

Instytut Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk
Zakład Biologii Molekularnej i Systemowej

Strukturalne i funkcjonalne uwarunkowania oddziaływań pomiędzy
kleszczem a patogenną bakterią na przykładzie białek TROSPA z
Ixodes ricinus i OspA z *Borrelia burgdorferi*

Structural and functional determinants of interactions between tick and
pathogenic bacteria on the example of TROSPA protein from *Ixodes ricinus* and
OspA protein from *Borrelia burgdorferi*

mgr inż. Dominik Lewandowski

Promotor
prof. dr hab. Marek Figlerowicz

Promotor pomocniczy
dr Anna Urbanowicz

Poznań 2015

Składam serdeczne podziękowania

prof. dr. hab. Markowi Figlerowiczowi za opiekę naukową, życzliwość oraz cenne uwagi udzielane mi podczas pisania niniejszej pracy

dr Annie Urbanowicz za poświęcony czas, udzielone wsparcie merytoryczne i miłą współpracę

dr. Kamilowi Szpotkowskiemu za pomoc w przeprowadzeniu pomiarów SAXS oraz wykonaniu analizy danych SAXS

dr. Karolowi Kamelowi za współpracę przy modelowaniu kompleksu białek oraz przeprowadzenie symulacji dynamiki molekularnej

dr. inż. Pawłowi Rodziewiczowi za wykonanie widm masowych MALDI-ToF

mgr Aleksandrze Dąbrowskiej za pomoc przy produkcji białka w komórkach owadzych

całemu Zespołowi Zakładu Biologii Molekularnej i Systemowej oraz Zespołowi Centrum Badań Biokrytalograficznych za okazaną pomoc i przyjacielską atmosferę

Szczególnie dziękuję Wioli oraz Moim Rodzicom za cierpliwość, wyrozumiałość i nieustające wsparcie

SPIS TREŚCI

Wykaz skrótów.....	8
1. Wstęp.....	10
1.1. Wprowadzenie.....	10
1.2. Pasożytniczy tryb życia kleszcza.....	12
1.2.1. Cykl rozwojowy kleszcza.....	12
1.2.2. Zdolność kleszcza do supresji systemów obronnych gospodarza ...	14
1.3. <i>Borrelia burgdorferi</i> - patogen przenoszony przez kleszcze.....	19
1.3.1. Ogólna charakterystyka <i>B. burgdorferi</i>	19
1.3.2. Zasiadlanie kleszcza przez <i>B. burgdorferi</i>	24
1.3.3. Udział białek ślinowych kleszcza w transferze <i>B. burgdorferi</i> do organizmu gospodarza.....	31
1.4. Strategie walki z odkleszczową infekcją wywołaną przez <i>B. burgdorferi</i>	34
2. Cel pracy	37
3. Materiały i metody	38
3.1. Materiały.....	38
3.1.1. Kleszcze <i>Ixodes ricinus</i>	38
3.1.2. Szczepy bakteryjne	38
3.1.3. Linie komórkowe	38
3.1.4. Plazmidy.....	39
3.1.5. Startery.....	40
3.1.6. Zestawy odczynników	42
3.1.7. Przeciwciała	43
3.1.8. Roztwory i bufony.....	43
3.1.9. Pożywki do hodowli bakterii	47
3.1.10. Pożywki do hodowli komórek owadzych	48
3.1.11. Żele	48
3.1.12. Markery masy.....	49
3.1.13. Złoża/kolumny do chromatografii białek	50
3.2. Metody	51
3.2.1. Rozdział elektroforetyczny DNA w warunkach natywnych	51
3.2.2. Rozdział elektroforetyczny białek w warunkach denaturujących	51

3.2.3.	Immunodetekcja białek metodą <i>western blot</i>	51
3.2.4.	Oczyszczanie DNA.....	52
3.2.5.	Powielanie DNA metodą PCR.....	53
3.2.6.	Konstrukcja wektorów plazmidowych	54
3.2.6.1.	Synteza cDNA do konstrukcji wektorów ekspresyjnych	54
3.2.6.2.	Powielanie wektorów ekspresyjnych z serii pMCSG	54
3.2.6.3.	Niezależne od ligacji klonowanie do wektorów ekspresyjnych z serii pMCSG	55
3.2.6.4.	Ligacja do wektora pCR-XL-TOPO oraz pET200/D-TOPO	56
3.2.6.5.	Ligacja do wektora pFastBac HT A	56
3.2.7.	Izolacja DNA	57
3.2.8.	Analiza konstruktów plazmidowych	58
3.2.9.	Mutageneza cDNA	59
3.2.10.	Konstrukcja wektora bakulowirusowego (bakmidu).....	62
3.2.11.	Analiza bakmidów	62
3.2.12.	Otrzymywanie rekombinowanych bakulowirusów	63
3.2.13.	Otrzymywanie białek	64
3.2.13.1.	Przygotowywanie szczepów bakteryjnych	64
3.2.13.2.	Produkcja białek w komórkach bakteryjnych.....	65
3.2.13.3.	Produkcja białek w komórkach owadzych.....	66
3.2.13.4.	Analiza rozpuszczalności białek.....	66
3.2.13.5.	Izolacja i oczyszczanie białek	66
3.2.13.6.	Pomiar stężenia białka	68
3.2.14.	Badanie aktywności białek - testy immunoenzymatyczne ELISA.....	68
3.2.15.	Przesiewowe testy krystalizacyjne	70
3.2.16.	Pomiary dynamicznego rozpraszania światła (DLS)	70
3.2.17.	Pomiary dichroizmu kołowego (CD)	71
3.2.18.	Pomiary małokątowego rozpraszania promieni rentgenowskich (SAXS)	72
3.2.19.	Modelowanie kompleksu białek TROSPA_NΔ44 i OspA <i>in silico</i>	72
3.2.20.	Analiza sekwencji aminokwasowej białek za pomocą narzędzi bioinformatycznych.....	73
4.	Wyniki	75
4.1.	Przygotowanie obiektów badań.....	75

4.1.1. Próba uzyskania sekwencji kodujących białka z rodziny Salp15: Iric-1, Iric-2 oraz Iric-3	75
4.1.2. Konstrukcja wektorów do produkcji białka Salp15 Iric-1 w bakteryjnym systemie ekspresyjnym	78
4.1.3. Produkcja w systemie bakteryjnym oraz oczyszczanie białek TROSPA, Salp15, OspA i OspC.....	79
4.2. Badanie aktywności białek TROSPA i Salp15 z <i>I. ricinus</i>	83
4.2.1. Badanie aktywności pełnej długości białka TROSPA produkowanego w <i>E. coli</i>	83
4.2.2. Badanie aktywności białka Salp15 produkowanego w <i>E. coli</i>	86
4.3. Analiza bioinformatyczna sekwencji aminokwasowych TROSPA oraz Salp15	88
4.4. Produkcja mutantów delecyjnych białka TROSPA oraz badanie ich aktywności.....	89
4.4.1. Konstrukcja wektorów ekspresyjnych do produkcji mutantów delecyjnych TROSPA w bakteryjnym systemie ekspresyjnym	89
4.4.2. Produkcja w systemie bakteryjnym oraz oczyszczanie mutantów delecyjnych TROSPA oraz białka OspA_NΔ6.....	90
4.4.3. Badanie aktywności mutantów delecyjnych TROSPA.....	94
4.5. Produkcja mutantów substytucyjnych białka TROSPA oraz badanie ich aktywności.....	97
4.5.1. Mutageneza cDNA TROSPA.....	97
4.5.2. Produkcja w systemie bakteryjnym, oczyszczanie oraz badanie aktywności mutantów substytucyjnych TROSPA V1 – V5.....	98
4.6. Produkcja białka TROSPA_NΔ50 w eukariotycznym systemie ekspresyjnym	100
4.6.1. Konstrukcja wektorów ekspresyjnych do produkcji białka TROSPA_NΔ50 w komórkach owadzych.....	100
4.6.2. Produkcja i oczyszczanie białka TROSPA_NΔ50	102
4.6.3. Porównanie aktywności białka TROSPA_NΔ50 produkowanego w komórkach bakteryjnych oraz owadzych	104
4.7. Badania struktury białka TROSPA oraz kompleksu TROSPA-OspA.....	107
4.7.1. Przesiewowe testy krystalizacyjne mutantów delecyjnych TROSPA.....	107
4.7.2. Pomiary dynamicznego rozpraszania światła.....	108

4.7.3. Sączenie molekularne białka TROSPA_NΔ44 w warunkach natywnych i denaturujących	112
4.7.4. Analiza sekwencji aminokwasowej TROSPA metodami bioinformatycznymi.....	114
4.7.4.1. Przewidywanie stopnia nieuporządkowania.....	114
4.7.4.2. Analiza hydrofobowości, średniego wypadkowego ładunku oraz punktu izoelektrycznego.....	115
4.7.5. Analiza struktury TROSPA_NΔ44 metodą dichroizmu kołowego	116
4.7.6. Analiza struktury TROSPA_NΔ44 metodą małokątowego rozpraszania promieni rentgenowskich (SAXS).....	119
4.7.7. Badania struktury kompleksu TROSPA_NΔ44 – OspA_NΔ6.....	123
4.7.8. Identyfikacja elementów molekularnego rozpoznania (MoRFs)	127
4.7.9. Modelowanie struktury kompleksu białek TROSPA_NΔ44 - OspA <i>in silico</i>	128
5. Dyskusja.....	134
5.1. Namnażanie fragmentów genów kleszcza zawierających odcinki kodujące białka z rodziny Salp15 (Iric-1, Iric-2 oraz Iric-3)	134
5.2. Produkcja oraz badanie aktywności białka Salp15.....	135
5.3. Produkcja oraz badanie aktywności białka TROSPA	137
5.4. Rejony TROSPA istotne dla oddziaływania TROSPA-OspA.....	138
5.5. Struktura białka TROSPA_NΔ44.....	141
5.6. Struktura kompleksu TROSPA_NΔ44-OspA.....	146
6. Wnioski.....	150
7. Streszczenie.....	152
8. Summary	154
9. Wykaz prac naukowych powstałych podczas realizacji pracy doktorskiej	155
10. Finansowanie.....	157
11. Literatura	158

Wykaz skrótów

- A₂₈₀** – (ang. *absorbance value at 280 nm*) wartość absorbancji przy długości fali wynoszącej 280 nm
- AP** – (ang. *alkaline phosphatase*) alkaliczna fosfataza
- BSA** – (ang. *bovine serum albumin*) albumina surowicy wołowej
- CAT** – (ang. *chloramphenicol acetyltransferase*) acetylotransferaza chloramfenikolu
- CD** – (ang. *circular dichroism*) dichroizm kołowy
- cDNA** – (ang. *complementary DNA*) DNA komplementarny do mRNA
- DLS** – (ang. *dynamic light scattering*) dynamiczne rozpraszanie światła
- D_{max}** – (ang. *maximum particle size*) wymiary maksymalne cząsteczki
- DNA** – (ang. *deoxyribonucleic acid*) kwas deoksyrybonukleinowy
- EDTA** – (ang. *ethylenediaminetetraacetic acid*) kwas etylenodiaminotetraoctowy
- ELISA** – (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*) test immunoenzymatyczny
- g** – (ang. *gravitational acceleration*) przyspieszenie ziemskie
- GST** – (ang. *glutathione S-transferase*) S-transferaza glutationu
- IDP** – (ang. *intrinsically disordered protein*) białko inherentnie nieuporządkowane
- IL** – (ang. *interleukin*) interleukina
- INiAC** – (ang. *immobilized nickel affinity chromatography*) chromatografia powinowactwa do złoża z unieruchomionymi jonami niklu
- LBP** – (ang. *ligand binding pocket*) kieszeń wiążąca ligand
- MG** – (ang. *molten globule*) białko występujące w konformacji stopionej globuli
- MoRF** – (ang. *molecular recognition features*) elementy molekularnego rozpoznania
- mRNA** – (ang. *messenger RNA*) matrycowy (informacyjny) RNA
- NMR** – (ang. *nuclear magnetic resonance*) magnetyczny rezonans jądrowy
- NusA** – (ang. *N utilization substance protein A*) białko uczestniczące w regulacji transkrypcji u *E. coli*
- PAA** – (ang. *polyacrylamide gel*) żel poliakrylamidowy
- PCR** – (ang. *polymerase chain reaction*) łańcuchowa reakcja polimerazy
- PDB** – Protein Data Bank
- PMG** – (ang. *pre-molten globule-like*) białko występujące w konformacji stopionej globuli typu PMG
- PSE** – (ang. *preformed structural elements*) elementy przejściowo formowane w białku, uczestniczące w molekularnym rozpoznaniu ligandu
- R_g** – (ang. *radius of gyration*) promień żyracji
- R_h** – (ang. *hydrodynamic radius*) promień hydrodynamiczny
- RNA** – (ang. *ribonucleic acid*) kwas rybonukleinowy

- SAXS** – (ang. *small angle X-ray scattering*) małąkątowe rozpraszanie promieni rentgenowskich
- SDS-PAGE** – (ang. *sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis*) elektroforeza w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących
- SEC** – (ang. *size-exclusion chromatography*) sączenie molekularne
- TCEP** – (ang. *tris(2-carboxyethyl)phosphine*) chlorowodorek tris(2-karboksyetylo)fosfiny
- TEV** – (ang. *tobacco etch virus protease*) proteaza wirusa mozaiki wżerkowej tytoniu
- TGE** – (ang. *tick gut extract*) ekstrakt z jelit kleszcza
- T_m** – (ang. *melting temperature*) temperatura topnienia
- Tris** – (ang. *tris(hydroxymethyl)aminomethane*) 2-amino-2-(hydroksymetylo)-1,3-propandiol

1. Wstęp

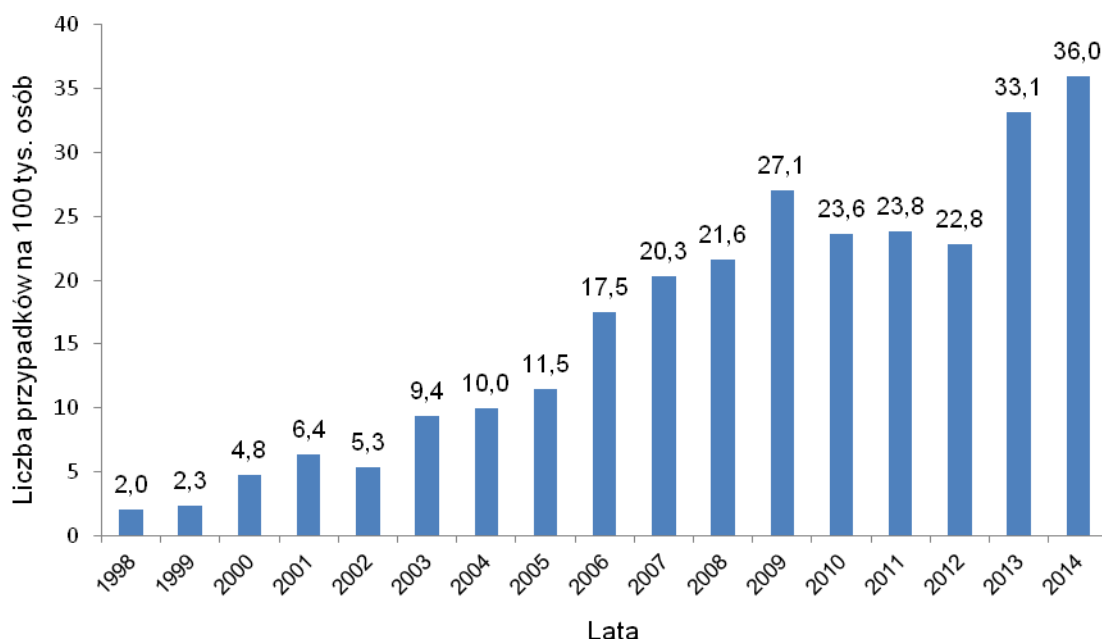
1.1. Wprowadzenie

Rozwój cywilizacyjny, towarzyszące mu zmiany środowiska naturalnego oraz ocieplanie klimatu powodują, że terytoria zasiedlane przez niektóre organizmy przenoszące groźne patogeny systematycznie ulegają poszerzeniu. Spośród wszystkich wirusów, bakterii i pierwotniaków wywołujących nowo pojawiające się i nawracające choroby zakaźne (ang. *emerging/re-emerging infectious diseases*) około jedna trzecia efektywnie rozprzestrzenia się jedynie z udziałem nosiciela zwanego też wektorem [1]. Zgodnie z przyjętą definicją nosicielami zwane są organizmy zasiedlane przez patogeny będące czynnikiem sprawczym danej jednostki chorobowej, u których nie występują symptomy tej choroby. W przypadku chorób zakaźnych zdecydowanie najliczniejszą grupę wektorów stanowią stawonogi, szczególnie komary (np. *Anopheles*, *Culex*, *Aedes*, *Ochlerotatus*) oraz kleszcze należące głównie do rodziny kleszczy twardych *Ixodidae* (np. *Hyalomma*, *Haemaphysalis*, *Ixodes*, *Amblyomma*, *Rhipicephalus*, *Dermacentor*). Komary są wektorami drobnoustrojów wywołujących takie choroby jak malaria, gorączka Zachodniego Nilu, denga, czy też żółta febra, kleszcze natomiast są wektorami patogenów wywołujących m. in. boreliozę, kleszczowe zapalenie mózgu, babeszjozę, anaplazmozy oraz erlichiozę [2]. Do grona wektorów przenoszących groźne choroby należy także zaliczyć muchy tse-tse (*Glossina spp.*), moskity (*Phlebotominae*), owady z rodziny meszkowatych (*Simuliidae*) i kuczmanowatych (*Culicoides*), wszy (*Pediculus humanus*), pchły (*Pulex*, *Xenopsylla*, *Ctenocephalides*, *Tunga*) oraz pluskwiaki (*Triatoma*) [1].

Pomimo iż większość zgonów z powodu infekcji chorobami rozprzestrzeganymi przez wektory następuje wskutek zachorowań na malarię roznoszoną przez komary, to jednak kleszcze w ostatnich dziesięcioleciach spowodowały największą liczbę infekcji wśród ludzi i zwierząt na terenie Eurazji i Ameryki Północnej [3]. Przyczyn takiego stanu rzeczy można upatrywać w następujących zjawiskach: ociepleniu klimatu, wzroście populacji dzikich zwierząt stanowiących rezerwar patogennych drobnoustrojów, a także rozwoju turystyki na terenach leśnych. Zaobserwowano, że kleszcze występują już nie

tylko w lasach i na polach, ale również na terenach parków śródmiejskich [4,5]. Wymienione zjawiska powodują stały przyrost liczby kleszczy oraz poszerzanie zasiedlanych przez nie obszarów. W rezultacie wzrasta prawdopodobieństwo ukąszenia człowieka przez te roztocza.

Kleszcze są wektorami wielu patogenów, w tym krętków z rodzaju *Borrelia*. Bakterie te są przyczyną boreliozy - najczęściej występującej choroby przenoszonej przez wektory w strefie klimatu umiarkowanego półkuli północnej. Liczba nowych przypadków boreliozy w Stanach Zjednoczonych w latach 1992-2006 uległa podwojeniu z około 10 do 20 tysięcy osób rocznie, podczas gdy we wschodnich Niemczech zapadalność wzrosła z 17,8 w 2002 roku do 31,7 przypadków na 100 000 mieszkańców w 2009 roku [6,7]. W całej Europie notuje się co roku powyżej 85 tysięcy nowych przypadków infekcji tym patogenem [8]. Niepokojące dane dotyczące zapadalności na boreliozę wśród ludności polskiej publikuje również Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego, który wskazuje na gwałtowny wzrost liczby zachorowań w latach 1998 – 2014 (Rycina 1.1.). Stwierdzono, iż obecnie borelioza jest w Polsce najdynamiczniej rozwijającą się chorobą zakaźną [9].



Rycina 1.1. Zapadalność na boreliozę w Polsce w latach 1998 – 2014 (wg Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego) [10].

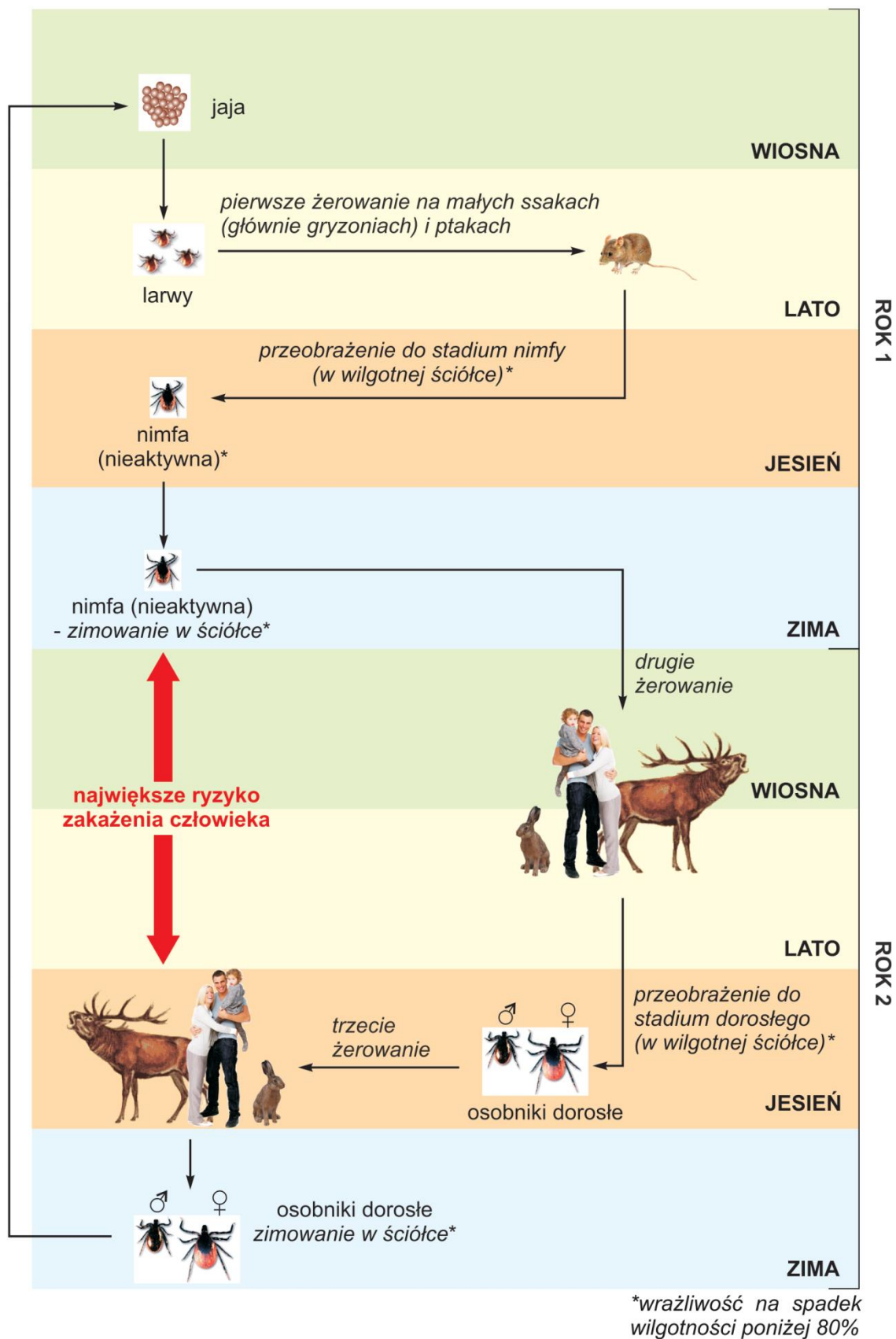
Biorąc pod uwagę powyższe dane stwierdzić można, iż problem powstrzymania dalszej ekspansji boreliozy staje się coraz poważniejszym wyzwaniem. Istnieje zatem potrzeba opracowania skutecznych strategii prewencji i leczenia tej choroby.

1.2. Pasożytniczy tryb życia kleszcza

Kleszcz to obligatoryjny pasożyt zewnętrzny, żywiący się krwią kręgowców lądowych. Należy on do gromady pajęczaków, podgromady roztoczy. Dotychczas scharakteryzowano ponad 800 gatunków kleszczy, jednakże wydaje się, że tylko część z nich (należące do rodzaju *Ixodes*, *Rhipicephalus*, *Dermacentor*, *Hyalomma*, *Haemaphysalis* oraz *Ornithodoros*) może przenosić czynniki chorobotwórcze na ludzi. Zarówno w Polsce, jak i w całej Europie dominującym gatunkiem kleszcza jest *Ixodes ricinus*, w Ameryce Północnej przeważają *I. scapularis* oraz *I. pacificus*, natomiast w Azji występuje głównie *I. persulcatus*. Rostocza te są wektorami dla wielu patogenów, w tym między innymi krętków z rodzaju *Borrelia*, których krążenie w przyrodzie jest ściśle powiązane z cyklem rozwojowym kleszcza [11,12].

1.2.1. Cykl rozwojowy kleszcza

Cykl rozwojowy kleszczy twardych (*Ixodidae*) trwa zazwyczaj około 2-3 lat (Rycina 1.2). Długość jego poszczególnych faz zmienia się wraz z regionem i warunkami środowiskowymi oraz zależy od występowania gospodarza, dlatego też w skrajnych przypadkach, w swoim siedlisku kleszcze mogą przetrwać w stanie wygłodzenia nawet do kilku lat [12].



Rycina 1.2. Cykl rozwojowy kleszcza *I. ricinus*.

W cyklu rozwojowym kleszcza występują 4 następujące po sobie fazy rozwojowe: jajo oraz 3 stadia pasożytnicze (larwa, nimfa oraz osobniki dorosłe - samiec i samica). Będąc w danym stadium rozwojowym kleszcz żywi się tylko raz, a następnie przechodzi przeobrażenie. Wyjątek stanowi samica, która w momencie odłączenia od gospodarza przed ukończeniem ssania krwi (proces ten trwa do 12 dni), jest w stanie ponowić żerowanie nawet po kilku dniach. Warunkiem do tego, aby samica była w stanie całkowicie wypełnić jelito krwią jest zapłodnienie przez samca. Może ona wtedy nawet 100-krotnie zwiększyć masę ciała. Po zakończeniu żerowania samica odłącza się od gospodarza i składa jaja, po uprzednim znalezieniu miejsca o odpowiedniej wilgotności (np. w norach, jamach czy też w warstwie podściółki). Składanie jaj może trwać nieprzerwanie nawet do kilku tygodni, po czym wycieńczona samica umiera [12].

Ze względu na miejsce, w którym kleszcze wyczekują na ofiarę i przeobrażają się można je podzielić na dwie grupy: i) przebywające głównie w miejscu bytowania gospodarza (w norze lub gnieździe, np. *I. lividus* i *I. crenulatus*) oraz ii) wyczekujące na gospodarza na otwartej przestrzeni (w lasach lub na łąkach, np. *I. ricinus*, *I. scapularis*, *I. persulcatus*). Kleszcze polujące na otwartych terenach zazwyczaj wspinają się na rośliny, eksponując pierwszą parę odnóży, które reagują na bodźce mechaniczne oraz zawierają receptory rejestrujące sygnały cieplne i chemiczne wysyłane przez ofiarę. Roztocze przyczepiają się do zwierzęcia, gdy znajdzie się ono wystarczająco blisko lub w przypadku braku bezpośredniego kontaktu fizycznego, podchodzą w kierunku potencjalnego gospodarza [12,13].

1.2.2. Zdolność kleszcza do supresji systemów obronnych gospodarza

Adaptacja kleszczy do odżywiania się krwią nastąpiła między innymi wskutek ewolucji komponentów znajdujących się w ślinie pasożyta. Aby z sukcesem ukończyć żerowanie, które trwa nawet do kilkunastu dni, kleszcze muszą przeciwdziałać reakcjom zachodzącym w organizmie gospodarza w odpowiedzi na naruszenie jego homeostazy. W tym celu gruczoły ślinowe pasożytów produkują ogromne ilości związków biologicznie czynnych, które

mają działanie przeciwbólowe, przeciwzakrzepowe, rozkurczające naczynia krwionośne, przeciwzapalne i immunomodulujące [14–16]. Wymienione powyżej substancje, produkowane przez kleszcze podczas żerowania prowadzą do wytworzenia w okolicy miejsca ukąszenia strefy „immunologicznie uprzywilejowanej” [17,18]. Z działania tych substancji korzystają również patogeny przenoszone przez kleszcze, którym ułatwiają one transfer pomiędzy wektorem i gospodarzem. Udowodniono, że związki produkowane przez gruczoły ślinowe kleszcza wzmagają wnikanie między innymi: (i) wirusa Thogoto [19] oraz *Theileria parva* [20], które przenoszone są przez *Rhipicephalus appendiculatus*; (ii) wirusa kleszczowego zapalenia mózgu [21] oraz *Francisella tularensis* [22], przenoszonych przez *I. ricinus*; (iii) wirusa pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej przenoszonego przez *Dermacentor reticulatus* [23]; a także (iv) *Anaplasma phagocytophilum* [24] i *B. burgdorferi* przenoszonych przez *I. scapularis* [25] oraz *I. ricinus* [26,27].

Ból i swędzenie to reakcja organizmu gospodarza na naruszenie powłoki ciała. Żerujący kleszcz zdolny jest do niemal całkowitego zniesienia tej reakcji [28]. Jednym z pierwszych mediatorów bólu jest ATP uwalniany z uszkodzonych komórek. Aktywuje on neutrofile, które zbierają się w miejscu uszkodzenia tkanki, a następnie podlegają degranulacji. Wykazano, że ślina kleszczy zawiera enzymy degradujące ATP [29]. Obok ATP, reakcję bólową inicjują również histamina, serotonina oraz bradykinina, które są uwalniane przez komórki w odpowiedzi na uszkodzenie tkanek [30]. Dowiedziono, że bradykinina jest degradowana przez występującą w ślinie kleszcza proteazę zwaną kininazą [31]. Natomiast serotonina i histamina może być neutralizowana przez białko SHBP (ang. *serotonin and histamine binding protein*), które zostało zidentyfikowane u kleszczy z rodzaju *Dermacentor* [32].

W procesie gojenia się rany bardzo ważną rolę odgrywa reakcja zapalna. W jej inicjacji uczestniczą znajdujące się w warstwie naskórka i skórze właściwej leukocyty, które stanowią pierwszą linię obrony w miejscu ugryzienia przez kleszcza. Uwalniają one mediatory reakcji zapalnej oraz substancje chemotaktyczne przyciągające neutrofile. Te z kolei prowadzą fagocytozę drobnoustrojów, przyczyniają się do przebudowy istoty pozakomórkowej i tworzenia nowych naczyń krwionośnych oraz nabłonków [33]. Kleszcze modułują przyciąganie neutrofilów poprzez wiązanie czynników

chemotaktycznych, hamowanie produkcji i aktywacji wolnych rodników tlenowych i tlenku azotu, a także obniżenie ekspresji integryn i adhezyń niezbędnych do migracji neutrofilów przez naczynia krwionośne [34–37]. Wydzielana przez pasożyta ślina hamuje także angiogenezę oraz przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej, nie dopuszczając do zagojenia się rany. W rezultacie zmniejsza się możliwość odrzucenia kleszcza (ang. *tick rejection*) [30,38,39].

Kleszcz kontroluje reakcję zapalną oraz odpowiedź immunologiczną, także poprzez modulację działania cytokin, które wpływają między innymi na migrację komórek krwi do odpowiednich tkanek [30]. Wykazano, że ekstrakt gruczołów ślinowych kleszcza hamuje wydzielanie przez makrofagi oraz komórki dendrytyczne cytokin wywołujących zapalenie (IL-1, IL-2, IL-12 i TNF- α) [40–42]. Kleszcze produkują również całe spektrum innych związków blokujących działanie cytokin chemotaktycznych. Związki te powstrzymują napływ leukocytów do miejsca ugryzienia i w rezultacie hamują rozwój reakcji zapalnej [43,44].

Inne ważne mechanizmy obronne gospodarza, z którymi muszą uporać się kleszcze są zaangażowane w utrzymanie hemostazy. W tym celu pasożyty produkują szereg substancji rozszerzających naczynia krwionośne, hamujących agregację płytek krwi oraz zapobiegających krzepnięciu krwi [34,45]. Aby uzyskać efekt wazodilatacji, czyli rozkurczu mięśni gładkich w ścianie naczyń krwionośnych, kleszcze produkują związki niebiałkowe takie jak prostaglandyny PGE2 i PGF2 α [46] oraz prostacykliny [47], a także białko tHRF (ang. *tick histamine release factor*) [48] i inhibitory proteaz serynowych [49]. Prostaglandyny PGE2 i PGF2 α dodatkowo podnoszą ciśnienie przepływu krwi w kapilarach, co w połączeniu z większą przepuszczalnością naczyń skutkuje intensywniejszym napływem krwi do tkanki w miejscu ugryzienia, umożliwiającym kleszczowi efektywniejsze żerowanie [30]. Kaskada krzepnięcia krwi jest przez kleszcza zahamowana przez wydzielanie inhibitorów proteaz (inhibitory typu Kunitza), białek z rodziny Salp9 i Salp14, czy też substancji wiążących trombinę i czynnik Xa [30,50]. Aktywacja płytek krwi jest blokowana przez związki takie jak apyryza, która hydrolizuje niezbędne dla agregacji trombocytów ADP i ATP, czy też dezintegryny zapobiegające wiązaniu się fibrynogenu z płytkami krwi [51].

