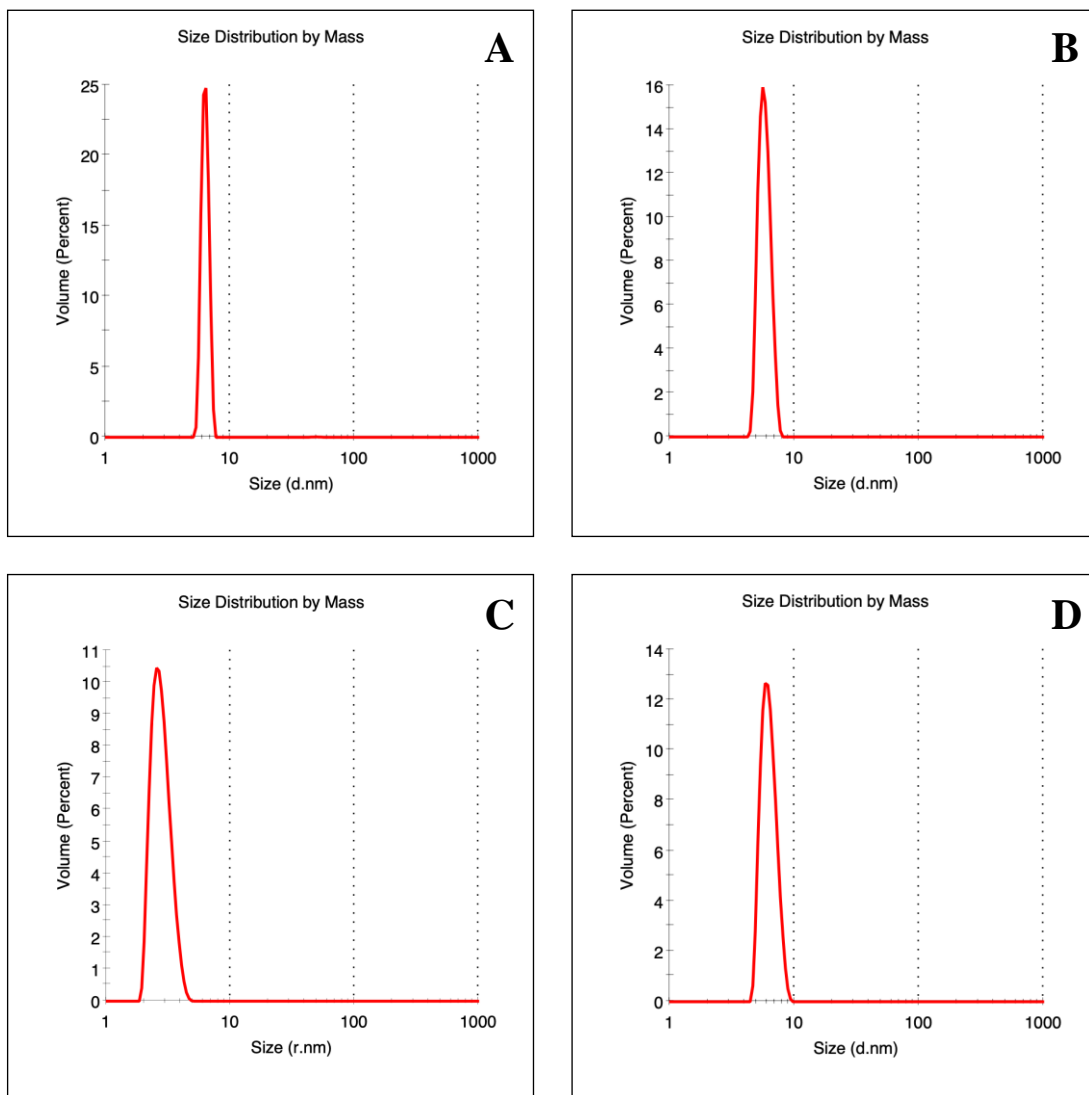
Oprócz analizy jakościowej uzyskanych preparatów białkowych metodą elektroforezy SDS-PAGE, przeprowadzono również pomiary DLS (Rozdział 3.2.9) mające na celu oszacowanie masy cząsteczkowej (kDa) badanych białek oraz stopnia homogenności przygotowanych preparatów (Tabela 4.20 i Rycina 4.21). Pomiary DLS wykonano dla białek OspC_NΔ35-37 w różnych warunkach buforowych. W tym celu uprzednio wykonano dializy, dzięki którym białka znalazły się w buforach o różnym pH. Wyniki analiz DLS pozwoliły zidentyfikować optymalne warunki, w których białka tworzyły jednorodny preparaty, wolne od agregatów, co było kluczowe dla dalszej krystalizacji białek. Aby zmaksymalizować szansę powodzenia późniejszych krystalizacji, wybrano następujące warunki buforowe:

- 1) 50 mM Tris-HCl (pH=7,5), 150 mM NaCl dla białek BA.OspC_NΔ37 i BB.OspC_NΔ37.
- 2) 25 mM HEPES (pH=6,5), 150 mM NaCl dla białek BG.OspC_NΔ35 i BG1.OspC_NΔ35 oraz dodatkowo dla białka BA.OspC_NΔ37.

Dwa wyselekcjonowane bufony stosowano podczas sączenia molekularnego białek OspC_NΔ35-37, a analiza DLS białek uzyskanych w ten sposób wykazała, że nie tworzą one agregatów, ponieważ na wykresach obecny jest ostry, pojedynczy pik, wskazujący na dobrej jakości, homogenny preparat (Rycina 4.21). Ponadto oszacowane masy białek (kDa) wskazują na formowanie przez białka OspC_NΔ35-37 dimeru w roztworze, co jest zgodne zarówno z wynikami badań strukturalnych, jak i analizami w warunkach natywnych (Tabela 4.20) (Kumaran i in., 2001 a,b).

Tabela 4.20. Oszacowane masy (kDa) dla białek OspC_NΔ35-37 obliczone na podstawie pomiarów DLS

Białko OspC_NΔ19	Oszacowana masa (kDa)
BA.OspC_NΔ37	51,6 +/- 5,4
BB.OspC_NΔ37	43,9 +/- 6,8
BG.OspC_NΔ35	43,3 +/- 7,2
BG1.OspC_NΔ35	55,6 +/- 7,6



Rycina 4.21. Wyniki pomiarów dynamicznego rozpraszania światła (DLS).
A. Analiza DLS dla białka BA.OspC_NΔ37. **B.** Analiza DLS dla białka BB.OspC_NΔ37.
C. Analiza DLS dla białka BG.OspC_NΔ35. **D.** Analiza DLS dla białka BG1.OspC_NΔ35.

4.6. Produkcja i oczyszczanie homologów białka Salp15

Salp15 jest białkiem śliny kleszcza *Ixodes scapularis*, które jest bogate w cysteiny i tworzy sieć mostków siarczkowych, które warunkują kształtowanie się struktury trzeciorzędowej białka. Dotychczas nie uzyskano danych strukturalnych, które umożliwiłyby zaproponowanie modelu przestrzennego Salp15. Dane literaturowe wskazują, że białko to odgrywa ważną rolę w cyklu enzoptycznym *Borrelia* poprzez interakcję z białkiem powierzchniowym OspC. Wykazano szereg funkcji Salp15, między innymi jego hamujący wpływ na proliferację limfocytów oraz możliwość hamowania funkcji układu odpornościowego, co w kontekście *Borrelia* zwiększa szansę na przeżycie bakterii w układzie krwionośnym organizmu gospodarza. Analogiczne funkcje przedstawiono dla białka homologicznego Iric-1 pochodzącego ze śliny kleszcza *Ixodes ricinus*, jednak w przypadku białek Iric-2 oraz Iric-3 brakuje wystarczających danych. Białka Salp15 i jego ortologi są zaopatrzone na końcu aminowym w sekwencję sygnałową (około 20 aminokwasów) (Kolb i in., 2015).

Zdecydowano się rozszerzyć tematykę badań dotyczących białek śliny kleszcza o kolejne homologi białka Salp15, czyli Iric-2 oraz Iric-3, jak również o znane już białko Iric-1. Białka te zawierają sekwencję sygnałową, dlatego konstrukty genetyczne zaprojektowano tak, aby umożliwiały produkcję dojrzałych form tych białek. Konstrukty oparte na bazie dwóch plazmidów ekspresyjnych: pET-39b(+) oraz pET-40b(+), zapewniające efektywną produkcję Iric-1_N Δ 19, Iric-2_N Δ 19 oraz Iric-3_N Δ 19, zostały wcześniej uzyskane w IChB PAN.

W ramach niniejszej pracy doktorskiej wykazano, że plazmid pET-39b(+) jest bardziej wydajny w produkcji białek Iric_N Δ 19. Umożliwia on produkcję białka z partnerem fuzyjnym DsbA (23 kDa) oraz znacznikiem histydynowego (HisTag). Białko DsbA, będące bakteryjną oksydoreduktazą, katalizuje formowanie mostków disiarczkowych wewnątrz łańcucha peptydowego, co prawdopodobnie pozytywnie wpływa na stabilizację struktury białek Iric_N Δ 19. Natomiast znacznik HisTag warunkuje wybór metody oczyszczania białek poprzez chromatografię powinowactwa INiAC. Dodatkowo, podczas projektowania konstruktów, wprowadzono miejsce rozpoznawane przez proteazę TEV, co pozwala na odseparowanie białek fuzyjnych od właściwych białek Iric_N Δ 19 poprzez trawienie proteolityczne.

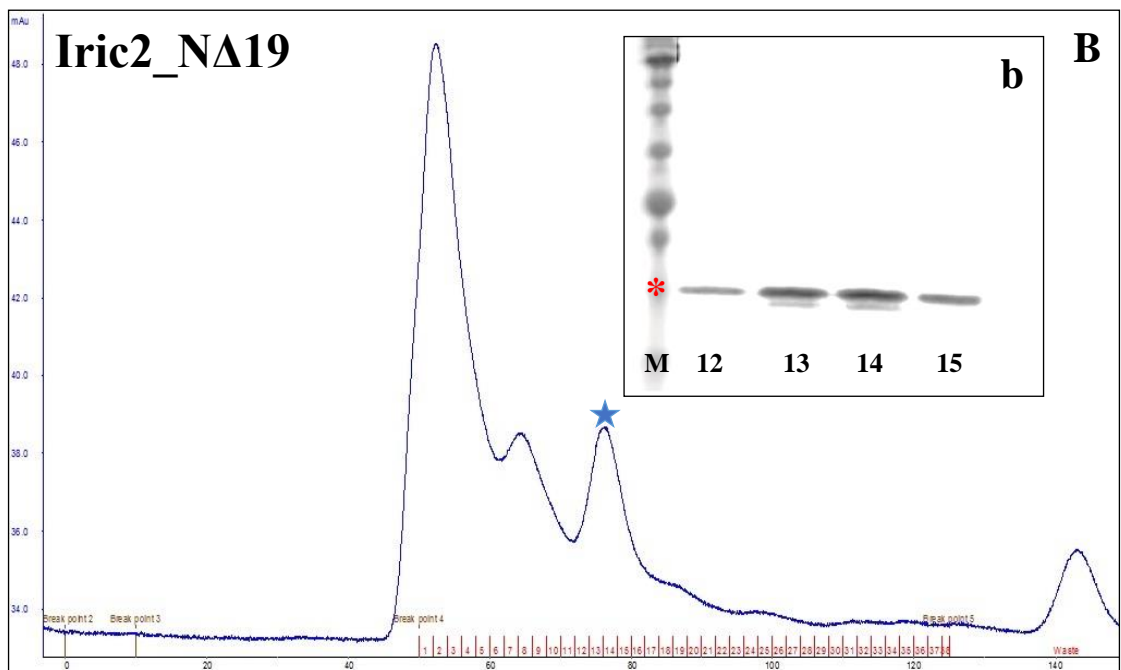
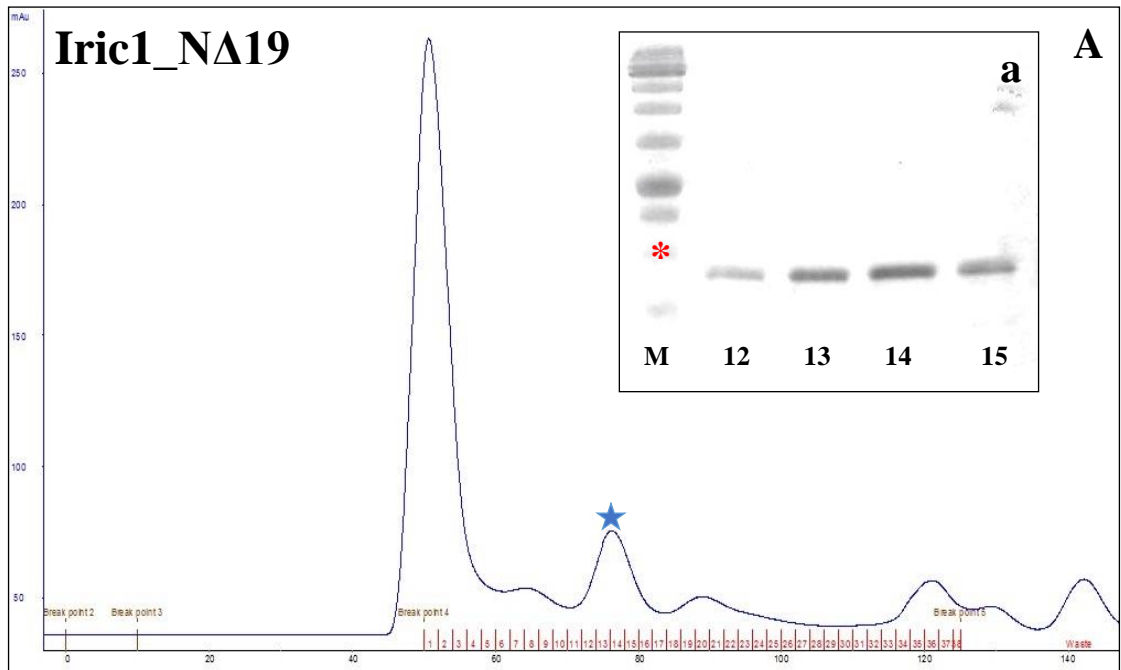
Białka Iric 1_NΔ19, Iric2_NΔ19 oraz Iric3_NΔ19 produkowano w ekspresyjnym szczepie bakteryjnym One Shot BL21-Star (DE3) *E. coli*, który został stransformowany plazmidami: pET-39b(+)-Iric1, pET-39b(+)-Iric2 oraz pET-39b(+)-Iric3 (Rozdział 3.2.2).

Do produkcji i oczyszczania stosowano zmodyfikowaną procedurę wypracowaną wcześniej (Rozdział 3.2.6.4). W przypadku zastosowanego wektora ekspresyjnego, antybiotykiem selekcyjnym była kanamycyna, ponadto zmieniono strategię lizy komórek bakteryjnych, rezygnując z używania lizozymu i stosując wyłącznie sonikację. Decyzja ta wynikała z podobnej masy cząsteczkowej lizozymu oraz białek Iric_NΔ19 (około 15 kDa), co zwiększało ryzyko kontaminacji preparatów białka Iric_NΔ19 lizozymem. Kolejnym kluczowym aspektem była konieczność użycia inhibitora proteaz na wczesnych etapach izolacji białek (etap 2 i 3), co było niezbędne dla zapewnienia wysokiej wydajności oczyszczania białek. Zauważono, że brak tego inhibitora prowadził do znacznego obniżenia wydajności w pozyskiwaniu białek Iric_NΔ19, dlatego wprowadzono go do standardowej procedury oczyszczania. Wreszcie, zaobserwowano dużą wrażliwość białek Iric_NΔ19 na zmiany warunków temperatury i wszystkie etapy ich oczyszczania były prowadzone w chłodni w temperaturze 4°C.

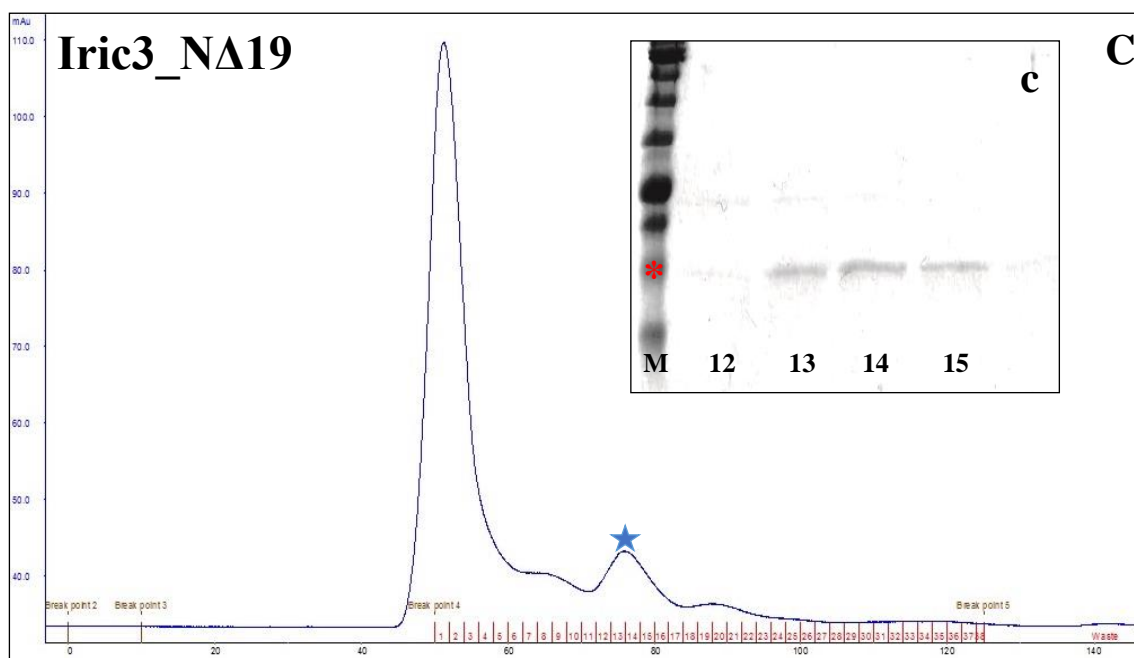
Konieczne było także przeprowadzenie optymalizacji warunków buforowych. Ustalono, że buforory stosowane w procedurze oczyszczania OspC nie zapewniały oczekiwanych rezultatów; uzyskiwane preparaty charakteryzowały się nie tylko niskim stężeniem białka Iric, ale również znacznym zanieczyszczeniem innymi białkami. W ramach optymalizacji warunków buforowych manipulowano zarówno pH roztworu, jak i stężeniem soli (NaCl), co pozwoliło na wybór buforów, które zapewniły satysfakcjonujące efekty oczyszczania białek:

- 1) Bufor: 25 mM HEPES (pH 6,8) oraz 1 M NaCl dla białek Iric1 i Iri2.
- 2) Bufor: 50 mM Tris (pH 8,0) oraz 1 M NaCl dla białka Iric3.

Sączenie molekularne dla białek Iric_NΔ19, ze względu na ich stosunkowo małą masę cząsteczkową (około 15 kDa), prowadzono z wykorzystaniem kolumny GE HiLoad 16/60 Superdex 75. Taki dobór kolumny pozwolił na uzyskanie dobrej jakości preparatów białka Iric_NΔ19. Obecność białek Iric_NΔ19 uzyskanych na ostatnim etapie oczyszczania potwierdzono za pomocą elektroforezy (Rozdział 3.2.14) (Rycina 4.22 i Rycina 4.23).



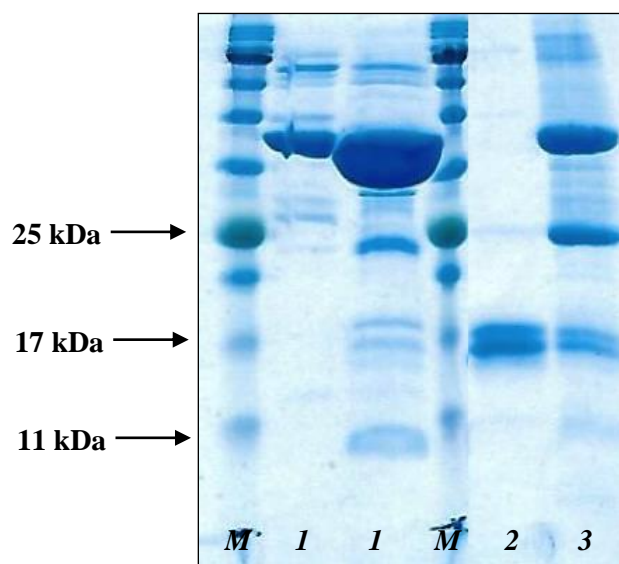
Rycina 4.22. Wyniki sączenia molekularnego białek Iric_{NΔ19} A-B. Chromatogramy dla białek Iric1_{NΔ19} (A) i Iric2_{NΔ19} (B). **Niebieską gwiazdką** oznaczono piki obejmujące frakcje, w których znajdują się białka Iric_{NΔ19}. **a-b.** Analiza SDS-PAGE frakcji (nr 12-15) zawierających odpowiednie białka Iric_{NΔ19}. **Czerwoną gwiazdką** oznaczono prążki o wielkości 17 kDa. **M** – wzorzec masy.