Niezwykle istotnym dla efektywnego żerowania kleszcza jest wyciszenie u gospodarza systemu dopełniacza. Proces ten zapewnia dodatkowe korzyści dla przenoszonych przez kleszcza patogenów, które nie są zwalczane przez system odpornościowy, dzięki czemu mogą rozpocząć zasiedlanie organizmu [35]. Układ dopełniacza stanowi jeden z wrodzonych mechanizmów obrony przed różnorodnymi czynnikami, np. drobnoustrojami. System ten tworzony jest przez szereg białek biorących udział we wspomaganie fagocytozy, kontroli reakcji zapalnej oraz eliminacji czynników szkodliwych [52,53]. Jednym z pierwszych scharakteryzowanych u kleszcza białek modulujących alternatywne działanie dopełniacza jest ISAC (ang. *I. scapularis anticomplement*) [54]. Jego działanie jest podobne do efektu wywoływanego przez czynnik CHF (ang. *Complement Factor H*) oraz DAF (ang. *decay accelerating factor*), które blokują aktywację dopełniacza poprzez destabilizację konwertazy C3 – enzymu kluczowego dla przebiegu alternatywnej ścieżki dopełniacza. Innym białkiem, które wykazuje działanie podobne do ISAC jest Salp20 zidentyfikowane u *I. scapularis* [55]. Natomiast u *I. ricinus* odkryto homologiczne białka – IRAC1 i IRAC2, które również hamują alternatywną ścieżkę ludzkiego dopełniacza, a mechanizm ich działania jest zbliżony do obserwowanego dla wyżej wymienionych białek ISAC oraz Salp20 [56,57]. Okazuje się, że również ścieżka lektynowa może być zatrzymana przez kleszcze na jej początkowym etapie za pośrednictwem białka TSLPI (ang. *tick salivary lectin pathway inhibitor*). Częsteczką tą, zidentyfikowaną u *I. scapularis*, blokuje dopełniacz poprzez L-fikolinę, która inicjuje ścieżkę lektynową [58].

Pomimo tego, że kleszcze potrafią skutecznie wyciszać odpowiedź systemu immunologicznego gospodarza, u niektórych zwierząt powstaje nabyta odporność na kolejne ataki tego pasożyta. Powstaje ona pod wpływem powtarzających się ugryzień. Zjawisko to zaobserwowano u świnek morskich oraz niektórych ras bydła. U zwierząt tych kilkakrotne ukąszenie przez wybrane gatunki kleszczy skutkowało wytworzeniem odpowiedzi immunologicznej, która znacznie zmniejszyła ilość pobranej krwi oraz zredukowała liczbę pasożytujących roztoczy [59,60]. Sugeruje się też, że efekt ten ma bezpośredni wpływ na zmniejszenie liczby przekazywanych przez kleszcza patogenów, ponieważ króliki po ugryzieniu przez niezainfekowane kleszcze *D. andersoni*, wykazywały odporność na infekcję *F. tularensis*, przy kolejnym żerowaniu

roztoczy zarażonych tą bakterią [61]. W podobny sposób zmniejszono podatność na zakażenie krętkami *B. burgdorferi* u świnek morskich, które były odporne na kleszcze, a także u myszy niewykazujących tego rodzaju odporności. Ssaki te były wcześniej kilkakrotnie poddane ugryzieniom nimf *I. scapularis* niezainfekowanych bakterią [62,63]. Zjawisko nabytej odporności na kleszcze i choroby odkleszczowe prawdopodobnie występuje też u ludzi. Na podstawie 14-letnich badań ludzi pochodzących z terenów endemicznego występowania boreliozy pokazano, że osoby, które wykazywały podwyższoną wrażliwość (ang. *cutaneous hypersensitivity*) na ugryzienia kleszczy były mniej podatne na rozwój infekcji *B. burgdorferi* [64]. Powyższe obserwacje sugerują, że żerowanie kleszcza może wywoływać u gospodarza odpowiedź immunologiczną, która neutralizuje działanie śliny kleszcza i obniża ryzyko zakażenia patogenami przenoszonymi przez te roztocza. Hipoteza ta znalazła potwierdzenie w badaniu histologicznym, w którym porównano tkanki pobrane od osobnika po jednym oraz dwóch ukąszeniach kleszcza *I. scapularis*. Okazało się, że w tkance pobranej z miejsca pierwszego ukąszenia była obecna niewielka liczba komórek uczestniczących w reakcji zapalnej, natomiast w tkance z miejsca drugiego ukąszenia ilość tych komórek była wielokrotnie większa [65].

1.3. *Borrelia burgdorferi* - patogen przenoszony przez kleszcze

1.3.1. Ogólna charakterystyka *B. burgdorferi*

Bakterie należące do rodzaju *Borrelia* można podzielić na 3 grupy filogenetyczne: grupa krętków wywołujących boreliozę, określana wspólnym mianem *Borrelia burgdorferi sensu lato* (s.l.) lub jako grupa LB (ang. *Lyme borreliosis*), bakterie będące przyczyną duru powrotnego – grupa RF (ang. *relapsing fever*), np. *B. miyamotoi* i *B. lonestari*, a także niedawno opisana grupa REP (ang. *reptile associated borreliae*), która występuje u gadów i jest przenoszona przez kleszcze z rodzaju *Amblyomma* oraz *Hyalomma*, np. *B. turcica* [66,67].

Dotychczas poznano ponad 20 gatunków bakterii należących do grupy *B. burgdorferi s.l.* Co najmniej osiem spośród nich stanowią gatunki patogeniczne dla człowieka: *B. burgdorferi sensu stricto* (s.s.), *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. lusitaniae*, *B. valaisiana*, *B. bissettii*, *B. spielmanii* i *B. bavariensis* [66,68]. Na terenie Stanów Zjednoczonych dominują bakterie *B. burgdorferi sensu stricto* (s.s.), podczas gdy w Europie scharakteryzowano co najmniej 9 gatunków endemicznych *Borrelia*: *B. burgdorferi s.s.*, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. bavariensis*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. spielmanii*, *B. bissettii*, oraz *B. finlandensis*. W Azji Wschodniej oraz Centralnej występują zasadniczo te same gatunki co w Europie, oprócz *B. lusitaniae*, którą do tej pory znaleziono wyłącznie na terenie Azji Zachodniej. Patrząc globalnie, zróżnicowanie genetyczne *B. burgdorferi s.l.* w Europie i w Azji jest znacznie większe niż wśród gatunków występujących na terenie Ameryki Północnej [66]. Ostatnie badania wskazują, że w Polsce występują przede wszystkim trzy groźne dla człowieka gatunki: *B. garinii*, *B. burgdorferi s.s.* oraz *B. afzelii* [69,70].

Krętki *B. burgdorferi s.l.* (zwane dalej *B. burgdorferi*) tworzą grupę mikroaerofilnych bakterii, które w zależności od cyklu życiowego są pasożytami zewnątrz- lub wewnątrzkomórkowymi. Ich komórki są wydłużone, silnie skręcone i otoczone dwiema błonami komórkowymi, których budowa jest odmienna od błon charakterystycznych dla bakterii Gram-ujemnych (Rycina 1.3.).



Rycina 1.3. Zdjęcie bakterii *Borrelia burgdorferi* s.s. wykonane z wykorzystaniem mikroskopii w ciemnym polu.

Powiększenie 400-krotne (Za zgodą Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library (PHIL), numer identyfikacyjny #6631).

Zewnętrzna błona komórkowa posiada w swojej strukturze stosunkowo niewielką ilość białek transbłonowych i jest pozbawiona stabilizujących membranę lipopolisacharydów. Cechuje ją natomiast obecność niskocząsteczkowych glikolipidów oraz przede wszystkim bardzo duża ilość lipoprotein (ang. *outer surface lipoproteins*). Białka te są niezwykle istotne dla wirulencji *B. burgdorferi*, umożliwiając oddziaływania z wektorem i z gospodarzem oraz kolonizację tych organizmów [71,72]. Ponad 130 produkowanych przez bakterię lipoprotein jest obiektem intensywnych badań, szczególnie wśród naukowców zajmujących się opracowywaniem szczepionki przeciwko temu patogenowi. Do dziś nie jest poznany sposób, w jaki bakteria kieruje lipoproteiny na powierzchnię zewnętrznej błony komórkowej. Uważa się, że centralnym elementem biorącym udział w tym procesie jest ortolog białka BamA (ang. *β-barrel assembly machinery A*) - BB0795. Wykazano bowiem, że mutanty pozbawione BB0795 posiadają znacznie mniejszą ilość białek

zewewnętrznej błony komórkowej takich jak p66, BesC oraz BB0405, a także obniżoną liczbę lipoprotein powierzchniowych – OspA i CspA [73].

Borrelia posiada genom, którego organizacja jest niespotykana u żadnego innego rodzaju bakterii [74]. Jest on silnie posegmentowany i niestabilny. W cyklu życiowym *B. burgdorferi*, DNA plazmidowy odgrywa również ważną rolę co chromosom bakteryjny. Co ciekawe plazmidowy DNA występuje zarówno w formie kolistej, jak i liniowej, a liczba tego typu cząsteczek w zależności od gatunku waha się od 13 do 21, co stanowi do 40% całego genomu. Podczas gdy konserwatywny chromosom o wielkości około 1000 kbp koduje geny odpowiedzialne za podstawowy metabolizm krętka, wydaje się, że wysoce zmienne geny plazmidowe, o sumarycznej wielkości 600 kbp, warunkują jego wirulencję [75]. Na podstawie dotychczasowych badań przypuszcza się, że genom *B. burgdorferi* nie koduje genów odpowiedzialnych za produkcję, czy też sekrecję związków toksycznych. Wydaje się zatem, że uszkodzenia tkanek związane z rozwojem boreliozy są wywołane reakcją zapalną powstałą w organizmie gospodarza [76].

Bakterie *B. burgdorferi* są rozprzestrzeniane wśród ludzi głównie za pośrednictwem czterech gatunków kleszczy: *I. ricinus*, *I. scapularis*, *I. pacificus* oraz *I. persulcatus* [77]. Oprócz tego, krętki te zostały wykryte u innych gatunków kleszczy oraz niektórych gatunków komarów, pcheł oraz much końskich [78,79]. W Polsce krętki boreliozy przenoszone są głównie przez dominującego na terenie Europy kleszcza *I. ricinus*.

Większość badań wskazuje, że *B. burgdorferi* nie przedostaje się do jaj złożonych przez zainfekowaną krętkiem samicę kleszcza (nie występuje transfer bakterii na drodze transowarialnej) [80,81]. Oznacza to, że larwa kleszcza, czyli jego pierwsze stadium rozwojowe, po wylęgnięciu się z jaja nie jest zarażone krętkami. Do zasiedlenia roztocza dochodzi w trakcie ssania krwi zakażonego kręgowca, który jest rezerwuarem bakterii. Następnie krętki mogą pozostawać w kleszczu podczas jego przeobrażeń do kolejnych form rozwojowych - nimfy i postaci dorosłej [77].

Kompetentny rezerwuar *B. burgdorferi* stanowią kręgowce, które pomimo bytującej w nich bakterii nie wykazują symptomów zakażenia takich jak stany zapalne narządów wewnętrznych, czy też układu ruchu. Innymi słowy są to zwierzęta, u których krętki boreliozy nie są zwalczane przez układ

immunologiczny, dzięki czemu mogą namnażać się w organizmie gospodarza, pozostając praktycznie „niezauważonymi”. Jednym z mechanizmów, które umożliwiają *B. burgdorferi* ukrycie się przed układem odpornościowym gospodarza jest produkcja białek powierzchniowych CRASP (ang. *complement regulator-acquiring surface proteins*), które blokują układ dopełniacza. Białka CRASP uniemożliwiają uruchomienie alternatywnej ścieżki dopełniacza poprzez dezaktywację konwertazy C3 [66,82]. Dzięki temu *B. burgdorferi* może kontynuować swój cykl życiowy, zakażając kolejne pokolenia kleszczy odżywiających się krwią zwierząt. W Ameryce Północnej rezerwuarem *B. burgdorferi* jest głównie mysz *Peromyscus leucopus*, natomiast w Europie stanowią go myszy, szczury, wiewiórki, jeże oraz liczne gatunki ptaków [83]. Kompetentnym rezerwuarem dla krętków *Borrelia* mogą być również większe ssaki takie jak borsuki i lisy w Europie, a także szopy oraz oposy w Ameryce Północnej [84,85]. Wydaje się, że istotną rolę w rozprzestrzenianiu *B. burgdorferi* odgrywają wędrowne ptaki, które mogą przenosić na długie dystanse zarówno krętka jak i zainfekowane bakterią kleszcze [86]. Duże ssaki kopytne nie stanowią kompetentnego gospodarza dla krętków, ponieważ bakteria ta jest zwalczana przez układ dopełniacza tych zwierząt. Jednakże odgrywają one istotną rolę w zakażaniu kleszczy [83].

Cykl życiowy *B. burgdorferi* przebiega w dwóch odmiennych typach organizmów: w wektorze-stawonogu oraz gospodarzu-kręgowcu. Transfer bakterii z wektora do gospodarza, a następnie ponowne nabycie krętka przez kleszcza wymaga przystosowania się tego mikroorganizmu do różnych środowisk poprzez odpowiednie reagowanie na bodźce i wynikające z niego zmiany w ekspresji genów. Wydaje się, że genom *Borrelia* koduje zaledwie dwa dwuskładnikowe systemy przekazywania sygnałów Hk1-Rrp1 oraz Hk2-Rrp2 (oprócz systemu CheA-CheY uczestniczącego w chemotaksji), a także dwa alternatywne czynniki transkrypcyjne: RpoS (σ^S) i RpoN (σ^{54}). Białko Rrp2 (ang. *response regulatory protein 2*) oraz RpoN (ang. *RNA polymerase factor N*) aktywują transkrypcję *rpoS*. Z kolei RpoS (ang. *RNA polymerase factor S*) funkcjonuje, jako regulator genów wirulencji uruchamianych w fazie stacjonarnej, tuż przed transferem krętków z kleszcza do gospodarza (m. in. *ospC*, *dbpA/B*, *bbk32*) [87,88]. Ścieżka Hk2-Rrp2 oraz czynniki RpoN i RpoS są niezbędne do przedostania się *B. burgdorferi* z wektora do organizmu kręgowca

oraz do zainicjowania infekcji gospodarza. Ostatnie badania wskazują, że czynnik transkrypcyjny BosR (ang. *Borrelia oxidative stress regulator*, znany również jako Fur) jest również niezbędny do ekspresji *rpoS*, prawdopodobnie poprzez przyłączenie się w jego rejonie promotorowym [89,90]. Co więcej, postuluje się, że w regulację ekspresji *rpoS* zaangażowane są również małe niekodujące RNA - DsrA_{Bb}, represor BadR (ang. *Borrelia host adaptation regulator*), lipoproteina VraA (ang. *virulent strain-associated repetitive antigen A*, zwana również BBI16), chaperon RNA – Hfq oraz wiążące RNA białko CsrA [91–95].

Regulator odpowiedzi Rrp1, który jest jedyną posiadaną przez krętka cyklazą guanylową, produkuje cząsteczkę sygnałową – cykliczny dimeryczny GMP (c-di-GMP), uczestniczącą w ekspresji genów ułatwiających adaptację bakterii do warunków panujących w przewodzie pokarmowym żerującego kleszcza. W badaniach z wykorzystaniem mutantów delecyjnych *B. burgdorferi* wykazano, że ścieżka Hk1-Rrp1 nie jest potrzebna bakterii do infekcji kręgowca, jest natomiast niezbędna do przetrwania w organizmie kleszcza. Wydaje się, że powodem wymierania w jelicie kleszcza mutantów pozbawionych *rrp1* może być zmniejszona ruchliwość komórek, a także niezdolność do wykorzystania cząsteczek glicerolu, chitobiozy oraz N-acetyloglukozaminy, które stanowią dla bakterii alternatywne źródło energii w nieaktywnym kleszczu. Wykazano bowiem, że ekspresja genów pełniących wyżej wymienione funkcje jest zależna od Rrp1 [96–98].

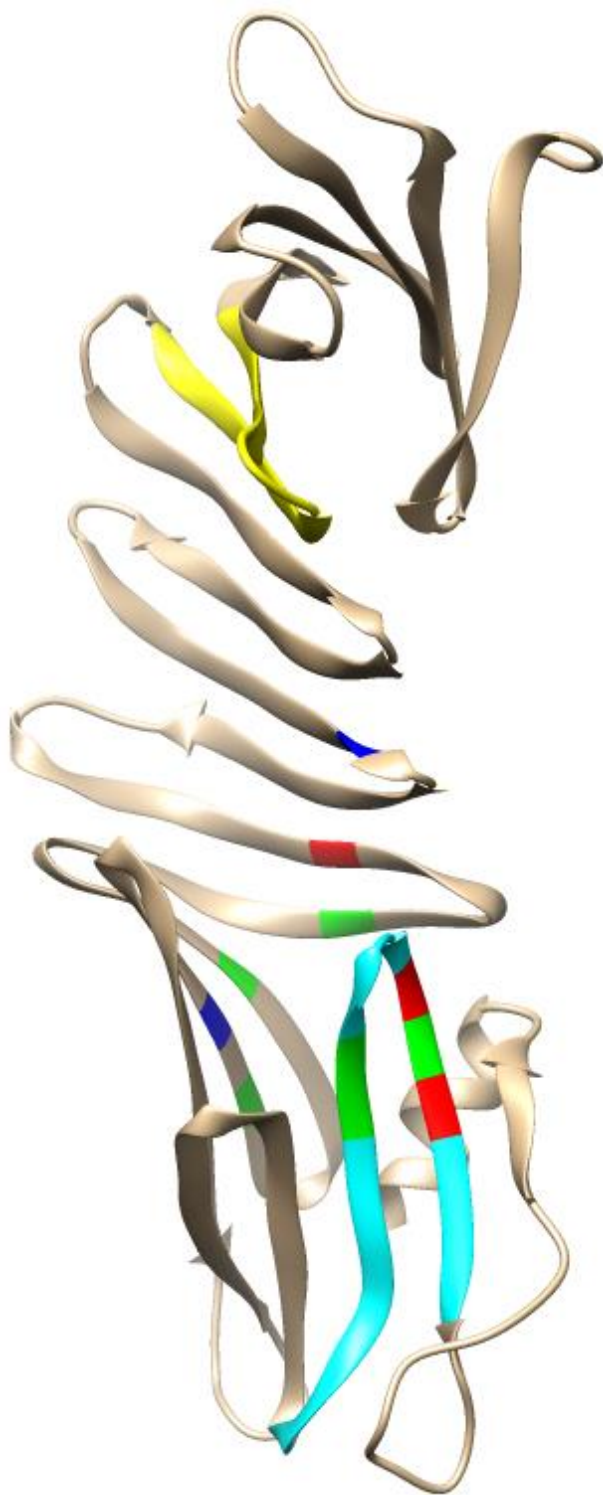
W jelicie ssącego krew kleszcza, na etapie migracji krętków z kleszcza do gospodarza aktywne są obydwie ścieżki Hk1-Rrp1 oraz Hk2-Rrp2, co oznacza, że dochodzi do wymiany sygnałów (ang. *crosstalk*). Wykazano, że białko PlzA, które jest jedynym znanym receptorem dla c-di-GMP, łączy obydwie ścieżki poprzez koordynację odpowiedzi na różne sygnały i moduluje w ten sposób ekspresję genów wirulencji. Wydaje się zatem, że *Borrelia* reguluje ekspresję genów, wykorzystując bardzo efektywnie swój stosunkowo prosty system przekazywania sygnałów [93].

1.3.2. Zasiedlanie kleszcza przez *B. burgdorferi*

W cyklu życiowym *B. burgdorferi* krętki namnażają się w organizmie kompetentnego gospodarza, a następnie przedostają się wraz z krwią do jelita żerującego kleszcza. Bakterie można wykryć w jelicie kleszcza już po 24 godzinach od momentu ugryzienia przez kleszcza [99]. Dotychczas nie poznano sposobu, w jaki krętek unika strawienia w jelicie, a także omija mechanizmy odpornościowe kleszcza. Dowiedziono natomiast, że w miejscu ugryzienia, komórki skóry produkują hormony stresu – adrenalinę i noradrenalinę, które indukują u *B. burgdorferi* produkcję białka powierzchniowego OspA (ang. *outer surface protein A*) [100]. Geny *ospA* oraz *ospB* leżą w jednym operonie, a kodowane przez nie białka stanowią najliczniejszą grupę lipoprotein, występujących na powierzchni zewnętrznej błony komórkowej bakterii. W regulacji ekspresji obu genów uczestniczą alternatywne czynniki transkrypcyjne RpoN, i RpoS oraz aktywna ścieżka Hk1-Rrp1 [101]. Wydaje się, że białka OspA i OspB specyficznie wiążą się z jelitem kleszcza i są niezbędne w jego kolonizacji. Krętki pozbawione białka OspA, nie są w stanie zasiedlić kleszcza i są ostatecznie wydalane z jelita wraz z resztkami niestrawionej krwi [102]. Pokazano, że zarówno przeciwciała anty-OspA, jak i anty-OspB, które wiążą się z bakterią, ale jednocześnie nie prowadzą do jej śmierci, zapobiegają przyłączeniu się bakterii do tkanki jelita [103,104]. Zademonstrowano również, że mutant *B. burgdorferi* pozbawiony operonu *ospAB* jest zdolny do zainfekowania myszy, w takim samym stopniu jak typ dziki, jednakże nie jest on w stanie skolonizować jelita *I. scapularis* i ginie w ciągu 48 godzin, po zakończeniu żerowania przez kleszcza [102]. Inna grupa badaczy stwierdziła natomiast, że chociaż OspA jest istotne dla przeżycia krętków w jelicie kleszcza to jednak zarówno OspA, jak i OspB nie są konieczne dla przetrwania bakterii w kleszczu, podczas jego przeobrażenia z larwy do nimfy [105]. Oprócz funkcji adhezyny bakteryjnej, umożliwiającej przywieranie do komórek nabłonka jelitowego kleszcza, OspA wiąże plazminogen, co ułatwia bakterii penetrowanie tkanek kleszcza i rozprzestrzenianie się w jego organizmie [106,107]. Co więcej, sugeruje się, że OspA chroni bakterię w jelicie kleszcza przed napływającymi wraz z krwią przeciwciałami gospodarza, które

rozpoznają konserwatywne białka krętka, takie jak p66 oraz p13 [105]. Z drugiej strony, wydaje się, że ta ochrona wynika również z wiązania się OspA z jego receptorem, czy też z plazminogenem. Wiązanie się tych dwóch białek na powierzchni borrelii za pośrednictwem OspA tworzy swoisty „płaszcz”, który osłania bakterię przed dostępem przeciwciał [106,108].

Naturalnie występująca forma OspA składa się z 273 reszt aminokwasowych i ulega lipidacji w miejscu N-końcowej cysteiny. Dotychczas uzyskano wyłącznie kryształy białka OspA w kompleksie z mysim przeciwciałem monoklonalnym. Badania krystalograficzne [109,110], a także badania NMR [111–113] oraz SAXS [114] (ang. *small-angle X-ray scattering*) białka OspA wskazują, że cząsteczka ta ma nietypową strukturę, na którą składa się 21 antyrównoległe ułożonych nici tworzących harmonijkę β oraz jedna krótka helisa α ulokowana na końcu karboksylowym (Rycina 1.4.). Centralnie położony, jednowarstwowy arkusz β łączy dwie globularne domeny z aminowego oraz karboksylowego końca białka. Na podstawie struktury OspA stwierdzono, że białko to posiada potencjalną kieszeń wiążącą ligand (LBP, ang. *ligand binding pocket*) w domenie β -beczułki położonej w pobliżu końca karboksylowego. Składa się ona z trzech naładowanych reszt aminokwasowych – Arg-139 z nici β 10, Glu-160 z nici β 12 i Lys-189 z nici β 15, oraz hydrofobowej wyściółki złożonej z pięciu aminokwasów – Leu-167, Leu-178, Leu-187, Phe-237 i Ile-243. Badacze analizujący strukturę OspA przypuszczają, że LBP mogłaby stanowić miejsce wiązania się ligandu białkowego poprzez wyeksponowaną pętlę posiadającą ładunki ujemne oraz hydrofobowy charakter [109].



Rycina 1.4. Struktura krystalograficzna OspA z *B. burgdorferi* (PDB ID: 1OSP) [109].

Na rysunku zaznaczono potencjalną kieszeń wiążącą ligand – LBP, składającą się z trzech naładowanych reszt aminokwasowych – **Arg-139**, **Glu-160** i **Lys-189** oraz z pięciu reszt hydrofobowych (zaznaczono na zielono) – **Leu-167**, **Leu-178**, **Leu-187**, **Phe-237** i **Ile-243**. Oprócz tego wyróżniono fragmenty OspA oddziałujące z ekstraktem z jelita kleszcza: 85-103 (zaznaczono na żółto) oraz 229-247 (zaznaczono na turkusowo). W rejonie 229-247 dodatkowo zakreślono mutacje substytucyjne aminokwasów **Val-236** i **Phe-237** oraz **Thr-242**, **Ile-243** i **Thr-244**, które powodowały znaczące obniżenie wiązania się mutantów OspA z ekstraktem z jelit kleszcza [115].

Przypuszcza się, że znajdujące się w rejonie końca karboksylowego nici β 18- β 20 (reszty aminokwasowe 229-247) zawierają miejsce wiązania się OspA z jego receptorem (Rycina 1.4.) [115]. Pokazano między innymi, że mutacje substytucyjne aminokwasów 236-237 (Val-Phe) oraz 242-244 (Thr-Ile-Thr) spowodowały znaczące obniżenie wiązania się mutantów OspA z ekstraktem z jelit kleszcza (TGE - ang. *tick gut extract*). Może wynikać to z bezpośredniego zaangażowania wyżej wymienionych aminokwasów w wiązanie z receptorem lub ze zmian konformacyjnych LBP [115]. Co ciekawe, reszty aminokwasowe Phe-237 oraz Ile-243 wchodzi w skład LBP i w strukturze przestrzennej OspA znajdują się obok siebie [109,110]. W kolejnym etapie badań wykazano, że oprócz peptydu OspA₂₂₉₋₂₄₇, fragment OspA₈₅₋₁₀₃ również wykazywał wysokie powinowactwo do TGE. Wykazano jednak, że peptyd OspA₂₂₉₋₂₄₇ skuteczniej konkurował o wiązanie z TGE niż OspA₈₅₋₁₀₃. Zademontrowano również, że białka OspA wiążą się ze sobą, co może umożliwiać krętkom wzajemne oddziaływanie i usprawnić kolonizację jelita kleszcza [115]. W doświadczeniu tym OspA pochodzące od *B. burgdorferi* 25015 (OspA₂₅₀₁₅) wiązało się z OspA wywodzącego się ze szczepu N40 (OspA_{N40}). Co więcej, tworzyły się również homokompleksy białek typu OspA₂₅₀₁₅-OspA₂₅₀₁₅ oraz OspA_{N40}-OspA_{N40}. Ponadto, dodatek białka OspA spowodował zwiększenie liczby bakterii *B. burgdorferi* związanych z TGE. Fenomen ten może częściowo wyjaśniać agregację krętków w jelicie kleszcza w badaniach *in vivo* oraz *in vitro* [116–118]. Z drugiej strony, obniżanie przez krętka ekspresji OspA podczas żerowania kleszcza prawdopodobnie zapobiega „zlepianiu się” bakterii ze sobą, co w rezultacie ułatwia im przechodzenie do gruczołów ślinowych roztocza [115].

Najnowsze badania wskazują, że białko OspA wiąże się również z ludzkim receptorem CD40 znajdującym się na powierzchni komórek nabłonkowych naczyń krwionośnych mózgu [119,120]. Wydaje się, że oddziaływanie OspA-CD40 może mieć bezpośredni związek z przedostawaniem się neuroinwazyjnych gatunków *Borrelia* przez barierę krew-mózg. Dowiedziono bowiem, że OspA_{SKT-7.1} pochodząca z infekującego mózg szczepu *B. bavariensis* oddziałuje z CD40, podczas gdy w przypadku białka OspA_{SKT-2} pochodzącego z nie-neuroinwazyjnego szczepu *B. burgdorferi* s.s. nie obserwowano takiego oddziaływania [120]. Wykazano, że fragment OspA,

który wiąże się z CD40 znajduje się pomiędzy aminokwasami Asn-127 i Asp-205, natomiast znajdujące się w tym rejonie reszty Asp-149, Phe-165, Ala-172, Val-186 oraz Leu-192 uczestniczą bezpośrednio w tworzeniu kompleksu OspA-CD40 [119].

Receptorem dla lipoproteiny OspA jest białko TROSPA (ang. *tick receptor for OspA*), znajdujące się w przestrzeniach międzykomórkowych i na mikrokosmkach w jelicie kleszcza [108,121]. TROSPA jest glikoproteiną, zakotwiczoną domeną transmembranową w błonie komórek nabłonkowych. *B. burgdorferi* wiąże się z receptorem TROSPA, co umożliwia jej kolonizację przewodu pokarmowego wektora. Bytujące w jelicie krętki intensywnie produkują białko OspA oraz równocześnie indukują znaczące zwiększenie produkcji TROSPA u kleszczy. Natomiast w trakcie żerowania roztocza, ekspresja TROSPA stopniowo maleje i w tym samym czasie *B. burgdorferi* również obniża syntezę OspA. Obydwie te zmiany najprawdopodobniej przyczyniają się do odczepiania się krętków od jelita kleszcza, co w kolejnych etapach pozwala bakteriom na migrację do kolejnego gospodarza [99,108,122]. Pokazano, że larwy oraz nimfy *I. scapularis* produkują znacznie większe ilości TROSPA, niż dorosłe kleszcze. Fakt ten koreluje ze zmniejszoną zdolnością osobników dorosłych do wiązania w jelicie bakterii *B. burgdorferi*, a także rekombinowanego białka OspA. Może to oznaczać, że niski poziom TROSPA jest wystarczający dla podtrzymania populacji *B. burgdorferi* albo występują inne mechanizmy wiązania się bakterii w jelicie dorosłego kleszcza. Z drugiej strony uważa się, że najważniejsza dla podtrzymania cyklu życiowego *B. burgdorferi* jest kolonizacja małych kompetentnych kręgowców oraz niedojrzałych form kleszczy. Natomiast dorosłe kleszcze, pomimo, że są zasiedlane przez *B. burgdorferi*, odżywiają się krwią większych, zazwyczaj niekompetentnych ssaków i uczestniczą w cyklu życiowym bakterii w zdecydowanie mniejszym stopniu niż larwy oraz nimfy [123,124].

Dowodzono, że przeciwciała anti-TROSPA znacząco obniżają liczbę krętków przylegających do jelita larwy oraz nimfy *I. scapularis*. W rezultacie zmniejszona zostaje ilość bakterii przekazana gospodarzowi podczas kolejnego żerowania kleszcza. Podobne wyniki uzyskano poprzez wyciszenie ekspresji TROSPA za pomocą interferencji RNA [108]. Powyżej opisane obserwacje świadczą o istotnej roli receptora TROSPA w kolonizacji kleszcza przez

B. burgdorferi, a następnie w migracji tego patogenu do organizmu nowo zasiedlanego gospodarza. Homologi białka TROSPA, które znaleziono u *I. ricinus* oraz *I. persulcatus* wykazują wysoki stopień identyczności w stosunku do TROSPA z *I. scapularis*, wynoszący odpowiednio 86,7% oraz 88,2% [121,125]. Ponadto, u *Rhipicephalus annulatus* zidentyfikowano ortolog TROSPA, który ulega podwyższonej ekspresji u osobników zakażonych patogennym pierwotniakiem *Babesia bigemina* i wykazuje 78% identyczności na poziomie aminokwasowym w stosunku do TROSPA z *I. ricinus*, *I. scapularis* oraz *I. persulcatus* [126]. Zaobserwowano, że wyciszenie ekspresji TROSPA powoduje znaczącą redukcję zakażenia *B. bigemina* u dwóch gatunków kleszczy - *R. annulatus* i *R. microplus*. Biorąc pod uwagę te wyniki oraz fakt, iż *B. burgdorferi* wiąże się z receptorem TROSPA w celu kolonizacji przewodu pokarmowego kleszczy z rodzaju *Ixodes*, wydaje się, że *Babesia* może wykorzystywać ortolog TROSPA do infekcji kleszczy z rodzaju *Rhipicephalus* [127].

Podczas transferu bakterii z zainfekowanego gospodarza do żerującego kleszcza u *B. burgdorferi* następuje również wzmożona ekspresja genu *bb0365* kodującego lipoproteinę La7. Mutanty pozbawione genu *bb0365* mają znacząco obniżoną przeżywalność w organizmie kleszcza [128]. Inne białka, które są niezbędne dla krętka do przetrwania w jelicie kleszcza to BB0733, zwane również PlzA oraz BB0323. PlzA to jedyne znane u *Borrelia* białko, które posiada domenę PilZ wiążącą cząsteczkę sygnałową – c-di-GMP. Obydwa mutanty, zarówno z wyłączonym genem *plzA*, jak i pozbawione genu *bb0323* miały ograniczoną zdolność do infekowania zarówno kleszcza, jak i gospodarza. Z tym, że w przypadku delekcji *plzA* przyczyną była najprawdopodobniej zmniejszona ruchliwość komórki, natomiast brak genu *bb0323* spowodował, że krętki zlepiły się ze sobą i wykazywały brak integralności zewnętrznej błony komórkowej [129,130].