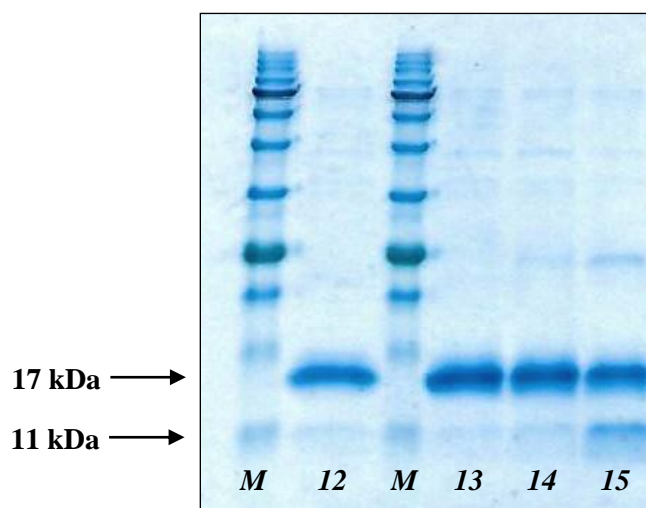
Rycina 4.23. Wyniki sączenia molekularnego białka Iric3_NΔ19. C. Chromatogram dla białka Iric3_NΔ19. **Niebieską gwiazdką** oznaczono pik obejmujący frakcje, w których znajdują się białka Iric3_NΔ19. **c.** Analiza SDS-PAGE frakcji (nr 12-15) zawierających odpowiednie białka Iric3_NΔ19. **Czerwoną gwiazdką** oznaczono prążki o wielkości 17 kDa. **M** – wzorzec masy.

Oczyszczanie białka Iric1_NΔ19 w warunkach denaturujących

Białko Iric1_NΔ19 wykorzystano do badań krystalizacyjnych kompleksu białek BB.OspC_NΔ37-Iric1_NΔ19. Ponieważ białko OspC krystalizuje w stężeniu 30 mg/ml, konieczne było uzyskanie równie wysokich stężeń dla białka Iric1_NΔ19. Z tego względu, że izolacja w warunkach natywnych nie pozwalała na uzyskanie tak wysokich stężeń, zastosowano dwie metody oczyszczania białka Iric1_NΔ19: w warunkach natywnych (Rozdział 3.2.6.5) oraz denaturujących (Rozdział 3.2.6.6). Każdy etap oczyszczania białka był monitorowany za pomocą elektroforezy (Rozdział 3.2.14). W wyniku rozdziłu elektroforetycznego (Rycina 4.24 i Rycina 4.25) zaobserwowano w każdym z żeli produkty o wielkości około 13 kDa, co potwierdziło obecność białka Iric1_NΔ19 we frakcjach, otrzymanych w wyniku sączenia molekularnego. Dodatkowo brak niespecyficznych produktów wskazuje na wysoką jakość przygotowanych produktów białkowych. Końcowy etap sączenia molekularnego dla obu białek prowadzono w buforze 25 mM HEPES, 150 mM NaCl (pH 6,8).



Rycina 4.24. Wynik rozdziału elektroforetycznego przedstawiający produkty oczyszczania białka fuzyjnego Iric1_NΔ19-DsbA-HisTag metodą chromatografii powinowactwa INiAC w warunkach denaturujących. Cyframi oznaczono poszczególne badane próby: 1 – białko fuzyjne Iric1_NΔ19-DsbA (36 kDa) eluowane 400 mM imidazolem, 2 – białko Iric1_NΔ19 (12,64 kDa) uzyskane w wyniku oddzielenia od partnera fuzyjnego, 3 – białko Iric1_NΔ19-DsbA poddane trawieniu proteolitycznemu proteazą TEV oraz M – wzorzec masy. Strzałkami oznaczono określone prążki wraz z odpowiadającymi im wielkościami.



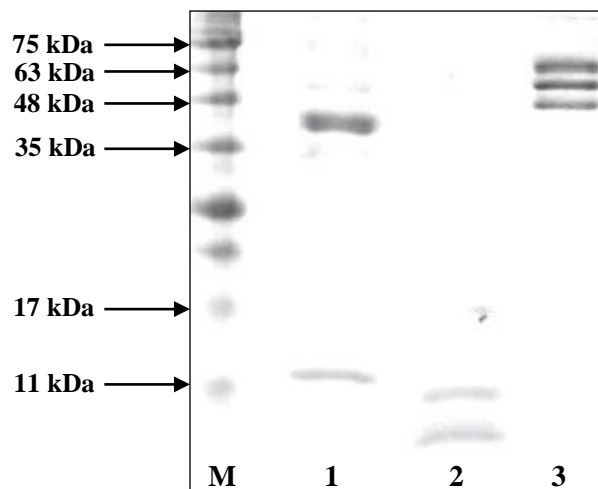
Rycina 4.25. Wyniki rozdziału elektroforetycznego preparatów białkowych otrzymanych w wyniku sączenia molekularnego białek Iric1_NΔ19. Analiza SDS-PAGE frakcji (nr 12-15) zawierających odpowiednie białka Iric1_NΔ19. M – wzorzec masy. Strzałkami oznaczono określone prążki wraz z odpowiadającymi im wielkościami.

4.7. Analiza jakości fibrynogenu pełnej długości oraz fragmentów E i D fibrynogenu

Z danych literaturowych wynika, że niektóre bakterie np. *Staphylococcus aureus* wykorzystują ludzki fibrynogen do tworzenia pewnego rodzaju osłony na swojej powierzchni, która chroni je przed usuwaniem z organizmu gospodarza. Gronkowiec złocisty produkuje co najmniej kilkanaście białek zaangażowanych w wiązanie fibrynogenu (Thomas i in., 2019). Biorąc pod uwagę powyższe informacje, zaplanowano eksperymenty mające na celu odpowiedź na pytanie, czy białka OspC_NΔ19 pochodzące z różnych gatunków *Borrelia* wchodzi w interakcję z fibrynogenem pełnej długości oraz jego fragmentami E i D (Rozdział 4.8). Dodatkowo, celem tych badań było ustalenie czy wiązanie to jest charakterystyczne dla wszystkich badanych białek OspC_NΔ19 pochodzących z analizowanych gatunków *Borrelia*, czy też wykazuje specyficzność gatunkową.

Fibrynogen funkcjonalnie tworzy dimer o masie 340 kDa, a każdy jego monomer składa się z trzech łańcuchów: Aα (66,5 kDa), Bβ (52 kDa) oraz γ (46,5 kDa). W wyniku proteolitycznego trawienia plazminą powstają dwa fragmenty: większy D oraz mniejszy fragment E. Każdy z tych fragmentów składa się z części łańcuchów Aα, Bβ oraz γ. Masy łańcuchów fragmentu D wynoszą: Aα (12 kDa), Bβ (37,6 kDa) oraz γ (41 kDa), natomiast masy łańcuchów fragmentu E: Aα (11 kDa), Bβ (7 kDa) oraz γ (8,5 kDa) (Lancelotti i in., 2021; Marchi i in., 2008; Slade i in., 1976). Przed przystąpieniem do analiz interakcji białek OspC_NΔ19 z fibrynogenem oraz jego fragmentami, konieczne było przygotowanie odpowiednich roztworów tych białek (Rozdział 3.2.7) oraz ocena jakości uzyskanych preparatów (Rozdział 3.2.14).

W wyniku rozdzielów elektroforetycznych (Rycina 4.26) zaobserwowano prążki odpowiadające masom łańcuchów Aα, Bβ oraz γ dla fragmentu D (ścieżka nr 1), fragmentu E (ścieżka nr 2) oraz pełnej długości fibrynogenu (ścieżka nr 3). Brak niespecyficznych produktów wskazuje na dobrą jakość przygotowanych próbek.



Rycina 4.26. Wynik rozdziału elektroforetycznego przedstawiający przygotowane preparaty fibrynogenu pełnej długości oraz fragmentów E i D. Cyframi oznaczono: 1 – fragment D fibrynogenu, 2 – fragment E fibrynogenu, 3 – fibrynogen pełnej długości oraz M – wzorzec masy. Strzałkami oznaczono określone prążki wraz z odpowiadającymi im wielkościami (kDa).

4.8. Badanie oddziaływań białek OspC_NΔ19 z fibrynogenem

Aby zweryfikować, czy białka OspC_NΔ19 wiążą ludzki fibrynogen, zastosowano technikę MST (Rozdział 3.1.2), która pozwala na ilościową analizę interakcji białek w roztworze, z użyciem stosunkowo niskich stężeń preparatów. Technika ta opiera się na zjawisku termoforezy, czyli ukierunkowanym ruchu cząsteczek w gradiencie temperatury. Ruch ten uzależniony jest od wszelkich zmian właściwości molekularnych takich jak wielkość, ładunek, otoczka hydratacyjna czy konformacja analizowanych molekuł, wynikających z interakcji białek. W badaniach MST gradient temperatury jest indukowany przez laser IR (ang. *infrared*, podczerwień), a detekcja ruchu cząsteczek w gradiencie temperatury jest możliwa poprzez przyłączenie znacznika fluorescencyjnego do jednej z badanych cząsteczek. Stała równowagi dysocjacji K_d ilościowo określa wzajemne powinowactwo badanych cząsteczek (Seidel i in ., 2013).

Na etapie przygotowań eksperymentów MST (Rozdział 3.2.10) wykonano szereg działań związanych z doбором odpowiedniego znacznika fluorescencyjnego dla poszczególnych białek. Po analizie sekwencji aminokwasowych białek OspC_NΔ19 oraz fibrynogeny podjęto decyzję o znakowaniu białka OspC_NΔ19 znacznikiem fluorescencyjnym RED-NHS 647 (reaguje z pierwszorzędowymi aminami łańcuchów bocznych lizyny), a fibrynogen znacznikiem RED-MALEIMIDE 647 (reaguje z grupami sulfhydrylowymi w cysteinach). Następnie wykonano pomiary poziomu fluorescencji wyznakowanych białek. Do dalszych analiz użyto preparatów znakowanych białek, których poziom fluorescencji wynosił 200-2000 jednostek (AU – arbitrary units).

W pierwszej serii pomiarów MST zastosowano znakowany fluorescencyjnie fibrynogen (Fibrynogen*RED-MALEIMIDE 647) oraz białka OspC_NΔ19 (nieznakowane) pochodzące z czterech różnych gatunków *Borrelia*: *B. afzelii*, *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii*, *B. spielmanii* (BA.OspC_NΔ19, BB.OspC_NΔ19, BG.OspC_NΔ19, BS.OspC_NΔ19). Stałe stężenie białka Fibrynogen*RED-MALEIMIDE 647 dodawano do serii rozcieńczeń czterech białek OspC_NΔ19 (nieznakowane) (Rozdział 3.2.10). Zarejestrowano sygnały MST dla każdego pomiaru, na podstawie których wykreślono krzywe wiązania i obliczono K_d . Wszystkie analizy potwierdziły interakcje fibrynogeny z białkami OspC_NΔ19 pochodzącymi z różnych gatunków *Borrelia* (Rycina 4.27). Uzyskane wyniki K_d w zakresach nanomolowych (nM) wskazują na wysokie powinowactwo białek OspC_NΔ19-fibrynogen (Tabela 4.21). Najsilniejszą interakcję zaobserwowano w przypadku pary białek BB.OspC_ND19-

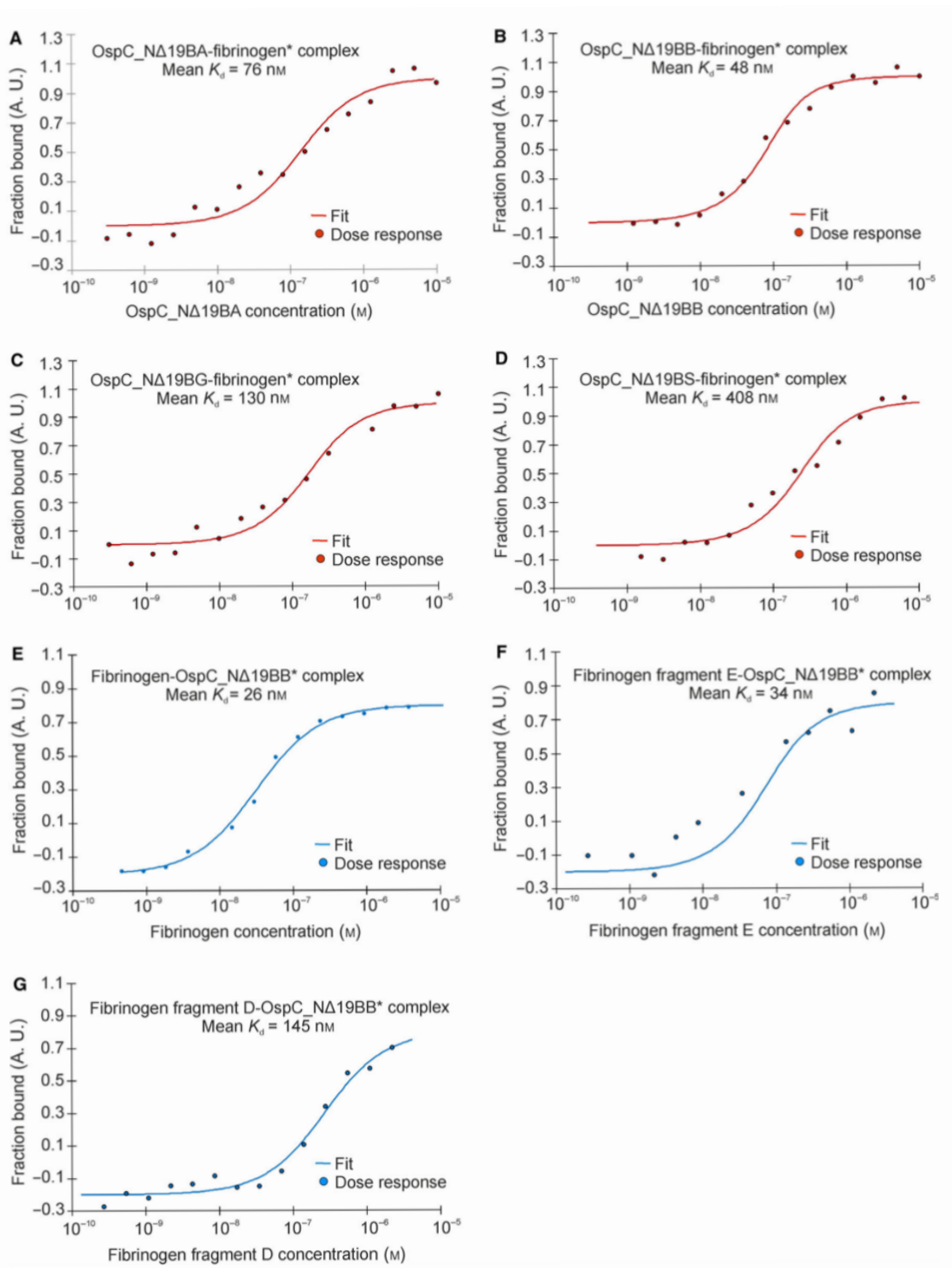
fibrynogen ($K_d = 48$ nM), a najsłabszą BS.OspC_ND19BB-fibrynogen ($K_d = 408$ nM). Ponadto charakterystyczny, sigmoidalny kształt krzywej wiązania uzyskany w wyniku pomiarów MST każdej z par białek fibrynogen-OspC_NΔ19 wskazuje na specyficzny charakter tych interakcji (Rycina 4.27).

W kolejnej serii eksperymentów przeprowadzono testy kontrolne, analizując dwa układy białek:

- 1) Znakowane fluorescencyjnie białko BB.OspC_NΔ19 (BB.OspC_NΔ19*RED-NHS 647) i fibrynogen (nieznakowany),
- 2) Znakowane fluorescencyjnie białko BB.OspC_NΔ19 (BB.OspC_NΔ19*RED-NHS 647) i albumina surowicy wołowej (ang. *bovine serum albumin*, BSA) (nieznakowana).

W pierwszym układzie przeprowadzone analizy potwierdziły interakcję fibrynogenu z białkiem BB.OspC_NΔ19 ($K_d = 26$ nM), a sigmoidalny kształt krzywej wiązania wskazał na specyficzny charakter interakcji. Natomiast w drugim badanym układzie nie potwierdzono wiązania białka BSA z BB.OspC_NΔ19.

W celu pozyskania dalszych informacji dotyczących wiązania fibrynogen-OspC_NΔ19 przeprowadzono dodatkowe eksperymenty MST wykorzystując znakowane fluorescencyjnie białko BB.OspC_NΔ19 (BB.OspC_NΔ19*RED-NHS) oraz dwa fragmenty fibrynogenu: fragment E oraz fragment D. Fragment E umieszczony jest w centralnej części fibrynogenu, a fragment D umiejscowiony jest na dwóch końcach fibrynogenu. Celem tych eksperymentów było porównanie zdolności wiązania fragmentów E i D fibrynogenu do OspC_NΔ19 oraz zaproponowanie potencjalnych miejsc wiązania tych białek. Przeprowadzone analizy potwierdziły interakcję białka BB.OspC_NΔ19 z oboma fragmentami fibrynogenu. Warto jednak zauważyć, że w przypadku fragmentu E stała $K_d = 34$ nM sugeruje, że wiązanie tego fragmentu charakteryzuje się wyższym powinowactwem niż w przypadku fragmentu D. Wyniki te wskazują na możliwość występowania specyficznego miejsca wiązania białka OspC_NΔ19 w centralnej części fibrynogenu (fragment E).



Rycina 4.27. Krzywe wiązania dla interakcji białek OspC_NΔ19 oraz ludzkiego fibrynogenu uzyskane w wyniku pomiarów MST. A-D. Znakowany fibrynogen*RED-MALEIMIDE 647 dodawano do serii rozcieńczeń czterech białek OspC_NΔ19: **A.** BA.OspC_NΔ19, **B.** BB.OspC_NΔ19, **C.** BG.OspC_NΔ19, **D.** BS.OspC_NΔ19 (nieznakowane). **E-G.** Znakowane BB.OspC_NΔ19*NHS 647 dodawano do serii rozcieńczeń: **E.** fibrynogenu pełnej długości, **F.** fragmentu E fibrynogenu, **G.** fragmentu D fibrynogenu.

*oznaczono cząsteczki znakowane fluorescencyjnie

Tabela 4.21. Wyniki pomiaru MST dla białek OspC_NΔ19 wraz obliczonymi stałymi dysocjacji K_d

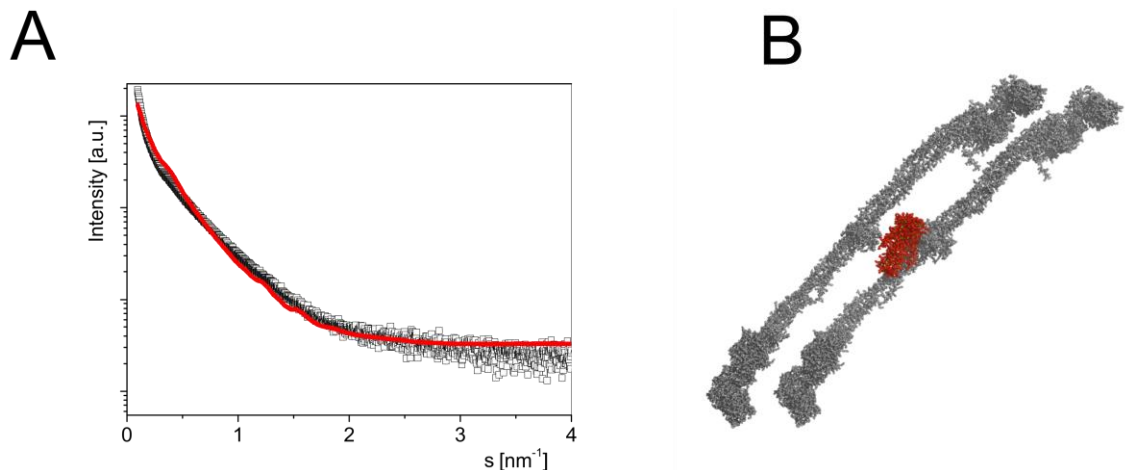
Analizowane interakcje białek	K_d (nM)	Średnia K_d (nM)
Fibrynogen*RED-Maleimide BA.OspC_NΔ19	64 ± 11 83 ± 14 82 ± 19	76
Fibrynogen*RED-Maleimide BB.OspC_NΔ19	56 ± 11 55 ± 10 32 ± 9	48
Fibrynogen*RED-Maleimide BG.OspC_NΔ19	141 ± 30 129 ± 27 120 ± 27	130
Fibrynogen*RED-Maleimide BS.OspC_NΔ19	374 ± 84 420 ± 107 430 ± 97	408
BB.OspC_NΔ19*RED-NHS Fibrynogen	32 ± 3 33 ± 5 13 ± 3	26
BB.OspC_NΔ19*RED-NHS Fibrynogen fragment E	21 ± 6 48 ± 14 33 ± 18	34
BB.OspC_NΔ19*RED-NHS Fibrynogen fragment D	166 ± 40 129 ± 29 142 ± 21	145
BB.OspC_NΔ19*RED-NHS BSA	-	-

*oznaczono cząsteczki znakowane fluorescencyjnie

4.9. Analiza struktury białka OspC_NΔ19 oraz kompleksu OspC_NΔ19-fibrynogen metodą małokątowego rozpraszania promieni rentgenowskich (SAXS)

Metoda SAXS została wykorzystana do analizy struktury białka BB.OspC_NΔ19 oraz jego kompleksu z fibrynohem (Rozdział 3.2.11). Na podstawie wykonanych pomiarów obliczono promień bezwładności (R_g), który charakteryzuje rozmiary badanych makrocząsteczek w roztworze. Otrzymane wyniki R_g dla białka OspC (R_g w zakresie 2,83-2,9 nm) potwierdzają jego zwartą, globularną strukturę oraz uporządkowany charakter łańcuchów polipeptydowych. Ponadto uzyskane dane SAXS umożliwiły opracowanie modelu białka OspC, charakteryzującego się lekko wydłużoną, beczułkowatą formą. Warto również podkreślić, że obliczone na podstawie danych SAXS wartości objętości Poroda ($43\,320\text{ nm}^3$) są zgodne z objętościami dla modelu krystalograficznego białka OspC, potwierdzając jego dimeryczną formę w roztworze. Dodatkowo obliczone masy cząsteczkowe (41,2 kDa) na podstawie danych SAXS również potwierdzają jego dimeryczną formę. Analizy SAXS przeprowadzone dla fibrynogenu również potwierdzają obecność tego białka w roztworze, a obliczone wartości objętości Poroda ($803\,200\text{ nm}^3$) oraz masy cząsteczkowej wskazują, że fibrynogen występuje w postaci układu dwóch dimerów (725,25 kDa).

Wykonano również pomiary SAXS dla kompleksu białek BB.OspC_NΔ19 i fibrynogenu. W tym celu analizowano mieszaniny tych białek w różnych stosunkach molowych (Tabela 3.12). Zarejestrowane dane zostały przetworzone za pomocą oprogramowania SASREF, co pozwoliło wygenerować model kompleksu tych białek (Rycina 4.28). Na podstawie uzyskanego modelowania zaproponowano potencjalne miejsce wiązania tych białek oraz zasugerowano, że białka te wiążą się w stosunku 2:1, co oznacza, że dwie cząsteczki fibrynogenu (dwa dimery) wiążą jedną cząsteczkę białka OspC (również w formie dimeru). Dodatkowo zaproponowane miejsce wiązania – białko OspC związane z cząsteczkami fibrynogenu w części centralnej – jest zgodne z wynikami MST, które wskazały na większe powinowactwo białka OspC do fragmentu E fibrynogenu.



Rycina 4.28. Wyniki pomiarów SAXS dla kompleksu BB.OspC_N Δ 19 oraz ludzkiego fibrynogenu. A. teoretyczna krzywa rozpraszania (czerwona), która odpowiada modelowi kompleksu białek fibrynogen-BB.OspC_N Δ 19 wygenerowanemu przez program SASREF na podstawie danych krystalograficznych oraz dane ekperymentalne (w postaci czarnych kwadratów), przedstawiające rzeczywiste dane zebrane podczas pomiarów SAXS. Teoretyczna krzywa rozpraszania pokrywa się z danymi eksperymentalnymi, co oznacza, że model teoretyczny dobrze odzwierciedla strukturę badanego kompleksu. B. wizualizacja czwartorzędowej struktury kompleksu fibrynogen-BB.OspC_N Δ 19. Białko OspC przedstawione jest kolorem czerwonym, a cząsteczki fibrynogenu kolorem szarym.

4.10. Badanie oddziaływań białek OspC_NΔ19 z homologami białka Salp15

Do przeanalizowania interakcji białek OspC_NΔ19 pochodzących z różnych gatunków *Borrelia* oraz trzech homologów białka Salp15: Iric1_NΔ19, Iric2_NΔ19 oraz Iric3_NΔ19 ponownie wykorzystano technikę MST. Korzystając już z wcześniejszych optymalizacji przeprowadzonych w trakcie badania oddziaływania OspC-fibrynogen, ponownie wyznakowano białka OspC_NΔ19 znacznikiem fluorescencyjnym NHS. Analogicznie wykonano pomiary kontrolne w celu sprawdzenia poziomu fluorescencji wyznakowanych białek. Do dalszych analiz wykorzystywano te białka, których poziom fluorescencji znajdował się w zakresie 200-2000 jednostek (Rozdział 3.2.10).

W pierwszej serii pomiarów MST wykorzystano znakowane fluorescencyjnie białka OspC_NΔ19 (BA.OspC_NΔ19*NHS 647, BB.OspC_NΔ19*NHS 647, BG.OspC_NΔ19*NHS 647, BS.OspC_NΔ19* 647) oraz białka Iric_NΔ19: Iric1_NΔ19, Iric2_NΔ19 oraz Iric3_NΔ19 (nieznakowane). Mierzono powinowactwo każdego znakowanego białka OspC_NΔ19*NHS 647 do każdego z białek Iric_NΔ19 (Iric1_NΔ19, Iric2_NΔ19 oraz Iric3_NΔ19). Sumarycznie wykonano pomiary interakcji 12 różnych par białek, a każdy z tych pomiarów został powtórzony 3-krotnie. Stałe stężenie znakowanych białek OspC_NΔ19*NHS 647 dodawano do serii rozcieńczeń trzech białek Iric_NΔ19 (nieznakowane). (Rozdział 3.2.10). Na podstawie zarejestrowanych sygnałów MST wykreślono krzywe wiązania oraz obliczono K_d . Co ciekawe, nie wszystkie przeprowadzone analizy potwierdziły interakcję białek OspC_NΔ19 z białkami Iric_NΔ19. Takie interakcje potwierdzono w przypadku białek BB.OspC_NΔ19 oraz BS.OspC_NΔ19, które oddziaływały ze wszystkimi białkami Iric_NΔ19 (Iric1_NΔ19, Iric2_NΔ19 oraz Iric3_NΔ19). Ponadto zaobserwowano również wiązanie białka BA.OspC_NΔ19, ale tylko z białkiem Iric1_NΔ19. Jednakże w przypadku białka BG.OspC_NΔ19 nie zanotowano wiązania z żadnym z trzech białek Iric_NΔ19. Wszystkie pomiary wykonano w tych samych warunkach (Rozdział 3.1.2). Natomiast dla pary białek BA.OspC_NΔ19 - Iric1_NΔ19 tworzenie kompleksu odnotowano tylko w temperaturze 37°C.

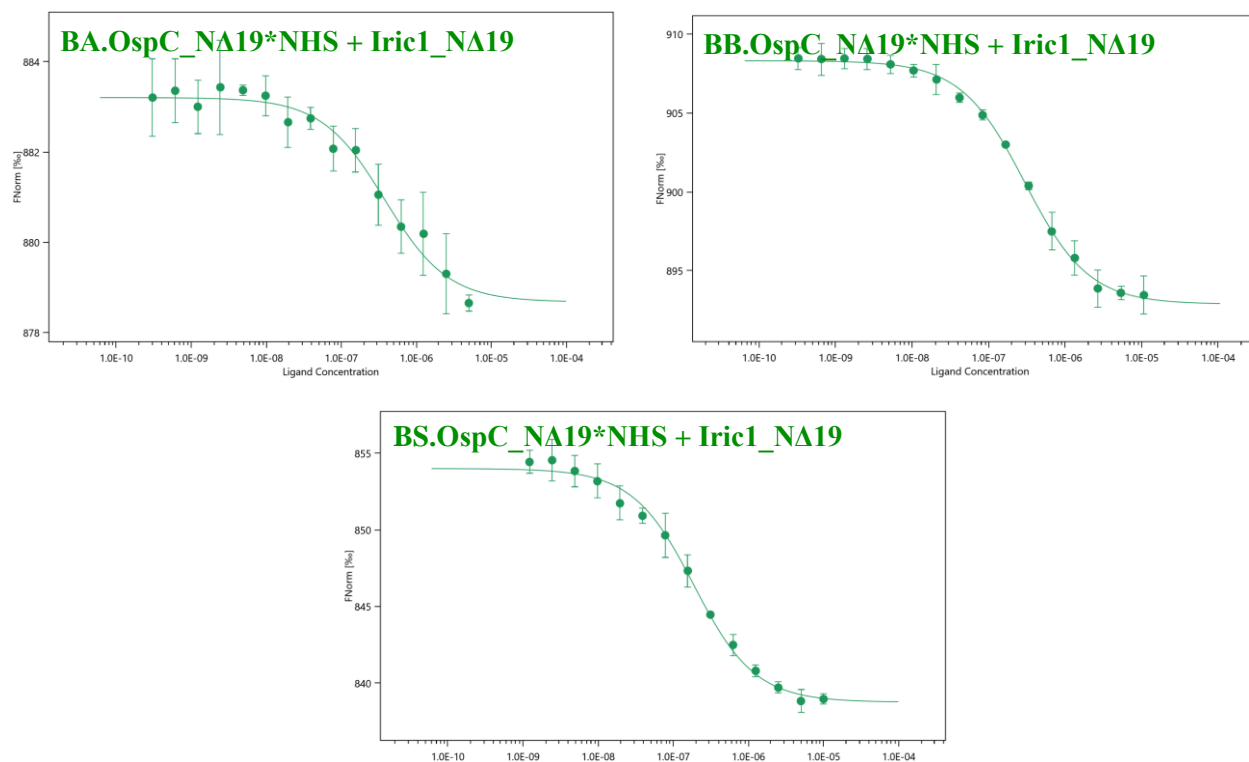
Uzyskane wyniki K_d w zakresach nanomolowych (100-350 nM) wskazują na wysokie powinowactwo między białkami OspC_NΔ19-Iric_NΔ19 (Tabela 4.22). Dodatkowo charakterystyczny, sigmoidalny kształt krzywej wiązania uzyskanej dla pomiarów interakcji białek OspC_NΔ19 - Iric_NΔ19 wskazuje na specyficzny charakter powyższych interakcji (Rycina 4.29 i Rycina 4.30).

Wykonano również kontrole negatywne do tej serii pomiarów MST, w których jako partnerów interakcji zastosowano białko powierzchniowe pochodzące z *Borrelia*, ale odpowiedzialne za kolonizację krętka w jelicie kleszcza – białko OspA_NΔ19 oraz trzy białka Iric_NΔ19. Do pomiarów MST wykorzystano fluorescencyjnie znakowane białko OspA_NΔ19 (OspA_NΔ19*NHS 647) oraz białka Iric1_NΔ19, Iric2_NΔ19 i Iric3_NΔ19 (nieznakowane). Stałe stężenie znakowanego białka OspA_NΔ19*NHS 647 dodawano do serii rozcieńczeń trzech białek Iric_NΔ19 (nieznakowane). Pomiary prowadzono w stałych warunkach buforowych (bufor do MST) oraz temperaturze pokojowej. Przeprowadzone pomiary nie potwierdziły interakcji dla żadnej z tych par białek (Rycina 4.31).

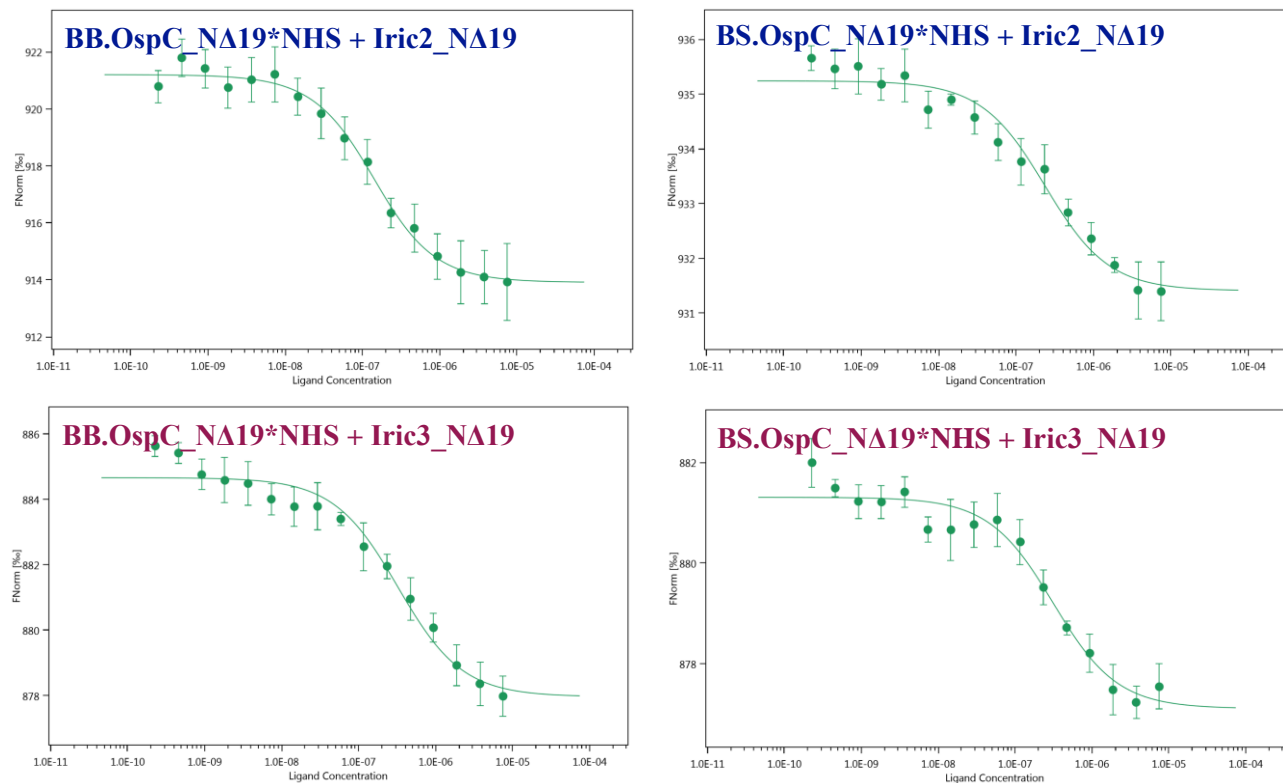
Tabela 4.22. Stałe K_d obliczone dla interakcji białek OspC_NΔ19 oraz Iric_NΔ19 na podstawie pomiarów MST. Stałe K_d dla analizowanych par białek zostały obliczone w oparciu o dane uzyskane w wyniku trzech niezależnych pomiarów MST dla danej pary białek. **Kolorem zielonym** oznaczono interakcję białek OspC_NΔ19 z białkiem Iric1_NΔ19. **Kolorem niebieskim** oznaczono interakcję białek OspC_NΔ19 z białkiem Iric2_NΔ19. **Kolorem różowym** oznaczono interakcję białek OspC_NΔ19 z białkiem Iric3_NΔ19. Kreską oznaczono pary, dla których nie wyznaczono stałych K_d , co zinterpretowano jako brak interakcji.

Analizowane oddziaływania par białek	K_d (nM)
BA.OspC_NΔ19*RED-NHS - Iric1_NΔ19	354,9 ± 80,11
BA.OspC_NΔ19*RED-NHS - Iric2_NΔ19	-
BA.OspC_NΔ19*RED-NHS - Iric3_NΔ19	-
BB.OspC_NΔ19*RED-NHS - Iric1_NΔ19	272,66 ± 16,10
BB.OspC_NΔ19*RED-NHS - Iric2_NΔ19	115,84 ± 17,00
BB.OspC_NΔ19*RED-NHS - Iric3_NΔ19	299,50 ± 74,40
BG.OspC_NΔ19*RED-NHS - Iric1_NΔ19	-
BG.OspC_NΔ19*RED-NHS - Iric2_NΔ19	-
BG.OspC_NΔ19*RED-NHS - Iric3_NΔ19	-
BS.OspC_NΔ19*RED-NHS - Iric1_NΔ19	163,98 ± 18,61
BS.OspC_NΔ19*RED-NHS - Iric2_NΔ19	211,64 ± 54,42
BS.OspC_NΔ19*RED-NHS - Iric3_NΔ19	287,59 ± 77,85

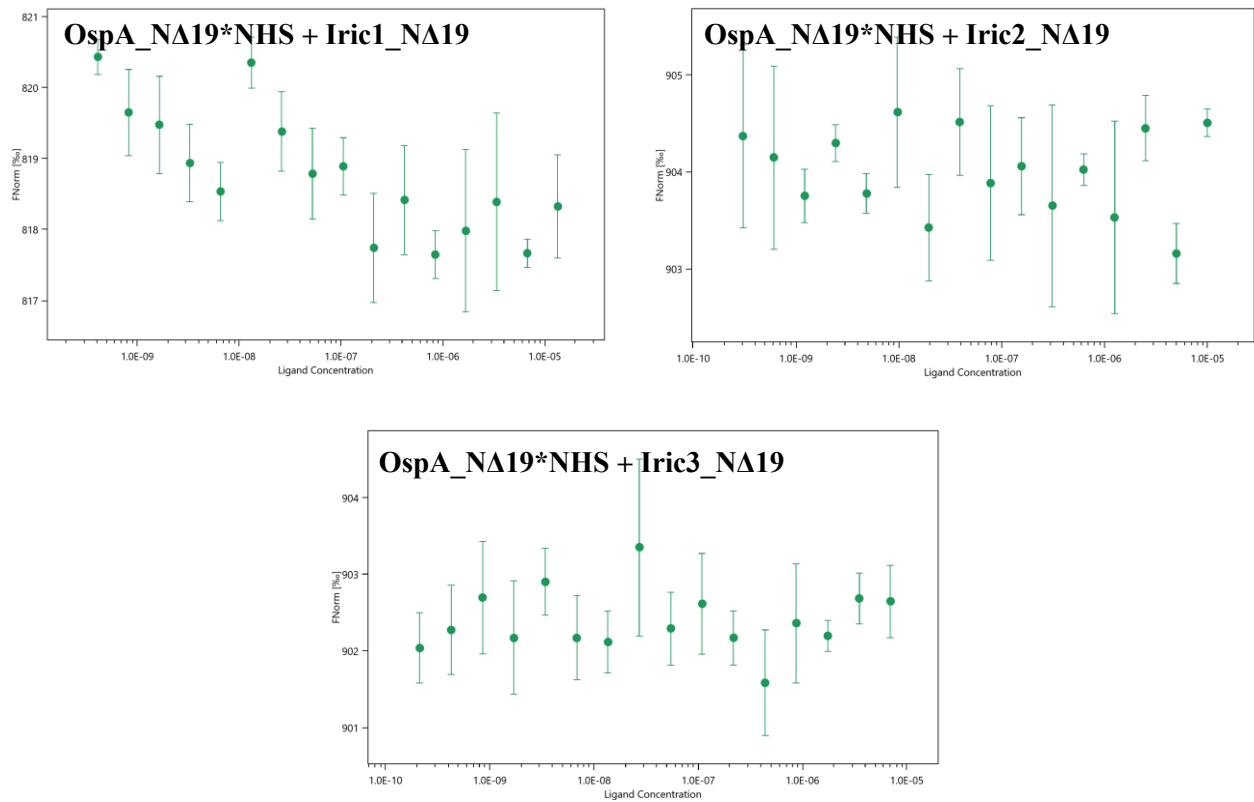
*- oznaczono wyznakowane fluorescencyjnie białka



Rycina 4.29. Na wykresach przedstawiono krzywe wiązania uzyskane w wyniku pomiarów MST dla interakcji różnych wariantów białek OspC_NΔ19 z białkiem Iric1_NΔ19. **Kolorem zielonym** oznaczono interakcję trzech białek OspC_NΔ19 (BA.OspC_NΔ19, BB.OspC_NΔ19, BS.OspC_NΔ19) z białkiem Iric1_NΔ19. Białka OspC_NΔ19 zostały wyznakowane RED-NHS 647, a serie rozcieńczeń wykonano dla białka Iric1_NΔ19 (ligand). Białka OspC_NΔ19 wyznakowane fluorescencyjnie zostały oznaczone gwiazdką (*NHS). Wyniki K_d oszacowane na podstawie trzech niezależnych pomiarów MST przedstawiono w tabeli Tabela 4.22, gdzie zastosowano analogiczną kolorystykę dla analizowanych par interakcji.