Po spożyciu krwi larwa kleszcza odczepia się od gospodarza i wkrótce potem ulega przeobrażeniu do kolejnej formy rozwojowej – nimfy. Jest to proces długotrwały, podczas którego następuje wyczerpywanie substancji odżywczych w jelicie roztocza [131]. To sprawia, że krętek musi przestawić się na alternatywne źródła energii. Ponieważ kleszcz przygotowujący się do okresu zimowania produkuje zwiększone ilości glicerolu, *Borrelia* uruchamia operon

glp, którego produkty umożliwiają jej pobranie i wykorzystanie cząsteczek tego alkoholu [132]. Co więcej, jako źródło energii krętka wykorzystują N-acetyloglukozaminę oraz chitobiozę, czyli substancje, z których zbudowana jest tzw. błona perytroficzna otaczająca krew, znajdującą się w treści jelitowej roztocza [133]. W warunkach niedoboru składników pokarmowych krętka zatrzymuje wzrost oraz podziały komórkowe i przestawia metabolizm na syntezę niezbędnych dla przetrwania aminokwasów. Kolejne produkowane przez krętka białka, które są niezbędne do jego przetrwania w warunkach głodu to lipoproteina BptA (ang. *Borrelia persistence in tick protein A*) oraz białko BB0690, które jest ortologiem białka Dps (ang. *DNA-binding protein from starved bacteria*), chroniącego DNA *E. coli* przed uszkodzeniami oksydacyjnymi [134,135].

Rozpoczęcie żerowania przez nimfę oraz napływ krwi do jelita roztocza prowadzi do zmiany profilu ekspresji genów krętka. Dochodzi do stopniowego wyciszania genów potrzebnych bakterii do przetrwania w organizmie wektora, podczas gdy geny niezbędne do infekcji kolejnego gospodarza podlegają wzmożonej transkrypcji [136]. W wyniku ich ekspresji powstają m. in. białko powierzchniowe p66 pełniące jednocześnie funkcję poryny i adhezyny [137,138], oraz lipoproteiny CRASP (ang. *complement regulator-acquiring surface proteins*), które chronią bakterię przed działaniem układu dopełniacza kręgowców poprzez wiązanie się z regulującym dopełniacz czynnikiem H oraz FHL-1 (ang. *factor H-like protein 1*) [139,140]. Inne białka, produkowane przez krętka wyłącznie w wektorze i niezbędne do infekcji gospodarza, stanowią antygeny zewnątrzkomórkowe BBA52 oraz BBA64 [141,142]. Równocześnie *Borrelia* namnaża się w jelicie kleszcza w bardzo szybkim tempie i tworzy skupiska przylegających do siebie krętków, które starają się przebić przez warstwę komórek nabłonkowych i dostać się do hemocelu [143]. Dowiedziono, że bakteria wykorzystuje w tym celu lipoproteinę powierzchniową BBE31, która oddziałuje z białkiem TRE31 produkowanym przez komórki nabłonka, co umożliwia penetrację ściany jelita [144]. Co więcej, *Borrelia* ułatwia sobie ten proces poprzez związanie występującego w osoczu krwi gospodarza plazminogenu, który po aktywacji do plazminy umożliwia nadtrawienie błony podstawnej tkanki jelita [145]. W wiązaniu plazminogenu uczestniczy m. in. BB0337, które jest białkiem występującym na powierzchni bakterii [146].

1.3.3. Udział białek ślinowych kleszcza w transferze *B. burgdorferi* do organizmu gospodarza

W ślinie kleszcza znajdują się substancje, które *B. burgdorferi* wykorzystuje w celu przeżycia w organizmie gospodarza. Należą do nich przede wszystkim białka chroniące bakterię przed przeciwciałami, wymiatające wolne rodniki tlenowe produkowane przez neutrofile, czy też tłumiące działanie dopełniacza (część z nich opisano w Rozdział 1.2.2.).

Po przedostaniu się z jelita kleszcza do hemocelu, krętki wędrują do gruczołów ślinowych, gdzie „opłaszczają się” białkiem Salp15 (ang. *salivary protein 15 kDa*), a następnie wraz ze śliną wektora zostają wstrzyknięte do krwi gospodarza [143,147]. Oddziaływanie z białkiem Salp15 jest możliwe dzięki zewnątrzkomórkowej lipoproteinie OspC, która jest niezbędna dla bakterii na początkowych etapach infekcji gospodarza [148–150]. Wydaje się, że OspC, oprócz wiązania się z Salp15, podobnie jak OspA, łączy się z plazminogenem, co pomaga bakterii przedostawać się przez tkanki atakowanego gospodarza [151–153]. Gen *ospC* znajduje się na kolistym plazmidzie wielkości 27 kpb i koduje lipoproteinę o wielkości 22-23 kDa [154]. Ekspresja *ospC* jest regulowana przez czynniki transkrypcyjne Rrp2, RpoN i RpoS [155,156]. W 2001 roku dwa niezależne zespoły badawcze rozwiązały strukturę białka OspC pochodzącego od *Borrelia burgdorferi* s.s. [157,158]. Pomimo wysokiej zmienności OspC na poziomie aminokwasowym, białka pochodzące od różnych szczepów oraz gatunków *Borrelia* wykazują wysokie podobieństwo strukturalne. Monomery OspC zbudowane są z pięciu α -helis i dwóch krótkich β -kartek. Aktywna biologicznie forma białka OspC występuje w postaci homodimeru, który posiada przypuszczalnie dwie domeny wiążące ligand (LBD, ang. *ligand-binding domain*). Domena LBD1 tworzona jest przez helisy α 1 i 1' należące do oddziałujących monomerów, natomiast LBD2 znajduje się na „koronie” dimeru OspC. Domena LBD1 jest wysoce konserwatywna, w przeciwieństwie do zmiennej sekwencyjnie LBD2 [159]. Wykazano, że pojedyncza substytucja kwasu glutaminowego w pozycji 61 na glutaminę (w obrębie domeny LBD1), powoduje znaczną utratę infekcyjności bakterii, pomimo zachowania zdolności wiązania plazminogenu (nie testowano oddziaływania z Salp15). Autorzy tych

badania sugerują, że przyczyną tego zjawiska może być dysfunkcja OspC na początkowym etapie infekcji. Może ona polegać na niezdolności wiązania niepoznanego dotąd ligandu [160].

Związanie białka ślinowego kleszcza Salp15 na powierzchni komórki bakteryjnej, pozwala krętkowi utworzyć płaszcz chroniący go przed przeciwciałami krążącymi we krwi gospodarza [147]. Co więcej, Salp15 wykazuje działanie immunosupresyjne, ponieważ blokuje aktywację limfocytów T, poprzez związanie limfocytarnego koreceptora CD4 (ang. *cluster of differentiation 4*) oraz zatrzymuje produkcję interleukiny 2. Oprócz tego, Salp15 wiąże się z receptorem DC-SIGN (ang. *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*) komórek dendrytycznych i hamuje w ten sposób produkcję cytokin prozapalnych. *B. burgdorferi* wzmacnia ekspresję Salp15 u kleszcza, co jest korzystne również dla wektora, ponieważ zapewnia mu efektywniejsze żerowanie [161–163]. Do tej pory, u kleszczy z rodzaju *Ixodes* scharakteryzowano 21 homologów tworzących nadrodzinę białek Salp15, jednakże na podstawie sekwencjonowania transkryptomu gruczołów ślinowych *I. ricinus* wydaje się, że istnieje duża liczba nieopisanych dotychczas przedstawicieli białek typu Salp15 [164–166]. Najlepiej poznane jest Salp15 pochodzące od *I. scapularis* oraz Iric-1 zidentyfikowane u *I. ricinus*. Badania *in vitro* wskazują, że Salp15 z *I. scapularis* oddziałuje nie tylko z OspC pochodzącym z różnych szczepów *B. burgdorferi* s.s. (N40, B31 i 297) ale również z *B. afzelii* oraz *B. garinii* [167]. Pokazano, że OspC tworzy kompleks również z białkiem Iric-1 wyprodukowanym w komórkach owadzych. Iric-1 wiązało się z OspC z *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* oraz *B. afzelii*, jednakże ochronę przed przeciwciałami gospodarza białko to zapewniało jedynie w przypadku *B. burgdorferi* s.s. [168]. Salp15 oraz jego ortologi są syntetyzowane jako około 135 aminokwasowe prekursorzy, zawierające prawdopodobnie sekwencję sygnałną o długości około 20 aminokwasów na końcu aminowym. Białka te są bogate w cysteiny oraz podlegają glikozylacji [168]. W najnowszych badaniach zademonstrowano, że odcinek pomiędzy resztami aminokwasowymi 48-67 w białkach Salp15 oraz Iric-1 uczestniczy w wiązaniu z białkiem OspC [169]. Niestety jak dotąd trzeciorzędowa struktura Salp15 nie została poznana. Określenie jej dostarczyłoby informacji zarówno o interakcjach zachodzących pomiędzy Salp15-OspC jak i mechanizmach umożliwiających blokowanie

produkcji interleukiny 2 przez to białko [162]. Oprócz tego, poznanie struktury Salp15 pozwoli wyjaśnić mechanizm oddziaływania pomiędzy tym białkiem a glikoproteiną gp120, która pełni kluczową rolę w zakażeniu limfocytów T CD4+ przez wirusa HIV. Odkryto bowiem, że Salp15 poprzez bezpośrednie wiązanie z receptorem gp120, częściowo zapobiega oddziaływaniu białek gp120-CD4 [170].

W miejscu ugryzienia przez kleszcza leukocyty produkują duże ilości wolnych rodników, które mają negatywny wpływ na przeżywalność *B. burgdorferi*. Wykazano, że związki te są wymiatane przez występujący w ślinie roztocza przeciwutleniacz Salp25D. Wyciszenie *salp25D* w gruczołach ślinowych *I. scapularis* spowodowało znaczne obniżenie liczby krętków nabytych przez kleszcza żywiącego się krwią zainfekowanej myszy [171,172]. Oprócz Salp25D, w ślinie *I. scapularis* odkryto białka ISL 929 oraz ISL 1373, które ograniczają zdolność do tworzenia wolnych rodników przez neutrofile [173]. Eliminacja rodników tlenowych w miejscu ugryzienia, z pewnością wpływa korzystnie na transmisję *B. burgdorferi*, jak i innych patogenów.

Udowodniono, że występujące w ślinie *I. scapularis* inhibitory proteaz mają działanie immunosupresyjne i wspomagają ssanie krwi przez kleszcza. Dodatkowo ich obecność jest korzystna dla krętka. Ostatnio scharakteryzowano cystatynę (*sialostatin L2*), która znacząco zwiększa przeżywalność *B. burgdorferi* w skórze zainfekowanej myszy poprzez zahamowanie proteaz zaangażowanych w odpowiedź układu immunologicznego gospodarza [174].

Innymi związkami zwiększającymi przeżywalność krętków boreliozy we krwi gospodarza oraz wspomagającymi transfer bakterii pomiędzy wektorem i gospodarzem są produkowane przez kleszcza białka IXAC, które blokują układ dopełniacza. Ich działanie polega przede wszystkim na destabilizacji konwertazy C3 lub C5, białek kluczowych dla działania dopełniacza. Do rodziny tej należą również białka ISAC i Salp20 z *I. scapularis*, czy też IRAC1 oraz IRAC2 z *I. ricinus* [54,55,57].

Oprócz tego, kleszcze produkują białko TSLPI, które blokuje ścieżkę lektynową układu dopełniacza, czyli etap wcześniejszy niż utworzenie konwertaz C3/C5. Białko to zapobiega wiązaniu się MBL (ang. *mannose-binding lectin*) do jego receptorów obecnych u *B. burgdorferi*, co zatrzymuje aktywację dopełniacza na powierzchni komórki bakteryjnej. Dowiedziono, że

TSLPI znacząco zwiększa przeżywalność krętków w organizmie gospodarza, a ekspresja jego genu u zainfekowanego kleszcza jest dodatkowo indukowana przez *B. burgdorferi* [58].

1.4. Strategie walki z odkleszczową infekcją wywołaną przez *B. burgdorferi*

Borelioza jest przewlekłą, wielofazową chorobą układową, charakteryzującą się występowaniem objawów skórnych, stawowych, kardiologicznych i neurologicznych. Ich różnorodność oraz podobieństwo do wielu innych schorzeń znacznie utrudnia rozpoznanie [175].

Powszechnie stosowane leczenie boreliozy za pomocą antybiotyków nie zawsze jest skuteczne. Inne środki zapobiegawcze w postaci pestycydów przeciwko kleszczom, czy też stosowanie odzieży ochronnej, nie przynoszą oczekiwanych rezultatów [176]. Dlatego też, prowadzone obecnie badania związane są głównie z prewencją choroby z Lyme, poprzez opracowanie skutecznej szczepionki. Pomimo wieloletnich wysiłków, nie ma aktualnie na rynku szczepionki dla ludzi chroniącej przed zakażeniem *B. burgdorferi*. Dostępne są między innymi szczepionki dla psów oparte o białko bakteryjne OspA [177]. Szczepionka przeznaczona dla ludzi, na bazie białka OspA (*LYMERix*), została wycofana z rynku amerykańskiego po niespełna 4 latach ze względu na możliwość wywołania u zaszczepionych osób niepożądanych efektów ubocznych [178,179].

W oddziaływaniu pomiędzy wektorem i patogenem znaczącą rolę odgrywają białka zewnątrzkomórkowe, dlatego też na nich skupia się uwaga badaczy opracowujących skład szczepionek przeciwko krętkom *Borrelia*. Pod uwagę brane są różne antygeny bakteryjne. Znacząca część z nich zakodowana jest w genetycznie niestabilnym plazmidowym DNA. Problemem w zastosowaniu białek powierzchniowych w szczepionkach jest ich gatunkowo zależna zmienność, co oznacza, że w Europie preparaty opracowane na bazie pojedynczego białka mogą być nieskuteczne [176].

Oprócz antygenów pochodzących od *B. burgdorferi*, istnieje możliwość wykorzystania antygenów pochodzących od kleszcza. Białka te są bardziej

zakonserwowane niż powierzchniowe białka borrelii. Istnieją przesłanki wskazujące, że immunoglobuliny wytworzone przeciwko ważnym dla krętków białkom roztocza, mogą powstrzymać kolonizację wektora przez bakterie i/lub ograniczyć ich przekazywanie z kleszcza do gospodarza. Ponadto, jeśli tak skomponowana szczepionka zakłóci funkcje życiowe roztocza, istnieje szansa odrzucenia kleszcza (ang. *tick rejection*) i w rezultacie ograniczenia „przy okazji” transferu innych drobnoustrojów (np. bakterii wywołujących zoonozy, wirusów, czy pierwotniaków) do organizmu gospodarza [176,180]. Jednym z przykładów skutecznego zastosowania takiej szczepionki, jest zmniejszenie liczby przekazywanych patogenów z rodzaju *Anaplasma* oraz *Babesia* przez zwierzęta immunizowane białkiem kleszcza 4D8 (ang. *subolesin*) [181]. 4D8 bierze udział w regulacji ekspresji genów oraz procesów rozwojowych kleszcza [182]. Okazało się, że kleszcze *I. scapularis* żerujące na zwierzętach immunizowanych białkiem 4D8, składały mniejszą ilość jaj, gorzej przybierały na wadze, a także wykazywały zwiększoną śmiertelność [183,184].

Kolejnym przykładem może być pochodzące od *I. scapularis* białko Salp15. Zastosowanie go w szczepionce zapewniało myszom znaczącą ochronę przed zakażeniem *B. burgdorferi* [167]. Podobny efekt uzyskano przy immunizacji tych zwierząt za pomocą białka tHRF (ang. *tick histamine release factor*) [48]. Obiecujące wyniki otrzymano również poprzez zablokowanie receptora TROSPA za pomocą przeciwciał pobranych wraz z krwią przez kleszcze żerujące na zainfekowanych myszach, które były immunizowane białkiem TROSPA. Okazało się, że znacząco zredukowano w ten sposób liczbę krętków zasiedlających jelito zarówno larwy, jak i nimfy *I. scapularis*. Co więcej, w rezultacie powyższego zabiegu nastąpiła 75% redukcja ilości bakterii przekazanej przez kleszcze do organizmu niezakażonych myszy [108]. W innych badaniach dowiedziono, że szczepienie bydła ortologiem białka TROSPA (pochodzącym z *R. microplus*), spowodowało obniżenie ilości *B. bigemina* zasiedlających kleszcze *R. microplus*, które żywiły się krwią immunizowanych zwierząt [127]. Ponadto zaobserwowano, że u kleszczy *R. microplus* żywiących się krwią zawierającą przeciwciała anty-TROSPA dochodziło do znacznego obniżenia wagi po ukończeniu żerowania, w stosunku do kontroli [185].

Przykładem skomercjalizowanej już szczepionki, ograniczającej żerowanie kleszcza oraz transfer patogenów, może być preparat oparty o glikoproteinę Bm86. Białko to występuje na powierzchni komórek nabłonka jelitowego kleszcza *R. microplus* [186]. Wytworzone po szczepieniu przeciwciała anty-Bm86, przedostają się do jelita kleszcza rozpoczynającego ssanie krwi i wiążą z komórkami epitelialnymi. Proces ten powoduje lizę komórek, które prawdopodobnie biorą udział w endocytozie. W rezultacie dochodzi do zahamowania żerowania przez roztocze, a także ograniczenia transferu patogenów. Antygen ten jest dostępny w formie szczepionek dla bydła pod nazwami handlowymi *Gavac* oraz *TickGARD* [187–189].

Skonstruowano także szczepionkę zawierającą białko 64P, które jest tzw. substancją cementową, wydzielaną przez kleszcza *R. appendiculatus*. Immunizacja świnek morskich, królików, chomików i bydła skróconą, rekombinowaną wersją białka 64P (64TRP) skutkowałą reakcją zapalną w miejscu ugryzienia, co w rezultacie prowadziło do podwyższonej śmiertelności kleszczy. Przeciwciała anty-64TRP najprawdopodobniej uszkadzały jelita żerujących roztoczy [190].

Pomimo rosnącej wiedzy na temat kleszczy i przenoszonych przez nie krętków *Borrelia*, nadal mało wiadomo na temat mechanizmów stanowiących fundament opisanych wcześniej procesów. Wydaje się, że dopiero lepsze zrozumienie molekularnych uwarunkowań oddziaływań pomiędzy białkami kleszczy oraz bakterii, umożliwi stworzenie strategii, a także narzędzi pozwalających ingerować w cykl życiowy tych patogenów [191]. Co więcej, poznanie molekularnych podstaw procesu wyciszania układu odpornościowego przez kleszcza może przynieść nowe rozwiązania służące zwalczaniu infekcji *B. burgdorferi*, a także umożliwić opracowanie nowej generacji związków o właściwościach przeciwzapalnych i immunomodulujących [163].

2. Cel pracy

Jednym z długofalowych celów badań realizowanych w Zakładzie Biologii Molekularnej i Systemowej ICHB PAN jest poznanie mechanizmów molekularnych kształtujących oddziaływanie pomiędzy kleszczem a patogennymi bakteriami. Nasze wstępne analizy wykazały, że doskonałym modelem umożliwiającym prowadzenie tego typu prac są dwu- lub wieloskładnikowe kompleksy białkowe tworzące się podczas zasiedlania różnych organów kleszcza *I. ricinus* przez patogenną bakterię *B. burgdorferi*. Biorąc pod uwagę powyższe względy oraz zaprezentowane w niniejszej rozprawie wyniki pilotażowych eksperymentów zdecydowano, iż podstawowym celem podjętych badań będzie strukturalna i funkcjonalna charakterystyka kompleksu warunkującego kolonizację jelita kleszcza przez bakterię. Kompleks ten tworzy kodowane przez kleszcza białko TROSPA (ang. *tick receptor for outer surface protein A*) oraz ulokowane na powierzchni bakterii białko OspA (ang. *outer surface protein A*).

Uznano, że osiągnięcie tak zarysowanego celu wymagać będzie realizacji następujących zadań szczegółowych:

1. Wybór modelowego układu będącego podstawowym obiektem badań.
2. Opracowanie metod produkcji białka TROSPA z *I. ricinus* oraz OspA pochodzącego z trzech gatunków *Borrelia*: *B. garinii*, *B. burgdorferi* s.s. i *B. afzelii*.
3. Badanie zdolności białka TROSPA do wiązania lipoproteiny OspA.
4. Identyfikacja domen/motywów strukturalnych TROSPA zaangażowanych w wiązanie OspA.
5. Analiza porównawcza aktywności białka TROSPA wyprodukowanego w bakteriach i w komórkach eukariotycznych.
6. Analiza struktury białka TROSPA dostępnymi metodami fizykochemicznymi oraz bioinformatycznymi.
7. Analiza struktury kompleksu tworzony przez TROSPA i OspA.
8. Stworzenie modelu opisującego strukturę kompleksu TROSPA–OspA.

3. Materiały i metody

3.1. Materiały

3.1.1. Kleszcze *Ixodes ricinus*

Kleszcze *I. ricinus* otrzymano dzięki uprzejmości dr hab. Beaty Wodeckiej z Katedry Genetyki na Wydziale Biologii Uniwersytetu Szczecińskiego.

3.1.2. Szczepy bakteryjne

Tabela 3.1. Stosowane szczepy bakteryjne.

Nazwa szczepu	Przeznaczenie	Wybrane cechy
One Shot TOP10 <i>E. coli</i> (Life Technologies)	Klonowanie cDNA oraz amplifikacja plazmidów	-
One Shot BL21-Star (DE3) <i>E. coli</i> (Life Technologies)	Produkcja białka	-Brak proteaz Lon i OmpT
SHuffle T7 Express lysY <i>E. coli</i> (NEB)	Produkcja białka	-Brak proteaz Lon i OmpT -Promowanie powstawania mostków disiarczkowych w cytoplazmie -Produkcja izomerazy disiarczkowej DsbC, która jest jednocześnie białkiem opiekuńczym asystującym w zwijaniu białek i naprawie niewłaściwie utworzonych mostków disiarczkowych.
DH10Bac <i>E. coli</i> (Life Technologies)	Konstrukcja bakmidu zawierającego pożądany gen	-Obecność wektora bakulowirusowego (bakmidu), który podlega rekombinacji z plazmidem donorowym (pFastBac), umożliwiając utworzenie bakmidu do ekspresji pożadanego genu w komórkach owadzych

3.1.3. Linie komórkowe

•Linia komórek owadzych Sf21 (Life Technologies)

- wyprowadzona z komórek jajnika poczwarki *Spodoptera frugiperda*
- stosowana do produkcji oraz namnażania rekombinowanego wektora bakulowirusowego w hodowli monowarstwowej

•Linia komórek owadzych High Five (Life Technologies)

- wyprowadzona z komórek jajnika *Trichoplusia ni*
- transfekowana wektorem bakulowirusowym, a następnie stosowana do produkcji rekombinowanych białek w hodowli zawieszinowej
- umożliwia uzyskanie od 5 do 10 razy wyższego poziomu ekspresji genu kodującego rekombinowane białko niż komórki Sf21

3.1.4. Plazmidy

Plazmid pET200-TROSPA zawierający sekwencję kodującą białka TROSPA pochodzącego z *I. ricinus* (GenBank: AGV09137.1) otrzymano dzięki uprzejmości dr Anny Urbanowicz [192].

Produkcję plazmidu pMK-Salp15 zawierającego sekwencję kodującą Salp15 Iric-1 z *I. ricinus* (GenBank: EU128526.1) zlecono firmie GeneArt.

Seqwencje kodujące białka OspA oraz OspC pochodzące z *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii* i *B. garinii* otrzymano dzięki uprzejmości dr hab. Beaty Wodeckiej z Katedry Genetyki na Wydziale Biologii Uniwersytetu Szczecińskiego.

Wektory ekspresyjne pET200 umożliwiające ekspresję białek OspA i OspC (z *B. burgdorferi s.s.*, *B. afzelii* i *B. garinii*), a także wektor ekspresyjny pMCSG48 umożliwiający ekspresję białka OspA_Δ6 zostały utworzone w Zakładzie Biologii Molekularnej i Systemowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu przez dr Annę Urbanowicz.

Wektory pMCSG7 oraz pMCSG48 otrzymano z Midwest Center for Structural Genomics (Argonne National Laboratory, Lemont, USA).

Tabela 3.2. Stosowane plazmidy.

Nazwa	Oporność na antybiotyki	Wybrane cechy
pCR-XL-TOPO (Life Technologies)	Kanamycyna	- szybka ligacja dzięki topoiomerazie I związanej kowalencyjnie z końcem 3' wektora
pMK (GeneArt)	Kanamycyna	- oparty o wektory z serii pUC
pET200/D-TOPO (Life Technologies)	Kanamycyna	- szybka ligacja dzięki topoiomerazie I związanej kowalencyjnie z końcem 3' wektora - rekombinowane białko zawiera dodatkowo na końcu aminowym znacznik histydynowy (6xHis) oraz miejsce rozpoznawane przez enterokinazę
pMCSG7 ⁽¹⁾	Ampicylina	- klonowanie niezależne od ligacji - rekombinowane białko zawiera dodatkowo na końcu aminowym znacznik histydynowy (6xHis) oraz miejsce rozpoznawane przez proteazę TEV
pMCSG48 ⁽¹⁾	Ampicylina	- klonowanie niezależne od ligacji - rekombinowane białko zawiera dodatkowo na końcu aminowym znacznik histydynowy (8xHis), białko NusA oraz miejsce rozpoznawane przez proteazę TEV
pFastBac HT A (Life Technologies)	Ampicylina, Gentamycyna	- produkcja w <i>E. coli</i> rekombinowanego wektora bakulowirusowego (bakmidu) do ekspresji pożądanego genu w komórkach owadzych - zawiera sekwencje Tn7L and Tn7R umożliwiające transpozycję pożądanego genu do genomu bakulowirusa - selekcja transformowanych komórek na podstawie testu α -komplementacji
pFastBac HT-CAT	Ampicylina, Gentamycyna	- wektor kontrolny w systemie Bac-to-Bac umożliwiający produkcję acetylotransferazy chloramfenikolu w komórkach owadzych

(1) – otrzymano z Midwest Center for Structural Genomics, Argonne National Laboratory, USA

3.1.5. Startery

Tabela 3.3. Stosowane startery.

Nazwa	Sekwencja zapisana w orientacji 5'-3'
Iric1_F	ATGGAATCTTTCGTCGCAATGAAGG
Iric1_R	CTAACATCCAGGAATGTGCCCAAC
S15_TOPO_F	CACC ATGGAATCTTTCGTCGC
S15_68_R	CTAGACGTTATGTAAATATATTTTATTTAAAAGTAAG

S15_70_R	CTAACATCCGGGAATGTGCGG
S15_72_R	CTAGGAAAATGTTCTTTATTGCCTG
TRO_TOPO_F	CACC ATGGCGGCTATGGAGGC
TRO_TOPO_R	GCGCCGCTGGAAGTTGA
TR_N24_p7	TACTTCCAATCCAATGCC GACACGGCGTCGCTGTCTG
TR_N37_p7	TACTTCCAATCCAATGCC ACGGAGGCTACGGTGGCTATG
TR_N44_p7	TACTTCCAATCCAATGCC GACACGGCGTCGCTGTCTG
TR_N50_p7	TACTTCCAATCCAATGCC CTGCCGCTCCAGTTGTCTG
TRO_p7_R	TTATCCACTTCCAATGTTA TCAACTTCCAGCGGCGCTCTG
TR_C7_p7	TTATCCACTTCCAATGTTA TCAGGCCCAAGCGCATAAATAAGAAG
TR_V1_F	GGAGGTTACG AACACGCAGAA ATTCGGCGGCT
TR_V1_R	AGCCGCCGAAT TCTGCGTGTTCG TAACTCC
TR_V2_F	GCCACGGCTACG CAGGCTTCGGTTACAGCGA ATATGGCGGACAC
TR_V2_R	GTGTCCGCCATAT TCGCCGTAACCGAAGCCTG CGTAGCCGTGGC
TR_V3_F	GCGGATATGGCG AACACGGCTACGAA ACTAAGCAA
TR_V3_R	TTGCTTAGTG TCGTAGCCGTGTCG CCATATCCGC
S152_p7_F	TACTTCCAATCCAATGCC ATGGAAAGCTTTGTTGCCATGAAAGTTG TTT
S152_p7_R	TTATCCACTTCCAATGTTA TTAACAACCCGGAATATGACCAACGCAT
S152_R	TTAACAACCCGGAATATGACCAACGCAT
TR_N50_BAK1_F	AGACGATGACGACAAG CTGCCGCTCCAGTTGTCTG
TR_N50_BAK2_F	ATGAATTCGACTACAAAGACGATGACGACAAG CTGCC
TR_N50_BAK_R	TACTGCAG TCAACTTCCAGCGGCGCTC
pMCSG_F	ATTGGAAGTGATAACGGATCCGAATT
pMCSG7_R	ATTGGATTGGAAGTACAGGTTCTCGGT
pMCSG48_R	ATTGGATTGGAAGTACAGGTTCTCGTT
BAC-SEQ1	ATTCATACCGTCCCACCATC
BAC-SEQ2	GGCTGATTATGATCCTCTAGTAC
pUC/M13_F	CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG
pUC/M13_R	AGCGGATAACAATTTACACAGG
T7FWD	TAATACGACTCACTATAGGG
T7REV	TAGTTATTGCTCAGCGGTGG

Kolorami oznaczono: **zielonym** – sekwencje umożliwiające niezależne od ligacji klonowanie do wektorów ekspresyjnych z serii pMCSG; **niebieskim** – sekwencje rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne; **pomarańczowym** – sekwencje umożliwiające klonowanie do wektora pET200/D-TOPO; **czernym** – nukleotydy zmienione w celu uzyskania mutantów substytucyjnych białka TROSPA. Sekwencję kodującą znacznik FLAG-tag podkreślono.

3.1.6. Zestawy odczynników

- QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) – do oczyszczania DNA
- QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) – do oczyszczania DNA z żelu agarozowego
- DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) – do oczyszczania DNA genomowego kleszcza
- Plasmid Midi Kit (Qiagen) – do izolacji plazmidów bakteryjnych w średniej skali
- AP Detection Reagent Kit (Merck Millipore) – do detekcji kolometrycznej alkalicznej fosfatazy (w metodzie *western blot*)
- Alkaline Phosphatase Substrate Kit (Bio-Rad) – do detekcji kolometrycznej alkalicznej fosfatazy (w metodzie ELISA)
- BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies) – do sekwencjonowania DNA
- Champion pET Directional TOPO Expression Kit (Life Technologies) – do klonowania cDNA do wektorów z serii pET200/D-TOPO umożliwiających produkcję białka w systemie bakteryjnym (*E. coli*)
- Bac-to-Bac Baculovirus Expression System (Life Technologies) – do produkcji genetycznie modyfikowanych bakulowirusów pozwalających na ekspresję pożądanego genu w komórkach owadzych
- Zestawy buforów do krystalizacji białka:
 - JCSG-plus HT-96 (Molecular Dimensions)
 - Morpheus HT-96 (Molecular Dimensions)
 - PACT premier HT-96 (Molecular Dimensions)
 - MIDAS HT-96 (Molecular Dimensions)
 - PEG / Ion HT (Hampton Research)
 - Index HT (Hampton Research)

3.1.7. Przeciwciała

Tabela 3.4. Stosowane przeciwciała i surowice.