Rycina 4.30. Na wykresach przedstawiono krzywe wiązania uzyskane w wyniku pomiarów MST dla interakcji różnych wariantów białek OspC_NΔ19 z białkami Iric_NΔ19 (Iric2_NΔ19, Iric3_NΔ19). **Kolorem niebieskim** oznaczono interakcję dwóch białek OspC_NΔ19 (BB.OspC_NΔ19, BS.OspC_NΔ19) z białkiem **Iric2_NΔ19**. **Kolorem różowym** oznaczono interakcję dwóch białek OspC_NΔ19 (BB.OspC_NΔ19, BS.OspC_NΔ19) z białkiem **Iric3_NΔ19**. Białka OspC_NΔ19 zostały oznaczone gwiazdką wraz ze znacznikiem fluorescencyjnym (*NHS). Wyniki K_d oszacowane na podstawie trzech niezależnych pomiarów MST przedstawiono w tabeli, w której zastosowano analogiczną kolorystykę dla analizowanych par interakcji (Tabela 4.19).



Rycina 4.31. Na wykresach przedstawiono wyniki kontrolnych pomiarów MST dla białek OspA_NΔ19 i Iric_NΔ19. Białka OspA_NΔ19 zostały wyznakowane RED-NHS 647, a serie rozcieńczeń wykonano dla poszczególnych białek Iric_NΔ19 (Iric1_NΔ19, Iric2_NΔ19, Iric3_NΔ19). Na wykresach nie zostały wykreślone krzywe wiązania dla białka OspA_NΔ19 z białkami Iric_NΔ19, co wskazuje na brak interakcji między tymi białkami. Białka OspA_NΔ19 zostały oznaczone gwiazdką wraz ze znacznikiem fluorescencyjnym (*NHS). Wykresy te potwierdzają brak interakcji dla pary białek OspA_NΔ19 - Iric_NΔ19.

4.11. Przesiewowe testy krystalizacyjne

W celu pogłębienia wiedzy dotyczącej wiązania białek OspC z grupą białek Iric, podjęto próby krystalizacji kompleksów tych białek, aby określić ich dokładne miejsca wiązania. Pierwszym etapem była optymalizacja warunków buforowych wspomagających proces krystalizacji białek OspC_NΔ19. Wykonano serię testów krystalizacyjnych przy użyciu Robota Gryphon i komercyjnych zestawów do krystalizacji (Index, Crystal Screen, PEG/Ion) (Rozdział 3.2.12) wykorzystując białka OspC_NΔ19 (BA.OspC_NΔ19, BBOspC_NΔ19, BGOspC_NΔ19, BSOspC_NΔ19) o stężeniu końcowym około 10 mg/ml. Białka te zostały uzyskane zgodnie ze szczegółowo przedstawioną procedurą w Rozdziałach 3.2.6.4 oraz 3.2.6.5, i zawieszono w buforze 50 mM Tris-HCl i 150 mM NaCl (pH 7,5). Niestety, w testach tych nie uzyskano białek OspC_NΔ19 w postaci krystalicznej w żadnym z warunków. Następnie przetestowano kolejne warunki, tym razem manipulując stężeniem białka OspC_NΔ19, wykorzystując te same komercyjne zestawy do krystalizacji, a także przygotowując bufony samodzielnie (Rozdział 3.2.12). Testowano stężenia białek OspC_NΔ19 na poziomie 10 mg/ml, 15 mg/ml oraz 20 mg/ml. Również w tym przypadku nie uzyskano białek w formie krystalicznej.

Po przeanalizowaniu danych literaturowych oraz dostępnych struktur białka OspC w bazie PDB (PDB: 1GGQ oraz 1F1M) pochodzących z *B. burgdorferi* podjęto decyzję o zmianie strategii prowadzenia testów krystalizacyjnych. W związku z tym utworzono nowe mutanty delecyjne białka OspC_NΔ35-37 (BA.OspC_NΔ37, BB.OspC_NΔ37, BG.OspC_NΔ35, BG1.OspC_NΔ35) (Rozdział 4.4.3), rozpuszczone w optymalnych buforach. Białka BA.OspC_NΔ37 oraz BB.OspC_NΔ37 zawieszono w buforze 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, natomiast białka BG.OspC_NΔ35 i BG1.OspC_NΔ35 w buforze 25 mM HEPES (pH 6,5), 150 mM NaCl. Następnie białka zagęszczano do stężenia około 30 mg/ml i preparaty o takim stężeniu wykorzystywano do testów krystalizacyjnych z użyciem komercyjnych zestawów do krystalizacji (Index, PEG/Ion, BCS, Morpheus). Płytki krystalizacyjne inkubowano w temperaturze 4°C. Pierwsze kryształy białek BB.OspC_NΔ37 i BG1.OspC_NΔ35 obserwowano po tygodniu inkubacji. Wyselekcjonowano warunki, w których zachodził proces krystalizacji białek: dla białka BB.OspC_NΔ37 były to 30% PEG 1500 o pH 7,0 (PEG/Ion), a dla białka BG1.OspC_NΔ35 były to 0,2 M octan sodu, trihydrat, 25% PEG 3350, 0,1M HEPES o pH 7,5 (Index).

Warunki krystalizacji białek BB.OspC_NΔ37 (PDB: 7BML) oraz BG1.OspC_NΔ35(PDB: 7NEN), w których udało się uzyskać kryształy, zastosowano podczas prób krystalizacji kompleksu białek BB.OspC_NΔ37–Iric1_NΔ19. Wybór tej pary białek był uzasadniony silnym powinowactwem zaobserwowanym podczas badań metodą MST oraz wcześniejszymi badaniami strukturalnymi dotyczącymi białka BB.OspC_NΔ37. Na tym etapie, oprócz uzyskania preparatów białka BB.OspC_NΔ37 (Rozdział 4.5.3), konieczne było uzyskanie wysokich stężeń białka Iric1_NΔ19 (Rozdział 4.6). Przed przystąpieniem do krystalizacji kompleksu białek BB.OspC_NΔ37 i Iric1_NΔ19, oba białka zagęszczono do stężenia końcowego około 30 mg/ml. Zagęszczone białka BB.OspC_NΔ37 i Iric1_NΔ19 mieszano w stosunku molowym 1:1 i inkubowano 1 godzinę w 4°C. Po inkubacji przygotowano testy krystalizacyjne wykorzystując komercyjne zestawy do krystalizacji (Index, PEG/Ion, BCS, Morpheus), jednak nie zaobserwowano kryształów kompleksu białka BB.OspC_NΔ37 i Iric1_NΔ19. Następnie zastosowano zestawy dedykowane do krystalizacji kompleksów białkowych, promujące oddziaływania międzycząsteczkowe – ProPlex oraz Midas. Pomimo tych prób, nie uzyskano oczekiwanych rezultatów w postaci wykrystalizowanych kompleksów OspC-Iric. Proces krystalizacji kompleksu białek OspC-Iric wymaga dalszej optymalizacji.

5. Dyskusja

Analiza porównawcza białek OspC z różnych gatunków Borrelia

Odkąd rozpoczęto badania nad boreliozą i czynnikiem sprawczym, jakim jest krętek *Borrelia* dowiedziono, że główne gatunki biorące udział w etiologii choroby to: *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* oraz *B. garinii*. Wykazano, że *B. burgdorferi* s.s. jest głównym gatunkiem zakaźnym na terenie Stanów Zjednoczonych, podczas gdy w Europie ma mniejsze znaczenie kliniczne, gdzie dominującymi gatunkami wywołującymi boreliozę są *B. afzelii* i *B. garinii* (Kazimirova i in., 2023). Pomimo że pula gatunków inwazyjnych wykracza poza te trzy główne gatunki, to większość dotychczasowych badań wciąż koncentruje się na *B. burgdorferi* s.s. (Råberg i in., 2017). Przeprowadzone do tej pory obserwacje pokazują, jak bardzo zróżnicowany jest rodzaj *Borrelia*. Co ważne, zróżnicowanie to występuje nie tylko między poszczególnymi gatunkami *Borrelia*, ale również w obrębie jednego gatunku *Borrelia*, co znacznie utrudnia badanie tej grupy bakterii (Barbour i Travinsky, 2010; Margos i in., 2009).

Jednym z najbardziej interesujących białek powierzchniowych *Borrelia*, charakteryzujących się wysokim polimorfizmem, jest białko OspC. Synteza tego białka rozpoczyna się z chwilą, gdy kleszcz zaczyna żerować na ciele żywiciela. Podkreśla się istotną rolę OspC w migracji krętka *Borrelia* z jelita do ślinianek kleszcza oraz w późniejszej transmisji *Borrelia* do układu krwionośnego gospodarza (Grimm i in., 2004). Analizy sekwencji genów kodujących białko OspC stały się podstawą do wyodrębnienia różnych serotypów *Borrelia* charakteryzujących się odmienną inwazyjnością wobec organizmu gospodarza. W ten sposób, dla *B. burgdorferi* s.s. wyróżniono 22 grupy serotypów, z których aż 16 zostało zidentyfikowanych w USA (Wang i in., 1999). Najnowsze badania wskazują na ciągłe poszerzenie się liczby różnych serotypów *Borrelia*, która obecnie obejmuje około 30 grup. Wykazano, że allele *ospC* różnią się specyficznością gatunkową wobec żywicieli; niektóre z nich infekują wiele gatunków żywicieli, podczas gdy inne ograniczają się do jednego lub kilku gatunków (Lemieux i in., 2023; Shifflett i in., 2024).

Poszerzenie analiz genów *ospC* o sekwencje z *B. afzelii* i *B. garinii* zwiększyło liczbę różnych grup (serotypów) *Borrelia* do co najmniej 69. Spośród tych 69 grup *Borrelia* wyodrębniono 24, które są inwazyjne dla organizmu człowieka (Lagal i in., 2003). W przypadku *B. afzelii* opisano 42 różne allele *ospC* pochodzące z krętków europejskich. Na podstawie analiz porównawczych sekwencji tych alleli wyodrębniono

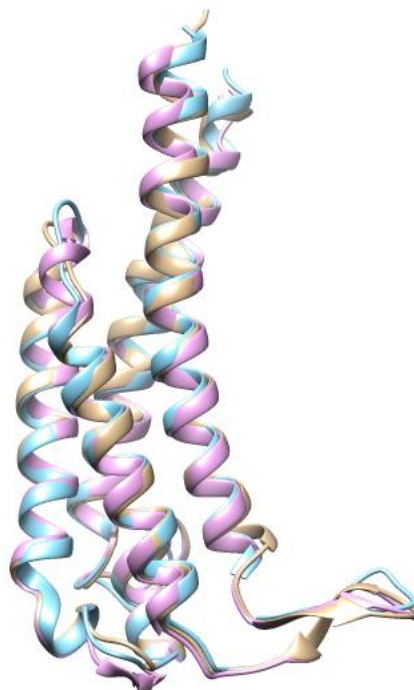
20 grup określanych jako serotypy *Borrelia*, podobnie jak w przypadku *B. burgdorferi* s.s. (Nouri i in., 2021).

Genotypowanie i określanie poziomu zjadliwości konkretnego szczepu *Borrelia* na podstawie *ospC*, może również stanowić istotny predyktor boreliozy obciążonej ryzykiem powikłań wieloukładowych (rozszkana forma choroby) (Barbour i Cook, 2018). Aby w pełni odpowiedzieć na pytanie, jaki jest udział białek OspC należących do różnych szczepów, konieczne są nie tylko badania genetyczne, lecz także poznawanie właściwości białek OspC (Jabbari i in., 2018).

Głównym obiektem badawczym niniejszej pracy są białka OspC pochodzące z czterech różnych gatunków *Borrelia*: *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. garinii* oraz *B. spielmanii*. Gatunki te charakteryzują się zróżnicowanym udziałem w etiologii boreliozy oraz różnorodnym profilem objawów chorobowych.

Białka OspC są najbardziej zróżnicowaną grupą lipoprotein powierzchniowych *Borrelia*. Analizy bioinformatyczne (Rozdział 4.1), mające na celu porównanie badanych białek oraz wyłonienie ich cech charakterystycznych, wykazały, że podobieństwo sekwencji aminokwasowych badanych białek OspC pochodzących z czterech gatunków *Borrelia* wynosi od 60% do 73% (Tabela 4.4). Pomimo wysokiego zróżnicowania sekwencji tych białek, struktury białek OspC zdeponowane w bazie PDB, należące do różnych grup infekcyjnych (grupa A, B i E) *B. burgdorferi* s.s., charakteryzują się wysokim stopniem podobieństwa do białek badanych (Rycina 5.1). W odróżnieniu od podobieństwa strukturalnego, opracowane modele *in silico* (Tabela 4.5) pokazały wysoki stopień zróżnicowania dystrybucji ładunków na powierzchni białek OspC. Za rozkład ładunków powierzchniowych odpowiadają rejony zmienne sekwencji aminokwasowych OspC (Tabela 4.6). Ponadto analizy sekwencji poszczególnych białek wykazały, że OspC_N19 pochodzące z *B. burgdorferii* s.s., *B. afzelii* oraz *B. garinii* w fizjologicznym pH posiadają wypadkowy ładunek ujemny, w przeciwieństwie do OspC_N19 pochodzącego z *B. spielmanii*, który charakteryzuje się silnie dodatnim ładunkiem. Różnice wynikające z zawartości aminokwasów kwasowych (Asp i Glu) i zasadowych (Lys, Arg i His) w łańcuchu polipeptydowym mogą wpływać na zróżnicowanie potencjału zakaźnego gatunków *Borrelia*. *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* oraz *B. garinii* są uważane za główne patogeny ludzkie, podczas gdy udział *B. spielmanii* w etiologii boreliozy u ludzi jest znacznie mniejszy, co może wskazywać na niższy potencjał zakaźny tego gatunku. Warto podkreślić, że *B. spielmanii* została wyizolowana z próbek pochodzących z biopsji skóry pacjentów, u których stwierdzono rumień

wędrujący, będący najczęstszym objawem zakażenia tym gatunkiem krętka. Sugeruje to, że *B. spielmanii* może wywoływać miejscowe infekcje skóry, skoncentrowane w obszarze ogniska zapalnego (Fingerle i in., 2008; Richter i in., 2006; Stanek i Reiter, 2011). Podobne wnioski zostały przedstawione przez Kumaran i in. (2001b), którzy postawili ciekawą hipotezę o korelacji pomiędzy inwazyjnością i zróżnicowaniem zawartości aminokwasów kwasowych w białku OspC. Zaobserwowano, że w białkach OspC pochodzących z inwazyjnych szczepów HB19 i B31 *B. burgdorferi* obecny jest duży region ujemnie naładowany, czego nie zaobserwowano w nieinwazyjnym szczepie 212 (Kumaran i in., 2001b).



Rycina 5.1. Wizualizacja struktur monomeru białek OspC nałożonych na siebie, wskazująca na wysoki poziom podobieństwa analizowanych struktur. Kolorem żółtym oznaczono strukturę białka OspC (PDB: 1GGQ) pochodzącego z *B. burgdorferi* s.s. wykrystalizowanego przez Dunn i Lawson (2001), kolorem niebieskim oznaczono strukturę OspC z *B. burgdorferi* s.s. (PDB:7BML) oraz różowym OspC z *B. garinii* (PDB:7NEN). Dwie ostatnie struktury zostały wykrystalizowane w ramach niniejszej pracy. Wizualizację wykonano przy pomocy programu Chimera.

Interakcja OspC-fibrynogen

Wiązanie różnych komponentów krwi organizmu gospodarza przez bakterie jest powszechne zarówno wśród bakterii Gram-ujemnych, jak i Gram-dodatnich (Ramachandran, 2014). Wśród gronkowców szeroko badane jest również wiązanie fibrynogenu (Thomas i in., 2019). U *Staphylococcus aureus* (Gronkowiec złocisty) zidentyfikowano aż dziewięć białek wiążących fibrynogen, podczas gdy *Staphylococcus pseudintermedius* (patogen psów) produkuje dwa białka wiążące fibrynogen: SpsD oraz SpsL. Badania wykazały, że białko SpsL charakteryzuje się wysokim powinowactwem do wiązania psiego fibrynogenu, co zostało potwierdzone poprzez badania porównawcze z fibrynogenem innego pochodzenia (m. in. owca, bydło czy człowiek) (Pickering i in., 2019; Pietrocola i in., 2016). Wykształcenie przez bakterie mechanizmów wiązania fibrynogenu może być ściśle związane z zakłócaniem procesu krzepnięcia krwi, promowaniem przylegania komórek bakteryjnych do tkanek organizmu gospodarza, unikaniem reakcji ze strony układu immunologicznego czy też stymulowaniem tworzenia ropni. Pomimo że czynniki bakteryjne związane z tropizmem do różnych tkanek żywiciela są w dalszym ciągu mało poznane, badania wskazują, że to właśnie białka powierzchniowe komórek bakteryjnych inicjują szereg interakcji z czynnikami gospodarza, umożliwiając skuteczne rozprzestrzenianie się patogenów w organizmie (Josse i in., 2017; Ribet i Cossart, 2015, Zhang i in., 2022).

Na wczesnych etapach infekcji, *Borrelia* musi przeciwstawić się wielokierunkowym działaniom układu odpornościowego żywiciela, które mają na celu eliminację patogenu z układu krwionośnego. Liczne badania potwierdziły, że białko OspC odgrywa kluczową rolę w umożliwieniu *Borrelia* przetrwania tych reakcji oraz adaptacji do niekorzystnego środowiska, jakim jest układ krwionośny żywiciela (Radolf i in., 2012). Obserwacje wykazały, że bakterie *Borrelia* są zdolne do wiązania na swojej powierzchni różnych czynników gospodarza, tworząc w ten sposób „płaszcz ochronny”, który umożliwia unikanie negatywnych skutków odpowiedzi immunologicznej kręgowców. OspC jest właśnie jednym z białek powierzchniowych wykazujących takie zdolności, co sprzyja przetrwaniu bakterii w układzie krwionośnym gospodarza (Kraiczy, 2016). Znaczenie takiego mechanizmu podkreśla wysoki poziom immunogenności białka OspC. Badania wykazały, że białko OspC zawiera w pobliżu końca karboksylowego wysoce konserwatywny epitop, który wywołuje silną odpowiedź immunologiczną (Lovrich i in., 2005). Fakt ten może wskazywać na konieczność stosowania przez *Borrelia* strategii, mającej na celu uniknięcie reakcji ze strony układu immunologicznego

gospodarza. Strategia ta może polegać na otaczaniu się bakterii białkami układu krwionośnego żywiciela, co pozwala ukryć regiony mogące potencjalnie stymulować odpowiedź immunologiczną, a w konsekwencji prowadzić do eliminacji bakterii z organizmu gospodarza (Kraiczy, 2016).

Mając na uwadze możliwość wiązania fibrynogenu przez różne grupy bakterii, w niniejszej pracy postawiono hipotezę, że krętki *Borrelia burgdorferi* s.l. także wiążą na swojej powierzchni fibrynogen. Prawdziwość tej hipotezy weryfikowano poprzez badania oddziaływań *in vitro* pomiędzy białkami OspC i fibrynogenem. Do osiągnięcia tego celu wykorzystano preparaty rekombinowanych białek OspC_N19 pochodzących z czterech różnych gatunków *Borrelia* oraz ludzki fibrynogen i technikę MST (Rozdział 4.8). Potwierdzono możliwość wiązania przez białka OspC nowego partnera białkowego, jakim jest ludzki fibrynogen. Uzyskane wyniki pokazały, że zidentyfikowane wiązanie OspC-fibrynogen charakteryzuje się silnym powinowactwem, z wartościami stałej K_d w zakresach 30-400 nM. Powinowactwo pomiędzy parą białek różni się pomiędzy poszczególnymi gatunkami *Borrelia*. Sigmoidalne kształty krzywych wiązań sugerują wysoką specyficzność uzyskanych interakcji. Wiązanie fibrynogenu na powierzchni krętka (za pośrednictwem białka OspC) może prowadzić do utworzenia na jego powierzchni pewnego rodzaju „ochronnego płaszcza”, który ułatwia bakteriom rozprzestrzenianie się w organizmie gospodarza.

Potwierdzeniem dla uzyskanych w niniejszej pracy wyników są wyniki dotyczące badań powinowactwa białek OspC z fibrynogenem uzyskane z wykorzystaniem dwóch niezależnych metod opublikowane w pracy Bierwagen i in., 2020. Interakcje białek OspC, pochodzących z gatunków *Borrelia* badanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej, z ludzkim fibrynogenem analizowano przy użyciu interferometrii warstwowej (ang. *Bio-Layer Interferometry*, BLI). Wyniki potwierdziły formowanie się kompleksów tych białek, a uzyskane wartości K_d w zakresach nanomolowych ($K_d = 0,74-49,92$ nM) wskazują na wysokie powinowactwo tych białek (Bierwagen i in., 2020). Należy zwrócić uwagę na zauważalną różnicę uzyskanych wartości K_d dla obu metod (BLI i MST). W przypadku technologii MST zaobserwowano nieco wyższe wartości K_d w zakresie 48-408 nM (Rozdział 4.8). Znakowanie fluorescencyjne lizyn w obrębie łańcucha polipeptydowego białka OspC_NΔ19, wymagane do przeprowadzenia pomiaru MST, mogło negatywnie wpłynąć na konformację białka lub rozkład ładunku powierzchniowego, co w konsekwencji mogło zmienić powinowactwo do fibrynogenu. Metoda BLI nie wymagała znakowania białka

OspC_NΔ19, lecz jedynie unieruchomienie białka przy użyciu znacznika HisTag, znajdującego się na jego końcu aminowym. Pozwoliło to zachować natywną konformację białka i zapewniło jego pełną dostępność dla wiązania z fibrynogenem. Trzecią metodą, za pomocą której potwierdzono oddziaływanie OspC-fibrynogen, był test immunoenzymatyczny ELISA, również wskazujący na silne oddziaływanie białka BB.OspC_NΔ19 z fibrynogenem (Kd=210 nM) tych białek.

Dodatkowym potwierdzeniem dla uzyskanych wyników są badania strukturalne SAXS, które również potwierdziły tworzenie kompleksu białka BB.OspC_NΔ19 z fibrynogenem oraz zasugerowały potencjalne miejsce wiązania białka OspC do centralnej części fibrynogeny (Rozdział 4.9). Wyniki te są spójne z analizami MST, które również wskazują na tworzenie kompleksu BB.OspC_NΔ19 z fragmentem E fibrynogeny, wykazującym większe powinowactwo w porównaniu do fragmentu D (Rozdział 4.8).

Ciekawą propozycją uzupełnienia badań *in vitro* dotyczących interakcji OspC-fibrynogen jest poszerzenie puli białek o fibrynogen pochodzący z innych gatunków (np. pies domowy *Canis familiaris*, kot domowy *Felis catus* czy bydlę domowe *Bos taurus*). Dzięki temu będzie można odpowiedź na pytanie „Czy wiązanie OspC-fibrynogen przedstawione w niniejszej pracy charakteryzuje się również specyficznością gatunkową?”.

Interakcja OspC-Iric

Interakcja między białkiem OspC oraz Salp15 odgrywa kluczową rolę w transmisji krętka *Borrelia* do organizmu gospodarza oraz w unikaniu jego odpowiedzi immunologicznej, co może przyczyniać się do rozwoju boreliozy (Kolb i in., 2015). Analiza baz danych umożliwiła zidentyfikowanie 18 sekwencji aminokwasowych, homologów Salp15 (białka Iric), pochodzących ze śliny kleszcza *I. ricinus*. (Wen i in., 2020). Ponieważ *I. ricinus* jest powszechnym gatunkiem pasożytniczym i wektorem wielu patogenów występującym w Europie, zgłębianie wiedzy na temat białek kleszcza zaangażowanych w pasożytnictwo jest istotne.

W niniejszej pracy przeanalizowano interakcje pomiędzy białkami OspC_NΔ19 pochodzącymi z różnych gatunków *Borrelia* a trzema homologami białka Salp15: Iric1_NΔ19, Iric2_NΔ19 oraz Iric3_NΔ19, z wykorzystaniem techniki MST (Rozdział 4.8). Białka Iric pochodzą ze śliny kleszcza *I. ricinus*, a wydajna ich produkcja w systemie bakteryjnym stanowiła wyzwanie, ponieważ naturalnie wytwarzane są w organizmach

eukariotycznych. Produkcja białek eukariotycznych w komórkach bakteryjnych jest problematyczna, ponieważ bakterie nie posiadają odpowiednich mechanizmów do właściwego fałdowania białek, tworzenia mostków siarczkowych oraz przeprowadzenia obróbki białek, takich jak modyfikacje potranslacyjne, które są kluczowe dla ich aktywności. Aby umożliwić prawidłowe formowanie mostków siarczkowych w rekombinowanych białkach Iric, zastosowano wektor pET-39(+), który pozwala na produkcję białka fuzyjnego Iric_NΔ19-DsbA. Warto podkreślić, że białko DsbA jest oksydoreduktazą triolową, pełniącą kluczową rolę w katalizowaniu tworzenia mostków disiarczkowych pomiędzy resztami cysteiny w białkach, co jest niezbędne dla ich prawidłowego fałdowania (Martin i in., 1993). Wykorzystanie tego wektora oraz optymalizacja warunków produkcji i oczyszczania białek Iric_NΔ19 umożliwiło ich efektywne uzyskanie (Rozdział 4.11). Badania nad białkami śliny ektopasożytów nie ograniczają się jedynie do rodzaju *Ixodes*, lecz coraz częściej obejmują również inne ektopasożyty żywiące się krwią (np. pluskwa domowa). Podobnie jak kleszcze *Ixodes*, organizmy te wykorzystują białka śliny, aby zapobiegać krzepnięciu krwi i zwężaniu naczyń krwionośnych oraz znieczulić receptory bólu gospodarza, co pozwala im na efektywne pobieranie pokarmu (Talbot i in., 2017). Sugeruje się, że w wyniku ewolucji i interakcji między pasożytem a gospodarzem, może zachodzić coraz większa specjalizacja gatunków pasożytów oraz genów zaangażowanych w te interakcje (Jmel i in., 2021). W związku z tym, metodyka przedstawiona w niniejszej pracy, dotycząca efektywnej produkcji białek śliny kleszcza *Ixodes*, może być zastosowana do szerokiego spektrum białek wydzielanych przez ślinianki innych ektopasożytów podczas przyszłych prac badawczych, umożliwiając dalsze zgłębianie mechanizmów ich działania oraz potencjalnych zastosowań terapeutycznych (Jmel i in., 2021; Talbot i in., 2017).

Wyniki MST wskazują na zróżnicowane powinowactwo między białkami OspC_NΔ19 a Iric_NΔ19 w zależności od gatunku *Borrelia*. Interakcje zostały potwierdzone dla białek BB.OspC_NΔ19 oraz BS.OspC_NΔ19 ze wszystkimi białkami Iric_NΔ19, podczas gdy BA.OspC_NΔ19 wykazywało interakcje jedynie z Iric1_NΔ19. Natomiast białko BG.OspC_NΔ19 nie wykazało żadnych interakcji z białkami Iric_NΔ19. W odróżnieniu od wyników MST, pomiary powinowactwa tych samych par białek OspC-Iric uzyskane przy użyciu technologii BLI, potwierdziły zdolność tworzenia się kompleksów dla wszystkich analizowanych par białek (Bierwagen i in., 2020). Różnice między wynikami uzyskanymi za pomocą tych dwóch metod badawczych mogą wynikać ze sposobu postępowania z białkami w obu podejściach. W przypadku MST

konieczne było kowalencyjne znakowanie białek OspC znacznikiem fluorescencyjnym, który reaguje z resztami lizyny w łańcuchu polipeptydowym tych białek. Natomiast technika BLI umożliwia detekcję interakcji makrocząsteczek bez potrzeby ich znakowania, jednak wymaga immobilizacji białka, co może modulować powinowactwo.

Z danych literaturowych wynika, że w obrębie sekwencji aminokwasowej białka OspC wyróżniono dwa epitopy: L5 (131-159 aa) oraz H5 (160-200 aa) (Rycina 4.3). Epitop L5 znajduje się w obrębie helisy alfa 3, regionu, który może być rozpoznawany przez układ immunologiczny gospodarza i jest istotny w kontekście wiązania białka OspC z różnymi receptorami. Z kolei epitop H5 znajduje się w helisie alfa 5, która jest kluczowa dla stabilności struktury białka oraz jego funkcji w interakcji z gospodarzem (Buckles i in., 2006; Marconi i in., 2020). Porównanie powyższych regionów badanych białek OspC wykazało, że w badanych białkach OspC z *B. afzelii* i *B. garinii* występują dwie dodatkowe lizyny, które nie są obecne w białkach OspC z *B. burgdorferi* s.s. i *B. spielmanii*. Brak oddziaływania po wyznakowaniu BA.OspC_Δ19 i BG.OspC_Δ19 sugeruje, że lizyny te mogą być zaangażowane w tworzenie kompleksu z białkami Iric_Δ19. Przeprowadzone eksperymenty wskazują, że w kontekście badania powyższych interakcji, technologia BLI może być bardziej odpowiednia, ponieważ nie wymaga znakowania białek, a jedynie ich immobilizacji przy użyciu HisTag umieszczonego na końcu aminowym białka. Można także rozważyć zmianę strategii znakowania białek do pomiarów MST i zastosowanie fluorescencyjnego znakowania znacznika HisTag, które mogłyby rozwiązać problem znakowania łańcuchów bocznych aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym białka.

Przesiewowe testy krystalizacyjne

Dotychczas nie uzyskano danych strukturalnych dotyczących kompleksów białek OspC-Iric. W ramach niniejszej pracy podjęto próby uzyskania kryształów tych kompleksów, jednak zakończyły się one niepowodzeniem. Niemniej jednak uzyskane wyniki dostarczyły pewnych istotnych informacji na temat wyzwań związanych z krystalizacją tych białek oraz możliwości, jakie daje optymalizacja warunków eksperymentalnych (Rozdział 4.11).

Pierwszym etapem badań była optymalizacja warunków krystalizacji białka OspC_Δ19, zakończona niepowodzeniem. Dane literaturowe wskazują, że zarówno koniec aminowy, jak i karboksylowy białka OspC są elastyczne, co może utrudniać

proces krystalizacji (Eicken i in., 2001). Wzorując się na wcześniej stosowanych podejściach zastosowano mutanty OspC_NΔ35-37. Uzyskano kryształy białek BB.OspC_NΔ37 i BG1.OspC_NΔ35, które zostały wykorzystane do badań strukturalnych w Centrum Synchrotronowym EMBL/Desy w Hamburgu (Kumaran i in., 2001b). Uzyskano struktury białek BB.OspC_NΔ37 (PDB:7BML) i BG1.OspC_NΔ35 (PDB: 7NEN), które zostały zdeponowane w bazie PDB. O ile wcześniej rozwiązano i opublikowano struktury białek OspC z *B. burgdorferi*, struktura OspC z *B. garinii* jest pierwszą opublikowaną spośród innych gatunków *Borrelia*. Wyniki te potwierdziły więc wcześniej zaobserwowaną wysoką konserwatywność strukturalną białek OspC z rodzaju *Borrelia*.

Na podstawie przeprowadzonych optymalizacji krystalizacji OspC oraz wyników wcześniejszych badań interakcji, podjęto próbę krystalizacji kompleksu BB.OspC_NΔ37-Iric1_NΔ19. Pomimo licznych prób optymalizacji procesu krystalizacji, nie udało się uzyskać tego kompleksu. Możliwe przyczyny braku powodzenia w krystalizacji kompleksu mogą obejmować wiele czynników, takich jak np. niewłaściwa proporcja białek czy nieprawidłowa konformacja białka Iric1_NΔ19 uzyskana w trakcie renaturacji, po oczyszczeniu białka w warunkach denaturujących.

W obliczu napotkanych trudności z krystalizacją kompleksu BB.OspC_NΔ37-Iric1_NΔ19, można zaproponować kilka kierunków dalszych badań. Oczyszczanie białka Iric1_NΔ19 w warunkach denaturujących może zakłócać przywracanie jego natywnej postaci, dlatego bardziej efektywne mogłoby być zastosowanie innych wariantów delecyjnych Iric lub innych strategii oczyszczania Iric_NΔ19.

6. PODSUMOWANIE

W niniejszej pracy doktorskiej przedstawiono wyniki badań, których celem było poszerzenie wiedzy na temat białek OspC, pochodzących z różnych gatunków *Borrelia*, będących czynnikami sprawczymi boreliozy. Przeprowadzona analiza porównawcza wykazała istotne różnice w sekwencjach aminokwasowych białek OspC, wpływające na zróżnicowaną dystrybucję ładunków na powierzchni tych białek, co zależy od gatunku *Borrelia*, z którego pochodzą. Kluczowym osiągnięciem było odkrycie potencjalnego nowego ligandu – fibrynogenu, który *in vitro* wykazał wysokie powinowactwo do białek OspC, oraz wykazanie różnic w sile tych interakcji w zależności od badanego typu OspC. Mianowicie, interakcja OspC z *B. burgdorferi* s.s. cechowała się najsilniejszym powinowactwem, podczas gdy w przypadku *B. spielmanii* obserwowano najslabsze powinowactwo, co sugeruje mniejszy udział *B. spielmanii* w etiologii boreliozy. Zaproponowano także model strukturalny kompleksu OspC – fibrynogen.

Dodatkowo praca zawiera analizy oddziaływań białek OspC z homologami Salp15 – Iric. Choć w literaturze scharakteryzowano już białko Iric1, pozostałe homologii Iric2 i Iric3 są wciąż mniej poznane. Wyniki przeprowadzonych badań potwierdziły interakcje białek Iric i OspC pochodzących z *B. afzelii*, *B. burgdorferi* s.s. oraz *B. spielmanii*, jednak nie zaobserwowano ich w przypadku *B. garinii*, co najprawdopodobniej wynikało z przyjętej strategii znakowania łańcuchów bocznych lizyny białka OspC stosowanej w pomiarach MST. Biorąc pod uwagę fakt, że ta sama para białek wykazywała wysokie powinowactwo podczas pomiarów z zastosowaniem innych technik, zaproponowano, że kowalencyjne przyłączenie znacznika fluorescencyjnego maskowało rejon OspC, który oddziałuje z białkami Iric.

Ważnym i pracochłonnym etapem pracy było opracowanie bardzo wydajnej preparatyki białek OspC oraz Iric, co wymagało licznych optymalizacji związanych z ich produkcją oraz oczyszczaniem. W efekcie przedstawiono szczegółowe protokoły produkcji tych białek, które mogą stanowić cenne narzędzie dla innych badaczy zajmujących się podobnym tematem. Ponadto, podjęto liczne próby krystalizacji kompleksu białek OspC-Iric, które jednak nie zakończyły się uzyskaniem struktur krystalicznych kompleksu. Wykrystalizowano natomiast białka OspC pochodzące z *B. burgdorferi* s.s. oraz *B. garinii*, a uzyskane dane strukturalne zostały zdeponowane w bazie PDB.

W świetle powyższych wyników należy podkreślić, że w przedstawionej pracy doktorskiej z powodzeniem zrealizowano założone cele badawcze. Opracowano wydajne protokoły produkcji badanych białek oraz szczegółowo opisano różnice między białkami OspC wynikające z ich przynależności do różnych gatunków *Borrelia*. Ponadto, zidentyfikowano interakcje białek OspC z różnymi ligandami pochodzącymi z organizmu ssaka (fibrynogen) oraz kleszcza (Iric), a także zaproponowano potencjalne miejsca wiązania tych ligandów. Co więcej, wstępne badania krystalograficzne umożliwiły uzyskanie struktur białek OspC z *B. burgdorferi* oraz *B. garinii*. Pomimo, że nie uzyskano struktury kompleksu białek OspC-Iric to opracowane protokoły przesiewowych testów krystalizacyjnych tego kompleksu mogą w przyszłości przyczynić się do poznania ich struktury.

Zaprezentowane badania mają istotne znaczenie dla poszerzania wiedzy na temat gatunków *Borrelia*, takich jak *B. afzelii* i *B. garinii*, które odgrywają kluczową rolę w rozprzestrzenianiu się boreliozy w Europie, a także na temat białek Iric pochodzących z klesza *Ixodes ricinus*, dominującego na tych terenach. Wyniki badań zostały także opublikowane w dwóch artykułach, które są powszechnie dostępne dla środowisk naukowych.

7. STRESZCZENIE

Borelioza, wywoływana przez krętki z rodzaju *Borrelia*, jest odzwierzęcą chorobą o zasięgu obejmującym całą północną półkulę Ziemi, stanowiącą istotne wyzwanie dla służby zdrowia. Pomimo trwających od lat 80-tych badań nad czynnikami sprawczymi boreliozy, brak skutecznej szczepionki oraz wysoka liczba zachorowań podtrzymują nieustanne zainteresowanie tą chorobą w środowiskach naukowych. Krętki z rodzaju *Borrelia* wyróżniają się zdolnością do wytwarzania licznych lipoprotein powierzchniowych, które odgrywają kluczową rolę na różnych etapach ich cyklu życiowego. W szczególności białko powierzchniowe OspC (ang. *Outer Surface Protein C*) pełni istotną funkcję w początkowych fazach infekcji, umożliwiając skuteczną adaptację krętka w organizmie ssaka. Badania wykazały, że OspC wchodzi w interakcje z białkami układu krwionośnego ssaka oraz białkami śliny kleszcza, co sprzyja efektywnej infekcji oraz przetrwaniu patogenu.

Celem niniejszej pracy była dogłębna analiza białek OspC pochodzących z różnych gatunków *Borrelia*. Badania koncentrowały się na identyfikacji różnic między tymi białkami oraz analizie interakcji z wybranymi ligandami pochodzącymi zarówno od kleszcza, jak i człowieka. Przeanalizowano *in vitro* interakcje OspC z ludzkim fibrynogenem oraz białkami Iric, homologami białka Salp15 (ang. *Salivary Gland Protein 15*), obecnych w ślinie kleszcza, wykorzystując technologię MST, która umożliwiła precyzyjną ocenę tych interakcji.

Uzyskane wyniki badań ujawniły nowe interakcje między OspC a fibrynogenem, a wartości stałych wiązań K_d na poziomie nanomolowym wskazały na ich silne powinowactwo. Na podstawie danych SAXS zaproponowano model przestrzenny kompleksu OspC-fibrynogen. Potwierdzono także interakcje OspC z białkami Iric i zaproponowano miejsce wiązania białka Iric przez OspC. Opracowane protokoły produkcji białek OspC i Iric umożliwiły uzyskanie wysokiej jakości preparatów białkowych, użytych także do badań strukturalnych. Mimo że przesiewowe testy krystalizacyjne nie doprowadziły do uzyskania kompleksu białek OspC-Iric, to struktura OspC pochodząca z *Borrelia garinii* wzbogaciła bazę danych o nowy gatunek *Borrelia*. Optymalizacje przeprowadzone w trakcie prezentowanych badań mogą przyczynić się do dalszych prób krystalizacji powyższego kompleksu.

Wyniki te dostarczają cennych informacji na temat różnorodności białek OspC, ich struktury oraz interakcji z różnymi ligandami, co ma kluczowe znaczenie

dla zrozumienia mechanizmów patogenezы boreliozy. Odkrycia te mogą przyczynić się do rozwoju skutecznych metod profilaktycznych i terapeutycznych, stanowiąc ważny wkład w dynamicznie rozwijające się badania nad boreliozą i jej patogenami, a także podkreślają potrzebę kontynuacji dalszych badań w tym zakresie.

8. SUMMARY

Lyme disease, caused by spirochetes of the genus *Borrelia*, is a zoonotic disease affecting the entire northern hemisphere of the Earth, posing a significant challenge to health services. Despite ongoing research on the causative agents of Lyme disease since the 1980s, the lack of an effective vaccine and the high number of cases maintain constant interest in this disease in scientific community. The spirochetes of the genus *Borrelia* are distinguished by their ability to produce numerous surface lipoproteins, which play a key role at various stages of their life cycle. In particular, the surface protein OspC (*Outer Surface Protein C*) plays an important role in the initial phases of infection, enabling effective adaptation of the spirochete in the mammalian body. Studies have shown that OspC interacts with mammalian bloodstream proteins and tick saliva proteins to promote effective infection and pathogen survival.