Nazwa przeciwciała	Producent	Stężenie początkowe	Stosowane rozcieńczenia
I-rzędowe królicze poliklonalne przeciwko białku OspA (ab69219)	Abcam	4 mg/ml	1:10000 (1),(2)
I-rzędowe kozie poliklonalne przeciwko białku OspC (ab31663)	Abcam	1 mg/ml	1:2500 (1),(2)
surowica królicza przeciwko białku TROSPA	Eurogentec	-	1:1000 (1)
I-rzędowe mysie monoklonalne przeciwko znacznikowi FLAG-tag (DYKDDDDK) (F1804)	Sigma	1 mg/ml	1:1000 (1)
II-rzędowe kozie poliklonalne przeciwko króliczym IgG, sprzężone z alkaliczną fosfatazą (ab6722-1)	Abcam	1 mg/ml	1:50000 (1),(2)
II-rzędowe kozie poliklonalne przeciwko mysim IgG, sprzężone z alkaliczną fosfatazą (ab97020)	Abcam	1 mg/ml	1:50000 (1)
II-rzędowe królicze poliklonalne przeciwko kozim IgG, sprzężone z alkaliczną fosfatazą (ab6742-1)	Abcam	1 mg/ml	1:50000 (1),(2)

(1)- western blot,(2)- ELISA

3.1.8. Roztwory i bufony

•Roztwory do izolacji plazmidów/bakmidów w małej skali

Roztwór ALM1

50 mM dekstroza
10 mM EDTA
25 mM Tris
Dopełniono wodą do 500 ml

Roztwór ALM1b

50 mM Tris
10 mM EDTA
Dopełniono wodą do 500 ml
Przy pomocy HCl ustawiano pH 8
Dodawano RNazy A ($C_k = 100 \mu\text{g/ml}$)

Roztwór ALM2 (sporządzany bezpośrednio przed użyciem)

1% SDS
0,2 M NaOH
Dopełniono wodą do 10 ml

•Bufor do rozdzielania elektroforetycznego kwasów nukleinowych w warunkach natywnych

Bufor 10x TBE

0,89 M Tris
0,89 M kwas borowy
0,02 M EDTA

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

Bufor 10x TGS

0,25 M Tris
1,92 M glicyna
1% SDS
Dopełniono wodą do 1000 ml

•Bufory stosowane w metodzie *western blot*

Bufor do transferu białek rozdzielonych w żelach poliakrylamidowych na membranę PVDF

20 ml buforu 10x TGS
40 ml metanolu
Dopełniono wodą do 200 ml

Bufor TBST

50 mM Tris-HCl
138 mM NaCl
2,7 mM KCl
0,05% Tween20
pH 8

Bufor blokujący - TBSTB

Bufor TBST z dodatkiem 1 % BSA

•**Bufory stosowane w testach immunoenzymatycznych ELISA**

1x PBST pH 7,4

10 mM Na₂HPO₄
1,8 mM KH₂PO₄
137 mM NaCl
2,7 mM KCl
0,05% Tween20

Bufor blokujący – PBSTB3

1x PBST z dodatkiem 3% BSA

Bufor blokujący – PBSTB1

1x PBST z dodatkiem 1% BSA

•**Bufory obciążające**

Bufor 4x SB do rozdzielania elektroforetycznego białek w warunkach denaturujących

250 mM Tris-HCl pH 6,8
20% β-merkaptoetanol
8% SDS
0,15% błękit bromofenolowy
40% glicerol
Dopełniono wodą do 10 ml

Bufor 6x LD do rozdzielania elektroforetycznego kwasów nukleinowych w warunkach natywnych

10 mM Tris-HCl, pH 7,5
50 mM EDTA
10% Ficoll400
0,25% błękit bromofenolowy
0,25% cyjanian ksyenu
Dopełniono wodą do 10 ml

•**Bufor do pomiarów dichroizmu kołowego - CDB**

10 mM NaH₂PO₄ pH 8
50 mM NaF

•**Bufor do sączenia molekularnego białek w warunkach natywnych – nSEC**

25 mM Tris-HCl, pH 7,9
200 mM NaCl
1 mM TCEP pH 7,9

•**Bufor do sączenia molekularnego białek w warunkach denaturujących – dSEC**

25 mM Tris-HCl, pH 7,9
200 mM NaCl
1 mM TCEP pH 7,9
8 M mocznik

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

Bufor do lizy komórek bakteryjnych *E. coli*

25 mM Tris-HCl, pH 7,9
500 mM NaCl
20 mM imidazol pH 7,9
15 U/ml benzonazy (Merck Millipore)
0,2 mg/ml lizozymu
1x CelLytic B (Sigma)

oraz:

1 mM TCEP pH 7,9 – do oczyszczania mutantów delecyjnych TROSPA, białka Salp15 oraz mutantu delecyjnego OspA_NΔ6

Bufor płuczący

25 mM Tris-HCl, pH 7,9
500 mM NaCl
20 mM imidazol pH 7,9

oraz:

1 mM TCEP pH 7,9 – do oczyszczania mutantów delecyjnych TROSPA, białka Salp15 oraz mutantu delecyjnego OspA_NΔ6

0,05% (v/v) Tween20 – do oczyszczania pełnej długości białka TROSPA, mutantów substytucyjnych TROSPA V1 – V5, lipoprotein OspA i OspC oraz TROSPA_NΔ50 produkowanego w komórkach owadzych

Bufor wymywający

25 mM Tris-HCl, pH 7,9
500 mM NaCl
400 mM imidazol pH 7,9

oraz:

1 mM TCEP pH 7,9 – do oczyszczania mutantów delecyjnych TROSPA, białka Salp15 oraz mutantu delecyjnego OspA_Δ6

0,05% (v/v) Tween20 – do oczyszczania pełnej długości białka TROSPA oraz mutantów substytucyjnych TROSPA V1 – V5, lipoprotein OspA i OspC oraz TROSPA_Δ50 produkowanego w komórkach owadzych

Bufor do lizy komórek owadzych

25 mM Tris-HCl, pH 7,9
500 mM NaCl
10 mM imidazol pH 7,9
1 % (v/v) Triton X-100
1 mM TCEP pH 7,9
15 U/ml benzonazy (Merck Millipore)
Inhibitor proteaz cOmplete ULTRA tablets, EDTA-free (Roche)

3.1.9. Pożywki do hodowli bakterii

•Stała pożywka LB

2 g peptonu
1,25 g ekstraktu drożdżowego
1,25 g NaCl
Dopełniono wodą do 250 ml
Dodawano 3,75 g agaru i sterylizowano w autoklawie
Otrzymaną pożywkę schładzano do temperatury 55°C, dodawano roztwór ampicyliny lub kanamycyny do stężenia końcowego 100 µg/ml, wylewano na sterylne szalki i pozostawiano do zastygnięcia

•Płynna pożywka LB-Lennox

10 g peptonu
5 g ekstraktu drożdżowego
5 g NaCl
Dopełniono wodą do 1000 ml i sterylizowano w autoklawie
Do schłodzonej pożywki dodawano roztwór ampicyliny lub kanamycyny do stężenia końcowego 100 µg/ml

•**Płynna pożywka SOC**

2 g tryptonu
0,5 g ekstraktu drożdżowego
0,2 ml 5M NaCl.
0,25 ml 1M KCl.
1 ml 1M MgCl₂
1 ml 1M MgSO₄
2 ml 1M glukozy
Dopełniono wodą do 100 ml
Sterylizowano przez filtrację - filtr strzykawkowy 0,22 µm Millex GP (Merck Millipore)

3.1.10. Pożywki do hodowli komórek owadzich

Linia komórek Sf21

Pożywka TC-100 (Gibco Life Technologies) zawierająca dodatkowo:

- FBS (Cytogen)
- roztwór gentamycyna-amfoterycyna C_k= 100 µg/ml (Life Technologies)
- roztwór penicillina-streptomycyna C_k= 100 µg/ml (Life Technologies)

Linia komórek High Five

Pożywka Express Five SFM (Life Technologies), zawierająca dodatkowo:

- L-glutaminę C_k= 18 mM (Life Technologies)
- roztwór gentamycyny C_k= 100 µg/ml (Life Technologies)
- Fungizone (amfoterycyna B) C_k= 0,25 µg/ml (Life Technologies)
- roztwór nystatyny C_k= 100 U/ml (Gibco Life Technologies)

3.1.11. Żele

•**Żel agarozowy do rozdziału elektroforetycznego kwasów nukleinowych w warunkach natywnych (1%)**

0,5 g agarozy
50 ml buforu TBE 0,5x
Rozpuszczono przez podgrzanie w kuchenke mikrofalowej, a następnie po schłodzeniu dodawano 1 µl Midori Green (Nippon Genetics)

•Żele poliakrylamidowe do rozdzielania elektroforetycznego białek w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)

Żel zagęszczający 5%

0,5 ml 40% roztworu akrylamidu-bisakrylamidu (stosunek ilościowy 37,5:1)
0,5 ml 1 M Tris-HCl pH 6,8
2,92 ml H₂O
40 µl 10% SDS
40 µl 10% APS
4 µl TEMED

Żel rozdzielający 12%

3 ml 40% roztworu akrylamidu-bisakrylamidu (stosunek ilościowy 37,5:1)
2,5 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8
4,3 ml H₂O
100 µl 10% SDS
100 µl 10% APS
4 µl TEMED

Żel rozdzielający 15%

3,75 ml 40% roztworu akrylamidu-bisakrylamidu (stosunek ilościowy 37,5:1)
2,5 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8
3,55 ml H₂O
100 µl 10% SDS
100 µl 10% APS
4 µl TEMED

3.1.12. Markery masy

•Markery masy kwasów nukleinowych

DirectLoad Wide Range DNA Marker (Sigma)

Perfect Plus TM 1 kb DNA Ladder (EURx)

•Markery masy białek

Broad Range Prestained SDS-PAGE Standards (Bio-Rad)

PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific)

Perfect Color Protein Ladder (EURx)

3.1.13. Złoża/kolumny do chromatografii białek

- **Chromatografia powinowactwa białek do złoża z immobilizowanymi jonami niklu**

Złoże Ni Sepharose High Performance (GE Healthcare)

Kolumna do chromatografii ciekzowej Luer Lock, Non-jacketed, bed volume 49 mL (Sigma)

- **Sączenie molekularne**

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

3.2. Metody

3.2.1. Rozdział elektroforetyczny DNA w warunkach natywnych

Rozdział elektroforetyczny DNA w warunkach natywnych prowadzono w 1% żelu agarozowym (Rozdział 3.1.11), w buforze 0,5x TBE, przy napięciu 120 – 130 V, w obecności markera masy DNA (Rozdział 3.1.12), a następnie analizowano w świetle UV przy użyciu zestawu do dokumentacji żeli GelLogic 200 (Kodak).

3.2.2. Rozdział elektroforetyczny białek w warunkach denaturujących

Do rozdziału elektroforetycznego białek w warunkach denaturujących stosowano aparat Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad). Żele składały się z górnej warstwy zgęszczającej 5% oraz dolnej rozdzielającej 12% lub 15%, w zależności od masy cząsteczkowej analizowanych białek (Rozdział 3.1.11). Przed rozdziałem badane preparaty były mieszane z buforem obciążającym 4x SB (Rozdział 3.1.7) w stosunku 3:1, inkubowane 5 min w temperaturze 95°C, a następnie schładzane na lodzie. Rozdział prowadzono w buforze 1x TGS (Rozdział 3.1.8), przy stałym napięciu 200 V, w obecności markera masy (Rozdział 3.1.12). Rozdzielone w żelu białka wybarwiano w roztworze PageBlue Protein Staining Solution (Thermo Scientific) lub dokonywano immunodetekcji (Rozdział 3.2.3).

3.2.3. Immunodetekcja białek metodą *western blot*

Procedura immunodetekcji białek obejmowała trzy etapy:

a) Transfer rozdzielonych w żelu białek na membranę PVDF

Po rozdziale elektroforetycznym białek w żelu warunkach denaturujących (Rozdział 3.2.2), zarówno żel jak i aktywowana w metanolu membrana PVDF (Thermo Scientific) były inkubowane przez 2 min w buforze 1x TGS (Rozdział 3.1.8) zawierającym 20% (v/v) metanolu. Następnie w aparacie do elektrotransferu metodą półsuchą (Bio-Rad) układano następujące warstwy:

bibułę PROTEAN II (Bio-Rad), aktywowaną membranę PVDF, żel oraz drugą bibułę. Transfer prowadzono przez około 1 godzinę, przy stałym natężeniu odpowiadającym 1 mA na każdy cm^2 pola powierzchni żelu i napięciu nieprzekraczającym 15 V.

b)Przemywanie i inkubacja membrany w roztworach zawierających przeciwciała

Po transferze, membranę PVDF zawierającą rozdzielone białka umieszczano w podwójnej kasecie w aparacie SNAP i.d. (Merck Millipore). Dalszy ciąg procedury przeprowadzono zgodnie z protokołem producenta, z wykorzystaniem 15 ml buforu blokującego TBSTB (Rozdział 3.1.8), 2,5 ml buforu TBSTB zawierającego przeciwciała I-rzędowe oraz II rzędowe (Rozdział 3.1.7), a także 3x 20 ml buforu TBST do przemywania po każdym z etapów.

c)Detekcja białka związanego do membrany

Detekcję kolorymetryczną prowadzono wykorzystując zestaw AP Detection Reagent Kit (Rozdział 3.1.6), zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta.

3.2.4. Oczyszczanie DNA

Oczyszczanie wyizolowanych plazmidów (Rozdział 3.2.7) oraz dsDNA po reakcjach enzymatycznych prowadzono wykorzystując zestaw QIAquick PCR Purification Kit (Rozdział 3.1.6), zgodnie z zaleceniami producenta. Natomiast izolację DNA genomowego kleszcza prowadzono przy użyciu zestawu DNeasy Blood & Tissue Kit (Rozdział 3.1.6), zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. Fragmenty DNA wycinane z żelu oczyszczano za pomocą QIAquick Gel Extraction Kit (Rozdział 3.1.6), zgodnie z zaleceniami producenta. Stężenie oczyszczonego DNA określano metodą pomiaru absorpcji światła o długości fali $\lambda=260$ nm, w spektrofotometrze Nanodrop (Thermo Scientific). Jakość DNA oceniano metodą elektroforezy w 1% żelach agarozowych (Rozdział 3.1.11).

3.2.5. Powielanie DNA metodą PCR

•Z wykorzystaniem polimerazy Taq

Reakcje prowadzono w objętości 50 μ l wg schematu podanego w Tabeli 3.5.

Tabela 3.5. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR-Taq.

Odczynnik	Ilość
Matryca DNA	1 ng – 1 μ g
Starter homologiczny do końca 5' namnażanego fragmentu (3.1.5)	15 pmol
Starter komplementarny do końca 3' namnażanego fragmentu (3.1.5)	15 pmol
Mieszanina dNTP ($C_p= 2,5$ mM, $C_k= 0,2$ mM)	4 μ l
MgCl ₂ ($C_p= 25$ mM, $C_k= 3$ mM)	6 μ l
Bufor Taq 10x (Thermo Scientific)	5 μ l
Polimeraza Taq (Thermo Scientific, nr kat. 10342)	1,25 U
H ₂ O	Do 50 μ l

Warunki reakcji:

Wstępna denaturacja: 94°C – 2 min

Synteza produktów, 30 cykli: 94°C – 30 s, 52°C – 30 s, 72°C – 100 s/1 kz

Końcowe wydłużenie produktów: 72°C – 7 min

•Z wykorzystaniem polimerazy o wysokiej dokładności kopiowania - Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific)

Reakcje prowadzono w objętości 50 μ l wg schematu podanego w Tabeli 3.6:

Tabela 3.6. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR-Phusion.

Odczynnik	Ilość
Matryca DNA	1 ng – 10 ng
Starter homologiczny do końca 5' namnażanego fragmentu (3.1.5)	25 pmol
Starter komplementarny do końca 3' namnażanego fragmentu (3.1.5)	25 pmol
Mieszanina dNTP ($C_p= 2,5$ mM, $C_k= 0,2$ mM)	4 μ l
Bufor HF 5x lub bufor GC* 5x (Thermo Scientific)	10 μ l
DMSO* 100% ($C_k= 3 - 9\%$)	1,5 - 4,5 μ l
Polimeraza Phusion Hot Start II (Thermo Scientific)	1 U
H ₂ O	Do 50 μ l

* - stosowane opcjonalnie

Warunki reakcji:

Wstępna denaturacja (aktywacja enzymu): 98°C – 30 s

Synteza produktów*, 35 cykli: 98°C – 10 s, 72°C – 30 s/1 kz

Końcowe wydłużenie produktów: 72°C – 5 min

* - w przypadku zastosowania gradientu temperatury stosowano 35 cykli: 98°C – 10 s, 48 – 68°C 10 s, 72°C – 30 s/1 kz

3.2.6. Konstrukcja wektorów plazmidowych

3.2.6.1. Synteza cDNA do konstrukcji wektorów ekspresyjnych

Podczas syntezy cDNA metodą PCR stosowano polimerazę Phusion o wysokiej dokładności kopiowania (Rozdział 3.2.5) oraz startery wprowadzające na jednym bądź obu końcach produktu sekwencje wymagane w dalszej procedurze tworzenia konstruktów (Tabela 3.3). Matrycę stanowiły otrzymane wcześniej plazmidy pET200-TROSPA [192] pMK-TROSPA_V4, pMK-TROSPA_V5 i pMK-Salp15 (zsyntetyzowane przez GeneArt, Life Technologies). Mieszaninę reakcyjną przygotowywano zgodnie z opisem w Tabeli 3.6. Otrzymane preparaty cDNA oczyszczano przy pomocy zestawu odczynników QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) zgodnie z protokołem producenta.

3.2.6.2. Powielanie wektorów ekspresyjnych z serii pMCSG

Wektory z serii pMCSG powielano za pomocą metody PCR według schematu zamieszczonego w Tabeli 3.7.

Tabela 3.7. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR-KOD.

Odczynnik	Ilość
Plazmid pMCSG7 lub pMCSG48	10 ng
pMCSG_F (3.1.5)	15 pmol
pMCSG7_R lub pMCSG48_R* (3.1.5)	15 pmol
Mieszanina dNTP (C _p = 2,5 mM, C _k = 0,2 mM)	4 µl
Bufor KOD 10x (Merck Millipore)	5 µl
MgSO ₄ (C _p = 25 mM, C _k = 1,5 mM)	3 µl

Betaina ($C_p= 5 \text{ M}$, $C_k= 1 \text{ M}$)	10 μl
Polimeraza KOD Hot Start (Merck Millipore)	1 U
H ₂ O	Do 50 μl

* - do powielania wektora pMCSG7 używano startera pMCSG7_R, natomiast do powielania pMCSG48 – pMCSG48_R

Warunki reakcji:

Wstępna denaturacja: 95°C – 2 min

Synteza produktów, 35 cykli: 95°C – 20 s, 60/65°C* – 10 s, 70°C – 4,5 min

* - pMCSG7 - 60°C, pMCSG48 - 65°C

Po reakcji, produkt PCR rozcieńczano 100x, a następnie używano 1 μl rozcieńczonego roztworu, jako matrycy w drugiej reakcji PCR według schematu zamieszczonego w Tabeli 3.7. Otrzymane produkty oczyszczano przy pomocy zestawu odczynników QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) zgodnie z protokołem producenta.

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

W celu utworzenia jednoniciowych „lepkich” końców w wektorach z serii pMCSG oraz w klonowanych insertach, poddawano je reakcji wytrawiania końców przez polimerazę DNA T4 (posiadającą aktywność 3'→5' egzonukleazową) w obecności dGTP (trawienie wektora) lub dCTP (trawienie insertu) według schematu podanego w Tabeli 3.8.

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

Odczynnik	Ilość
DNA wektora lub insertu	X*
dGTP/ dCTP ($C_p= 50 \text{ mM}$, $C_k= 5 \text{ mM}$)	1,6 μl
BSA ($C_p= 1 \text{ mg/ml}$, $C_k= 0,1 \text{ mg/ml}$) (Promega)	1,6 μl
DTT ($C_p= 40 \text{ mM}$, $C_k= 4 \text{ mM}$)	1,6 μl
Bufor NEB2 10x (NEB)	1,6 μl
Polimeraza DNA T4 (NEB)	1 U
H ₂ O	Do 16 μl

* - około 50-80 ng insertu lub 150 ng wektora

Warunki reakcji:

Inkubacja przez 40 min w 22°C, a następnie inaktywacja enzymu w 75°C przez 20 min.

Po inaktywacji cieplnej enzymu dodawano 5 µl mieszaniny zawierającej wektor do 16 µl mieszaniny zawierającej insert, a następnie inkubowano przez 5 min w temperaturze pokojowej.

Dodawano 5 µl 25 mM EDTA i inkubowano kolejne 5 min w temperaturze pokojowej.

Używano 10 µl mieszaniny do transformacji komórek bakteryjnych TOP10 (Rozdział 3.1.2), zgodnie z zaleceniami producenta.

3.2.6.4. Ligacja do wektora pCR-XL-TOPO oraz pET200/D-TOPO

W celu otrzymania wektorów na bazie plazmidów pCR-XL-TOPO oraz pET200/D-TOPO prowadzono reakcję ligacji wektora i cDNA zgodnie z protokołem producenta. Mieszaninę wektora i cDNA (stosunek molowy 3:1) inkubowano przez 5 min w 22°C, a następnie używano 3 µl do transformacji komórek bakteryjnych TOP10 (Rozdział 3.1.2), zgodnie z zaleceniami producenta.

3.2.6.5. Ligacja do wektora pFastBAC HT A

Plazmid pFastBac HT A i odpowiednie produkty PCR poddawano trawieniu enzymami restrykcyjnymi EcoRI i PstI (Promega). Mieszaninę reakcyjną przygotowano zgodnie z opisem zawartym w Tabeli 3.9. Produkty reakcji oczyszczano przy pomocy zestawu odczynników QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) zgodnie z zaleceniami producenta.

Tabela 3.9. Skład mieszaniny i warunki reakcji trawienia dsDNA enzymami restrykcyjnymi.

Odczynnik	Ilość
DNA	2,5 µg
Bufor H (10x) (Promega)	5 µl
BSA ($C_p= 10$ mg/ml, $C_k= 0,1$ mg/ml) (Promega)	0,5 µl
Enzym EcoRI ($C_p= 12$ U/µl, $C_k= 0,96$ U/µl)	4 µl
Enzym PstI ($C_p= 10$ U/µl, $C_k= 0,6$ U/µl)	3 µl
H ₂ O	Do 50 µl

Warunki reakcji:

37°C – 16 h

80°C – 20 min (inaktywacja enzymu)

W celu otrzymania wektorów ekspresyjnych na bazie pFastBac HT A prowadzono reakcję ligacji wektora i cDNA (stosunek molowy 3:1) według schematu zamieszczonego w Tabeli 3.10.

Tabela 3.10. Skład mieszaniny reakcyjnej – ligacja cDNA z wektorem pFastBac HT A.

Odczynnik	Ilość
Wektor pFastBac HT A	60 ng
Insert	15 ng
T4 DNA Ligase Buffer 10x (Thermo Scientific)	2 µl
Ligaza DNA T4 (Thermo Scientific)	1 U
H ₂ O	Do 20 µl

Warunki reakcji:

16°C – 16 h

Po reakcji ligacji, pobierano 3 µl mieszaniny reakcyjnej i transformowano nimi komórki bakteryjne TOP10 (Rozdział 3.1.2), zgodnie z zaleceniami producenta.

3.2.7. Izolacja DNA

•Izolacja DNA plazmidowego

- Pojedyncze kolonie bakteryjne, wyhodowane na stałej pożywce LB z antybiotykiem, przenoszono do 2 ml płynnej pożywki LB zawierającej odpowiedni antybiotyk (Rozdział 3.1.9) i inkubowano 16 h w temperaturze 37°C, wytrząsając z prędkością 300 rpm.
- Z hodowli pobierano 1,5 ml zawiesiny bakteryjnej i wirowano 1 min z prędkością 12 000 x g w temperaturze pokojowej.
- Supernatant dekantowano, a zawierający bakterie osad zawieszano w 100 µl roztworu ALM1 (Rozdział 3.1.8).
- Dodawano 200 µl świeżo przygotowanego roztworu ALM2 (Rozdział 3.1.8), delikatnie mieszano i inkubowano na lodzie przez 5 min.

- Dodawano 150 μ l 7,5 M octanu amonu, mieszano i inkubowano na lodzie przez 20 min.
- Wirowano 20 min z prędkością 12 000 x g w temperaturze pokojowej.
- Supernatant przenoszono do nowej probówki, dodawano 1 ml 96% etanolu i inkubowano na lodzie przez 20 min.
- Wirowano 15 min z prędkością 12 000 x g w temperaturze pokojowej.
- Supernatant dekantowano, a osad przemywano 200 μ l 70% etanolu.
- Wirowano 5 min z prędkością 12 000 x g w temperaturze pokojowej.
- Supernatant dekantowano, a osad suszono w temperaturze pokojowej.
- Osad rozpuszczano w roztworze zawierającym 49,5 μ l i 0,5 μ l RNazy A ($C_p=$ 10 mg/ml, $C_k=$ 0,1 mg/ml)
- Otrzymane plazmidy poddawano analizie (Rozdział 3.2.8)

•Izolacja DNA genomowego kleszcza

Izolację DNA genomowego kleszczy wykonano przy użyciu zestawu DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen), zgodnie z zaleceniami producenta.

3.2.8. Analiza konstruktów plazmidowych

Obecność insertu w wektorach pCR-XL-TOPO oraz pET200/D-TOPO wstępnie potwierdzano za pomocą cięcia enzymami restrykcyjnymi NheI i SacI (Life Technologies) w buforze Tango zgodnie z zaleceniami producenta. Natomiast obecność insertu w pozostałych wektorach weryfikowano metodą PCR z wykorzystaniem polimerazy Taq (Rozdział 3.2.5). W każdym przypadku stosowano parę starterów, z których jeden był homologiczny do sekwencji kodującej białko, natomiast drugi był komplementarny do sekwencji użytego wektora. Produkty reakcji analizowano metodą elektroforezy w 1% żelu agarozowym (Rozdział 3.2.1).

Wyselekcjonowane preparaty poddawane były sekwencjonowaniu. Sekwencjonowano obszar kodujący białko wraz z miejscami ligacji z wykorzystaniem zestawu odczynników BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies) oraz starterów wymienionych w Tabeli 3.3. Skład i warunki reakcji sekwencjonowania podano w Tabeli 3.11:

Tabela 3.11. Skład mieszaniny i warunki reakcji sekwencjonowania.

Odczynnik	Ilość
Matryca DNA (plazmid)	150 ng
Starter*	15 pmol
DMSO ($C_p= 50\%$, $C_k= 5\%$)	2 μ l
BigDye buffer 5x	3 μ l
Ready Reaction Premix	1 μ l
H ₂ O	Do 20 μ l

* - do sekwencjonowania używano starterów (Rozdział 3.1.5): BAC-SEQ1 i BAC-SEQ2 – wektory pFastBac HT A; T7FWD i T7REV – wektory z serii pMCSG oraz pET200; pUC/M13_F i pUC/M13_R – wektory pCR-XL

Warunki reakcji:

Wstępna denaturacja: 94°C – 1 min

Synteza produktów, 35 cykli: 94°C – 10 s, 50°C – 10 s, 60°C – 4 min

Po reakcji PCR, do każdej mieszaniny reakcyjnej dodawano 5 μ l 125 mM roztworu EDTA i 60 μ l 96% etanolu, mieszano, inkubowano przez 15 min i wirowano (16 000 x g, 4°C, 30 min). Roztwór dekantowano, a powstały osad przemywano 200 μ l 70% etanolu i ponownie wirowano (16 000 x g, 4°C, 10 min). Roztwór dekantowano, a osad suszono i rozpuszczano w 10 μ l formamidu. Tak przygotowane próbki przekazywano Wydziałowej Pracowni Techniki Biologii Molekularnej, Wydziału Biologii, Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, w której prowadzone były dalsze etapy sekwencjonowania.

3.2.9. Mutageneza cDNA

Mutagenezę cDNA przeprowadzano w kilku etapach:

a) Alkaliczna denaturacja DNA stanowiącego matrycę do mutagenezy

Denaturowano 1-10 μ g DNA w roztworze zawierającym 40 μ l H₂O oraz 10 μ l 1 M NaOH z dodatkiem 1 mM EDTA, a następnie inkubowano przez 15 min w 37°C.

Do mieszaniny dodawano 5 μ l 3 M octanu sodu (pH 4,8) w celu neutralizacji roztworu, a następnie wytrącano DNA poprzez dodatek 150 μ l 96% etanolu o temperaturze 4°C.

Wirowano przez 10 min w temperaturze 4°C ($\geq 12\,000 \times g$). Delikatnie dekantowano supernatant, a osad przemywano 70% etanolem. Ponownie wirowano przez 2 min, dekantowano, suszono przez 15 min w 37°C, a następnie DNA rozpuszczano w H₂O.

b) Amplifikacja matrycowego DNA z wykorzystaniem starterów wprowadzających mutacje

Reakcje PCR prowadzono w objętości 50 μ l wg schematu podanego w Tabeli 3.12.

Tabela 3.12. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR-Phusion.

Odczynnik	Ilość
Matryca - plazmidowy DNA	500 ng
Starter homologiczny <u>lub</u> komplementarny do namnażanego fragmentu (3.1.4)*	100 pmol
Mieszanina dNTP ($C_p = 2,5$ mM, $C_k = 0,2$ mM)	4 μ l
Bufor GC 5x (Thermo Scientific)	10 μ l
Polimeraza Phusion Hot Start II (Thermo Scientific)	1 U
H ₂ O	Do 50 μ l

*- przygotowywano dwie mieszaniny reakcyjne, z których jedna zawierała starter homologiczny, a druga starter komplementarny do namnażanego fragmentu

Warunki reakcji:

Wstępna denaturacja (aktywacja enzymu): 98°C – 30 s

Synteza produktów, 10 cykli: 98°C – 10 s, 70°C – 30 s, 72°C – 3 min

Końcowe wydłużanie produktów: 72°C – 5 min

Po 10 cyklach, obydwie mieszaniny łączono ze sobą, a następnie przeprowadzano kolejne 20 cykli reakcji PCR w tych samych warunkach.

c)Oczyszczanie produktów PCR i trawienie DpnI

Produkty reakcji oczyszczano przy pomocy zestawu odczynników QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) zgodnie z zaleceniami producenta, a następnie poddano działaniu enzymu DpnI, który trawi wyłącznie DNA metylowane (matryca w reakcji PCR). Proces ten umożliwia strawienie DNA stanowiącego matrycę, pozostawiając niosące mutację produkty reakcji PCR. Reakcję trawienia prowadzono według schematu zawartego w Tabeli 3.13. Jako kontrolę trawiono również plazmid stanowiący matrycę w reakcji PCR (Tabela 3.12).

Tabela 3.13. Skład mieszaniny i warunki reakcji trawienia metylowanego DNA za pomocą enzymu DpnI.

Odczynnik	Ilość
DNA	około 5 µg
Bufor Multi-Core (10x) (Promega)	5 µl
BSA ($C_p= 10$ mg/ml, $C_k= 0,1$ mg/ml) (Promega)	0,5 µl
Enzym DpnI (Promega)	50 U
H ₂ O	Do 50 µl

Warunki reakcji:

37°C – 3 h

Po reakcji trawienia, 10 µl próbki analizowano metodą elektroforezy w 1% żelu agarozowym (Rozdział 3.2.1), jako kontrolę stosowano: (i) plazmid wyjściowy oraz (ii) ten sam plazmid poddany trawieniu DpnI. Pozostałe 20 µl próbki oczyszczano przy pomocy zestawu odczynników QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) zgodnie z zaleceniami producenta, a kolejne 20 µl przeznaczano do transformacji komórek bakteryjnych TOP10 według protokołu producenta.

d)Analiza konstruktów

Z transformowanych komórek izolowano DNA plazmidowy zgodnie z procedurą przedstawioną w Rozdziale 3.2.7, a następnie sprawdzano czy mutacje zostały poprawnie wprowadzone zgodnie z procedurą opisaną w Rozdziale 3.2.8.

3.2.10. Konstrukcja wektora bakulowirusowego (bakmidu)

W celu uzyskania rekombinowanego bakmidu, utworzonym wcześniej konstruktem pFastBac HT A (Rozdział 3.2.6.5) transformowano komórki kompetentne DH10Bac (Rozdział 3.1.2) zgodnie z zaleceniami producenta. Jednocześnie, jako kontrolę pozytywną stosowano wektor pFastBac HT-CAT. Następnie prowadzono selekcję kolonii bakteryjnych na podstawie testu α -komplementacji (ang. *blue-white screening*). Wybrane białe kolonie bakteryjne były pasażowane na stałą pożywkę LB (Rozdział 3.1.9) (z dodatkiem kanamycyny ($C_k= 50 \mu\text{g/ml}$), gentamycyny ($C_k= 7 \mu\text{g/ml}$), tetracykliny ($C_k= 10 \mu\text{g/ml}$), Bluo-gal ($C_k= 100 \mu\text{g/ml}$) oraz IPTG ($C_k= 40 \mu\text{g/ml}$)), a następnie inkubowane przez noc w 37°C .

Białe kolonie przenoszono do 2 ml płynnej pożywki LB (Rozdział 3.1.8) (z dodatkiem kanamycyny ($C_k= 50 \mu\text{g/ml}$), gentamycyny ($C_k= 7 \mu\text{g/ml}$), tetracykliny ($C_k= 10 \mu\text{g/ml}$)) i inkubowano 16 h w temperaturze 37°C , wytrząsając z prędkością 300 rpm.

Bakmid izolowano zgodnie z procedurą opisaną w Rozdziale 3.2.7 ze zmianami:

1. Stosowano bufor ALM1b zamiast ALM1.
2. Po wytrącaniu, DNA rozpuszczano w 10 mM Tris-HCl pH 8.

3.2.11. Analiza bakmidów

Obecność insertów w bakmidach weryfikowano metodą PCR z wykorzystaniem polimerazy Taq według schematu podanego w Tabeli 3.14. Produkty reakcji analizowano metodą elektroforezy w 1% żelu agarozowym (Rozdział 3.2.1).

Tabela 3.14. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR-Bak.

Odczynnik	Ilość
Bakmid	100 ng
pUC/M13_F	12,5 pmol
pUC/M13_R	12,5 pmol
Mieszanina dNTP ($C_p= 2,5 \text{ mM}$, $C_k= 0,2 \text{ mM}$)	4 μl
MgCl_2 ($C_p= 25 \text{ mM}$, $C_k= 3 \text{ mM}$)	6 μl
Bufor Taq 10x (Thermo Scientific)	5 μl
Polimeraza Taq (Thermo Scientific)	1,25 U
H_2O	Do 50 μl

Warunki reakcji:

Wstępna denaturacja: 94°C – 2 min

Synteza produktów, 30 cykli: 94°C – 30 s, 55°C – 30 s, 72°C – 3 min

Końcowe wydłużenie produktów: 72°C – 7 min

3.2.12. Otrzymywanie rekombinowanych bakulowirusów

Poprawnie skonstruowane bakmidy wykorzystano do transfekcji komórek owadzych Sf21 (Rozdział 3.1.3) w celu wyprodukowania, a następnie namnożenia rekombinowanych bakulowirusów. Stoki wirusowe przygotowano zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta Bac-to-Bac Baculovirus Expression System (Rozdział 3.1.6) z uwzględnieniem wymienionych poniżej zmian:

•Transfekcja komórek z linii Sf21

Komórki Sf21 zawieszono w pożywce hodowlanej TC-100 z dodatkiem FBS i antybiotyków (Rozdział 3.1.10). Do każdej studzienki na 6-dołkowej płytce hodowlanej przeniesiono po 2ml zawiesiny komórkowej (800 tys. komórek/ml). Inkubowano w 27°C około 1h (do momentu przyklejenia się komórek do powierzchni studzienki).