The aim of this study was an in-depth analysis of the OspC proteins from various *Borrelia* species. The research focused on identifying differences between these proteins and analyzing interactions with selected derived ligands from both ticks and humans. The *in vitro* interactions of OspC with human fibrinogen and Iric proteins, homologues of Salp15 (*Salivary Gland Protein 15*), present in tick saliva were analyzed using MST technology, which enabled a precise assessment of these interactions.

The obtained research results revealed new interactions between OspC and fibrinogen, and the values of K_d binding constants at the nanomolar level indicated their strong affinity. Based on SAXS data, a spatial model of the OspC-fibrinogen complex was proposed. Interactions of OspC with Iric proteins were also confirmed and a binding site for the Iric protein by OspC was proposed. The developed protocols for the production of OspC and Iric proteins made it possible to obtain high-quality protein preparations, also used for structural studies. Although crystallization screening tests did not result in the production of an OspC-Iric protein complex, the OspC structure from *Borrelia garinii* added a new *Borrelia* species to the database. The optimizations carried out during the presented research may contribute to further attempts to crystallize the above complex.

These results provide valuable information on the diversity of OspC proteins, their structure and interactions with various ligands, which is crucial for understanding the mechanisms of Lyme disease pathogenesis. These discoveries may contribute

to the development of effective preventive and therapeutic methods, constituting an important contribution to the dynamically developing research on Lyme disease and its pathogens, and also highlight the need to continue further research in this area.

9. WYKAZ PUBLIKACJI

Badania wykonywane w ramach pracy doktorskiej zostały opublikowane w poniższych pracach:

Czasopisma naukowe znajdujące się na tzw. liście filadelfijskiej:

- 1) **Bierwagen, P.**, Szpotkowski, K., Jaskolski, M., Urbanowicz, A. (2019). *Borrelia* outer surface protein C is capable of human fibrinogen binding. *The FEBS Journal*, 286(12), 2415-2428. DOI:10.1111/febs.14810.

Praca nagrodzona w konkursie im. prof. Kazimierza Bassalika za najlepszą pracę mikrobiologiczną opublikowaną w roku 2019

Nagroda przyznana przez Komitet Biologii Molekularnej PAN

- 2) **Bierwagen, P.**, Sliwiak, J., Jaskolski, M., Urbanowicz, A. (2020). Strong interactions between Salp15 homologues from the tick *I. ricinus* and distinct types of the outer surface OspC protein from *Borrelia*. *Ticks and Tick Borne Diseases*, 12(2). DOI: 10.1016/j.ttbdis.2020.101630.

Monografie pokonferencyjne nierecenzowane:

- 1) **Bierwagen, P.**, Urbanowicz A., (2016) „Comparative structural studies of OspC from *Borrelia burgdorferi* sensu lato”, 2nd Congress BIO 2016 „Expanding beyond the limits” (Book of Abstracts, strona: 109).
- 2) **Bierwagen, P.**, Szpotkowski, K., Jaskólski, M., Urbanowicz, A. (2018) „Outer surface protein C (OspC) from *Borrelia* is capable of fibrinogen binding”, The 43rd FEBS Congress.

10. FINANSOWANIE

Badania wykonywane w ramach pracy doktorskiej były finansowane z projektu:

NCN, OPUS9 2015/17/B/NZ1/00873, „Strukturalne badania białek kluczowych dla oddziaływań pomiędzy kleszczem, ssakiem i patogenem” (2016-2018).

11. LITERATURA

Adeolu, M., Gupta, R. S. (2014). A phylogenomic and molecular marker based proposal for the division of the genus *Borrelia* into two genera: the emended genus *Borrelia* containing only the members of the relapsing fever *Borrelia*, and the genus *Borrelia* gen. nov. containing the members of the Lyme disease *Borrelia* (*Borrelia burgdorferi* sensu lato complex). *Antonie van Leeuwenhoek*, 105(6), 1049–1072. DOI:10.1007/s10482-014-0164-x.

Anderson, J. M., Ammerman, N. C., Norris, D. E. (2004). Molecular differentiation of metastriate tick immatures. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 4(4), 334–342. DOI:10.1089/vbz.2004.4.334.

Anguita, J., Ramamoorthi, N., Hovius, J. W. ., Das, S., Thomas, V., Persinski, R., Fikrig, E. (2002). Salp15, an *Ixodes scapularis* salivary protein, inhibits CD4+ T cell activation. *Immunity*, 16(6), 849–859. DOI:10.1016/s1074-7613(02)00325-4.

Bakker, R. G., Li, C., Miller, M. R., Cunningham, C., Charon, N. W. (2006). Identification of specific chemoattractants and genetic complementation of a *Borrelia burgdorferi* chemotaxis mutant: flow cytometry-based capillary tube chemotaxis assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(4), 1180–1188. DOI:10.1128/AEM.01913-06.

Barbour, A. G., Benach, J. L. (2019). Discovery of the Lyme Disease Agent. *mBio*, 10(5). DOI:10.1128/mbio.02166-19.

Becker, M., Bunikis, J., Lade, B. D., Dunn, J. J., Barbour, A. G., Lawson, C. L. (2005). Structural Investigation of *Borrelia burgdorferi* OspB, a Bactericidal Fab Target. *Journal of Biological Chemistry* 280(17), 17363–17370. DOI:10.1074/jbc.m412842200.

Bierwagen, P., Szpotkowski, K., Jaskolski, M., Urbanowicz, A. (2019). *Borrelia* outer surface protein C is capable of human fibrinogen binding. *The FEBS Journal*, 286(12), 2415–2428. DOI:10.1111/febs.14810.

Bierwagen, P., Sliwiak, J., Jaskolski, M., Urbanowicz, A. (2020). Strong interactions between Salp15 homologues from the tick *I. ricinus* and distinct types of the outer surface OspC protein from *Borrelia*. *Ticks and Tick Borne Diseases*, 12(2). DOI: 10.1016/j.ttbdis.2020.101630.

Boyle, W. K., Groshong, A. M., Drecktrah, D., Boylan, J. A., Gherardini, F. C., Blevins, J. S., Bourret, T. J. (2019). DksA controls the response of the Lyme disease

spirochete *Borrelia burgdorferi* to starvation. *Journal of Bacteriology*, 201(4). DOI:10.1128/jb.00582-18.

Breuner, N. E., Hojgaard, A., Eisen, L. (2018). Lack of Evidence for Transovarial Transmission of the Lyme Disease Spirochete *Borrelia mayonii* by Infected Female *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) Ticks. *Journal of Medical Entomology*, 55(3), 739–741. DOI:10.1093/jme/tjx248.

Brisson, D., Dykhuizen, D. E., Ostfeld, R. S. (2008). Conspicuous impacts of inconspicuous hosts on the Lyme disease epidemic. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275(1631), 227–235. DOI:10.1098/rspb.2007.1208.

Buckles, E. L., Earnhart, C. G., Marconi, R. T. (2006). Analysis of antibody response in humans to the type A OspC loop 5 domain and assessment of the potential utility of the loop 5 epitope in Lyme disease vaccine development. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13(10), 1162-1165. DOI:10.1128/CVI.00099-06.

Burke, G., Wikel, S. K., Spielman, A., Telford, S. R., McKay, K., Krause, P. J., (2005). Hypersensitivity to ticks and Lyme disease risk. *Emerging infectious diseases*, 11(1), 36-41. DOI:10.3201/eid1101.040303.

Burn, L., Tran, T. M. P., Pilz, A., Vyse, A., Fletcher, M. A., Angulo, F. J., Stark, J. H. (2023). Incidence of Lyme borreliosis in Europe from National Surveillance Systems (2005–2020). *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 23(4), 156-171. DOI: 10.1089/vbz.2022.0071.

Byram, R., Gaultney, R. A., Floden, A. M., Hellekson, C., Stone, B. L., Bowman, A., Brisette, C. A. (2015). *Borrelia burgdorferi* RevA significantly affects pathogenicity and host response in the mouse model of Lyme disease. *Infection and Immunity*, 83(9), 3675–3683. DOI:10.1128/iai.00530-15.

Cabezas-Cruz, A., Valdés, J. J. (2014). Are ticks venomous animals? *Frontiers in Zoology*, 11(1), 47. DOI:10.1186/1742-9994-11-47.

Caimano, M. J., Dunham-Ems, S., Allard, A. M., Cassera, M. B., Kenedy, M., Radolf, J. D. (2015). Cyclic di-GMP modulates gene expression in Lyme disease spirochetes at the tick-mammal interface to promote spirochete survival during the blood meal and tick-to-mammal transmission. *Infection and Immunity*, 83(8), 3043–3060. DOI:10.1128/iai.00315-15.

Caimano, M. J., Groshong, A. M., Belperron, A., Mao, J., Hawley, K. L., Luthra, A., Radolf, J. D. (2019). The RpoS gatekeeper in *Borrelia burgdorferi*: an invariant

regulatory scheme that promotes spirochete persistence in reservoir hosts and niche diversity. *Frontiers in microbiology*, 10. DOI:10.3389/fmicb.2019.01923.

Caine, J. A., Coburn, J. (2015). A short-term *Borrelia burgdorferi* infection model identifies tissue tropisms and bloodstream survival conferred by adhesion proteins. *Infection and Immunity*, 83(8), 3184–3194. DOI:10.1128/iai.00349-15.

Caine, J. A., Coburn, J. (2016). Multifunctional and redundant roles of *Borrelia burgdorferi* Outer Surface Proteins in tissue adhesion, colonization, and complement evasion. *Frontiers in Immunology*, 7(442). DOI:10.3389/fimmu.2016.00442.

Caine, J. A., Lin, Y.-P., Kessler, J. R., Sato, H., Leong, J. M., Coburn, J. (2017). *Borrelia burgdorferi* outer surface protein C (OspC) binds complement component C4b and confers bloodstream survival. *Cellular Microbiology*, 19(12). DOI:10.1111/cmi.12786.

Carr, A. L., Mitchell, R. D., Dhammi, A., Bissinger, B. W., Sonenshine, D. E., Roe, R. M. (2017). Tick Haller's organ, a new paradigm for arthropod olfaction: how ticks differ from insects. *International journal of molecular sciences*, 18(7), 1563. DOI:10.3390/ijms18071563.

Carrasco, S. E., Troxell, B., Yang, Y., Brandt, S. L., Li, H., Sandusky, G. E., Condon, K. W., Serezani, C. H., Yang, X. F. (2015). Outer surface protein OspC is an antiphagocytic factor that protects *Borrelia burgdorferi* from phagocytosis by macrophages. *Infection and Immunity*, 83(12), 4848–4860. DOI:10.1128/iai.01215-15.

Casjens, S., Palmer, N., Van Vugt, R., Mun Huang, W., Stevenson, B., Rosa, P., M. Fraser, C. (2002). 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(3), 490–516. DOI:10.1046/j.1365-2958.2000.01698.x.

CDC. (2024). *Where Ticks Live*. Pobrane z: <https://www.cdc.gov/ticks/about/where-ticks-live.html>.

Chmelař, J., Kotál, J., Karim, S., Kopacek, P., Francischetti, I. M. B., Pedra, J. H. F., Kotsyfakis, M. (2016). Sialomes and mialomes: A systems-biology view of tick tissues and tick–host interactions. *Trends in Parasitology*, 32(3), 242–254. DOI:10.1016/j.pt.2015.10.002.

Coleman, J. L., Gebbia, J. A., Piesman, J., Degen, J. L., Bugge, T. H., Benach, J. L. (1997). Plasminogen is required for efficient dissemination of *B. burgdorferi* in ticks

and for enhancement of spirochetemia in mice. *Cell*, 89(7), 1111-1119. DOI:10.1016/S0092-8674(00)80298-6.

Corona, A., Schwartz, I. (2015). *Borrelia burgdorferi*: carbon metabolism and the tick-mammal enzootic cycle. *Microbiology spectrum*, 3(3).

DOI:10.1128/microbiolspec.mbp-0011-2014.

Das, S., Banerjee, G., DePonte, K., Marcantonio, N., Kantor, F. S., Fikrig, E. (2001). Salp25D, an *Ixodes scapularis* antioxidant, is 1 of 14 immunodominant antigens in engorged tick salivary glands. *The Journal of Infectious Diseases*, 184(8), 1056–1064.

DOI:10.1086/323351.

Dowdell, A. S., Murphy, M. D., Azodi, C., Swanson, S. K., Florens, L., Chen, S., Zückert, W. R. (2017). Comprehensive spatial analysis of the *Borrelia burgdorferi* lipoproteome reveals a compartmentalization bias toward the bacterial surface. *Journal of Bacteriology*, 199(6). DOI:10.1128/jb.00658-16.

Drecktrah, D., Lybecker, M., Popitsch, N., Rescheneder, P., Hall, L. S., Samuels, D. S. (2015). The *Borrelia burgdorferi* RelA/SpoT Homolog and Stringent Response Regulate Survival in the Tick Vector and Global Gene Expression during Starvation. *PLOS Pathogens*, 11(9), e1005160. DOI:10.1371/journal.ppat.1005160.

Dunham-Ems, S. M., Caimano, M. J., Eggers, C. H., Radolf, J. D. (2012). *Borrelia burgdorferi* requires the alternative sigma factor RpoS for dissemination within the vector during tick-to-mammal transmission. *PLoS Pathogens*, 8(2), e1002532. DOI:10.1371/journal.ppat.1002532.

Earnhart, C. G., Buckles, E. L., Dumler, J. S., Marconi, R. T. (2005). Demonstration of OspC type diversity in invasive human Lyme disease isolates and identification of previously uncharacterized epitopes that define the specificity of the OspC murine antibody response. *Infection and immunity*, 73(12), 7869-7877.

DOI:10.1128/iai.73.12.7869-7877.2005.

Earnhart, C. G., LeBlanc, D. V., Alix, K. E., Desrosiers, D. C., Radolf, J. D., Marconi, R. T. (2010). Identification of residues within ligand-binding domain 1 (LBD1) of the *Borrelia burgdorferi* OspC protein required for function in the mammalian environment. *Molecular Microbiology*, 76(2), 393–408.

DOI:10.1111/j.1365-2958.2010.07103.x.

ECDC. (2023). *Ixodes persulcatus* - current known distribution: October 2023. Pobrane z: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/ixodes-persulcatus-current-known-distribution-october-2023>.

ECDC. (2023). *Ixodes ricinus* - current known distribution: October 2023. Pobrane z: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/ixodes-ricinus-current-known-distribution-october-2023>.

Eicken, C., Sharma, V., Klabunde, T., Owens, R. T., Pikas, D. S., Höök, M., Sacchetti, J. C. (2001). Crystal structure of Lyme disease antigen outer surface protein C from *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(13), 10010–10015. DOI:10.1074/jbc.m010062200.

Eisen, R. J., Eisen, L. (2018). The Blacklegged Tick, *Ixodes scapularis*: An Increasing Public Health Concern. *Trends in Parasitology*, 34(4), 295–309. DOI:10.1016/j.pt.2017.12.006.

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), 1755-1759. DOI:10.1128/IAI.72.3.1755–1759.2004.

Fingerle, V., Schulte-Spechtel, U. C., Ruzic-Sabljic, E., Leonhard, S., Hofmann, H., Weber, K., Wilske, B. (2008). Epidemiological aspects and molecular characterization of *Borrelia burgdorferi* s.l from southern Germany with special respect to the new species *Borrelia spielmanii* sp. nov. *International journal of medical microbiology*, 298(3-4), 279-290. DOI:10.1016/j.ijmm.2007.05.002.

Fisher, M. A., Grimm, D., Henion, A. K., Elias, A. F., Stewart, P. E., Rosa, P. A., Gherardini, F. C. (2005). *Borrelia burgdorferi* 54 is required for mammalian infection and vector transmission but not for tick colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(14), 5162–5167. DOI:10.1073/pnas.0408536102.

Floden, A. M., Watt, J. A., Brissette, C. A. (2011). *Borrelia burgdorferi* enolase is a surface-exposed plasminogen binding protein. *PloS one*, 6(11), e27502. DOI:10.1371/journal.pone.0027502.

Francischetti, I. M., Sa-Nunes, A., Mans, B. J., Santos, I. M., Ribeiro J. M. C. (2009). The role of saliva in tick feeding. *Frontiers in Bioscience*, 14(6), 2051-2088. DOI:10.2741/3363.

Franke, J., Hildebrandt, A., Dorn, W. (2013). Exploring gaps in our knowledge on Lyme borreliosis spirochaetes – Updates on complex heterogeneity, ecology, and pathogenicity. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 4(1-2), 11–25. DOI:10.1016/j.ttbdis.2012.06.007.

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), 580–586. DOI:10.1038/37551.

Gern, L. (2009). Life Cycle of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and transmission to humans. *Current Problems in Dermatology*, 37, 18–30. DOI:10.1159/000213068.

Guglielmone, A. A.; Robbins, R. G. (2018). *Hard Ticks (Acari: Ixodida: Ixodidae) Paraziting Humans*. Cham: Springer.

Haake, D. A. (2000). Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiology*, 146(7), 1491-1504. DOI:10.1099/00221287-146-7-1491.

Haake, D. A., Zückert, W. R. (2017). Spirochetal lipoproteins in pathogenesis and immunity. W: B. Adler (red.) *Spirochete Biology: The Post Genomic Era*. Springer - Current Topics in Microbiology and Immunology. DOI:10.1007/82_2017_78.

Hovius, J. W., Schuijt, T. J., de Groot, K. A., Roelofs, J. J. T. H., Oei, G. A., Marquart, J. A., de Beer, R., van't Veer, C., van der Poll, T., Ramamoorthi, N., Fikrig, E., van Dam, A. P. (2008). Preferential protection of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto by a Salp15 homologue in *Ixodes ricinus* saliva. *The Journal of Infectious Diseases*, 198(8), 1189–1197. DOI:10.1086/591917.

Hubner, A., Yang, X., Nolen, D. M., Popova, T. G., Cabello, F. C., Norgard, M. V. (2001). Expression of *Borrelia burgdorferi* OspC and DbpA is controlled by a RpoN-RpoS regulatory pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(22), 12724–12729. DOI:10.1073/pnas.231442498.

Hyde, J. A., Shaw, D. K., Smith III, R., Trzeciakowski, J. P., Skare, J. T. (2009). The BosR regulatory protein of *Borrelia burgdorferi* interfaces with the RpoS regulatory pathway and modulates both the oxidative stress response and pathogenic properties of the Lyme disease spirochete. *Molecular Microbiology*, 74(6), 1344–1355. DOI:10.1111/j.1365-2958.2009.06951.x.

Imai, D. M., Samuels, D. S., Feng, S., Hodzic, E., Olsen, K., Barthold, S. W. (2013). The early dissemination defect attributed to disruption of decorin-binding proteins is abolished in chronic murine Lyme borreliosis. *Infection and Immunity*, 81(5), 1663–1673. DOI:10.1128/iai.01359-12.

Jmel, M. A., Aounallah, H., Bensaoud, C., Mekki, I., Chmelař, J., Faria, F., Kotsyfakis, M. (2021). Insights into the role of tick salivary protease inhibitors during ectoparasite–host crosstalk. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 892. DOI:10.3390/ijms22020892.

Jones, L. D., Nuttall, P. A. (1990). The effect of host resistance to tick infestation on the transmission of Thogoto Virus by ticks. *Journal of General Virology*, 71(5), 1039–1043. DOI:10.1099/0022-1317-71-5-1039.

Josek, T., Allan, B. F., Alleyne, M. (2017). Morphometric analysis of chemoreception organ in male and female ticks (Acari: Ixodidae). *Journal of medical entomology*, 55(3), 547-552. DOI:10.1093/jme/tjx232.

Julius, D., Basbaum, A. I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413(6852), 203–210. DOI:10.1038/35093019.

Juncadella, I. J., Anguita, J. (2009). The Immunosuppressive Tick Salivary Protein, Salp15. *Pathogen-Derived Immunomodulatory Molecules*, 121-131. DOI:10.1007/978-1-4419-1601-3_10.

Kazimírová, M., Štibrániová, I. (2013). Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3. DOI:10.3389/fcimb.2013.00043.