W międzyczasie przygotowano mieszaninę transfekcyjną, w której skład wchodziło:

a) 7 μ l Cellfectin II Reagent (Life Technologies) + 100 μ l pożywki TC-100 (niewzbogaconej, czyli bez dodatku FBS i antybiotyków)

b) 5 μ l bakmidu (C=500 ng/ μ l) + 100 μ l pożywki TC-100 (niewzbogaconej)

Połączono mieszaninę a) i b), a następnie inkubowano przez 30 min w temperaturze pokojowej. Do uzyskanej mieszaniny transfekcyjnej dodano 0,8 ml pożywki TC-100 (niewzbogaconej) delikatnie mieszając.

Po przyklejeniu się komórek do dna studzienki z dna ich powierzchni zebrano supernatant, a następnie 3-krotnie przemyto je 1 ml pożywki TC-100 (niewzbogaconej).

Do komórek dodano 1 ml mieszaniny transfekcyjnej. Następnie inkubowano je przez 5 h w temperaturze 27°C.

Po 5 h inkubacji usunięto mieszaninę transfekcyjną z hodowli, a komórki zalano 2 ml TC-100 z dodatkiem FBS i antybiotyków. Tak przygotowaną hodowlę inkubowano w 27°C od 3 do 6 dni (do momentu pojawienia się infekcji wirusowej).

Po upływie tego czasu pożywkę zawierającą rekombinowane wiriony zbierano z hodowli do 2 ml probówek, odwirowywano (500 x g, 5 min), a supernatant (około 1,8 ml) przenoszono do nowej probówki.

•**Namnażanie stoku zawierającego rekombinowane bakulowirusy**

Przygotowano zawiesinę komórek Sf21 o stężeniu 800 tys. komórek/ml w 10 ml pożywki TC-100 z dodatkiem FBS i antybiotyków. Do butelki hodowlanej T-75 przeniesiono 10 ml przygotowanej zawiesiny. Inkubowano w 27°C do momentu przyklejenia się komórek do dna butelki (około 1h). Do tak przygotowanej hodowli dodano 100 µl pożywki zawierającej rekombinowane wiriony. Komórki inkubowano przez 8 dni w 27°C. Po upływie tego czasu supernatant zbierano i odwirowywano (500 x g, 5 min).

3.2.13. Otrzymywanie białek

3.2.13.1. Przygotowywanie szczepów bakteryjnych

Komórki bakteryjne przeznaczone do produkcji białek przygotowywano w oparciu o szczepy *E. coli* BL21-Star oraz SHuffle (Rozdział 3.1.2). Do 50 µl zawiesiny komórek kompetentnych dodawano 1 µl roztworu wektora ekspresyjnego (10 ng/µl) i przeprowadzano transformację metodą szoku cieplnego. Zawiesinę bakterii delikatnie mieszano i inkubowano kolejno: na lodzie (30 min), w 42°C (30 s) i ponownie na lodzie (5 min). Dodawano ogrzaną do temperatury pokojowej pożywkę SOC i wytrząsano przez 1 h z prędkością 250 rpm (Tabela 3.15). Otrzymaną zawiesiną transformowanych bakterii zaszczepiano 10 ml płynnej pożywki LB z antybiotykiem. Bakterie inkubowano przez 16 h w 30/37°C przy prędkości wytrząsania 300 rpm, otrzymując

zawiesinę bakterii w stacjonarnej fazie wzrostu. Uzyskaną hodowlę stosowano do zaszczepienia świeżej pożywki LB z antybiotykiem, w której prowadzono produkcję białka (Rozdział 3.2.13.2).

W celu sporządzenia stoków bakteryjnych do świeżej próbki pobierano 0,6 ml zawiesiny z hodowli bakterii w fazie logarytmicznego wzrostu (wartość OD_{600} wynosząca 0,4 – 0,6). Następnie dodawano taką samą objętość (0,6 ml) 50% roztworu glicerolu, delikatnie mieszano, zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C . W celu wznowienia hodowli niewielką ilością zamrożonego preparatu zaszczepiano płynną pożywkę LB z odpowiednim antybiotykiem. Bakterie inkubowano przez 16 h w odpowiedniej temperaturze (Tabela 3.15), przy prędkości wytrząsania 300 rpm, otrzymując zawiesinę bakterii w stacjonarnej fazie wzrostu.

Tabela 3.15. Warunki transformacji szczepów *E. coli* BL21-Star oraz SHuffle.

	BL21-Star	SHuffle T7
Objętość dodanej pożywki SOC po transformacji	250 μl	950 μl
Regeneracja komórek po transformacji	37°C przez 1h	30°C przez 1h
Temperatura hodowli bakterii	37°C	30°C

3.2.13.2. Produkcja białek w komórkach bakteryjnych

W celu wyprodukowania białek heterologicznych w bakteriach płynną pożywkę LB z odpowiednim antybiotykiem zaszczepiano zawiesiną bakterii danego szczepu ekspresyjnego (BL21-Star lub SHuffle) w stacjonarnej fazie wzrostu w stosunku 20:1. Hodowlę prowadzono w $30/37^{\circ}\text{C}$ (Tabela 3.15) wytrząsając z prędkością 300 rpm do momentu osiągnięcia przez zawiesinę bakterii gęstości optycznej OD_{600} około 0,4 – 0,6. Ekspresję białka indukowano przez dodanie roztworu izopropyl- β -D-tiogalaktopiranozydu (IPTG) do stężenia końcowego 0,4 (SHuffle) lub 0,5 mM (BL21). Produkcję prowadzono przez 16 h w 16°C (BL21-Star oraz SHuffle) wytrząsając hodowlę z prędkością 300 rpm. Po tym czasie zawiesinę bakterii wirowano (6000 x g, 4°C , 6 min), pożywkę dekantowano, a osad bakteryjny zamrażano w -80°C .

3.2.13.3. Produkcja białek w komórkach owadzych

Komórki z linii High Five zawieszono w 90 ml pożywki Express Five SFM (Rozdział 3.1.10) bez dodatku nystatyny, a następnie przenoszono do kolby Erlenmeyera o pojemności 250 ml. Stężenie komórek w powstałej zawieszynie wynosiło 2 mln komórek/ml. Do komórek dodano 10 ml przygotowanego wcześniej stoku wirusowego (Rozdział 3.2.12). Komórki inkubowano przez 96h w 27°C, wytrząsając z prędkością 120 rpm. Po tym czasie komórki oddzielano od pożywki przez wirowanie (5 min, 200 x g). Pożywkę dekantowano, a komórki przepłukiwano buforem 1x PBS i ponownie wirowano. Bufor PBS dekantowano, a osad komórkowy zamrażano w -80°C.

3.2.13.4. Analiza rozpuszczalności białek

Zwirowany osad komórek bakteryjnych lub komórek owadzych pochodzący z 1 ml hodowli zawieszano w 300 µl buforu do lizy komórek bakteryjnych/owadzych (Rozdział 3.1.8). Preparat wytrząsano z prędkością 200 rpm przez 15 min, a następnie wirowano (16 000 x g, 15 min, 4°C). Supernatant zawierający frakcję białek rozpuszczalnych przenoszono do nowej probówki, a osad zawieszano w 300 µl buforu 1x SB. Zebrane frakcje analizowano metodą SDS-PAGE (Rozdział 3.2.2) oraz przez immunodetekcję białek (Rozdział 3.2.3).

3.2.13.5. Izolacja i oczyszczanie białek

•Chromatografia powinowactwa białek do złoża z immobilizowanymi jonami niklu (INiAC)

Zwirowany osad komórek bakteryjnych lub komórek owadzych zawieszano w 35 ml buforu do lizy (Rozdział 3.1.8) i wytrząsano z prędkością 200 rpm przez 15 min. Preparat sonikowano w cyklach 2 s sonikacji/10 s przerwy przez 4 min (komórki bakteryjne) lub 1 min (komórki owadzie), przy amplitudzie drgań odpowiednio 80% lub 60%, w 4°C. Po sonikacji preparat wirowano przez 30 min w 4°C (35 000 x g). Supernatant наносzono na 5 ml upakowanego złoża Ni Sepharose HP (Rozdział 3.1.13), umieszczonego w

kolumnie o objętości 49 ml (Rozdział 3.1.13) i zrównoważonego wcześniej odpowiednim buforem płuczającym (Rozdział 3.1.8). Następnie złożę przemywano pięciokrotnie 50 ml buforu płuczającego*, z wykorzystaniem systemu podciśnieniowego. Do tego celu zaadaptowano kolektor podciśnieniowy Vac-Man (Promega) umożliwiający znaczne usprawnienie chromatografii INiAC, dzięki możliwości równoległego prowadzenia kilku rozdzielów w tym samym czasie oraz przyspieszonemu przepływowi fazy ruchomej, przy zachowaniu wysokiej jakości rozdzielu. Warunkiem zastosowania powyższej metody jest dobre wiązanie się ze złożem białka ze znacznikiem HisTag. Metoda ta okazała się na tyle skuteczna, że została na stałe wdrożona jako standardowa metoda oczyszczania białek ze znacznikiem histydynowym w laboratorium Zakładu Biologii Molekularnej i Systemowej ICHB PAN.

Oczyszczone białko eluowano grawitacyjnie w 20 ml buforu wymywającego (2 razy po 10 ml) (Rozdział 3.1.8). Na koniec złożę przemywano 40 ml buforu wymywającego, a następnie równoważono przemywając 2 razy 50 ml buforu płuczającego.

Białka fuzyjne zawierające sekwencję rozpoznawaną przez proteazę TEV poddawano trawieniu podczas dializy wobec buforu zawierającego 25 mM Tris-HCl pH 7,9; 500 mM NaCl, 1 mM TCEP pH 7,9 oraz 0,1 mg proteazy TEV na każdy 1 mg rekombinowanego białka. Objętość buforu dializacyjnego ustalano w taki sposób, aby stężenie końcowe imidazolu w preparacie po dializie wynosiło 20 mM. Dializę prowadzono przez noc w temperaturze 6°C - 8°C. W celu usunięcia proteazy TEV oraz odciętej części białka fuzyjnego zawierającej znacznik histydynowy, preparat białkowy nakładano ponownie na zrównoważone złożę Ni Sepharose HP. Oczyszczone białko zbierano grawitacyjnie do nowej probówki, po czym złożę przemywano 5 ml buforu płuczającego. Zebrane frakcje analizowano metodą SDS-PAGE (Rozdział 3.2.2).

* - Przy oczyszczaniu pełnej długości białka TROSPA i mutantów substytucyjnych V1 – V5 złożę przemywano 5 krotnie 50 ml buforu płuczającego (3.1.8) z dodatkiem imidazolu w stężeniach: 20, 40, 60, 80 i 90 mM.

•Sączenie molekularne

Preparat zawierający oczyszczone białko zagęszczano poprzez ultrafiltrację do około 4 ml na filtrze Amicon Ultra-15 (Merck Millipore) o punkcie odcięcia (MWCO, ang. *molecular weight cut-off*) 10 000 Da (4700 x g, 4°C). Zagęszczony preparat nakładano na kolumnę HiLoad 16/60 Superdex 200 (Rozdział 3.1.13) zrównoważoną wcześniej odpowiednim buforem. Rozdział w warunkach natywnych prowadzono w buforze nSEC w temperaturze 4°C, natomiast w warunkach denaturujących w buforze dSEC w temperaturze 20°C (Rozdział 3.1.8). Rozdział prowadzono w systemie ÄKTAprime plus. Zebrane frakcje analizowano metodą SDS-PAGE (Rozdział 3.2.2).

3.2.13.6. Pomiar stężenia białka

Stężenie białka określano przy użyciu spektrofotometru ND-1000 (NanoDrop). Przybliżone stężenia białek wyznaczano poprzez pomiary absorbancji przy długości fali 280 nm. Aby dokładnie ustalić stężenie białka w roztworze homogenym mierzono absorbancję przy długości fali 280 nm z uwzględnieniem masy molowej białka oraz molowego współczynnika ekstynkcji wyznaczonego za pomocą programu ProtParam (Rozdział 3.2.21).

3.2.14. Badanie aktywności białek – testy immunoenzymatyczne ELISA

- W buforze PBST (Rozdział 3.1.8) przygotowywano roztwory preparatów białkowych (TROSPA lub Salp15) o stężeniu 5 µg/ml. Do dołków w płytkach 96-dołkowych Microlon 600 High Binding (Greiner) наносzono po 100 µl przygotowanych preparatów. Dla każdego badanego białka przygotowywano po dwie płytki – właściwą oraz kontrolną.
- Płytki inkubowano przez noc w 4°C.
- Płytki przemywano 5-krotnie buforem PBST (5x 300 µl/dołek), z wykorzystaniem automatycznego aparatu ImmunoWash 1575 (Bio-Rad).
- Do dołków наносzono po 250 µl buforu PBSTB3 i inkubowano przez noc w 4°C.

- Płytki przemywano 5-krotnie buforem PBST (5x 300 µl/dolek), z wykorzystaniem automatycznego aparatu ImmunoWash 1575 (Bio-Rad).
- Do dołek nanoszono po 100 µl roztworu białka OspA (do badań TROSPA) lub OspC (do badań Salp15) o stężeniu 250 µg/ml w buforze PBSTB1, zaczynając od 2 kolumny (1 kolumna – bufor PBSTB1). W każdej kolejnej kolumnie stężenie białka było 2-krotnie niższe niż w kolumnie poprzedniej, np. stężenie białka w 2 kolumnie – 250 µg/ml, 3 – 125 µg/ml, 4 – 62,5 µg/ml itd. Do dołek w płytkach kontrolnych analogicznie nanoszono po 100 µl roztworu białka OspC (kontrola w badaniach TROSPA) lub OspA (kontrola w badaniach Salp15).
- Inkubowano 1 h w temperaturze pokojowej.
- Płytki przemywano 5-krotnie buforem PBST (5x 300 µl/dolek), z wykorzystaniem automatycznego aparatu ImmunoWash 1575 (Bio-Rad).
- Do dołek nanoszono po 100 µl buforu PBSTB1 zawierającego odpowiednie przeciwciało I-rzędowe (Rozdział 3.1.7).
- Inkubowano 1 h w temperaturze pokojowej.
- Płytki przemywano 5-krotnie buforem PBST (5x 300 µl/dolek), z wykorzystaniem automatycznego aparatu ImmunoWash 1575 (Bio-Rad).
- Do dołek nanoszono po 100 µl buforu PBSTB1 zawierającego odpowiednie przeciwciało II-rzędowe sprzężone z alkaliczną fosfatazą (Rozdział 3.1.7).
- Inkubowano 1 h w temperaturze pokojowej.
- Płytki przemywano 5-krotnie buforem PBST (5x 300 µl/dolek), z wykorzystaniem automatycznego aparatu ImmunoWash 1575 (Bio-Rad).
- Do dołek nanoszono po 100 µl roztworu zawierającego substrat dla alkalicznej fosfatazy Alkaline Phosphatase Substrate Kit (Bio-Rad) i inkubowano do zabarwienia się roztworu na kolor żółty (około 20 min).
- Reakcję zatrzymywano poprzez dodanie po 100 µl 0,4 M NaOH.
- Dokonywano odczytu absorbancji przy długości fali 405-420 nm za pomocą automatycznego czytnika do płytek Microplate Reader (Model 550, Bio-Rad).

Analizy statystyczne wyników ELISA prowadzono poprzez porównanie grupy referencyjnej/kontrolnej z grupą badaną przy użyciu testu t-Studenta dla

zmiennych niepowiązanych. Różnice przy $p < 0,05$ uznano za statystycznie istotne.

3.2.15. Przesiewowe testy krystalizacyjne

Przesiewowe testy krystalizacyjne białek przeprowadzono metodą kropli siedzącej przy użyciu robota Gryphon Xtallization Robot (ARI) oraz 6 zestawów buforów do krystalizacji białek (Rozdział 3.1.6). Przed nałożeniem białka na płytkę preparat wirowano przez 30 min w 20°C, z prędkością 16 000 x *g*. Na jedną płytkę 96-dołkową (INTELLI-PLATE 96-3 Low Volume Reservoir, ARI) wykorzystywano około 40 µl białka (96 kropeł o objętości 400 nl) w buforze nSEC. Kroplę białka mieszano z buforem krystalizacyjnym w stosunku 1:1 lub 2:1. Płytki inkubowano w temperaturze 20°C.

3.2.16. Pomiary dynamicznego rozpraszania światła (DLS)

Promień hydrodynamiczny (R_h) białek wyznaczano poprzez pomiary dynamicznego rozpraszania światła (DLS) przy użyciu spektroskopu Zetasizer µV (Malvern Instruments). Do oszacowania masy białka globularnego na podstawie jego promienia hydrodynamicznego wykorzystano oprogramowanie Zetasizer 7.11 (Malvern Instruments).

Do pomiarów wykorzystywano 4 µl preparatu w buforze nSEC o stężeniu białka $C = 2$ mg/ml, umieszczonego w kuwecie kwarcowej o długości drogi optycznej wynoszącej 1 cm (Hellma QS 105.231). Każdorazowo wykonywano 13 pomiarów w temperaturze pokojowej. Pomiary przeprowadzono bezpośrednio po zagęszczeniu oraz zwirowaniu roztworu białka (10 min, 21 000 x *g*, 4°C). Jeśli po powyższych zabiegach w preparacie nadal występowały zagregowane formy białka, poddawano je dodatkowo filtracji na filtrach próbówkowych Microcon YM-100 (Sigma), o punkcie odcięcia 100 000 MWCO (5 – 10 min, 14 000 x *g*, 4°C).

Pomiary DLS wykorzystywano również do analizy temperatury topnienia białka (T_m) oraz zmian R_h białka w różnych temperaturach. Dane zbierano w zakresie temperatur wynoszącym od 4°C do 80°C ($\Delta T = 2^\circ C$), po 5 min inkubacji

preparatu w danej temperaturze, przy szybkości ogrzewania próbki wynoszącej 1°C/min. Dla zadanej temperatury każdorazowo wykonywano 13 pomiarów.

Technikę DLS zastosowano również do pomiaru zmian R_h białka w warunkach denaturujących, w moczniku o stężeniu wynoszącym: 0; 1; 2; 3; 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8 lub 8,75 M oraz w chlorowodorku guanidyny o stężeniu wynoszącym: 0; 1; 2; 3; 3,5; 3,7; 3,9; 4,1; 4,3; 4,5; 4,7; 4,9; 5,1; 5,3; 5,5; 6 lub 7 M. Przed pomiarem do próbek w buforze nSEC dodawano związek denaturujący, a następnie próbki inkubowano przez 20 min w temperaturze pokojowej, po czym wirowano przez 10 min (21 000 x g, 20°C). Każdorazowo wykonywano 13 pomiarów w temperaturze pokojowej.

3.2.17. Pomiary dichroizmu kołowego (CD)

Widma dichroizmu kołowego (CD) dla białka uzyskano przy użyciu spektrometru J-815 CD (JASCO) wyposażonego w przystawkę termostatującą Peltiera. Około 600 µl roztworu białka ($C = 50 \mu\text{g/ml}$) w buforze CDB (Rozdział 3.1.8) poddawano analizie w kuwecie kwarcowej o długości drogi optycznej wynoszącej 2 mm (Hellma 100-QS). Akumulowano widmo z trzech pomiarów przeprowadzonych w trybie ciągłym (ang. *continuous scanning mode*), przy prędkości skanowania 50 nm/min, szerokości pasma – 1 nm, zbiorze danych co 0,5 nm i czasie integracji danych (DIT) wynoszącym 1 sekundę. Dane zbierano w zakresie długości fali od 185 do 350 nm lub od 185 do 260 nm podczas analizy temperatury topnienia białka (T_m). Pomiary T_m białka wykonano w zakresie temperatur od 20 do 90°C ($\Delta T = 2^\circ\text{C}$), przy szybkości ogrzewania próbki wynoszącej 1°C/min. Widma przetwarzano w programie Spectra Manager (JASCO) przy użyciu filtra Savitzky-Golay (wygładzanie z użyciem okna 20 punktowego), a następnie analizowano w programie CONTIN-LL dostępnym na serwerze obliczeniowym DichroWeb. Jako zestaw referencyjny do analizy danych wykorzystano bazę zawierającą widma CD dla 48 białek, w tym dla pięciu białek zdenaturowanych (DichroWeb; *reference set 7*).

3.2.18. Pomiary małokątowego rozpraszania promieni rentgenowskich (SAXS)

Dane małokątowego rozpraszania promieniowania rentgenowskiego zostały zebrane w dwóch centrach synchrotronowych MAX Lab w Lund (Szwecja) [193] oraz EMBL działającym przy ośrodku DESY w Hamburgu (Niemcy) [194].

Bezpośrednio przed pomiarem próbki do pomiarów SAXS były wirowane (10 min, 21 000 x g, 4°C) w celu usunięcia pęcherzyków powietrza oraz agregatów białek. Próbki białka (C= 1 – 12 mg/ml) w buforze nSEC (Rozdział 3.1.8) o objętości 20 µl umieszczano w kapilarze za pomocą robota. W celu osiągnięcia lepszej jakości wykonywano cztery pomiary, które następnie uśredniano. Do rejestracji dyfrakcji wykorzystano detektor Pilatus 1M pixel X-ray detector (Dectris). Do pomiarów wykorzystywano długość fali 0,91 Å. Zakres pomiarowy wektora rozpraszania (s) zawierał się w granicach $0,01 < s < 4,5 \text{ nm}^{-1}$ (MAX IV) lub $0,088 < s < 5 \text{ nm}^{-1}$ (DESY). Krzywe rozpraszania tła pochodzące od buforu, mierzono zawsze przed i po pomiarze badanego układu. Wyniki zostały opracowane za pomocą pakietu programów PRIMUS 3.2 [195], w którym wyznaczano również masę oraz objętość białek wraz z otoczką hydratacyjną.

3.2.19. Modelowanie kompleksu białek TROSPA_NΔ44 i OspA *in silico*

Modele białka TROSPA_NΔ44 uzyskano przy użyciu metody EOM [196] na podstawie danych SAXS. Ze względu na fakt, iż modele wygenerowane przez EOM posiadają informację jedynie o położeniu atomu definiującego położenie węgla Cα (tzw. modele Cα), modele pełnoatomowe TROSPA_NΔ44, zawierające zrekonstruowane łańcuchy główne oraz grupy boczne, odtworzono za pomocą algorytmu REMO [197].

•Dokowanie molekularne

Uzyskane modele TROSPA_NΔ44 wykorzystano do dokowania molekularnego do białka OspA_NΔ17 (PDB ID: 1OSP) na serwerze ClusPro 2.0

[198], GRAMM-X [199] oraz Hex [200], wykorzystując domyślny zestaw parametrów.

- Dynamika molekularna

Wybrane modele kompleksu TROSPA_Δ44–OspA poddano symulacji dynamiki molekularnej. Przed symulacją ładunek białka został zneutralizowany. Relaksację struktury przeprowadzono w polu siłowym amber99SB [201] przy użyciu pakietu GROMACS [202] oraz zastosowaniu następujących parametrów: temperatura 298 K, zespół izotermiczno-izobaryczny (stała liczba cząstek, stała temperatura i ciśnienie, NPT), w 0,1 M NaCl, przy użyciu modelu trójpunktowego wody (TIP3P). Walidację otrzymanych modeli przeprowadzano w programie CHIMERA 1.10.1 [203].

D_{\max} i objętość (wraz z otoczką hydratacyjną) modeli białek oraz kompleksu TROSPA_Δ44–OspA wyznaczano w programie CRY SOL 2.8 [204].

3.2.20. Analiza sekwencji aminokwasowej białek za pomocą narzędzi bioinformatycznych

Analizę sekwencji aminokwasowej białek prowadzono przy użyciu poniższych narzędzi bioinformatycznych:

- TMpred, TMHMM, DAS – predykcja obecności domen transbłonowych [88,205,206]
- Phobius - predykcja obecności domen transbłonowych oraz peptydów sygnałnych [207]
- PrediSi – predykcja obecności peptydów sygnałnych [208]
- MetaDisorder Server – predykcja stopnia nieuporządkowania białka [209]
- ProtParam – obliczanie współczynnika ekstynkcji białka [210]
- Protein Calculator – obliczanie wypadkowego ładunku białka w określonym pH roztworu [211]
- Compute pI/Mw – obliczanie teoretycznego punktu izoelektrycznego białka [210]

- ProtScale – obliczanie znormalizowanej hydrofobowości białka [210]
- MoRFPRED i ANCHOR – przewidywanie występowania w białku tzw. elementów molekularnego rozpoznania (ang. *Molecular Recognition Features*) [212,213]

4. Wyniki

4.1. Przygotowanie obiektów badań

Zgodnie z przyjętymi na wstępie założeniami obiektem podejmowanych badań miały być dwu- lub wieloskładnikowe kompleksy białkowe tworzące się podczas zasiedlania różnych organów kleszcza przez patogenne bakterie. Biorąc pod uwagę fakt, iż produkcja białek bakteryjnych w powszechnie stosowanych bakteryjnych systemach ekspresyjnych nie powinna narażać poważnych problemów uznano, że czynnikiem limitującym postęp prac będzie uzyskanie homogennych białek kleszcza. Jako potencjalne obiekty badań wybrano pochodzące od *I. ricinus* białko TROSPA oraz białka z rodziny Salp15 (Iric-1, Iric-2 oraz Iric-3). W przypadku każdego z tych białek istniało wiele przesłanek świadczących o ich zaangażowaniu w oddziaływanie z białkami bakteryjnymi, odpowiednio OspA (TROSPA) oraz OspC (Salp15).

4.1.1. Próba uzyskania sekwencji kodujących białka z rodziny Salp15: Iric-1, Iric-2 oraz Iric-3

Sekwencję kodującą TROSPA otrzymano wcześniej w Zakładzie Biologii Molekularnej i Systemowej ICHB PAN [192], stąd w pierwszym etapie badań podjęto próbę uzyskania sekwencji kodujących białka Iric-1, Iric-2 oraz Iric-3.

Najczęściej stosowana procedura uzyskania sekwencji kodujących białka ślinowe kleszcza polega na izolacji mRNA z jego gruczołów ślinowych, a następnie przeprowadzeniu reakcji RT-PCR z wykorzystaniem starterów specyficznych do poszukiwanych sekwencji [168,214]. Ekspresja genów kodujących białka z rodziny Salp15 jest indukowana podczas ssania krwi przez kleszcza [163], dlatego też mRNA powinien być pozyskiwany od kleszczy w chwili gdy pożywiają się krwią [15,148,215]. Nie dysponując odpowiednim materiałem biologicznym podjęto próbę uzyskania sekwencji kodujących białka z rodziny Salp15 na podstawie DNA genomowego *I. ricinus*. Podobna strategia została wcześniej zastosowana do uzyskania cDNA TROSPA [192]. Polegała ona na namnożeniu metodą PCR fragmentu zawierającego sekwencję

kodującą TROSPA na podstawie DNA genomowego kleszcza, przy użyciu odpowiednio zaprojektowanych starterów.

W celu uzyskania sekwencji kodujących białka Iric-1, Iric-2 oraz Iric-3 przeprowadzono:

- Izolację genomowego DNA kleszcza *I. ricinus* (Rozdział 3.2.7)
- Amplifikację wybranych fragmentów genomowego DNA metodą PCR

W reakcji PCR wykorzystano startery zaprojektowane na podstawie zdeponowanych w bazie danych NCBI GenBank sekwencji cDNA/mRNA kleszcza (Tabela 3.3 oraz 4.1).

Tabela 4.1. Startery do amplifikacji sekwencji kodujących Iric-1, Iric-2 oraz Iric-3

Zestaw starterów	Sekwencja kodująca białko referencyjne, na podstawie której zaprojektowano startery
1) S15_TOPO_F S15_68_R	<i>Ixodes ricinus</i> Salp15 Iric-1 mRNA, complete cds (GenBank: EU128526.1)
2) S15_TOPO_F S15_70_R	<i>Ixodes ricinus</i> Salp15 Iric-2 mRNA, complete cds (GenBank: EU128527.1)
3) S15_TOPO_F S15_72_R	<i>Ixodes ricinus</i> Salp15 Iric-3 mRNA, complete cds (GenBank: EU128528.1)

Reakcje PCR przeprowadzono z wykorzystaniem polimerazy Phusion o wysokiej dokładności kopiowania według opisu przedstawionego w Tabeli 3.6. Przed przeprowadzeniem właściwych reakcji PCR przetestowano dwa różne bufor w celu optymalizacji warunków reakcji: (i) standardowy bufor HF (ang. *high-fidelity*) lub (ii) bufor GC (ang. *GC-rich templates*). Oba bufor testowano bez dodatku lub z dodatkiem DMSO (dimetylosulfotlenek; o stężeniu końcowym 3 lub 6%). DMSO stosowano w celu obniżenia temperatury topnienia DNA i zwiększenia specyficzności reakcji PCR. Spośród przetestowanych warunków najwyższą specyficzność reakcji PCR dla wszystkich 3 zestawów starterów uzyskano w buforze GC z dodatkiem 3% DMSO, dlatego też składniki te stosowano w kolejnych etapach.

Następnie przeprowadzono właściwe reakcje PCR. Hybrydyzację starterów prowadzono w gradiencie temperatury od 48 do 68°C ($\Delta T=3,33^\circ\text{C}$). W wyniku reakcji PCR otrzymano produkty o długości około 500 i 1300 nt – dla zestawu starterów nr 1; około 600 nt – dla zestawu starterów nr 2; około 450 i 1300 nt – dla zestawu starterów nr 3. Produkty reakcji PCR analizowano metodą elektroforezy w 1% żelu agarozowym (Rozdział 3.2.1) (dane niezamieszczone w tej pracy).

•Klonowanie i analiza produktów PCR

Homogeny produkt reakcji PCR o długości 600 nt (otrzymany z wykorzystaniem zestawu starterów nr 2) oczyszczono za pomocą QIAquick PCR Purification Kit (Rozdział 3.2.4), natomiast pozostałe produkty, ze względu na obecność fragmentów DNA różniących się długością, izolowano z żelu za pomocą QIAquick Gel Extraction Kit (Rozdział 3.2.4). Oczyszczone fragmenty DNA klonowano w wektorze pCR-XL-TOPO (Rozdziały 3.2.6.4, 3.2.7). Wyizolowany z bakterii DNA plazmidowy (Rozdział 3.2.7) poddano sekwencjonowaniu (Rozdział 3.2.8). Analiza sekwencji sklonowanych produktów PCR wykazała, że żaden z nich nie zawiera fragmentów DNA wykazujących podobieństwo na poziomie powyżej 60% w stosunku do sekwencji kodujących białka Iric-1, Iric-2 oraz Iric-3 (Tabela 4.1).

Pomimo podjętych prób nie udało się uzyskać żadnej z sekwencji kodujących białka z rodziny Salp15. W zaistniałej sytuacji spośród białek wymienionych w Tabeli 4.1, jako obiekt dalszych badań wybrano Salp15 Iric-1, gdyż: (i) Salp15 Iric-1 jest najlepiej scharakteryzowanym białkiem w obrębie rodziny Salp15 z kleszcza *I. ricinus* (między innymi znana jest sekwencja mRNA Salp15) [147,169,214] oraz (ii) wiadomo, iż wiąże ono bakteryjne białko OspC [147,168]. Syntezę dwuniciowego cDNA kodującego Salp15 Iric-1 z uwzględnieniem optymalizacji kodonów rzadko występujących w *E. coli* zlecono firmie GeneArt.

4.1.2. Konstrukcja wektorów do produkcji białka Salp15 Iric-1 w bakteryjnym systemie ekspresyjnym

Wektory pozwalające otrzymać białko TROSPA z *I. ricinus* oraz lipoproteiny OspA i OspC (z *B. garinii*, *B. burgdorferi* s.s. i *B. afzelii*) w bakteryjnym systemie ekspresyjnym zostały wcześniej otrzymane w Zakładzie Biologii Molekularnej i Systemowej ICHB PAN. Wektory te zostały utworzone na podstawie wektora pET200, który umożliwia produkcję białek zawierających znacznik histydynowy (HisTag) na końcu aminowym [192].

Wektory do produkcji białka Salp15 Iric-1 (zwanego dalej Salp15) w bakteryjnym systemie ekspresyjnym utworzono na bazie plazmidów z serii pMCSG - pMCSG7 oraz pMCSG48. Wektory te umożliwiają klonowanie niezależne od ligacji oraz produkcję białka ze znacznikiem histydynowym (HisTag), który można usunąć za pomocą proteazy TEV (dzięki sekwencji specyficznie rozpoznawanej przez proteazę TEV). Co więcej, wektor pMCSG48 umożliwia produkcję białka, które oprócz znacznika HisTag zawiera dodatkowo zwiększający rozpuszczalność znacznik fuzyjny NusA (MW= 56,6 kDa).