Kazimírová, M., Mahríková, L., Hamšíková, Z., Stanko, M., Golovchenko, M., Rudenko, N. (2023). Spatial and Temporal Variability in Prevalence Rates of Members of the *Borrelia burgdorferi* Species Complex in *Ixodes ricinus* Ticks in Urban, Agricultural and Sylvatic Habitats in Slovakia. *Microorganisms*, 11(7), 1666. DOI:10.3390/microorganisms11071666.

Kenedy, M. R., Lenhart, T. R., Akins, D. R. (2012). The role of *Borrelia burgdorferi* outer surface proteins. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 66(1), 1–19. DOI:10.1111/j.1574-695x.2012.00980.x.

Kilpatrick, A. M., Dobson, A. D., Levi, T., Salkeld, D. J., Swei, A., Ginsberg, H. S., Diuk-Wasser, M. A. (2017). Lyme disease ecology in a changing world: consensus, uncertainty and critical gaps for improving control. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1722). DOI: 10.1098/rstb.2016.0117.

Kim, T. K., Tirloni, L., Pinto, A. F. M., Moresco, J., Yates, J. R., da Silva Vaz, I., Mulenga, A. (2016). *Ixodes scapularis* tick saliva proteins sequentially secreted every 24 h during blood feeding. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(1). DOI:10.1371/journal.pntd.0004323.

Kolb, P., Vorreiter, J., Habicht, J., Bentrop, D., Wallich, R., Nassal, M. (2015). Soluble cysteine-rich tick saliva proteins Salp15 and Iric-1 from *E. coli*. *FEBS Open Bio*, 5(1), 42–55. DOI:10.1016/j.fob.2014.12.002.

Kostick, J. L., Szkotnicki, L. T., Rogers, E. A., Bocci, P., Raffaelli, N., Marconi, R. T. (2011). The diguanylate cyclase, Rrp1, regulates critical steps in the enzootic cycle of the Lyme disease spirochetes. *Molecular Microbiology*, 81(1), 219–231. DOI:10.1111/j.1365-2958.2011.07687.x.

Kostick-Dunn, J. L., Izac, J. R., Freedman, J. C., Szkotnicki, L. T., Oliver, L. D., Marconi, R. T. (2018). The *Borrelia burgdorferi* c-di-GMP Binding Receptors, PlzA and PlzB, Are Functionally Distinct. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8. DOI:10.3389/fcimb.2018.00213.

Kotál, J., Langhansová, H., Lieskovská, J., Andersen, J. F., Francischetti, I. M. B., Chavakis, T., Kopecky, J., Pedra, J. H. F., Kotsyfakis, M., Chmelař, J. (2015). Modulation of host immunity by tick saliva. *Journal of Proteomics*, 128, 58–68. DOI:10.1016/j.jprot.2015.07.005.

Kowalec, M., Szewczyk, T., Welc-Falęciak, R., Siński, E., Karbowski, G., Bajera, A. (2017). Ticks and the city—are there any differences between city parks and natural forests in terms of tick abundance and prevalence of spirochaetes?. *Parasites and Vectors*, 10, 1-19. DOI: 10.1186/s13071-017-2391-2.

Kugeler, K. J., Schwartz, A. M., Delorey, M. J., Mead, P. S., Hinckley, A. F. (2021). Estimating the Frequency of Lyme Disease Diagnoses, United States, 2010-2018. *Emerging Infectious Diseases*, 27(2), 616-619. DOI: 10.3201/eid2702.202731.

Kumaran, D., Eswaramoorthy, S., Dunn, J. J., Swaminathan, S. (2001a). Crystallization and preliminary X-ray analysis of *Borrelia burgdorferi* outer surface protein C (OspC). *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 57(2), 298–300. DOI:10.1107/s0907444900017546.

Kumaran, D., Eswaramoorthy, S., Luft, B. J., Koide, S., Dunn, J. J., Lawson, C. L., Swaminathan, S. (2001b). Crystal structure of outer surface protein C (OspC) from the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *The EMBO Journal*, 20(5), 971–978. DOI:10.1093/emboj/20.5.971.

Kurtenbach, K., De Michelis, S., Sewell, H.-S., Etti, S., Schäfer, S. M., Holmes, E., Donaghy, M. (2002). The key roles of selection and migration in the ecology of Lyme borreliosis. *International Journal of Medical Microbiology*, 291(33), 152–154. DOI:10.1016/s1438-4221(02)80029-7.

Kurtenbach, K., Hanincová, K., Tsao, J. I., Margos, G., Fish, D., Ogden, N. H. (2006). Fundamental processes in the evolutionary ecology of Lyme borreliosis. *Nature Reviews Microbiology*, 4(9), 660–669. DOI:10.1038/nrmicro1475.

Lagal, V., Postic, D., Ruzic-Sabljić, E., Baranton, G. (2003). Genetic diversity among *Borrelia* strains determined by single-strand conformation polymorphism analysis of the *ospC* gene and its association with invasiveness. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(11), 5059–5065. DOI:10.1128/jcm.41.11.5059-5065.2003.

Lagal, V., Portnoi, D., Faure, G., Postic, D., Baranton, G. (2006). *Borrelia burgdorferi* sensu stricto invasiveness is correlated with OspC–plasminogen affinity. *Microbes and Infection*, 8(3), 645–652. DOI:10.1016/j.micinf.2005.08.017.

Lancellotti, S., Rutella, S., De Filippis, V., Pozzi, N., Rocca, B., De Cristofaro, R. (2008). Fibrinogen-elongated γ chain inhibits thrombin-induced platelet response, hindering the interaction with different receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 283(44), 30193-30204. DOI: 10.1074/jbc.M803659200.

LaRocca, T. J., Crowley, J. T., Cusack, B. J., Pathak, P., Benach, J., London, E., Benach, J. L. (2010). Cholesterol lipids of *Borrelia burgdorferi* form lipid rafts and are required for the bactericidal activity of a complement-independent antibody. *Cell Host and Microbe*, 8(4), 331–342. DOI:10.1016/j.chom.2010.09.001.

Lawrie, C. H., Randolph, S. E., Nuttall, P. A. (1999). *Ixodes* ticks: serum species sensitivity of anticomplement activity. *Experimental Parasitology*, 93(4), 207–214. DOI:10.1006/expr.1999.4456.

Lemieux, J. E., Huang, W., Hill, N., Cerar, T., Freimark, L., Hernandez, S., Strle, K. (2023). Whole genome sequencing of human *Borrelia burgdorferi* isolates reveals linked blocks of accessory genome elements located on plasmids and associated with human dissemination. *PLoS Pathogens*, 19(8), e1011243. DOI: 10.1371/journal.ppat.1011243.

Li, X., Neelakanta, G., Liu, X., Beck, D. S., Kantor, F. S., Fish, D., Fikrig, E. (2007). Role of outer surface protein D in the *Borrelia burgdorferi* life cycle. *Infection and Immunity*, 75(9), 4237–4244. DOI:10.1128/iai.00632-07.

Li, X., Strle, K., Wang, P., Acosta, D. I., McHugh, G. A., Sikand, N., Steere, A. C. (2013). Tick-specific Borrelial antigens appear to be upregulated in American but not European patients with Lyme arthritis, a late manifestation of Lyme Borreliosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 208(6), 934–941. DOI:10.1093/infdis/jit269.

Liang, F. T., Brown, E. L., T., Iozzo, R. V., Fikrig, E. (2004). Protective niche for *Borrelia burgdorferi* to evade humoral immunity. *The American Journal of Pathology*, 165(3), 977–985. DOI:10.1016/s0002-9440(10)63359-7.

Lin, Y. P., Diuk-Wasser, M. A., Stevenson, B., Kraiczy, P. (2020). Complement evasion contributes to Lyme borreliae–host associations. *Trends in parasitology*, 36(7), 634–645. DOI:10.1016/j.pt.2020.04.011.

Lindgren, E., Jaenson, T. (red.) (2006). *Lyme borreliosis in Europe: influences of climate and climate change, epidemiology, ecology and adaptation measures*. Dania: Światowa Organizacja Zdrowia.

Liu, X. Y., Bonnet, S. I. (2014). Hard tick factors implicated in pathogen transmission. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(1).

DOI:10.1371/journal.pntd.0002566.

Madison-Antenucci, S., Kramer, L. D., Gebhardt, L. L., Kauffman, E. (2020). *Emerging Tick-Borne Diseases. Clinical Microbiology Reviews*, 33(2). DOI:10.1128/cmr.00083-18.

Mans, B. J. (2011). Evolution of vertebrate hemostatic and inflammatory control mechanisms in blood-feeding arthropods. *Journal of Innate Immunity*, 3(1), 41–51. DOI:10.1159/000321599.

Marchi, R., Vilar, R., Durual, S., Goodyer, M., Gay, V., Neerman-Arbez, M., Casini, A. (2021). Fibrin clot properties to assess the bleeding phenotype in unrelated patients with hypodysfibrinogenemia due to novel fibrinogen mutations. *Thrombosis research*, 197, 56–64. DOI:10.1016/j.thromres.2020.11.003.

Marconi, R. T., Konkel, M. E., Garon, C. F. (1993). Variability of osp genes and gene products among species of Lyme disease spirochetes. *Infection and immunity*, 61(6), 2611–2617. DOI:10.1128/iai.61.6.2611-2617.1993.

Margos, G., Wilske, B., Sing, A., Hizo-Teufel, C., Cao, W. C., Chu, C., Fingerle, V. (2013). *Borrelia bavariensis* sp. nov. is widely distributed in Europe and Asia. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(11), 4284–4288. DOI: 10.1099/ijs.0.052001-0.

Margos, G., Gofton, A., Wibberg, D., Dangel, A., Marosevic, D., Loh, S. M., Fingerle, V. (2018). The genus *Borrelia* reloaded. *PLOS ONE*, 13(12), e0208432. DOI:10.1371/journal.pone.0208432.

Mead, P. S. (2015). Epidemiology of Lyme Disease. *Infectious Disease Clinics of North America*, 29(2), 187–210. DOI:10.1016/j.idc.2015.02.010.

Mead, P. (2022). Epidemiology of Lyme disease. *Infectious Disease Clinics*, 36(3), 495–521. DOI: 10.1016/j.idc.2022.03.004.

Millan, M. J. (1999). The induction of pain: an integrative review. *Progress in Neurobiology*, 57(1), 1-164. DOI:10.1016/s0301-0082(98)00048-3.

Mitchell, R. D., Zhu, J., Carr, A. L., Dhammi, A., Cave, G., Sonenshine, D. E., Roe, R. M. (2017). Infrared light detection by the haller's organ of adult american dog ticks, *Dermacentor variabilis* (Ixodida: Ixodidae). *Ticks and tick-borne diseases*, 8(5), 764-771. DOI:10.1016/j.ttbdis.2017.06.001.

Mudenda, L., Pierlé, S. A., Turse, J. E., Scoles, G. A., Purvine, S. O., Nicora, C. D., Clauss, T. R. W., Ueti, M. W., Brown, W. C., Brayton, K. A. (2014). Proteomics informed by transcriptomics identifies novel secreted proteins in *Dermacentor andersoni* saliva. *International Journal for Parasitology*, 44(13), 1029–1037. DOI:10.1016/j.ijpara.2014.07.003.

Mylonas, I. (2011). Borreliosis During Pregnancy: A Risk for the Unborn Child? *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11(7), 891–898. DOI:10.1089/vbz.2010.0102.

Nadelman, R. B. (2015). Erythema migrans. *Infectious Disease Clinics*, 29(2), 211-239. DOI:10.1016/j.idc.2015.02.001.

Narasimhan, S., Koski, R. A., Beaulieu, B., Anderson, J. F., Ramamoorthi, N., Kantor, F., Capello, M., Fikrig, E. (2002). A novel family of anticoagulants from the saliva of *Ixodes scapularis*. *Insect Molecular Biology*, 11(6), 641–650. DOI:10.1046/j.1365-2583.2002.00375.x.

Narasimhan, S., DePonte, K., Marcantonio, N., Liang, X., Royce, T. E., Nelson, K. F., Fikrig, E. (2007). Immunity against *Ixodes scapularis* salivary proteins expressed within 24 hours of attachment thwarts tick feeding and impairs *Borrelia* transmission. *PLoS ONE*, 2(5), e451. DOI:10.1371/journal.pone.0000451.

Narasimhan, S., Booth, C. J., DePonte, K., Wu, M.-J., Liang, X., Mohanty, S., Fikrig, E. (2018). Host-specific expression of *Ixodes scapularis* salivary genes. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 10(2), 386-397. DOI:10.1016/j.ttbdis.2018.12.001.

Nava, S., Guglielmone, A. A., Mangold, A. J. (2009). An overview of systematics and evolution of ticks. *Frontiers in Bioscience*, 14, 2857-2877. DOI:10.2741/3418.

Nouri, M., Latorre-Margalef, N., Czopek, A., Råberg, L. (2021). Cross-reactivity of antibody responses to *Borrelia afzelii* OspC: Asymmetry and host heterogeneity. *Infection, Genetics and Evolution*, 91, 104793. DOI:10.1016/j.meegid.2021.104793.

Nuttall, P. A. (2019a). Wonders of tick saliva. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 10(2), 470-481. DOI:10.1016/j.ttbdis.2018.11.005.

Nuttall, P. A. (2019b). Tick saliva and its role in pathogen transmission. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 135, 165-176. DOI:10.1007/s00508-019-1500-y.

O'Bier, N. S., Hatke, A. L., Camire, A. C., Marconi, R. T. (2021). Human and veterinary vaccines for Lyme disease. *Current issues in molecular biology*, 42(1), 191-222. DOI:10.21775/cimb.042.191.

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), 1689–1705. DOI:10.1128/iai.71.4.1689-1705.2003.

Önder, Ö., Humphrey, P. T., McOmber, B., Korobova, F., Francella, N., Greenbaum, D. C., Brisson, D. (2012). OspC is potent plasminogen receptor on surface of *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Biological Chemistry*, 287(20), 16860–16868. DOI:10.1074/jbc.m111.290775.

Pal, U., de Silva, A. M., Montgomery, R. R., Fish, D., Anguita, J., Anderson, J. F., Fikrig, E. (2000). Attachment of *Borrelia burgdorferi* within *Ixodes scapularis* mediated by outer surface protein A. *The Journal of clinical investigation*, 106(4), 561-569. DOI: 10.1172/JCI9427.

Pal, U., Li, X., Wang, T., Montgomery, R. R., Ramamoorthi, N., deSilva, A. M., Fikrig, E. (2004). TROSPA, an *Ixodes scapularis* Receptor for *Borrelia burgdorferi*. *Cell*, 119(4), 457–468. DOI:10.1016/j.cell.2004.10.027.

Pal, U., Kitsou, C., Drecktrah, D., Yas, O. B., Fikrig, E. (2020). Interactions between ticks and lyme disease spirochetes. *Current issues in molecular biology*, 42(1), 113-144. DOI:10.21775/cimb.042.113.

Parise, C. M., Breuner, N. E., Hojgaard, A., Osikowicz, L. M., Replogle, A. J., Eisen, R. J., Eisen, L. (2020). Experimental demonstration of reservoir competence of the white-footed mouse, *Peromyscus leucopus* (Rodentia: Cricetidae), for the Lyme disease spirochete, *Borrelia mayonii* (Spirochaetales: Spirochaetaceae). *Journal of medical entomology*, 57(3), 927-932. DOI: 10.1093/jme/tjz242.

Piesman, J., Gern L. (2004). Lyme borreliosis in Europe and North America. *Parasitology*, 129(7), 191-220. DOI:10.1017/s0031182003004694.

Plow, E. F., Ploplis, V. A., Carmeliet, P., Collen, D. (1999). Plasminogen and cell migration in vivo. *Fibrinolysis and Proteolysis*, 13(2), 49-53. DOI:10.1016/S0268-9499(99)90079-6.

Radolf, J. D., Caimano, M. J., Stevenson, B., Hu, L. T. (2012). Of ticks, mice and men: understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes. *Nature reviews microbiology*, 10(2), 87-99. DOI:10.1038/nrmicro2714.

Ramamoorthi, N., Narasimhan, S., Pal, U., Bao, F., Yang, X. F., Fish, D., Fikrig, E. (2005). The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. *Nature*, 436(7050), 573–577. DOI:10.1038/nature03812.

Ribeiro, J. M., Makoul, G.T., Levine, J., Robinson, D. R., Spielman A. (1985). Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. *Journal of Experimental Medicine*, 161(2), 332–344. DOI:10.1084/jem.161.2.332.

Ribeiro, J. M. C., Francischetti, I. M. B. (2003). Role arthropod saliva in blood feeding: Sialome and Post-Sialome Perspectives. *Annual Review of Entomology*, 48(1), 73–88. DOI:10.1146/annurev.ento.48.060402.102812.

Richter, D., Postic, D., Sertour, N., Livey, I., Matuschka, F. R., Baranton, G. (2006). Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(4), 873-881. DOI:10.1099/ijs.0.64050-0.

Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K., Lambris, J. D. (2010). Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature Immunology*, 11(9), 785–797. DOI:10.1038/ni.1923.

Rochlin, I., Ninivaggi, D. V., Benach, J. L. (2019). Malaria and Lyme disease - the largest vector-borne US epidemics in the last 100 years: success and failure of public health. *BMC Public Health*, 19(1). DOI:10.1186/s12889-019-7069-6.

Sal, M. S., Li, C., Motalab, M. A., Shibata, S., Aizawa, S.I., Charon, N. W. (2008). *Borrelia burgdorferi* uniquely regulates its motility genes and has an intricate flagellar hook-basal body structure. *Journal of Bacteriology*, 190(6), 1912–1921. DOI:10.1128/jb.01421-07.

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.

Samuels, D. S. (2011). Gene Regulation in *Borrelia burgdorferi*. *Annual Review of Microbiology*, 65(1), 479–499. DOI:10.1146/annurev.micro.112408.134040.

Sanderson-Smith, M. L., De Oliveira, D. M. P., Ranson, M., McArthur, J. D. (2012). Bacterial plasminogen receptors: mediators of a multifaceted relationship. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012(272148), 1–14.

DOI:10.1155/2012/272148.

Sangamnatdej, S., Paesen, G. C., Slovak, M., Nuttall, P. A. (2002). A high affinity serotonin- and histamine-binding lipocalin from tick saliva. *Insect Molecular Biology*, 11(1), 79–86. DOI:10.1046/j.0962-1075.2001.00311.x.

Schmelz, M. (2010). Itch and pain. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 34(2), 171–176. DOI:10.1016/j.neubiorev.2008.12.004.

Schotthoefer, A. M., Frost, H. M. (2015). Ecology and epidemiology of Lyme borreliosis. *Clinics in laboratory medicine*, 35(4), 723-743.

DOI:10.1016/j.cll.2015.08.003.

Schön, M. P. (2022). The tick and I: Parasite-host interactions between ticks and humans. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 20(6), 818-853. DOI:10.1111/ddg.14821.

Schuijt, T. J., Hovius, J. W. R., van Burgel, N. D., Ramamoorthi, N., Fikrig, E., van Dam, A. P. (2008). The tick salivary protein Salp15 inhibits the killing of serum-sensitive *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates. *Infection and Immunity*, 76(7), 2888–2894. DOI:10.1128/iai.00232-08.

Schwan, T. G., Piesman, J., Golde, W. T., Dolan, M. C., Rosa, P. A. (1995). Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(7), 2909–2913. DOI:10.1073/pnas.92.7.2909.

Seinost, G., Dykhuizen, D. E., Dattwyler, R. J., Golde, W. T., Dunn, J. J., Wang, I. N., Wormser, G. P., Schriefer, M. E., Luft, B. J. (1999). Four clones of *Borrelia burgdorferi* Sensu Stricto cause invasive infection in humans. *Infection and Immunity*, 67(7), 3518-3524. DOI:10.1128/IAI.67.7.3518-3524.1999.

Semenza, J. C., Suk, J. E. (2018). Vector-borne diseases and climate change: a European perspective. *FEMS Microbiology Letters*, 365(2). DOI:10.1093/femsle/fnx244.

Seshu, J., Esteve-Gassent, M. D., Labandeira-Rey, M., Kim, J. H., Trzeciakowski, J. P., Höök, M., Skare, J. T. (2006). Inactivation of the fibronectin-binding adhesin gene bbk32 significantly attenuates the infectivity potential of *Borrelia burgdorferi*. *Molecular Microbiology*, 59(5), 1591–1601. DOI:10.1111/j.1365-2958.2005.05042.x.

Setubal, J. C., Reis, M., Matsunaga, J., Haake, D. A. (2006). Lipoprotein computational prediction in spirochaetal genomes. *Microbiology*, 152(1), 113–121. DOI:10.1099/mic.0.28317-0.