W celu uzyskania wektorów umożliwiających produkcję Salp15 wykorzystano zakupiony od GeneArt plazmid pMK-Salp15 zawierający pełnej długości sekwencję kodującą białko Salp15. Za pomocą metody PCR namnożono cDNA Salp15 (zgodnie z opisem w Tabeli 3.6), z wykorzystaniem plazmidu pMK-Salp15 jako matrycy oraz odpowiednio zaprojektowanych starterów (http://bioinformatics.anl.gov/cgi-bin/tools/primer_design.pl) (Tabela 3.3 i 4.2). Uzyskane dsDNA oczyszczono i wprowadzono (Rozdział 3.2.6.3) do przygotowanych wcześniej wektorów pMCSG7 i pMCSG48 (Rozdział 3.2.6.2). Otrzymane produkty wykorzystano do transformacji komórek kompetentnych TOP10. Następnie z wybranych pojedynczych kolonii bakteryjnych izolowano DNA plazmidowe (Rozdział 3.2.7). W kolejnym etapie wyizolowane plazmidy poddawano analizie metodą PCR (Rozdział 3.2.8) z wykorzystaniem pary starterów, z których jeden był homologiczny do sekwencji użytego wektora (T7FWD), natomiast drugi był komplementarny do sekwencji kodującej białko (S152_R). Wybrane konstrukty poddano sekwencjonowaniu (Rozdział 3.2.8) przy użyciu startera T7REV. Analiza wyników sekwencjonowania potwierdziła, że sekwencje kodujące Salp15 mają zachowane prawidłowe ramki odczytu oraz

nie zawierają żadnych mutacji. Otrzymane konstrukty przedstawiono w Tabeli 4.2. Plazmidy pMCSG7-Salp15 oraz pMCSG48-Salp15 wykorzystano do transformacji komórek kompetentnych *E. coli* SHuffle (Rozdział 3.1.2) zgodnie z zaleceniami producenta, a następnie podjęto próbę uzyskania poszczególnych białek.

Tabela 4.2. Wektory do produkcji białka Salp15

Konstrukt	Startery	Powstałe białko fuzyjne
pMCSG7-Salp15	S152_p7_F i S152_p7_R	6xHisTag-TEV*-Salp15
pMCSG48-Salp15		8xHisTag-NusA-TEV*-Salp15

* – koduje sekwencję ENLYFQS rozpoznawaną przez proteazę TEV

4.1.3. Produkcja w systemie bakteryjnym oraz oczyszczanie białek TROSPA, Salp15, OspA i OspC

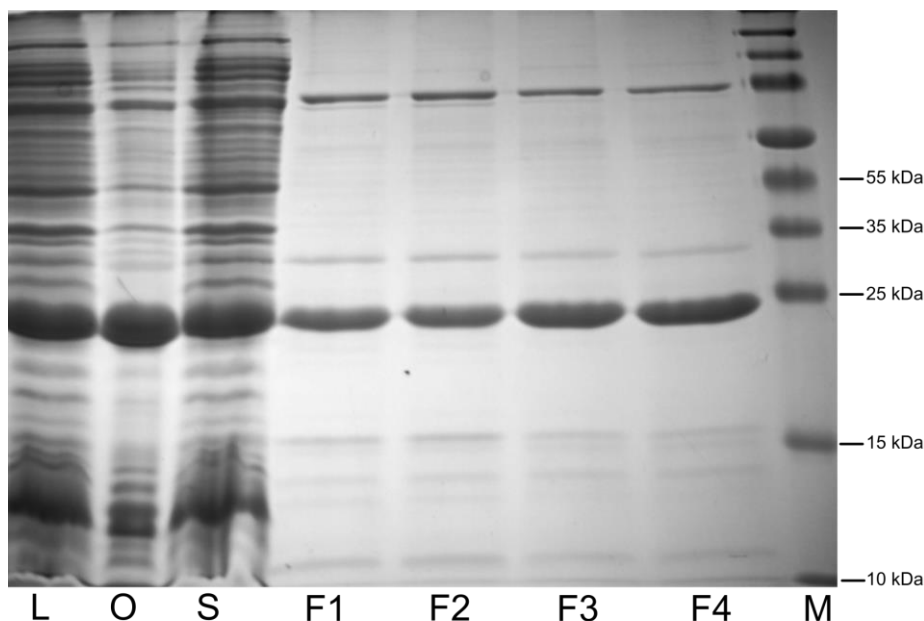
•TROSPA, OspA i OspC

Pełnej długości białko TROSPA oraz sześć lipoprotein OspA i OspC (pochodzących z *B. garinii*, *B. burgdorferi* s.s. i *B. afzelii*) wyprodukowano używając plazmidy stworzone na podstawie wektora pET200. Wektor ten umożliwia otrzymanie białek zawierających znacznik histydynowy (HisTag) na końcu aminowym, co pozwala na oczyszczanie białek metodą chromatografii powinowactwa do złoża z immobilizowanymi jonami niklu - INiAC (ang. *immobilized nickel affinity chromatography*). Z powodu obecności w białku TROSPA fragmentu, który został wcześniej zidentyfikowany jako tworzący domenę transbłonową, bufory do jego izolacji zawierały detergenty niedenaturujące – CellLyctic B lub Tween20. Zastosowano je w celu zmniejszenia agregacji białka poprzez redukcję niespecyficznych oddziaływań hydrofobowych pomiędzy fragmentami obejmującymi domenę transbłonową. Analogicznie postępowano podczas oczyszczania białek OspA oraz OspC, które posiadają lipidowaną cysteinę na końcu aminowym. Wszystkie wymienione białka produkowano w szczepie *E. coli* BL21-Star, które cechują się zwiększoną stabilnością mRNA (dzięki mutacji w genie RNazy E) oraz

brakiem proteaz Lon i OmpT, co umożliwia wydajną produkcję heterologicznych białek oraz zmniejsza ryzyko ich proteolizy.

Hodowlę bakterii prowadzono do momentu osiągnięcia logarytmicznej fazy wzrostu ($OD_{600} = 0,4-0,6$), a następnie dodawano IPTG tj. czynnik indukujący ekspresję heterologicznego genu. Z pobranych podczas hodowli próbek izolowano frakcje białek rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych (Rozdział 3.2.13.4), które analizowano metodą SDS-PAGE w celu oszacowania ilości produkowanego białka. Po przetestowaniu szeregu warunków hodowli, takich jak temperatura (16, 25 i 37°C), czas hodowli (4, 16 i 40 godz.) i stężenie IPTG (0,5 i 1 mM) uznano, że białka w formie rozpuszczalnej najwydajniej produkowane są przy zastosowaniu następującej procedury: po osiągnięciu przez bakterie fazy logarytmicznego wzrostu, pożywkę schładzano do temperatury około 16°C, indukowano IPTG do stężenia końcowego 0,5 mM i wytrząsano przez 16 godz. w 16°C z prędkością 300 rpm. Po tym czasie zawiesinę bakterii wirowano, pożywkę dekantowano, a osad bakteryjny zamrażano w -80°C (Rozdziały 3.2.13.1-2). Poprawność sekwencji wyprodukowanych białek potwierdzano poprzez analizę metodą spektrometrii mas MALDI-ToF (ang. *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight*).

Izolację białka TROSPA, OspA oraz OspC rozpoczynano od zawieszenia osadu komórek bakteryjnych pochodzących z 1 litra hodowli w buforze do lizy (Rozdział 3.1.8) zawierającego dodatkowo CellLytic B. Do izolacji białka TROSPA stosowano dodatkowo odczynnik redukujący TCEP w celu ochrony grup tiolowych przed utlenieniem i tym samym uniemożliwienia tworzenia niespecyficznego międzycząsteczkowego mostków disiarczkowych pomiędzy resztami cystein (Cys155). Następnie białka oczyszczano wykorzystując metodę chromatografii INiAC (Rozdział 3.2.13.5). Aby uzyskać czyste preparaty, na etapie przemywania złoża zawierającego związane białka, stosowano dodatkowe przepłukiwanie buforem zawierającym rosnące stężenia imidazolu (20 – 90 mM). Białka wypłukiwano ze złoża buforem wymywającym z dodatkiem Tween20 ($C_k = 0,05\%$). Skład poszczególnych frakcji analizowano metodą elektroforezy w warunkach denaturujących (SDS) w 12% żelu poliakrylamidowym (Rycina 4.1).



Rycina 4.1. Analiza SDS-PAGE otrzymanych po chromatografii INiAC preparatów zawierających pełnej długości białko TROSPA ze znacznikiem HisTag.

L – lizat zawierający ekstrakt białek *E. coli* BL21-Star; O – osad po wirowaniu stanowiący frakcję białek nierozpuszczalnych; S – supernatant po wirowaniu stanowiący frakcję białek rozpuszczalnych; F1 – F4 – frakcje białek po elucji 5 ml buforu wymywającego; M – wzorzec mas PageRuler Plus Prestained Protein Ladder.

•Salp15

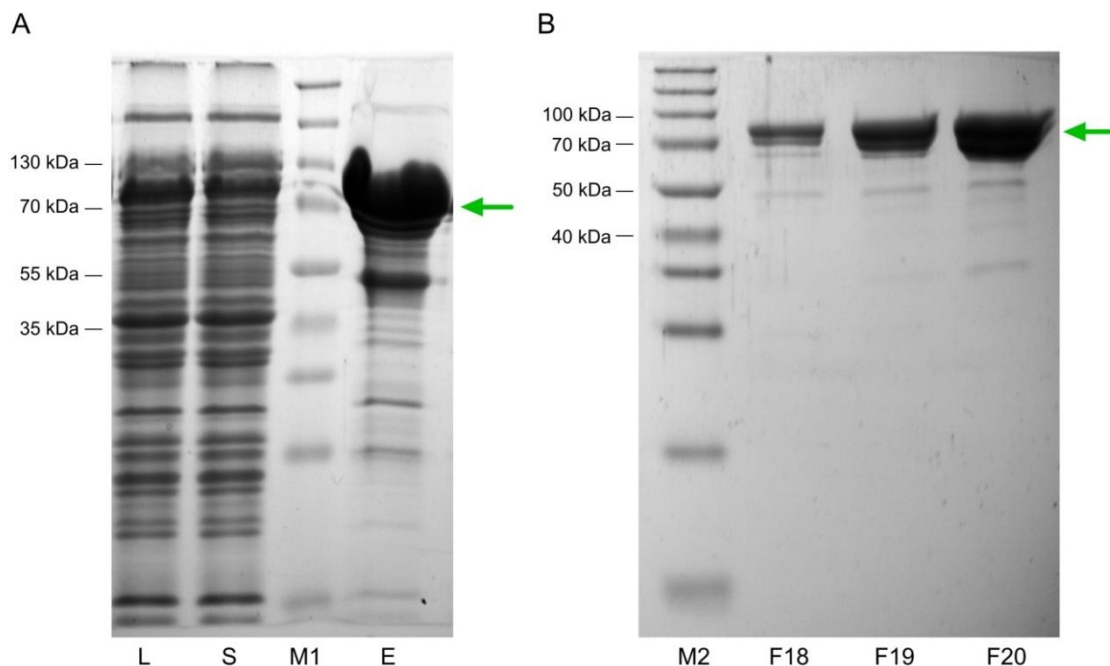
Białko Salp15 wyprodukowano stosując wektory pMCSG7 i pMCSG48. Umożliwiają one otrzymanie białka zawierającego znacznik histydynowy na końcu aminowym, dzięki czemu możliwe jest jego oczyszczanie przy zastosowaniu chromatografii powinowactwa INiAC. Dodatkowo, białko produkowane przy użyciu wektora pMCSG48, oprócz znacznika HisTag, posiada na końcu aminowym czynnik transkrypcyjny *E. coli* – NusA, który podnosi wydajność translacji białka fuzyjnego oraz zwiększa rozpuszczalność białek wykazujących tendencję do agregacji [216]. Co więcej, wyprodukowane za pomocą wektorów pMCSG białka fuzyjne posiadały sekwencję złożoną z aminokwasów ENLYFQS, rozpoznawaną przez proteazę TEV (ang. *Tobacco Etch Virus*), dzięki czemu możliwe było odcięcie znacznika HisTag- (pMCSG7) oraz HisTag-NusA- (pMCSG48). Do produkcji bogatego w cysteiny białka Salp15, które potencjalnie może posiadać w swojej strukturze mostki disiarczkowe, wybrano szczep SHuffle (Rozdział 3.1.2). Delecja genów kodujących reduktazę glutaredoksyny oraz reduktazę tioredoksyny w

komórkach SHuffle umożliwia formowanie się w ich cytoplazmie mostków disiarczkowych. Dodatkowo, szczep ten produkuje izomerazę disiarczkową DsbC, która asystuje przy zwijaniu białek i naprawie niewłaściwie utworzonych mostków disiarczkowych [217]. Optymalizację warunków produkcji białek, ich produkcję, analizę rozpuszczalności oraz sekwencji aminokwasowej prowadzono analogicznie jak dla białka TROSPA.

Rozpuszczalną formę Salp15, w postaci białka fuzyjnego HisTag-NusA-Salp15 wyprodukowano w komórkach *E. coli* SHuffle z wykorzystaniem wektora pMCSG48-Salp15. Salp15 produkowane przy użyciu wektora pMCSG7, a więc posiadające jedynie znacznik HisTag na końcu aminowym, powstawało z niską wydajnością. Ponadto większość otrzymanego w ten sposób białka występowała we frakcji nierozpuszczalnej, najprawdopodobniej wskutek gromadzenia się w tzw. ciałkach inkluzyjnych.

Izolację białka Salp15 rozpoczynano od zawieszenia osadu komórek bakteryjnych pochodzących z 1 litra hodowli w buforze do lizy (Rozdział 3.1.8), zawierającym dodatkowo odczynnik redukujący TCEP w celu ochrony grup tiolowych przed utlenieniem i tym samym uniemożliwienia tworzenia niespecyficznego wewnątrzcząsteczkowego i/lub międzycząsteczkowego mostków disiarczkowych. Następnie białka oczyszczano wykorzystując metodę chromatografii powinowactwa INiAC (Rozdział 3.2.13.5). Po wypłukaniu ze złoża, białko poddawano trawieniu proteazą TEV podczas dializy. Okazało się jednak, że po odcięciu partnera fuzyjnego białko Salp15 wytrącało się z roztworu. Dlatego też, do dalszych badań wykorzystano białko fuzyjne HisTag-NusA-Salp15 (Rycina 4.2 oraz 4.4A).

Ze względu na obecność zanieczyszczeń białkowych preparat uzyskany po chromatografii INiAC zagęszczano i dodatkowo poddawano sączeniu molekularnemu (Rozdział 3.2.13.5) w buforze nSEC (Rozdział 3.1.8). Dzięki temu otrzymano homogenne, rozpuszczalne białko HisTag-NusA-Salp15.



Rycina 4.2. Analiza SDS-PAGE preparatów białkowych otrzymanych po oczyszczeniu białka Salp15 metodą chromatografii INiAC (A), a następnie sączenia molekularnego (B). Zielona strzałka wskazuje białko fuzyjne HisTag-NusA-Salp15 (MW= 71,4 kDa). W poszczególnych ścieżkach uwidoczniono: L – lizat zawierający ekstrakt białek *E. coli* SHuffle; S – supernatant po wirowaniu stanowiący frakcję białek rozpuszczalnych; E – frakcja białek po elucji 10 ml buforu wymywającego; F18-F20 – frakcje nr 18, 19 i 20, zawierające białka po sączeniu molekularnym; M1 – wzorzec mas PageRuler Plus; M2 – wzorzec mas Spectra Multicolor Broad Range.

4.2. Badanie aktywności białek TROSPA i Salp15 z *I. ricinus*

Przed przystąpieniem do bardziej szczegółowej charakterystyki białka należy upewnić się, czy obiekt naszych badań jest nie tylko homogenny, ale i aktywny. Aby scharakteryzować aktywność biologiczną białek TROSPA i Salp15 przeprowadzono eksperymenty pozwalające zweryfikować ich zdolności do tworzenia kompleksów z OspA (TROSPA) i OspC (Salp15).

4.2.1. Badanie aktywności pełnej długości białka TROSPA produkowanego w *E. coli*

Wcześniejsze badania wykazały, że białko TROSPA pochodzące z *I. scapularis* wiąże specyficznie występującą na powierzchni *B. burgdorferi* lipoproteinę OspA [108]. Na tej podstawie wysunięto hipotezę, że z OspA oddziałuje również homolog TROSPA pochodzący z *I. ricinus*. Aby

zweryfikować powyższe założenie zbadano zdolność białka TROSPA z *I. ricinus* do wiązania białek OspA pochodzących z trzech dominujących na terenie Europy gatunków *Borrelia*: *B. afzelii*, *B. garinii* oraz *B. burgdorferi* s.s. W tym celu wykonano testy immunoenzymatyczne ELISA zgodnie z protokołem zamieszczonym w Rozdziale 3.2.14.

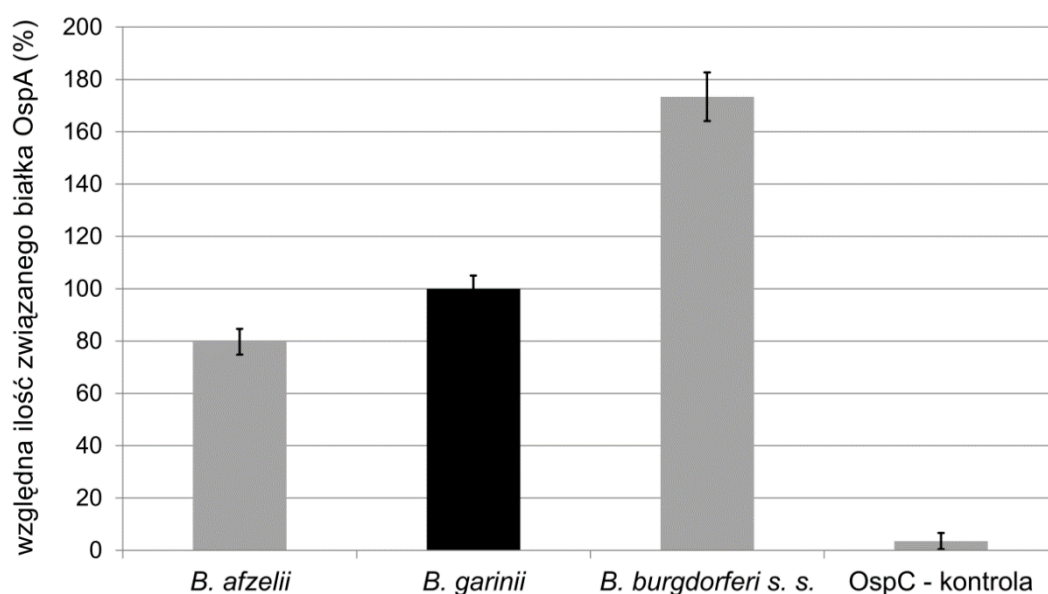
Przed przystąpieniem do doświadczeń sprawdzono czy poliklonalne królicze przeciwciała anti-OspA wykazują takie samo powinowactwo do OspA pochodzącego z *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* oraz *B. afzelii*. W tym celu wykonano serię rozcieńczeń białek OspA, uzyskane próbki rozdzielono w żelu PAA, poddano analizie *western blot* z wykorzystaniem przeciwciała anti-OspA, a następnie porównano intensywność prążków dla poszczególnych stężeń OspA przy użyciu programu Multi Gauge v3.0. Uzyskane wyniki świadczyły, że przeciwciała anti-OspA wykazują takie samo powinowactwo do białek OspA pochodzących z *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* oraz *B. afzelii*.

Po wykonaniu analizy powinowactwa przeciwciał względem białek OspA przystąpiono do testu ELISA. W pierwszym etapie płytki 96-dołkowe opłaszczono białkiem TROSPA (oraz BSA i TEV – białka kontrolne), blokowano BSA, a następnie dodawano OspA (lub OspC - kontrola) w stężeniach od 250 do 0,2 $\mu\text{g/ml}$ (kolumny od 2 do 12). W kolejnym etapie określano ilość związanego białka OspA/OspC z wykorzystaniem przeciwciała I-rzędowego anti-OspA/anti-OspC (Rozdział 3.1.7) oraz II-rzędowego sprzężonego z alkaliczną fosfatazą (AP). Po dodaniu substratu dla AP (fosforan-*p*-nitrofenylu), enzym katalizował reakcję defosforylacji prowadzącą do powstania barwnego produktu, którego stężenie mierzono spektrofotometrycznie. Wszystkie eksperymenty wykonano w 8 powtórzeniach technicznych i 2 biologicznych, dla każdej z trzech par białek TROSPA-OspA, prób kontrolnych: TROSPA-OspC, BSA-OspA i TEV-OspA oraz dla każdego z 11 stężeń białek OspA/OspC.

Otrzymane wyniki pomiarów spektrofotometrycznych normalizowano w każdej serii testów względem próby ślepej (kolumna 1 na płytce), która nie zawierała białka OspA/OspC. Następnie, dla każdej z badanych par białek wyznaczano średnią arytmetyczną absorbancji wraz z odchyleniem standardowym, dla każdego z 11 stężeń. W kolejnym etapie analizy obliczano względną ilość białka OspA/OspC związanego przez TROSPA, BSA i TEV, w odniesieniu do średniej wartości absorbancji uzyskanej dla pary białek TROSPA

oraz OspA z *B. garinii*, która stanowiła wartość referencyjną (100%). Względną ilość związanych białek OspA/OspC wyrażano w procentach, jako średnią wartość absorbancji dla danej pary białek podzieloną przez średnią wartość absorbancji dla pary referencyjnej TROSPA-OspA_{B.garinii}. Porównania pomiędzy grupami białek dokonano przy użyciu testu t-Studenta dla zmiennych niepowiązanych. Przyjęty poziom istotności (p) wynosił $p < 0,05$.

Analiza danych wykazała, że białko TROSPA wiąże się z OspA pochodzącym z wszystkich trzech gatunków *Borrelia*, jednakże wykazuje różne powinowactwo w zależności od typu OspA ($p \leq 0,0003$). Najefektywniej kompleksy białkowe powstawały pomiędzy TROSPA i OspA z *B. burgdorferi* s.s. (Rycina 4.3). OspA nie wiązało się białkami kontrolnymi – BSA oraz TEV.



Rycina 4.3. Porównanie ilości białka OspA z *B. afzelii*, *B. garinii* lub *B. burgdorferi* s.s. związanego przez białko TROSPA w testach *in vitro*/ELISA.

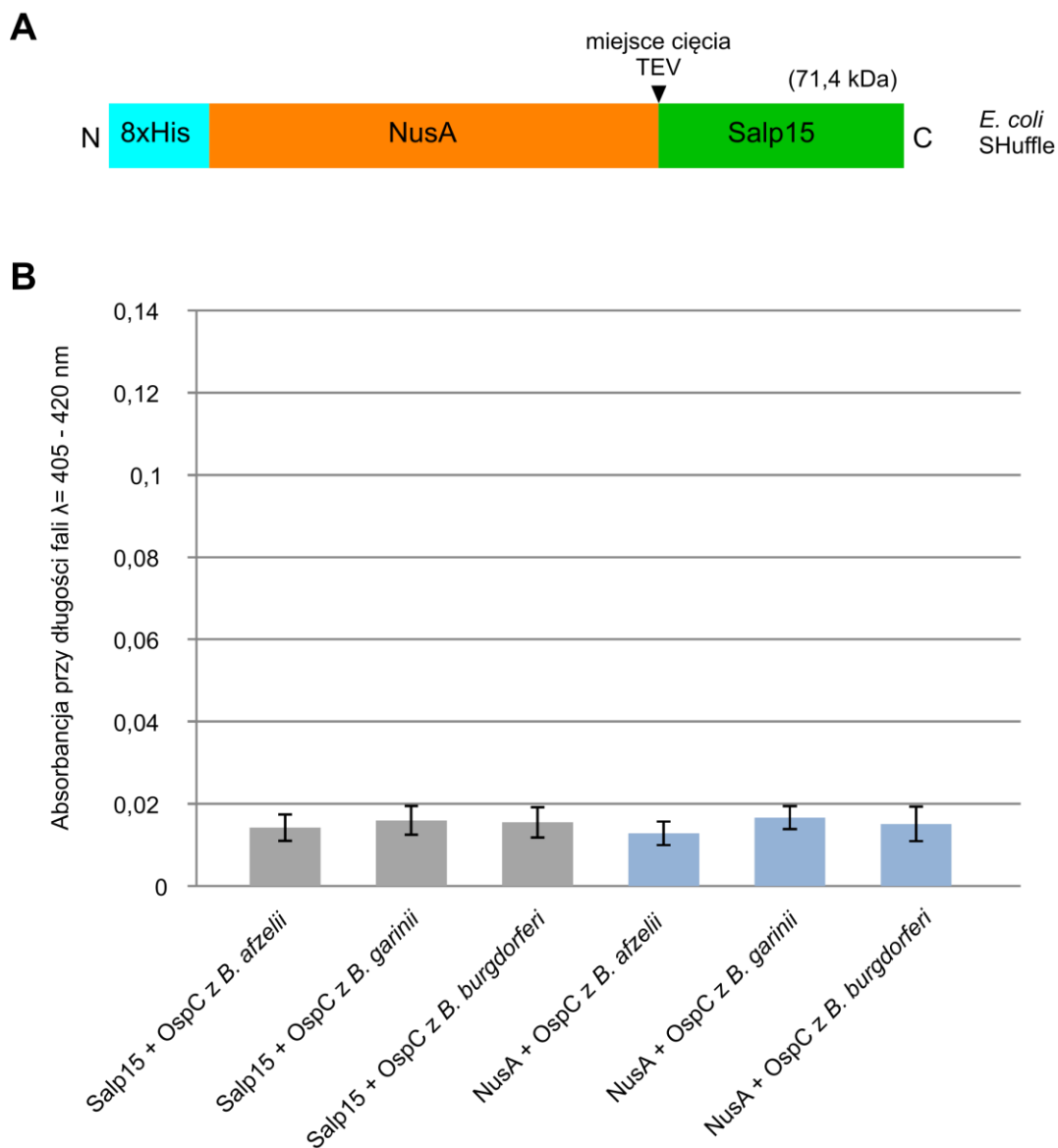
Białko TROSPA oraz jego mutanty zostały unieruchomione na płytce, a następnie inkubowane z OspA/OspC_(kontrola). Ilość związanego OspA/OspC_(kontrola) badano za pomocą przeciwciał I-rzędowych specyficznych wobec OspA/OspC oraz II-rzędowych sprzężonych z enzymem AP. AP katalizuje powstawanie barwnego produktu, którego stężenie mierzono kolorymetrycznie. Każdy słupek przedstawia średnią względną absorbancję z 16 reakcji wraz z odchyleniem standardowym dla stężenia białka OspA wynoszącego 30 µg/ml. Średnią względną absorbancję (wyrażoną w %) dla każdej z 4 par białek obliczono poprzez podzielenie średniej absorbancji przez średnią absorbancję zmierzoną dla kompleksu utworzonego przez białko TROSPA i OspA z *B. garinii* (próba referencyjna – 100%; czarny słupek). Różnice pomiędzy ilością związanego białka OspA z *B. garinii* oraz OspA z *B. afzelii* ($p=0,0003$), pomiędzy OspA z *B. garinii* oraz OspA z *B. burgdorferi* s.s. ($p<0,0001$), a także pomiędzy OspA z *B. afzelii* oraz OspA z *B. burgdorferi* s.s. ($p<0,0001$) były istotne statystycznie.

4.2.2. Badanie aktywności białka Salp15 produkowanego w *E. coli*

Wcześniejsze badania wykazały, że wyprodukowane w komórkach owadzych białko Salp15 Iric-1 (GenBank: ABU93613.1; zwane dalej Salp15) wykazuje zdolność do wiązania lipoproteiny OspC pochodzącej z trzech gatunków *Borrelia*: *B. afzelii*, *B. garinii* oraz *B. burgdorferi* s.s. [147]. Na tej podstawie sformułowano hipotezę, że białko Salp15 wyprodukowane w komórkach bakteryjnych również jest zdolne do tworzenia kompleksu z białkiem OspC. Aby zweryfikować to założenie przeprowadzono analizę oddziaływania pomiędzy wyprodukowanym w *E. coli* białkiem Salp15 oraz białkami OspC pochodzącymi z trzech ww. gatunków *Borrelia*. W tym celu wykonano testy immunoenzymatyczne ELISA zgodnie z protokołem zamieszczonym w Rozdziale 3.2.14.

W pierwszym etapie 3 płytki 96-dołkowe opłaszczono białkiem fuzyjnym HisTag-NusA-Salp15 (Rycina 4.4A). Kontrolę stanowiło białko HisTag-NusA, które zostało wykorzystane do opłaszczenia kolejnych 3 płytek. Następnie dodawano białko OspA pochodzące z *B. afzelii*, *B. garinii* lub *B. burgdorferi* s.s. w stężeniach od 250 do 0,2 $\mu\text{g/ml}$ (kolumny od 2 do 12), do odpowiednich dołków opłaszczonych zarówno Salp15 jak i NusA. W kolejnym etapie badano ilość związanego białka OspC z wykorzystaniem przeciwciała I-rzędowego anty-OspC (Rozdział 3.1.7) oraz II-rzędowego sprzężonego z AP. Analogicznie jak w opisanym wcześniej eksperymencie stężenie barwnego produktu reakcji katalizowanej przez AP mierzono spektrofotometrycznie. Wszystkie eksperymenty wykonano w 8 powtórzeniach technicznych i 2 biologicznych dla każdej z 3 par białek Salp15-OspC, 3 par białek NusA-OspC oraz dla każdego z 11 stężeń białka OspC. Uśrednione wyniki pomiarów spektrofotometrycznych wraz z odchyleniem standardowym dla stężenia białka OspC wynoszącego 30 $\mu\text{g/ml}$ przedstawiono na Rycinie 4.4B.

W wyniku przeprowadzonych eksperymentów stwierdzono, że białko Salp15 produkowane w szczepie SHuffle *E. coli* nie wiąże się z żadnym z białek OspC (odczyt absorbancji na poziomie tła – Rycina 4.4B). OspC nie wiązało się również z białkiem kontrolnym NusA.



Rycina 4.4. Badanie aktywności białka Salp15.

A. Schematyczne przedstawienie białka fuzyjnego NusA-Salp15 produkowanego w *E. coli*. Kolorem turkusowym zaznaczono znacznik HisTag, kolorem zielonym Salp15, natomiast kolorem pomarańczowym - białko NusA (MW= 56,6 kDa). **B.** Porównanie ilości białka OspC związanego przez Salp15. Białko fuzyjne NusA-Salp15 oraz NusA (kontrola) zostały unieruchomione na płytkach, a następnie inkubowane z OspC. Ilość związanego OspC badano za pomocą przeciwciał I-rzędowych specyficznych wobec OspC oraz II-rzędowych sprzężonych z AP. Po dodaniu substratu dla AP, stężenie produktu reakcji katalizowanej przez enzym mierzono spektrofotometrycznie. Każdy słupek przedstawia średnią absorbancję z 16 reakcji wraz z odchyleniem standardowym dla stężenia białka OspC wynoszącego 30 $\mu\text{g/ml}$.

4.3. Analiza bioinformatyczna sekwencji aminokwasowych TROSPA oraz Salp15

Badania aktywności wykazały, że białko TROSPA produkowane w *E.coli* jest aktywne, jednakże wykazuje ono tendencję do agregacji i wytrącania się z roztworu przy próbie zagęszczenia preparatu do stężenia powyżej 1 mg/ml, niezbędnego do przeprowadzenia badań strukturalnych. W celu zidentyfikowania hydrofobowych fragmentów mogących powodować agregację (domeny transbłonowe, peptydy sygnałne), przeprowadzono analizę bioinformatyczną sekwencji aminokwasowej TROSPA. Podobną analizę wykonano dla Salp15, aby wykryć obecność elementów mogących uniemożliwić jego zwijanie do natywnej konformacji i prowadzić do powstania nieaktywnej formy białka. W analizie wykorzystano następujące programy: TMpred [210], DAS [206], TMHMM [205], Phobius [207], PrediSi [208] (Tabela 4.3).

Tabela 4.3. Lokalizacja potencjalnych domen transbłonowych oraz peptydów sygnałnych w białku TROSPA oraz Salp15

	TROSPA	Salp15
Lokalizacja domeny transbłonowej (nazwa serwera)	15-24 (DAS) 16-37 (TMHMM) 20-44 (TMpred)	-
Lokalizacja peptydu sygnałnego (nazwa serwera)	1-37 (Phobius)	-

Analizy bioinformatyczne sekwencji aminokwasowej TROSPA wskazały na obecność domeny transbłonowej oraz peptydu sygnałnego transportu przez błonę komórkową. W przypadku białka Salp15 zastosowane narzędzia bioinformatyczne nie wykazały obecności domeny transbłonowej lub peptydu sygnałnego.

4.4. Produkcja mutantów delecyjnych białka TROSPA oraz badanie ich aktywności

Na podstawie dotychczas uzyskanych wyników, stwierdzono, iż jedynie w przypadku kompleksu TROSPA-OspA otrzymano białka pozwalające przeprowadzić zaplanowane badania. Zdecydowano więc by dalsze prace zostały skupione tylko na tym układzie. Jednocześnie postanowiono wyprodukować mutanty delecyjne białka TROSPA w celu uzyskania aktywnego mutantu o cechach odpowiednich do badań strukturalnych tj.: (i) białka, które nie tworzy agregatów i występuje w pojedynczej formie oligomerycznej (np. w postaci monomeru, dimeru, trimeru etc.) oraz (ii) posiada dobrą rozpuszczalność w roztworach wodnych. Do produkcji mutantów delecyjnych wybrano system bakteryjny ze względu na fakt, iż pozwolił on wcześniej na wydajną produkcję aktywnego białka TROSPA.

4.4.1. Konstrukcja wektorów ekspresyjnych do produkcji mutantów delecyjnych TROSPA w bakteryjnym systemie ekspresyjnym

Na podstawie przeprowadzonych analiz bioinformatycznych (Rozdział 4.3) oraz danych literaturowych [108] zaprojektowano wektory umożliwiające produkcję w *E. coli* mutantów delecyjnych TROSPA, pozbawionych fragmentu lub całej domeny transbłonowej.