Sevilla, E., Bes, M. T., Peleato, M. L., Fillat, M. F. (2021). Fur-like proteins: Beyond the ferric uptake regulator (Fur) paralog. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 701(108770). DOI:10.1016/j.abb.2021.108770.

Seidel, S. A. I., Dijkman, P. M., Lea, W. A., van den Bogaart, G., Jerabek-Willemsen, M., Lazic, A., Joseph, J. S., ... Duhr, S. (2013). Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions. *Methods*, 59(3), 301–315. DOI:10.1016/j.ymeth.2012.12.005.

Shifflett, S. A., Ferreira, F. C., González, J., Toledo, A., Fonseca, D. M., Ellis, V. A. (2024). Diversity and host specificity of *Borrelia burgdorferi*'s outer surface protein C (ospC) alleles in synanthropic mammals, with a notable ospC allele U absence from mixed infections. *Infection and immunity*, 92(1), e00244-23. DOI: 10.1128/iai.00244-23.

Slade, C. L., Pizzo, S. V., Taylor Jr, L. M., Steinman, H. M., McKee, P. A. (1976). Characterization of fragment E from fibrinogen and cross-linked fibrin. *Journal of Biological Chemistry*, 251(6), 1591-1596. DOI: 10.1016/S0021-9258(17)33689-X.

Snyder, A. (2015). Willy Burgdorfer. *The Lancet*, 385(9963), 110. DOI:10.1016/s0140-6736(15)60011-3.

Sonenshine, D. E., Roe, R. M. (2014). *Biology of ticks volume 1*. Oxford University Press.

Stanek, G., Strle, F. (2003). Lyme borreliosis. *The Lancet*, 362(9396), 1639–1647. DOI:10.1016/s0140-6736(03)14798-8.

Stanek, G., Reiter, M. (2011). The expanding Lyme *Borrelia* complex—clinical significance of genomic species?. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(4), 487-493. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03492.x.

Stanek, G., Wormser, G. P., Gray, J., Strle, F. (2012). Lyme borreliosis. *The Lancet*, 379(9814), 461–473. DOI:10.1016/s0140-6736(11)60103-7.

Stanek, G., Strle, F. (2018). Lyme borreliosis—from tick bite to diagnosis and treatment. *FEMS Microbiology Reviews*, 42(3), 233–258. DOI:10.1093/femsre/fux047.

Steen, N. A., Barker, S. C., Alewood, P. F. (2006). Proteins in the saliva of the *Ixodida* (ticks): Pharmacological features and biological significance. *Toxicon*, 47(1), 1–20. DOI:10.1016/j.toxicon.2005.09.010.

Steere, A. C. (2001). Lyme disease. *The New England Journal of Medicine*, 345 (2). DOI: 10.1056/NEJM200107123450207.

Steere, A. C., Strle, F., Wormser, G. P., Hu, L. T., Branda, J. A., Hovius, J. W. R., Mead, P. S. (2016). Lyme borreliosis. *Nature Reviews Disease Primers*, 2(1). DOI:10.1038/nrdp.2016.90.

Sternbach, G., Dibble, C. L. (1996). Willy Burgdorfer: Lyme disease. *The Journal of Emergency Medicine*, 14(5), 631–634. DOI:10.1016/s0736-4679(96)00143-6.

Strnad, M., Rudenko, N., Rego, R. O. (2023). Pathogenicity and virulence of *Borrelia burgdorferi*. *Virulence*, 14(1), 2265015. DOI:10.1080/21505594.2023.2265015.

Strnad, M., Koizumi, N., Nakamura, S., Vancová, M., Rego, R. O. (2024). It's not all about flagella—sticky invasion by pathogenic spirochetes. *Trends in Parasitology*, 40(5). DOI:10.1016/j.pt.2024.03.004.

Stübs, G., Fingerle, V., Wilske, B., Göbel, U. B., Zähringer, U., Schumann, R. R., Schröder, N. W. (2009). Acylated cholesteryl galactosides are specific antigens of *Borrelia* causing lyme disease and frequently induce antibodies in late stages of disease. *Journal of biological chemistry*, 284(20), 13326-13334. DOI: 10.1074/jbc.M809575200.

Sun, H. (2004). Plasminogen is a critical host pathogenicity factor for group a streptococcal infection. *Science*, 305(5688), 1283–1286. DOI:10.1126/science.1101245.

Talbot, B., Balvín, O., Vonhof, M. J., Broders, H. G., Fenton, B., Keyghobadi, N. (2017). Host association and selection on salivary protein genes in bed bugs and related blood-feeding ectoparasites. *Royal Society Open Science*, 4(6), 170446. DOI:10.1098/rsos.170446.

Thomas, S., Liu, W., Arora, S., Ganesh, V., Ko, Y.-P., Höök, M. (2019). The complex fibrinogen interactions of the *Staphylococcus aureus* coagulases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9. DOI:10.3389/fcimb.2019.00106.

Tilly, K., Rosa, P. A., Stewart, P. E. (2008). Biology of Infection with *Borrelia burgdorferi*. *Infectious Disease Clinics of North America*, 22(2), 217–234. DOI:10.1016/j.idc.2007.12.013.

Tokarz, R., Anderton, J. M., Katona, L. I., Benach, J. L. (2004). Combined effects of blood and temperature shift on *Borrelia burgdorferi* gene expression as determined by

whole genome DNA array. *Infection and immunity*, 72(9), 5419-5432. DOI:10.1128/iai.72.9.5419-5432.2004.

Urbanowicz, A., Lewandowski, D., Szpotkowski, K., Figlerowicz, M. (2016). Tick receptor for outer surface protein A from *Ixodes ricinus* — the first intrinsically disordered protein involved in vector-microbe recognition. *Scientific Reports*, 6(1). DOI:10.1038/srep25205.

Van Dam, A. P., Oei, A., Jaspars, R., Fijen, C., Wilske, B., Spanjaard, L., Dankert, J. (1997). Complement-mediated serum sensitivity among spirochetes that cause Lyme disease. *Infection and immunity*, 65(4), 1228-1236. DOI:10.1128/IAI.65.4.1228-1236.1997.

Von Lackum, K., Stevenson, B. (2005). Carbohydrate utilization by the Lyme borreliosis spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *FEMS Microbiology Letters*, 243(1), 173-179. DOI: 10.1016/j.femsle.2004.12.002.

Wang, I. N., Dykhuizen, D. E., Qiu, W., Dunn, J. J., Bosler, E. M., Luft, B. J. (1999). Genetic diversity of *ospC* in a local population of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. *Genetics*, 151(1), 15-30. DOI: 10.1093/genetics/151.1.15.

Wang, X., Huang, Y., Niu, S., Jiang, B.-G., Jia, N., van der Geest, L., Cao, W.-C. (2014). Genetic diversity of Salp15 in the *Ixodes ricinus* complex (Acari: Ixodidae). *PLoS ONE*, 9(4), e94131. DOI:10.1371/journal.pone.0094131.

Weber, K., Bratzke, H.J., Neubert, U., Wilske, B., Duray, P.H. (1988). *Borrelia burgdorferi* in a newborn despite oral penicillin for Lyme borreliosis during pregnancy. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 7(4), 286-289. DOI:10.1097/00006454-198804000-00010.

Wen, S., Wang, F., Ji, Z., Pan, Y., Jian, M., Bi, Y., Bao, F. (2020). Salp15, a multifunctional protein from tick saliva with potential pharmaceutical effects. *Frontiers in Immunology*, 10, 3067. DOI:10.3389/fimmu.2019.03067.

Wikel, S. (2013). Ticks and tick-borne pathogens at the cutaneous interface: host defenses, tick countermeasures, and a suitable environment for pathogen establishment. *Frontiers in Microbiology*, 4(337). DOI:10.3389/fmicb.2013.00337.

Wilske, B., Preac-Mursic, V., Jauris, S., Hofmann, A., Pradel, I., Soutschek, E., Schwab, E., Will, G., Wanner, G. (1993). Immunological and molecular polymorphisms of *OspC*, an immunodominant major outer surface protein of *Borrelia burgdorferi*. *Infection and immunity*, 61(5), 2182–2191. DOI:10.1128/IAI.61.5.2182-2191.1993.

Wilske, B., Fingerle, V., Schulte-Spechtel, U. (2007). Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 49(1), 13–21. DOI:10.1111/j.1574-695X.2006.00139.x.

Wormser, G. P., Brisson, D., Liveris, D., Hanincová, K., Sandigursky, S., Nowakowski, J., Nadelman, R. B., Ludin, S., Schwartz, I. (2008). *Borrelia burgdorferi* genotype predicts the capacity for hematogenous dissemination during early Lyme disease. *The Journal of Infectious Diseases*, 198(9), 1358–1364. DOI:10.1086/592279.

Xiang, X., Yang, Y., Du, J., Lin, T., Chen, T., Yang, X. F., Lou, Y. (2017). Investigation of ospC expression variation among *Borrelia burgdorferi* strains. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(131). DOI:10.3389/fcimb.2017.00131.

Xu, H., Raddi, G., Liu, J., Charon, N. W., Li, C. (2011). Chemoreceptors and flagellar motors are subterminally located in close proximity at the two cell poles in spirochetes. *Journal of Bacteriology*, 193(10), 2652–2656. DOI:10.1128/jb.01530-10.

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), 641–648. DOI:10.1084/jem.20031960.

Zipfel, P. F., Skerka, C. (2009). Complement regulators and inhibitory proteins. *Nature Reviews Immunology*, 9(10), 729–740. DOI:10.1038/nri2620.

Zipfel, P. F., Hallström, T., Riesbeck, K. (2013). Human complement control and complement evasion by pathogenic microbes – Tipping the balance. *Molecular Immunology*, 56(3), 152–160. DOI:10.1016/j.molimm.2013.05.222.

SPIS RYCIN

Rycina 1.1. Zgłoszone przypadki zachorowań na boreliozę w latach 2010-2023 w Polsce (wg Narodowego Instytut Zdrowia Publicznego)	13
Rycina 1.2. Białko OspC ze szczepu B31 B. burgdorferi s.s. (PDB:1GGQ).	34
Rycina 3.1. Schemat serii rozcieńczeń niewyznakowanego białka (ligandu)	80
Rycina 4.1. Wynik rozdziału elektroforetycznego DNA zawierającego sekwencję koduującą (cDNA) białko BS.OspC namnożoną metodą PCR.	95
Rycina 4.2. Wynik rozdziału elektroforetycznego DNA zawierającego sekwencję koduującą białko BS.OspC..	96
Rycina 4.3. Wynik rozdziału DNA zawierającego sekwencję kodującą (cDNA) białko BA.OspC_NΔ19 namnożonej metodą PCR.....	97
Rycina 4.4. Wynik rozdziału elektroforetycznego DNA zawierającego liniowe formy wektorów z serii pMCSG uzyskanych w wyniku trawienia enzymem restrykcyjnym SspI.	99
Rycina 4.5. Wynik rozdziału elektroforetycznego DNA zawierającego sekwencję koduującą białkoBA.OspC_NΔ19.	100
Rycina 4.6. Wynik rozdziału elektroforetycznego białek BA.OspC_NΔ19 wyprodukowanych z wykorzystaniem różnych wektorów ekspresyjnych z serii pMCSG.	102
Rycina 4.7. Wynik rozdziału elektroforetycznego białka fuzyjnego OspC_NΔ19BA- NusA-HisTag produkowanego w bakteriach <i>E. coli</i> poddawanych indukcji IPTG oraz niepoddawanych indukcji IPTG (warunki kontrolne).....	103
Rycina 4.8. Wynik rozdziału elektroforetycznego preparatów białkowych otrzymanych po oczyszczeniu białka fuzyjnego OspC_NΔ19BA-NusA-HisTag metodą chromatografii powinowactwa INiAC.....	105
Rycina 4.9. Wynik rozdziału elektroforetycznego preparatu białkowego otrzymanego w wyniku hydrolizy proteolitycznej białka fuzyjnego OspC_NΔ19BA-NusA- HisTag proteazą TEV.....	106
Rycina 4.10. Wynik rozdziału elektroforetycznego preparatu białkowego otrzymanego po oczyszczeniu białka BA.OspC_NΔ19 i oddzieleniu od frakcji białek fuzyjnych (NusA-HisTag) metodą chromatografii powinowactwa INiAC.	107
Rycina 4.11. Wynik rozdziału elektroforetycznego DNA zawierającego sekwencje koduujące (cDNA) białka OspC_NΔ19 namnożone metodą PCR.	109

Rycina 4.12. Wynik rozdziału elektroforetycznego DNA zawierającego sekwencje kodujące białka OspC_NΔ19.....	110
Rycina 4.13. Wyniki rozdziałów elektroforetycznych DNA zawierającego sekwencje kodujące (cDNA) białka OspC_NΔ35-37 namnożone metodą PCR.....	114
Rycina 4.14. Wyniki rozdziałów elektroforetycznych DNA zawierających sekwencje kodujące białka OspC_NΔ35-37.....	116
Rycina 4.15. Wyniki sączenia molekularnego (filtracji żelowej) białek OspC_NΔ19.	122
Rycina 4.16. Przykładowe krzywe absorpcji uzyskane w wyniku pomiaru absorbancji przy długości fali 540 nm dla dwóch frakcji białka BA.OspC_NΔ19.....	123
Rycina 4.17. Krzywe DLS.....	125
Rycina 4.18. Wyniki sączenia molekularnego białka BA.OspC_NΔ37.....	127
Rycina 4.19. Wyniki sączenia molekularnego białek OspC_NΔ35-37.....	128
Rycina 4.20. Wyniki sączenia molekularnego białka BG1.OspC_NΔ35.....	129
Rycina 4.21. Wyniki pomiarów dynamicznego rozpraszania światła (DLS).....	131
Rycina 4.22. Wyniki sączenia molekularnego białek Iric_NΔ19.....	134
Rycina 4.23. Wyniki sączenia molekularnego białka Iric3_NΔ19.....	135
Rycina 4.24. Wynik rozdziału elektroforetycznego przedstawiający produkty oczyszczania białka fuzyjnego Iric1_NΔ19-DsbA-HisTag metodą chromatografii powinowactwa INiAC w warunkach denaturujących.....	136
Rycina 4.25. Wyniki rozdziału elektroforetycznego preparatów białkowych otrzymanych w wyniku sączenia molekularnego białek Iric1_NΔ19.	136
Rycina 4.26. Wynik rozdziału elektroforetycznego przedstawiający przygotowane preparaty fibrynogenu pełnej długości oraz fragmentów E i D.....	138
Rycina 4.27. Krzywe wiązania dla interakcji białek OspC_NΔ19 oraz ludzkiego fibrynogenu uzyskane w wyniku pomiarów MST.....	141
Rycina 4.28. Wyniki pomiarów SAXS dla kompleksu BB.OspC_NΔ19 oraz ludzkiego fibrynogenu.	144
Rycina 4.29. Na wykresach przedstawiono krzywe wiązania uzyskane w wyniku pomiarów MST dla interakcji różnych wariantów białek OspC_NΔ19 z białkiem Iric1_NΔ19.....	147
Rycina 4.30. Na wykresach przedstawiono krzywe wiązania uzyskane w wyniku pomiarów MST dla interakcji różnych wariantów białek OspC_NΔ19 z białkami Iric_NΔ19 (Iric2_NΔ19, Iric3_NΔ19).....	148

Rycina 4.31. Na wykresach przedstawiono wyniki kontrolnych pomiarów MST dla białek OspA_NΔ19 i Iric_NΔ19. Białka OspA_NΔ19 zostały wyznakowane RED-NHS 647, a serie rozcieńczeń wykonano dla poszczególnych białek Iric_NΔ19 (Iric1_NΔ19, Iric2_NΔ19, Iric3_NΔ19).	149
Rycina 5.1. Wizualizacja struktur monomeru białek OspC nałożonych na siebie, wskazująca na wysoki poziom podobieństwa analizowanych struktur.	154

SPIS TABEL

Tabela 3.1. Stosowane startery	55
Tabela 3.2. Stosowane plazmidy	57
Tabela 3.3. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR- ALLin™ Hot Start Taq Polymerase ...	61
Tabela 3.4. Warunki reakcji PCR- ALLin™ Hot Start Taq Polymerase.....	61
Tabela 3.5. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR-ALLin™ HiFi DNA Polymerase	62
Tabela 3.6. Warunki reakcji PCR-ALLin™ HiFi DNA Polymerase	62
Tabela 3.7. Skład mieszaniny reakcyjnej trawienia endonukleazą SspI.....	65
Tabela 3.8. Skład mieszanin reakcyjnych do tworzenia jednoniciowych końców dsDNA za pomocą polimerazy T4	66
Tabela 3.9. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR-Taq DNA Polymerase (EurX).....	69
Tabela 3.10. Warunki reakcji PCR-Taq DNA Polymerase (EurX).....	69
Tabela 3.11. Schemat analizy wiązań poszczególnych kompleksów białek metodą MST	80
Tabela 3.12. Stężenia molowe białek OspC_NΔ19BB i fibrynogenu oraz stosunki molowe przygotowanych mieszanin.....	82
Tabela 4.1. Sekwencje aminokwasowe białek OspC_NΔ19 wraz z podstawowymi parametrami (pI oraz masa cząsteczkowa)	87
Tabela 4.2. Przewidywana dystrybucja ładunków na powierzchni białka OspC_NΔ19 pochodzącego z czterech różnych gatunków <i>Borrelia</i>	88
Tabela 4.3. Porównanie sekwencji aminokwasowych białek OspC_NΔ19 pochodzących z różnych gatunków <i>Borrelia</i>	89
Tabela 4.4. Podobieństwo sekwencji aminokwasowych białek OspC_NΔ19 pochodzących z różnych gatunków <i>Borrelia</i>	89
Tabela 4.5. Sekwencje aminokwasowe poszczególnych białek OspC_NΔ35-37 wraz z podstawowymi parametrami (pI oraz masa cząsteczkowa).....	90
Tabela 4.6. Sekwencje aminokwasowe białek Iric_NΔ19 wraz z podstawowymi parametrami (pI oraz masa cząsteczkowa)	92
Tabela 4.7. Porównanie sekwencji aminokwasowych białek Iric_NΔ19: I1 dla Iric1_NΔ19, I2 dla Iric2_NΔ19 oraz I13 dla Iric3_NΔ19.	92
Tabela 4.8. Podobieństwo oraz identyczność sekwencji aminokwasowych białek Iric_NΔ19.....	92

Tabela 4.9 Wyniki pomiarów stężeń DNA oraz ich oceny jakości metodą absorpcji światła o długości fali 260 nm	98
Tabela 4.10 Wyniki pomiarów stężeń DNA oraz ich oceny jakości metodą absorpcji światła o długości fali 260 nm	99
Tabela 4.11. Wyniki pomiarów stężeń plazmidowego DNA oraz ich oceny jakości metodą absorpcji światła o długości fali 260 nm.....	101
Tabela 4.12. Wyniki pomiarów stężeń DNA oraz ich oceny jakości metodą absorpcji światła o długości fali 260 nm	109
Tabela 4.13. Wyniki pomiarów stężeń plazmidowego DNA oraz ich oceny jakości metodą absorpcji światła o długości fali 260 nm.....	111
Tabela 4.14. Sekwencje nukleotydowe kodujące białka OspC_NΔ19 uzyskane w wyniku sekwencjonowania 5' → 3'	112
Tabela 4.15. Wyniki pomiarów stężeń cDNA oraz ich oceny jakości metodą absorpcji światła o długości fali 260 nm	115
Tabela 4.16. Wyniki pomiarów stężeń plazmidowego DNA oraz ich oceny jakości metodą absorpcji światła o długości fali 260 nm.....	117
Tabela 4.17. Sekwencje nukleotydowe kodujące białka OspC_NΔ35-37 uzyskane w wyniku sekwencjonowania 5' → 3'	118
Tabela 4.18. Przykładowe wyniki pomiaru absorbancji przy długości fali 540 nm oraz obliczone stężenia białka dla wybranych frakcji BA.OspC_NΔ19.	124
Tabela 4.19. Oszacowane masy (kDa) białek OspC_NΔ19 na podstawie pomiarów DLS	125
Tabela 4.20. Oszacowane masy (kDa) dla białek OspC_NΔ35-37 obliczone na podstawie pomiarów DLS.....	130
Tabela 4.21. Wyniki pomiaru MST dla białek OspC_NΔ19 wraz obliczonymi stałymi dysocjacji K_d	142
Tabela 4.22. Stałe K_d obliczone dla interakcji białek OspC_NΔ19 oraz Iric_NΔ19 na podstawie pomiarów MST.	146