W tym celu wykorzystano otrzymany wcześniej plazmid pET200-TROSPA zawierający pełnej długości cDNA TROSPA [192]. Za pomocą metody PCR namnożono cDNA TROSPA (zgodnie z opisem w Tabeli 3.6), z wykorzystaniem plazmidu pET200-TROSPA jako matrycy oraz odpowiednio zaprojektowanych starterów (http://bioinformatics.anl.gov/cgi-bin/tools/primer_design.pl). Uzyskane produkty PCR oczyszczono i wprowadzono metodą niezależną od ligacji (Rozdział 3.2.6.3) do przygotowanych wcześniej wektorów pMCSG7 i pMCSG48 (Rozdział 3.2.6.2). Pozostałe etapy wykonywano zgodnie z protokołem zamieszczonym w Rozdziale 4.1.2. Otrzymane konstrukty przedstawiono w Tabeli 4.4 oraz na Rycinie 4.7A.

Tabela 4.4. Wektory do produkcji mutantów delecyjnych TROSPA

Konstrukt	Startery	Powstałe białko fuzyjne
pMCSG7-TROSPA_NΔ24	TR_N24_p7 i TRO_p7_R	6xHisTag-TEV*- TROSPA_NΔ24
pMCSG7-TROSPA_NΔ37	TR_N37_p7 i TRO_p7_R	6xHisTag-TEV*- TROSPA_NΔ37
pMCSG7-TROSPA_NΔ44	TR_N44_p7 i TRO_p7_R	6xHisTag-TEV*- TROSPA_NΔ44
pMCSG48-TROSPA_NΔ44		8xHisTag-NusA-TEV*- TROSPA_NΔ44

* – sekwencja rozpoznawana przez proteazę TEV

Uzyskane mutanty delecyjne pozbawione były odcinka DNA kodującego N-końcowy fragment białka o długości 24 (TROSPA_NΔ24), 37 (TROSPA_NΔ37) oraz 44 (TROSPA_NΔ44) reszt aminokwasowych.

4.4.2. Produkcja w systemie bakteryjnym oraz oczyszczanie mutantów delecyjnych TROSPA oraz białka OspA_NΔ6

•Mutanty delecyjne białka TROSPA

Rozpuszczalne formy mutantów delecyjnych białka TROSPA wyprodukowano w komórkach *E. coli* BL21-Star. TROSPA_NΔ44 otrzymano przy użyciu wektora pMCSG48, natomiast pozostałe mutanty (TROSPA_NΔ24 i TROSPA_NΔ37) wyprodukowano przy użyciu wektora pMCSG7.

Izolację białek rozpoczynano od zawieszenia osadu komórek bakteryjnych pochodzących z 1 litra hodowli w buforze do lizy (Rozdział 3.1.8), zawierającym dodatkowo odczynnik redukujący TCEP, który hamując utlenianie grup tiolowych zapobiega tworzeniu niespecyficznym międzycząsteczkowym mostków disiarczkowych. Następnie białka oczyszczano wykorzystując metodę chromatografii powinowactwa INiAC (Rozdział 3.2.13.5). Po wypłukaniu ze złoża, białka poddawano trawieniu proteazą TEV podczas dializy, a następnie ponownie przesączało przez złoża chromatograficzne. Uzyskane frakcje analizowano za pomocą SDS-PAGE. Po rozdziale elektroforetycznym, białka wycinano z żelu i poddawano analizie spektrometrycznej MALDI-ToF w celu potwierdzenia poprawności sekwencji aminokwasowej. Otrzymane po chromatografii INiAC preparaty białek zagęszczano przez ultrafiltrację i prowadzono sączenie molekularne (Rozdział 3.2.13.5) w buforze nSEC

(Rozdział 3.1.8). Etap ten, oprócz oczyszczania, miał na celu ocenę stopnia zagregowania białek i uzyskanie pojedynczej formy merycznej białka.

Stwierdzono, że uzyskane mutanty delecyjne wykazują różną zdolność do agregacji w zależności od tego czy posiadają całkowicie, czy częściowo usuniętą domenę transbłonową (Rycina 4.5). Zgodnie z oczekiwaniami najsilniej agregowało białko TROSPA pełnej długości, znacznie słabiej białka TROSPA_NΔ24 oraz TROSPA_NΔ37. Jednak i w ich przypadku proces ten zachodził, szczególnie podczas próby zagęszczenia białek powyżej 1 – 2 mg/ml. Brak tendencji do agregacji i zwiększenie rozpuszczalności obserwowano jedynie w przypadku białka TROSPA_NΔ44. Jak potwierdzono poprzez pomiary DLS usunięcie 44 reszt aminokwasowych z końca aminowego białka TROSPA pozwoliło na zagęszczenie preparatu do około 95 mg/ml, przy jednoczesnym zachowaniu niezagregowanej formy białka.

Sączenie molekularne TROSPA_NΔ44 bez obecności związku redukującego (TCEP) wykazało, że część białka tworzyła dimery (dane niezamieszczone w tej pracy). Natomiast rozdział chromatograficzny TROSPA_NΔ44 z dodatkiem TCEP do buforu powodował, że białko to występowało w formie monomerycznej. Może oznaczać to, iż reszta Cys155 w TROSPA_NΔ44 jest wyeksponowana na powierzchni białka, co sprzyja tworzeniu niespecyficznym mostków disiarczkowych.

Podczas elektroforezy SDS-PAGE pełnej długości białko TROSPA oraz mutanty delecyjne TROSPA wykazywały wolniejszą w stosunku do swojej masy cząsteczkowej migrację w żelu. TROSPA o masie 16,5 kDa migrowało jak białko o masie 21 kDa (Rycina 4.1), natomiast TROSPA_NΔ44 o masie 12,53 kDa (Rycina 4.6) przemieszczało się w żelu jak białko o masie nieco większej niż 15 kDa (Rycina 4.5B). Oznacza to, iż białka te migrowały w żelu około 1,3 razy wolniej niż białka o podobnej masie. Taka nietypowa ruchliwość elektroforetyczna jest jedną z inherentnych cech białek nieuporządkowanych, które wiążą mniej SDS, przez co wykazują 1,2 - 1,8 razy wolniejszą migrację w żelu poliakrylamidowym [218,219].

W trakcie oczyszczania TROSPA_NΔ44 okazało się, że w preparacie występuje również skrócona forma białka. Analiza za pomocą spektrometrii mas MALDI-ToF wykazała, że oprócz białka TROSPA_NΔ44 o masie molowej 12533,50 Da, w preparacie znajduje się również polipeptyd o masie

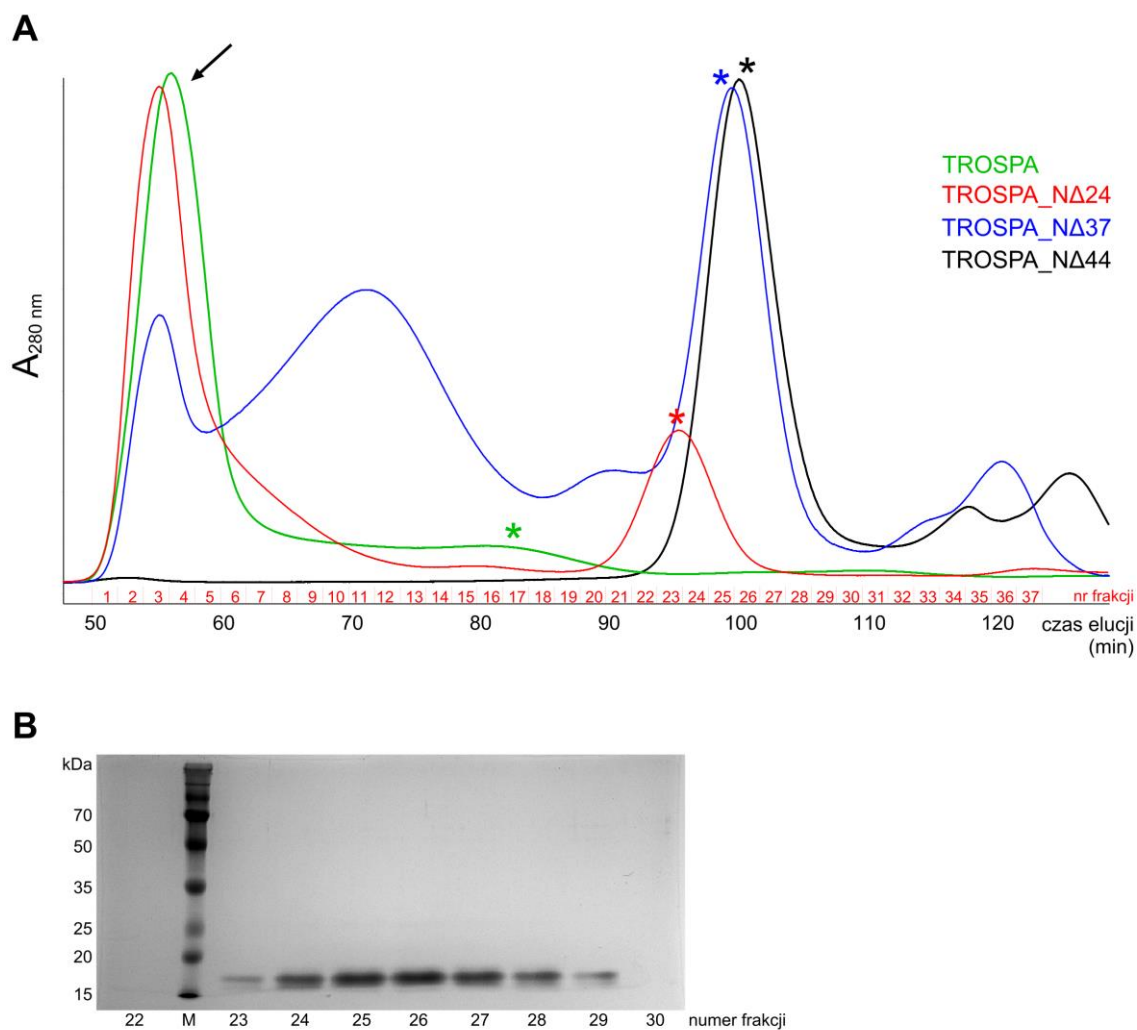
11917,05 Da. Seria analiz przeprowadzonych metodą spektrometrii mas pozwalała sądzić, że skrócona forma białka TROSPA_NΔ44 pozbawiona jest 7 reszt aminokwasowych (-DQSAAGS) na końcu karboksylowym (białko TROSPA_NΔ44_CΔ7). Pomimo zastosowania roztworu inhibitorów proteaz (cOmplete ULTRA tablets, EDTA-free, Roche), z dodatkiem lub bez dodatku 1 mM EDTA, nie udało się zahamować procesu spontanicznego tworzenia białka TROSPA_NΔ44_CΔ7.

Na podstawie powyższej analizy oraz danych literaturowych [108] dotyczących białka TROSPA z *I. scapularis* postanowiono otrzymać trzy kolejne mutanty delecyjne TROSPA: TROSPA_NΔ44_CΔ7, TROSPA_NΔ50 oraz TROSPA_NΔ50_CΔ7 (Rozdział 4.4.1 i Tabela 4.5). Etap utworzenia wektorów ekspresyjnych, produkcję oraz oczyszczanie wyżej wymienionych białek przeprowadzono analogicznie jak w przypadku pozostałych mutantów delecyjnych. Okazało się jednak, że synteza tych białek zachodzi z niską wydajnością. W rezultacie brak odpowiednich ilości białek znacząco utrudniał przeprowadzenie testów krystalizacyjnych oraz badań fizykochemicznych. Dlatego też zdecydowano by w dalszych badaniach wykorzystać białko TROSPA_NΔ44.

Tabela 4.5. Wektory do produkcji mutantów delecyjnych TROSPA

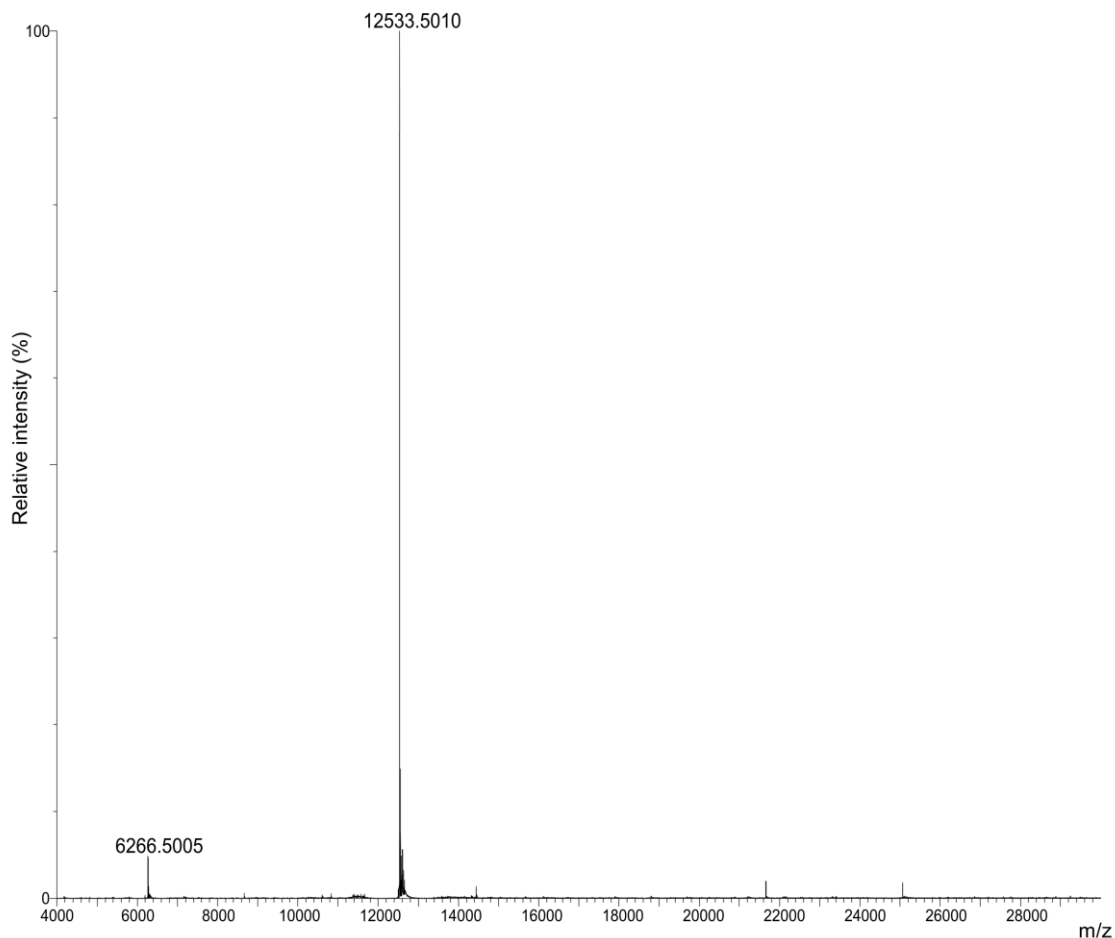
Konstrukt	Startery	Powstałe białko fuzyjne
pMCSG7-TROSPA_NΔ44_CΔ7	TR_N44_p7 i TR_C7_p7	6xHisTag-TEV*-TROSPA_NΔ44_CΔ7
pMCSG7-TROSPA_NΔ50	TR_N50_p7 i TRO_p7_R	6xHisTag-TEV*-TROSPA_NΔ50
pMCSG7-TROSPA_NΔ50_CΔ7	TR_N50_p7 i TR_C7_p7	6xHisTag-TEV*-TROSPA_NΔ50_CΔ7

* – sekwencja rozpoznawana przez proteazę TEV



Rycina 4.5. Sączenie molekularne (chromatografia żelowa) białka TROSPA oraz jego mutantów delecyjnych w buforze nSEC.

A. Chromatogramy z sączenia molekularnego pełnej długości białka TROSPA oraz mutantów delecyjnych TROSPA_N Δ 24, TROSPA_N Δ 37 oraz TROSPA_N Δ 44. Czarna strzałka wskazuje frakcje białek zagregowanych, natomiast gwiazdki oznaczają miejsce wypływu białek w formie monomerycznej (lub oligomerycznej w przypadku pełnej długości białka TROSPA). **B.** Analiza SDS-PAGE frakcji (nr 22 – 30) zawierających białko TROSPA_N Δ 44; M – wzorec mas Perfect Color Protein Ladder (EURx).



Rycina 4.6. Widmo masowe białka TROSPA_NΔ44 wykonane przy użyciu spektrometru mas MALDI-ToF. Na widmie oprócz jonu naładowanego pojedynczo ($m/z = 12533,5010$) widoczny jest również jon naładowany podwójnie ($m/z = 6266,5005$).

4.4.3. Badanie aktywności mutantów delecyjnych TROSPA

W celu zbadania aktywności mutantów delecyjnych TROSPA_NΔ24, TROSPA_NΔ44 oraz TROSPA_NΔ50_CΔ7 pod kątem utraty bądź zachowania właściwości wiązania białka OspA, wykonano testy immunoenzymatyczne ELISA zgodnie z procedurą przedstawioną w Rozdziale 3.2.14.

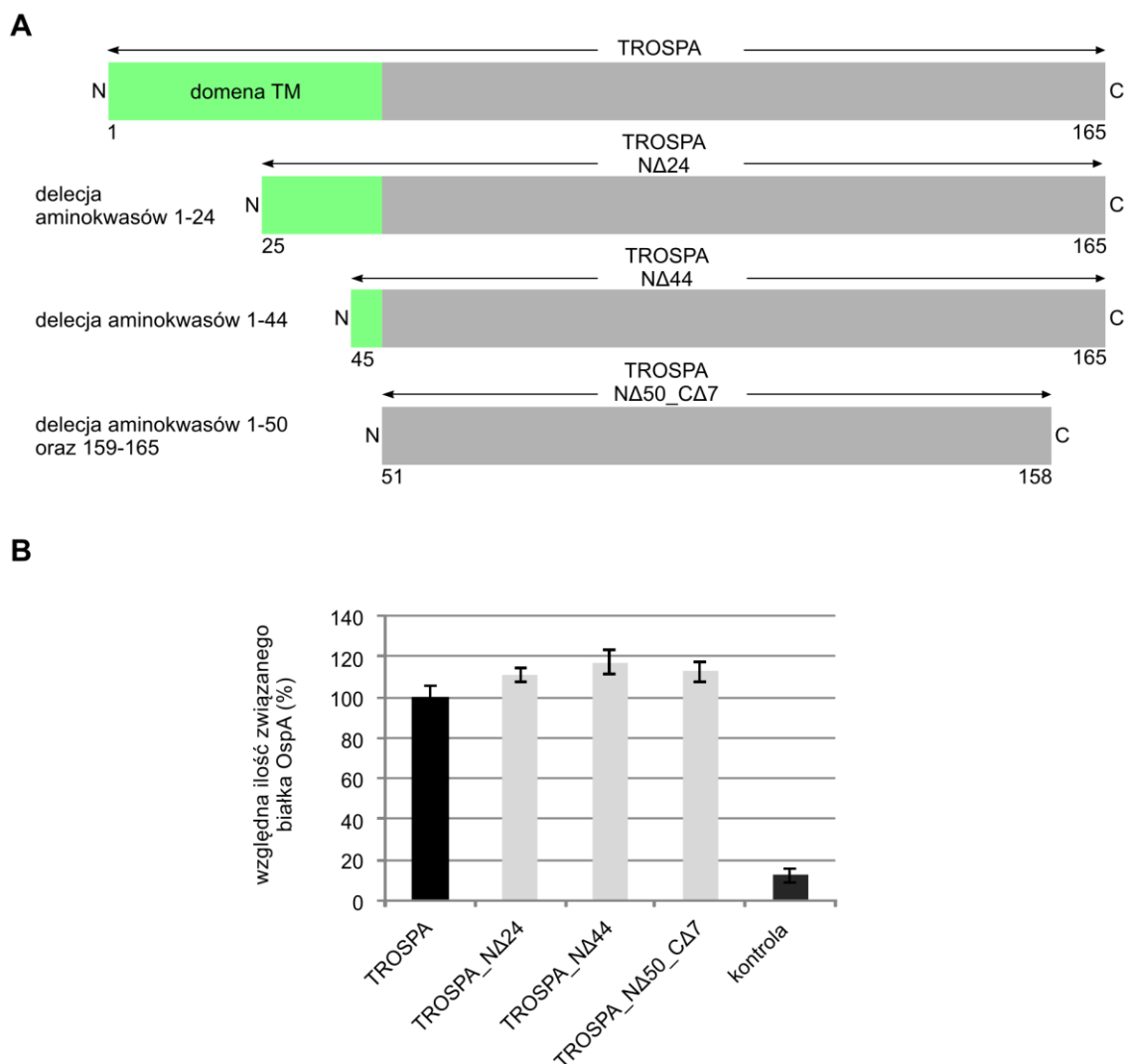
W pierwszym etapie płytki 96-dołkowe opłaszczono czterema wariantami białka TROSPA: TROSPA, TROSPA_NΔ24, TROSPA_NΔ44, TROSPA_NΔ50_CΔ7. Następnie płytki inkubowano z BSA po czym dodawano białko OspA pochodzące z *B. garinii* (lub OspC - kontrola) w stężeniach od 250 do 0,2 $\mu\text{g/ml}$ (kolumny od 2 do 12). W kolejnym etapie badano ilość związanego białka OspA/OspC z wykorzystaniem przeciwciała I-rzędowego anty-OspA/anty-OspC (Rozdział 3.1.7) oraz II-rzędowego sprzężonego z AP. Po dodaniu

substratu dla AP, stężenie produktu reakcji katalizowanej przez enzym mierzono spektrofotometrycznie. Wszystkie eksperymenty wykonano w 8 powtórzeniach technicznych i 2 biologicznych dla każdego z 4 wariantów białka TROSPA, próby kontrolnej TROSPA-OspC oraz dla każdego z 11 stężeń białka OspA/OspC.

Normalizację oraz analizę wyników pomiarów spektrofotometrycznych prowadzono zgodnie z procedurą zamieszczoną w Rozdziale 4.2.1, traktując wartość absorbancji uzyskaną dla pary białek TROSPA oraz OspA z *B. garinii* jako wartość referencyjną (100%). Wyniki testów immunoenzymatycznych ELISA przedstawiono na Rycinie 4.7B.

W wyniku przeprowadzonych eksperymentów stwierdzono, że wprowadzone delecje (24, 44 oraz 50 N-końcowych aminokwasów jak i 50 N-końcowych i 7 C-końcowych) nie powodowały obniżenia zdolności mutantów TROSPA do wiązania się z OspA. Co więcej, TROSPA_Δ24, TROSPA_Δ44 oraz TROSPA_Δ50_Δ7 wykazywały wyższe powinowactwo do OspA w porównaniu do pełnej długości białka TROSPA (odpowiednio o 11%, 17% i 13%; $p \leq 0,0003$). Uzyskane wyniki świadczyły, że usunięcie 7-aminokwasowego odcinka z końca karboksylowego białka nie wpływa na wiązanie OspA przez TROSPA_Δ50_Δ7 oraz TROSPA_Δ44_Δ7 (dane niezamieszczone w tej pracy) w porównaniu do TROSPA_Δ44 (w obu przypadkach $p > 0,05$).

Na podstawie analizy mutantów delecyjnych, do dalszych badań strukturalnych wybrano białko TROSPA_Δ44, gdyż wiązało ono białka OspA na tym samym poziomie co pełnej długości TROSPA, charakteryzowało się dobrą rozpuszczalnością i występowało w roztworze w formie monomerycznej.



Rycina 4.7. Mutanty delecyjne TROSPA z *I. ricinus* oraz ich powinowactwo do białka OspA z *B. garinii*.

A. Schematyczne przedstawienie mutantów delecyjnych TROSPA. Zielonym kolorem zaznaczono domenę transbłonową (TM). **B.** Porównanie efektywności wiązania białka OspA z *B. garinii* przez mutanty TROSPA. Białko TROSPA oraz jego mutanty zostały unieruchomione na płytce, a następnie inkubowane z OspA/OspC^(kontrola). Ilość związanego OspA/OspC^(kontrola) badano za pomocą przeciwciał I-rzędowych specyficznych wobec OspA/OspC oraz II-rzędowych sprzężonych z AP (szczegółowy opis w tekście). Każdy słupek przedstawia średnią względną absorbancję z 16 reakcji wraz z odchyleniem standardowym dla stężenia białka OspA wynoszącego 30 µg/ml. Średnią względną absorbancję (wyrażoną w %) dla każdej z 5 par białek obliczono poprzez podzielenie średniej absorbancji przez absorbancję zmierzoną dla kompleksu utworzonego przez białko TROSPA i OspA z *B. garinii* (próbę referencyjną – 100%; czarny słupek). Różnice w ilości związanego białka OspA pomiędzy TROSPA i mutantami delecyjnymi były istotne statystycznie ($p=0,0002$ dla TROSPA_NΔ24, $p<0,0001$ dla TROSPA_NΔ44 oraz $p=0,0003$ dla TROSPA_NΔ50_Δ7); na podstawie [192].

4.5. Produkcja mutantów substytucyjnych białka TROSPA oraz badanie ich aktywności

Analizy bioinformatyczne (Rozdział 3.2.21) sekwencji aminokwasowych białek TROSPA i OspA wykazały, że w roztworze o odczynie obojętnym (pH 7) białka te posiadają silnie przeciwstawne ładunki wynoszące odpowiednio -12 oraz +5. Wydaje się zatem, że oddziaływania elektrostatyczne mogą odgrywać istotną rolę w interakcjach pomiędzy obydwoma białkami. Aby zweryfikować niniejszą hipotezę, przygotowano serię mutantów substytucyjnych TROSPA (TROSPA V1 – V5), w których zamieniono ujemnie naładowane reszty aminokwasowe kwasu glutaminowego i asparaginowego na pozbawione ładunku reszty glutaminy i asparaginy.

4.5.1. Mutageneza cDNA TROSPA

Mutacje V1 – V3 w sekwencji kodującej TROSPA wprowadzono metodą PCR (Rozdział 3.2.9), z wykorzystaniem odpowiednio zaprojektowanych starterów (Tabela 4.6). Jako matrycę wykorzystano wektor pET200-TROSPA, zawierający pełnej długości sekwencję cDNA TROSPA. Sekwencja kodująca mutanty TROSPA V4 i V5 została zsyntetyzowana przez firmę GeneArt (Life Technologies), a następnie sklonowana w wektorze pET200 (Rozdział 3.2.6.4) po uprzedniej amplifikacji metodą PCR, z wykorzystaniem starterów TRO_TOPO_F i TRO_TOPO_R (Rozdział 3.2.6.1). W rezultacie utworzono pięć konstruktów kodujących mutanty substytucyjne TROSPA (pET200-TROSPA V1–V5). Zmiany w sekwencji aminokwasowej mutantów V1 – V5, w stosunku do TROSPA, przedstawiono w Tabeli 4.6 oraz na Rycinie 4.8A.

Tabela 4.6. Mutanty substytucyjne TROSPA V1 – V5

Nazwa	Startery	Zmiany w sekwencji aminokwasowej TROSPA
TROSPA V1	TR_V1_F i TR_V1_R	Asp87, Asp90 →Asn Glu89 →Gln
TROSPA V2	TR_V2_F i TR_V2_R	Glu123 →Gln Asp129 →Asn
TROSPA V3	TR_V3_F i TR_V3_R	Asp132, Asp136 →Asn
TROSPA V4	TRO_TOPO_F i TRO_TOPO_R	Asp75, Asp82, Asp87, Asp90 →Asn Glu84, Glu89 →Gln
TROSPA V5		Glu123 →Gln Asp129, Asp132, Asp136, Asp159 →Asn

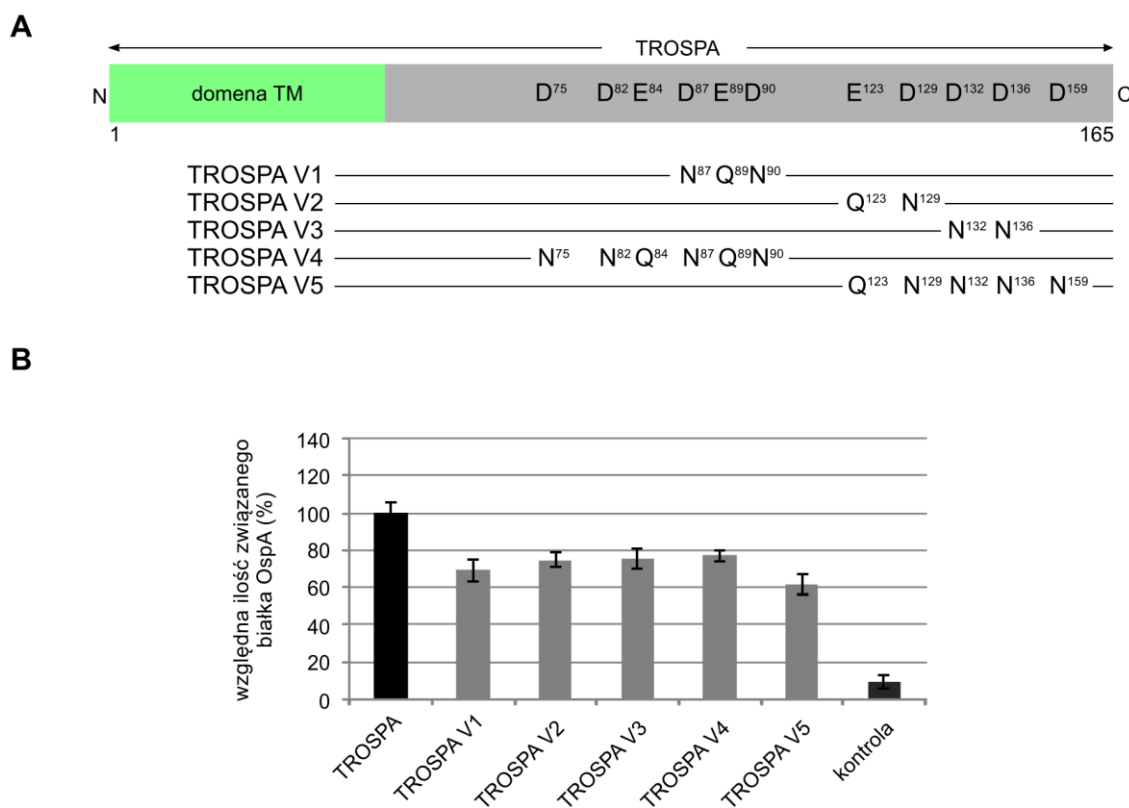
4.5.2. Produkcja w systemie bakteryjnym, oczyszczanie oraz badanie aktywności mutantów substytucyjnych TROSPA V1 – V5

Mutanty substytucyjne TROSPA V1 – V5 wyprodukowano w komórkach *E. coli* BL21-Star i oczyszczano analogicznie jak pełnej długości białko TROSPA (Rozdział 4.1.3).

W celu określenia zdolności mutantów substytucyjnych TROSPA V1 – V5 do wiązania białka OspA, wykonano testy immunoenzymatyczne ELISA zgodnie z opisem w Rozdziale 3.2.14. W pierwszym etapie 2 płytki 96-dołkowe opłaszczono białkiem TROSPA, a kolejne pięć płytek opłaszczono mutantami substytucyjnymi TROSPA V1 – V5. Następnie płytki inkubowano z BSA po czym dodawano białko OspA pochodzące z *B. garinii* (lub OspC - kontrola) w stężeniach od 250 do 0,2 µg/ml (kolumny od 2 do 12). W kolejnym etapie badano ilość związanego białka OspA/OspC z wykorzystaniem przeciwciała I-rzędowego anti-OspA/anti-OspC (Rozdział 3.1.7) oraz II-rzędowego sprzężonego z AP. Wszystkie eksperymenty wykonano w 8 powtórzeniach technicznych i 2 biologicznych dla każdego z 6 wariantów białka TROSPA, próby kontrolnej TROSPA-OspC oraz dla każdego z 11 stężeń białka OspA/OspC. Normalizację oraz analizę wyników pomiarów spektrofotometrycznych prowadzono zgodnie z opisem w Rozdziale 4.2.1, traktując wartość absorbancji uzyskaną dla pary białek TROSPA oraz OspA z

B. garinii jako wartość referencyjną (100%). Wyniki testów immunoenzymatycznych ELISA przedstawiono na Rycinie 4.8B.

Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że w porównaniu do TROSPA, mutanty substytucyjne V1 – V5 wykazywały znacząco niższe powinowactwo do OspA (odpowiednio o 31%, 25%, 24%, 23% oraz 39% dla mutantów V1–V5; $p < 0,0001$). Różnica ta była tym większa, im więcej ujemnie naładowanych reszt aminokwasowych zostało zamienionych na aminokwasy pozbawione ładunku. Największa różnica wystąpiła w przypadku białka TROSPA V5, które posiadało modyfikacje skupione w pobliżu końca karboksylowego. Ponadto stwierdzono, że żaden z mutantów V1 – V5 nie utracił zdolności do wiązania się z białkiem OspA (Rycina 4.8B).



Rycina 4.8. Mutanty substytucyjne TROSPA z *I. ricinus* oraz ich powinowactwo do białka OspA z *B. garinii*.

A. Schematyczne przedstawienie mutantów substytucyjnych TROSPA V1 – V5. Na schemacie zaznaczono ujemnie naładowane reszty aminokwasowe asparagianinu (D) oraz glutaminianu (E), które zamieniano na pozbawione ładunku asparaginę (N) i glutaminę (Q). Numery w górnym indeksie symbolu aminokwasu oznaczają pozycję zmienionej reszty aminokwasowej. Zielonym kolorem zaznaczono domenę transbłonową (TM). **B.** Porównanie efektywności wiązania białka OspA z *B. garinii* związanego przez mutanty V1 – V5 w testach *in vitro*/ELISA. (szczegółowy opis w tekście) [192].

4.6. Produkcja białka TROSPA_NΔ50 w eukariotycznym systemie ekspresyjnym

Aby stwierdzić czy potencjalne modyfikacje potranslacyjne TROSPA mogą wpływać na jego zdolność do wiązania OspA, postanowiono uzyskać kodowane przez kleszcza białko w komórkach owadzych (system bakulowirusowy). Dane literaturowe dotyczące białka TROSPA wskazują na obecność domeny transbłonowej sięgającej 50 reszty aminokwasowej od końca aminowego [108], dlatego też zdecydowano się na produkcję mutantu pozbawionego nie 44 (tak jak w TROSPA_NΔ44), lecz 50 aminokwasów (TROSPA_NΔ50). TROSPA_NΔ50 na końcu aminowym posiadało znacznik histydynowy, sekwencję rozpoznawaną przez proteazę TEV oraz FLAG-tag. Znacznik FLAG-tag składa się z sekwencji 8 aminokwasów (DYKDDDDK) rozpoznawanej specyficznym przeciwciałem anti-FLAG (Tabela 3.4), co umożliwia immunodetekcję białka.

4.6.1. Konstrukcja wektorów ekspresyjnych do produkcji białka TROSPA_NΔ50 w komórkach owadzych

W celu uzyskania TROSPA_NΔ50 w komórkach owadzych posłużono się systemem Bac-to-Bac. Funkcję wektora w tym systemie spełniają infekujące komórki owadzie bakulowirusy. Po wnikięciu wirusa do komórki, na późnym etapie infekcji dochodzi między innymi do ekspresji genu kodującego białko poliedrynę. Gen ten znajduje się pod kontrolą bardzo silnego promotora i można go zastąpić genem kodującym inne białko.

Poniżej przedstawiony został trójetapowy proces otrzymywania wektora bakulowirusowego do produkcji białka TROSPA_NΔ50.

Etap1 - konstrukcja plazmidu donorowego pFastBacHT-TROSPA_NΔ50

W celu uzyskania cDNA TROSPA_NΔ50 zawierającego dodatkowo sekwencję kodującą FLAG-tag przeprowadzono dwie reakcje PCR (zgodnie z opisem w Tabeli 3.6, z uwzględnieniem zmian: bufor GC oraz 6% DMSO). W pierwszej reakcji (PCR1), jako matrycę wykorzystano plazmid pET200-

TROSPA oraz startery TR_N50_BAK1_F i TR_N50_BAK_R (Tabela 3.3). Następnie pobierano 1 μ l mieszaniny reakcyjnej PCR1 i wykorzystywano zawarty w niej produkt jako matrycę w drugiej reakcji PCR (PCR2), z użyciem starterów TR_N50_BAK2_F i TR_N50_BAK_R. Namnożony dsDNA analizowano w żelu agarozowym (Rozdział 3.2.1), a następnie oczyszczano (Rozdział 3.2.4). Otrzymany cDNA oraz wektor pFastBac HT A poddawano trawieniu za pomocą enzymów restrykcyjnych EcoRI i PstI, ponownie oczyszczano i prowadzono ligację zgodnie z procedurą zamieszczoną w Rozdziale 3.2.6.5. Produkty ligacji wykorzystano do transformacji komórek kompetentnych TOP10. Następnie z wyselekcjonowanych komórek bakteryjnych izolowano DNA plazmidowe (Rozdział 3.2.7). W kolejnym etapie wstępnie potwierdzano obecność w plazmidzie odpowiedniego insertu metodą PCR (Rozdział 3.2.8). PCR prowadzono z wykorzystaniem starterów BAC-SEQ1 i TR_N50_BAK_R. Wybrane konstrukty poddano sekwencjonowaniu (Rozdział 3.2.8) przy użyciu startera BAC-SEQ1.

Etap 2 - konstrukcja wektora bakulowirusowego (bakmidu)

Otrzymanymi plazmidami donorowymi pFastBacHT-TROSPA_N Δ 50 oraz pFastBacHT-CAT (kontrola) transformowano komórki *E. coli* DH10Bac. W komórkach tych dochodziło do przeniesienia cDNA kodującego białko TROSPA_N Δ 50/CAT z plazmidów pFastBacHT do bakmidów. Następnie wykonano dwukrotną selekcję transformantów za pomocą testu α -komplementacji oraz przeprowadzono izolację DNA bakmidowego. Wszystkie etapy wykonano zgodnie z procedurą zamieszczoną w Rozdziale 3.2.10. Obecność cDNA kodującego białko TROSPA_N Δ 50/CAT w bakmidach potwierdzono metodą PCR z wykorzystaniem polimerazy Taq oraz starterów pUC/M13_F oraz pUC/M13_R (Rozdział 3.2.11).

Etap 3 - produkcja rekombinowanych bakulowirusów

Bakmidy zawierające cDNA TROSPA_N Δ 50 oraz CAT (kontrola) wykorzystano do transfekcji linii komórek Sf21, pochodzących z jajnika poczwarki *Spodoptera frugiperda*. Metoda transfekcji w systemie Bac-to-Bac

polega na połączeniu ujemnie naładowanego bakmidu z dodatnio naładowanymi fosfolipidami (tutaj: Cellfectin II Reagent), co prowadzi do utworzenia liposomów zawierających DNA. Cząstki te wykazują zdolność przenikania przez błony komórkowe, dzięki czemu związany z nimi materiał genetyczny jest efektywnie dostarczany do komórek. Po 5-godzinnej inkubacji komórek Sf21 z mieszaniną transfekcyjną, prowadzono kilkudniową hodowlę, aż do momentu pojawienia się infekcji wirusowej wywołanej przez rekombinowane bakulowirusy (Rozdział 3.2.12). Uzyskane w pierwszym pasażu bakulowirusy wykorzystano ponownie do drugiej i trzeciej infekcji komórek Sf21, aby zwiększyć miano cząstek wirusowych.

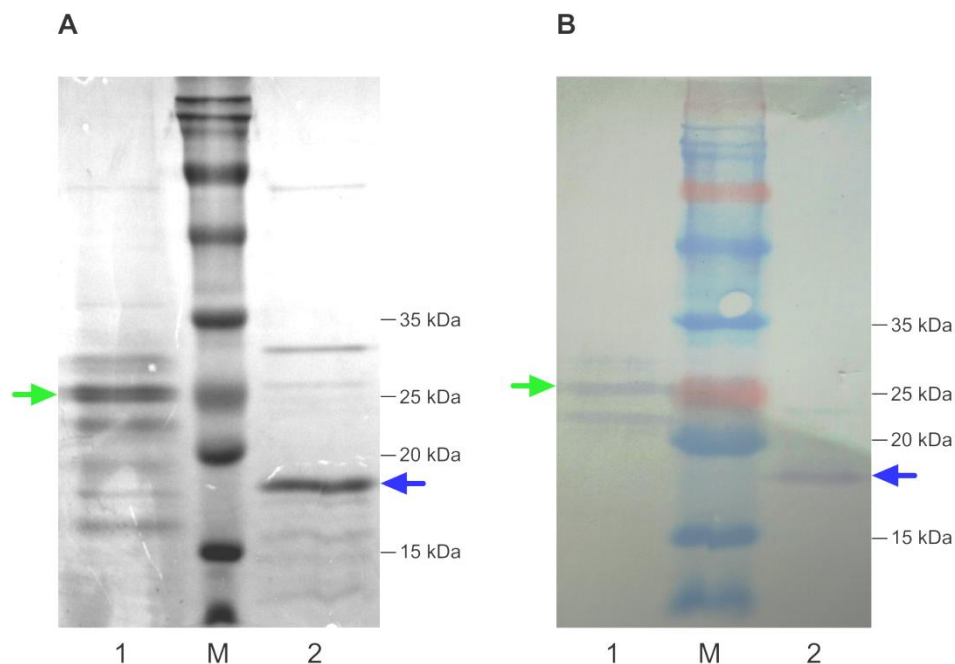
4.6.2. Produkcja i oczyszczanie białka TROSPA_NΔ50

Białko TROSPA_NΔ50 oraz CAT (kontrola) produkowano w komórkach High Five pochodzących z jajnika motyla *Trichoplusia ni*. Komórki te umożliwiają uzyskanie wyższego poziomu ekspresji rekombinowanego białka niż komórki z linii Sf21. Oprócz tego cechują się szybszym przyrostem biomasy (czas podwojenia 24h) niż Sf21 (czas podwojenia 30h). Hodowlę zawiesinową komórek High Five, zaszczepiono preparatem zawierającym rekombinowane bakulowirusy i wytrząsano przez 96h. Po zakończeniu hodowli komórki zbierano przez odwirowanie, przepłukiwano buforem PBS i zamrażano w -80°C (Rozdział 3.2.13.3).

Izolację białka TROSPA_NΔ50 rozpoczynano od zawieszenia osadu komórek bakteryjnych pochodzących z 50 ml hodowli (około 2×10^8 komórek) w buforze do lizy (Rozdział 3.1.8), zawierającym m. in. detergent Triton X-100 ($C_k = 1\%$), który w stężeniu 1% efektywnie rozpuszcza błony komórkowe. Następnie białko oczyszczano wykorzystując metodę chromatografii powinowactwa INiAC (Rozdział 3.2.13.5). Białko eluowano grawitacyjnie 10 ml buforu wymywającego (2 razy po 5 ml). Po wypłukaniu ze złoża, białko poddano trawieniu proteazą TEV podczas dializy, a następnie ponownie przesączono przez złożo chromatograficzne. Okazało się jednak, że etap ten powodował duże straty białka, dlatego też zdecydowano się na jego pominięcie. Otrzymany preparat zagęszczano przez ultrafiltrację. Analogicznie prowadzono oczyszczanie białka CAT.

Ze względu na obecność innych białek w preparacie, jako metodę detekcji wykorzystano *western blot*, z wykorzystaniem surowicy króliczej, zawierającej poliklonalne przeciwciała przeciwko pełnej długości białku TROSPA produkowanemu w systemie bakteryjnym. Na podstawie analizy wyników *western blot* na żelu poliakrylamidowym zidentyfikowano prążek odpowiadający białku TROSPA_NΔ50 (zaznaczono zieloną strzałką na Rycinie 4.9). Białko wycięto z żelu i poddano analizie spektrometrycznej MALDI-ToF w Zakładzie Biochemii Produktów Naturalnych Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN. W preparacie zidentyfikowano 22-aminokwasowy peptyd o masie 2359,021 Da z końca karboksylowego TROSPA_NΔ50, a tym samym stwierdzono obecność poszukiwanego białka. Analiza mas peptydów, powstałych po trawieniu TROSPA_NΔ50 trypsyną, za pomocą programu GlycoMod (ExpASy), wykazała obecność dwóch potencjalnie O-glikozylowanych peptydów o masie 2432,558 Da (51-58: LPLQLSPR) oraz 2807,175 Da (139-143: QFISK), w których dodatek reszty cukrowej do Ser56 i Ser142 zwiększałby masę TROSPA_NΔ50 o 3693,81 Da. Peptydy te nie zostały wykryte na widmach masowych białka TROSPA_NΔ50 produkowanego w bakteriach. Powyższy eksperyment wykonano w dwóch powtórzeniach tj. zebrano po dwa widma dla TROSPA_NΔ50 produkowanego w komórkach owadzych oraz dla TROSPA_NΔ50 produkowanego w komórkach bakteryjnych.

Produkcja TROSPA_NΔ50 w układzie eukariotycznym miała na celu uzyskanie białka modyfikowanego potranslacyjnie. Pokazano bowiem, że pełnej długości białko TROSPA wyizolowane z kleszcza *Ixodes scapularis* podlega glikozylacji. W następstwie tego procesu TROSPA o przewidywanej masie 16,1 kDa migruje w żelu PAA jak białko o masie około 55 kDa [108]. Analiza *western blot* wykazała, że uzyskane w komórkach eukariotycznych białko fuzyjne HisTag-TROSPA_NΔ50 o masie 15,40 kDa migruje jak białko o masie cząsteczkowej około 25 kDa. Dla porównania białko HisTag-TROSPA_NΔ50 produkowane w komórkach bakteryjnych (MW= 14,42 kDa) migruje jak białko o masie około 17 kDa (Rycina 4.9).



Rycina 4.9. Analiza preparatów TROSPA_NΔ50 otrzymanych po oczyszczaniu białek wyprodukowanych w komórkach owadzych lub bakteryjnych.

A. Wynik rozdziálu elektroforetycznego (SDS-PAGE) białek po oczyszczaniu metodą INiAC oraz **B.** ich analiza metodą *western blot*. W poszczególnych ścieżkach uwidoczono: 1 – białko TROSPA_NΔ50 o masie 15,40 kDa (zaznaczono zieloną strzałką) wyprodukowane w komórkach owadzych High Five; 2 - białko TROSPA_NΔ50 o masie 14,42 kDa wyprodukowane w *E. coli* BL21-Star (zaznaczono niebieską strzałką); M – wzorzec mas Perfect Color Protein Ladder.

4.6.3. Porównanie aktywności białka TROSPA_NΔ50 produkowanego w komórkach bakteryjnych oraz owadzych

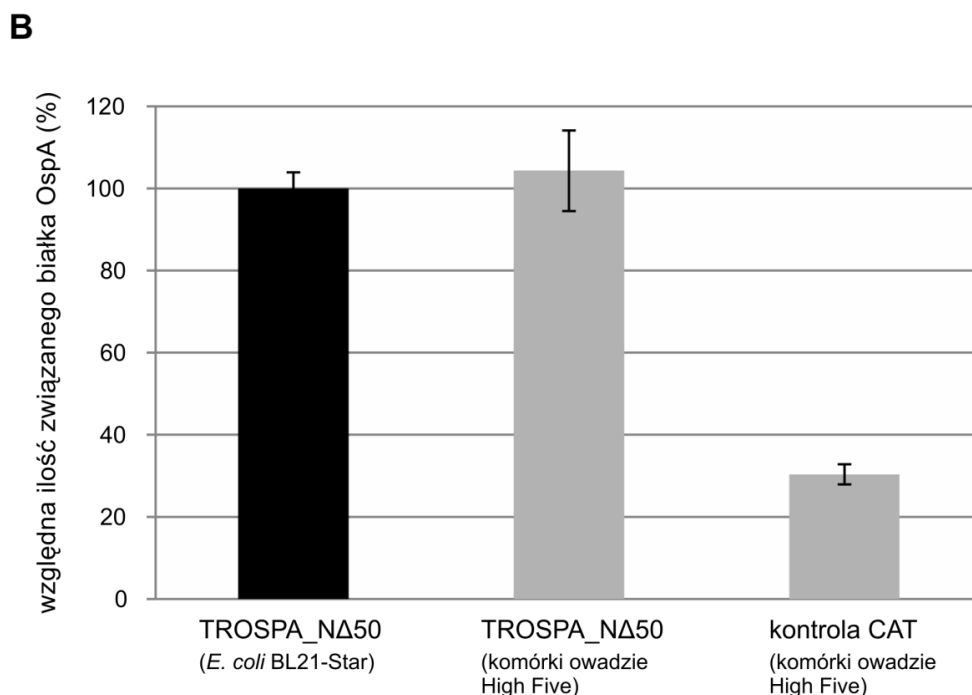
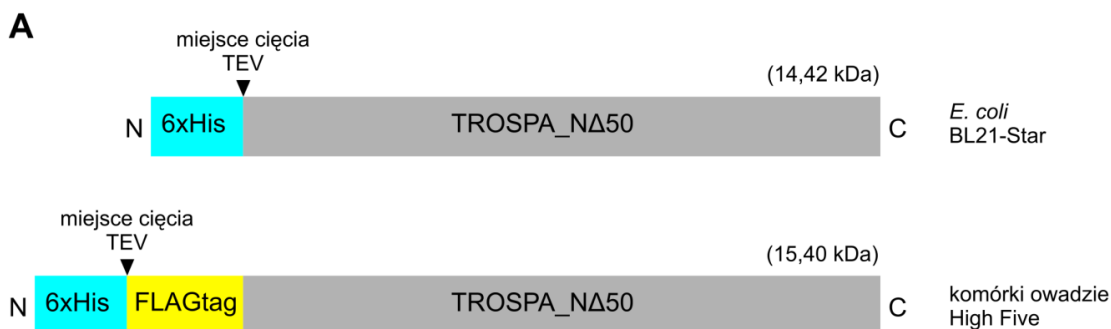
W celu porównania aktywności mutantów delecyjnych TROSPA_NΔ50 produkowanych w dwóch różnych systemach ekspresyjnych – prokariotycznym oraz eukariotycznym, wykonano testy immunoenzymatyczne ELISA zgodnie z procedurą zawartą w Rozdziale 3.2.14. Do badań wykorzystano skróconą formę białka – TROSPA_NΔ50 (Rycina 4.10A), ponieważ wcześniejsze badania pokazały, że mutant TROSPA_NΔ50 wykazuje zdolność pełnej długości białka TROSPA do wiązania białka OspA (Rozdział 4.4.3), a także fakt, iż usunięcie domeny transbłonowej znacząco ułatwia oczyszczanie białka.

W pierwszym etapie płytki 96-dołkowe opłaszczono: (i) białkiem TROSPA_NΔ50 produkowanym w systemie eukariotycznym, (ii) TROSPA_NΔ50 produkowanym w systemie prokariotycznym oraz (iii) białkiem CAT służącym jako kontrola. Następnie dodawano białko OspA pochodzące z

B. burgdorferi w stężeniach od 250 do 0,2 µg/ml (kolumny od 2 do 12). W kolejnym etapie oceniano efektywność wiązania białka OspA z wykorzystaniem przeciwciał I-rzędowych anty-OspA (Rozdział 3.1.7) oraz II-rzędowych sprzężonych z AP. Podobnie jak we wcześniejszych eksperymentach stężenie produktu reakcji katalizowanej przez AP określano spektrofotometrycznie.

Wszystkie eksperymenty wykonano w 8 powtórzeniach technicznych i 2 biologicznych dla obydwu wariantów białka TROSPA_NΔ50, próby kontrolnej CAT oraz dla każdego z 11 stężeń białka OspA. Normalizację oraz analizę wyników pomiarów spektrofotometrycznych prowadzono zgodnie z protokołem przedstawionym w Rozdziale 4.2.1, traktując wartość absorbancji uzyskaną dla pary białek TROSPA_NΔ50 (produkowanego w *E. coli*) oraz OspA z *B. burgdorferi* jako wartość referencyjną (100%). Wyniki testów immunoenzymatycznych ELISA przedstawiono na Rycinie 4.10B.

Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że niezależnie od tego czy białko zostało wyprodukowane w komórkach owadzych, czy w *E. coli*, TROSPA_NΔ50 z podobną efektywnością wiąże bakteryjne białko OspA ($p=0,2644$).



Rycina 4.10. Porównanie zdolności białka TROSPA_NΔ50 produkowanego w komórkach bakteryjnych oraz owadzie do wiązania białka OspA.

A. Schematyczne przedstawienie TROSPA_NΔ50 produkowanego w komórkach owadzie oraz w *E. coli*. Kolorem turkusowym zaznaczono znacznik HisTag, natomiast kolorem żółtym - znacznik FLAGtag. **B.** Porównanie efektywności wiązania białka OspA przez dwa warianty białka TROSPA_NΔ50 – produkowany w komórkach bakteryjnych lub owadzie. Obydwa warianty TROSPA_NΔ50 oraz białko CAT (kontrola) zostały unieruchomione na płytce, a następnie inkubowane z OspA. Ilość związanego OspA badano za pomocą przeciwciał I-rzędowych specyficznych wobec OspA oraz II-rzędowych sprzężonych z AP. Po dodaniu substratu dla AP, stężenie produktu reakcji katalizowanej przez enzym mierzono spektrofotometrycznie. Każdy słupek przedstawia średnią względną absorbancję z 16 reakcji wraz z odchyleniem standardowym dla stężenia białka OspA wynoszącego 30 μg/ml. Średnią względną absorbancję (wyrażoną w %) dla każdej z 3 par białek obliczono poprzez podzielenie średniej absorbancji przez absorbancję zmierzoną dla kompleksu utworzonego przez TROSPA_NΔ50 z *E. coli* i OspA (próba referencyjna – 100%; czarny słupek). Różnica w ilości związanego białka OspA pomiędzy TROSPA_NΔ50 produkowanym w *E. coli* i w komórkach owadzie była statystycznie nieistotna ($p=0,2644$).

4.7. Badania struktury białka TROSPA oraz kompleksu TROSPA-OspA

Do badań strukturalnych wybrano mutanty delecyjne TROSPA, które wiązały białko OspA na tym samym poziomie co pełnej długości TROSPA, charakteryzowały się dobrą rozpuszczalnością i występowały w roztworze w formie monomerycznej.

4.7.1. Przesiewowe testy krystalizacyjne mutantów delecyjnych TROSPA

Do testów krystalizacyjnych wybrano 3 mutanty delecyjne TROSPA: TROSPA_N Δ 44, TROSPA_N Δ 44_C Δ 7 oraz TROSPA_N Δ 50_C Δ 7. Białka te wyprodukowano w *E. coli* BL-21 Star, a następnie oczyszczono zgodnie z procedurą zamieszczoną w Rozdziale 4.4.2. Białko TROSPA_N Δ 44 zagęszczono do stężenia 10 mg/ml, natomiast białka TROSPA_N Δ 44_C Δ 7 oraz TROSPA_N Δ 50_C Δ 7 zagęszczono do około 4,5 mg/ml. Tak przygotowane preparaty wykorzystano do testów krystalizacyjnych wykonywanych metodą kropli siedzącej przy użyciu robota (Rozdział 3.2.15).

Testy krystalizacyjne przeprowadzono z wykorzystaniem zestawów: JCSG-plus, Morpheus, PACT premier, MIDAS, PEG/Ion HT, oraz Index HT (Rozdział 3.1.6). W wyniku prowadzonych około 6 miesięcy obserwacji nie stwierdzono tworzenia się kryształów białek w żadnej z 576 mieszanin. W większości kropeł formował się jedynie ciężki, amorficzny strąk białka (Rycina 4.11) [220].

Nieudane próby uzyskania kryształów białka skłoniły nas do zastosowania szeregu metod pozwalających scharakteryzować strukturę biomolekuł w roztworze. W tym celu można posłużyć się metodami takimi jak małokątowe rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego (SAXS), spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), spektroskopia dichroizmu kołowego (CD), spektroskopia fourierowska w podczerwieni (FT-IR), dynamiczne rozpraszanie światła (DLS) oraz wieloma innymi [221].



Rycina 4.11. Ciężki, amorficzny strąć białka TROSPA_NΔ44.

4.7.2. Pomiary dynamicznego rozpraszania światła

Pomiary dynamicznego rozpraszania światła (DLS, ang. *Dynamic Light Scattering*) umożliwiają wyznaczenie promienia hydrodynamicznego (R_h) cząsteczek poprzez analizę zmian intensywności światła rozproszonego przez molekuly ulegające w roztworze ruchom Browna. Związek pomiędzy szybkością ruchów Browna cząstek oraz ich R_h jest opisany za pomocą równania Stokesa-Einsteina:

$$D = k_B T / (6\pi\eta R_h),$$

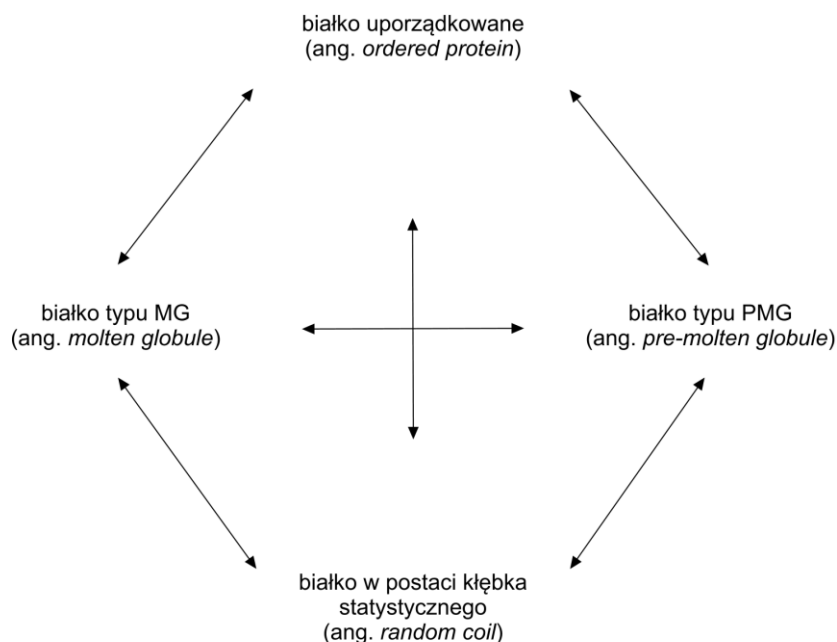
gdzie D – współczynnik dyfuzji, k_B – stała Boltzmann'a, T – temperatura, η - lepkość rozpuszczalnika.

DLS pozwala ocenić, czy w próbce występują zagregowane formy białka [222,223]. Za pomocą DLS można również zbadać stabilność termiczną białka oraz wyznaczyć jego temperaturę topnienia T_m (ang. *melting point*). T_m oznacza temperaturę, przy której następuje denaturacja termiczna oraz agregacja cząsteczek białka, mierzona gwałtownym wzrostem wartości R_h [224].

Zmiany wartości R_h wraz ze wzrastającym stężeniem związku denaturującego, takiego jak mocznik oraz chlorowodorek guanidyny (GuHCl), niosą ze sobą informację na temat struktury białka. Dla białek posiadających stabilną strukturę trzeciorzędową krzywa denaturacyjna, która opisuje wzrost wartości R_h w zależności od stężenia GuHCl oraz mocznika, ma duże

nachylenie oraz sigmoidalny kształt [225]. Denaturacja białek globularnych za pomocą GuHCl oraz mocznika często przebiega w co najmniej dwóch etapach: (i) ze stanu uporządkowanego (natywnego) do konformacji podobnej do stopionej globuli (MG; ang. *molten globule-like*) oraz (ii) ze stanu MG do konformacji kłębka statystycznego (Rycina 4.12) [225].

Z drugiej strony dla białek nieuporządkowanych o charakterystyce podobnej do konformacji stopionej globuli typu PMG (ang. *premolten globule-like*), będącego stanem przejściowym pomiędzy MG a kłębką statystycznym krzywa denaturacyjna ma małe nachylenie oraz może cechować się brakiem wyraźnie zarysowanego sigmoidalnego kształtu [226–228].



Rycina 4.12. Model kwartetu białkowego

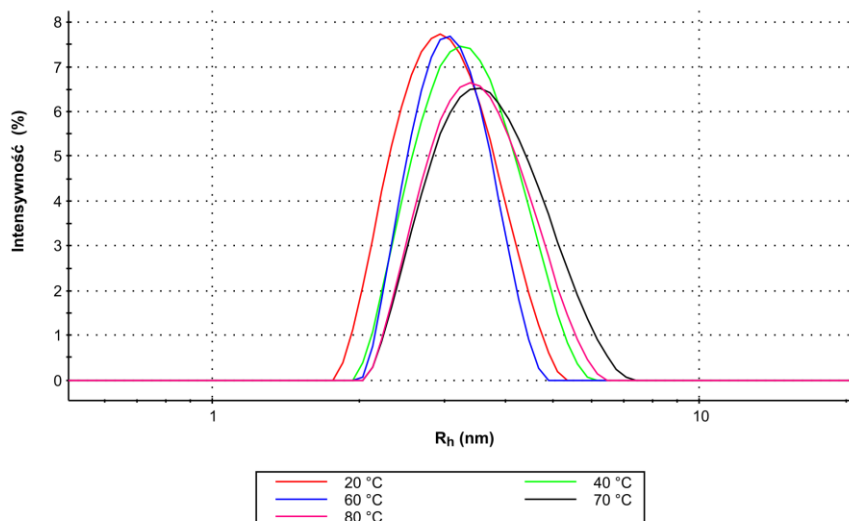
Zgodnie z modelem kwartetu białkowego funkcja białka może wynikać z czterech różnych stanów organizacji jego struktury przestrzennej (formy ustrukturyzowanej, konformacji stopionej globuli typu MG oraz PMG, a także kłębka statystycznego) oraz wzajemnych przekształceń pomiędzy każdą z konformacji [229,230].

Pomiary DLS wykazały, że białko TROSPA_NΔ44 nie tworzy agregatów. Podczas denaturacji termicznej w zakresie temperatur od 4°C do 80°C (pH 7,9) R_h białka TROSPA_NΔ44 wahał się w granicach od 2,91 nm do 3,45 nm (Rycina 4.13A i B). W warunkach fizjologicznych temperatury (4°C – 37°C) średni R_h wynosił 3,22 nm. Powyższe wartości R_h odpowiadają masie

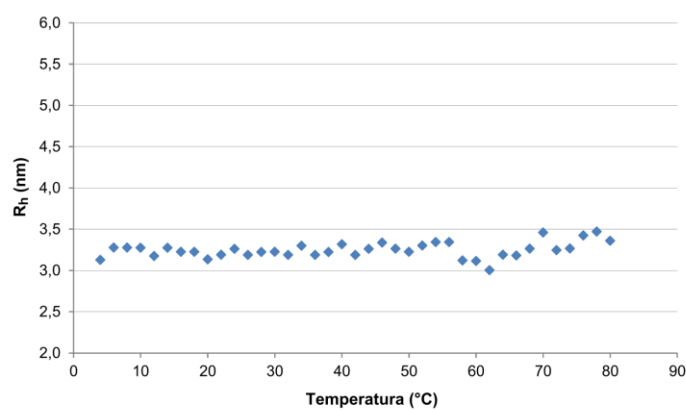
molekularnej wynoszącej odpowiednio od 41 kDa do 61 kDa dla hipotetycznego białka globularnego [223]. TROSPA_NΔ44 ma zatem prawie 2 razy większy R_h niż białko globularne o podobnej masie (R_h białka globularnego o masie 12,53 kDa wynosi około 1,75 nm). Tak duży R_h w stosunku do relatywnie niskiej masy molowej świadczy o małym stopniu upakowania łańcucha polipeptydowego, co jest charakterystyczne dla białek nieuporządkowanych o konformacji stopionej globuli typu PMG (ang. *premolten globule-like*) lub kłębka statystycznego [231]. Co więcej, w badanym przedziale temperatur (4°C – 80°C) nie doszło do denaturacji termicznej i agregacji białka, o czym świadczy brak znaczącego wzrostu wartości R_h . Wskazuje to na jego stabilność termiczną, która również jest jedną z cech białek pozbawionych stabilnej struktury trzeciorzędowej [227,232].

Podczas denaturacji chemicznej białka za pomocą mocznika lub GuHCl R_h TROSPA_NΔ44 wzrastał wraz ze wzrostem stężenia związku denaturującego od 2,87 nm przy braku mocznika do 4,89 nm w buforze z mocznikiem o stężeniu wynoszącym 8,75 M oraz od 2,89 nm przy braku GuHCl do 4,87 nm w 7 M GuHCl (Rycina 4.13C). Podczas denaturacji TROSPA_NΔ44 w moczniku oraz GuHCl krzywa denaturacyjna wykazywała monotoniczny wzrost. Dodatkowo, w przypadku denaturacji TROSPA_NΔ44 w moczniku zaobserwowano podwójnie sigmoidalny kształt krzywej denaturacyjnej, co może świadczyć o stopniowej denaturacji ustrukturyzowanych fragmentów TROSPA_NΔ44 [227].

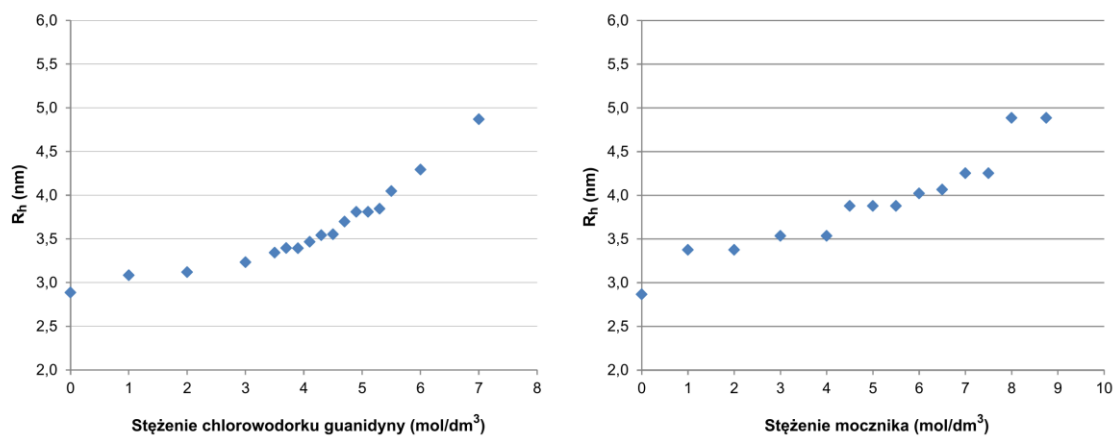
A



B



C

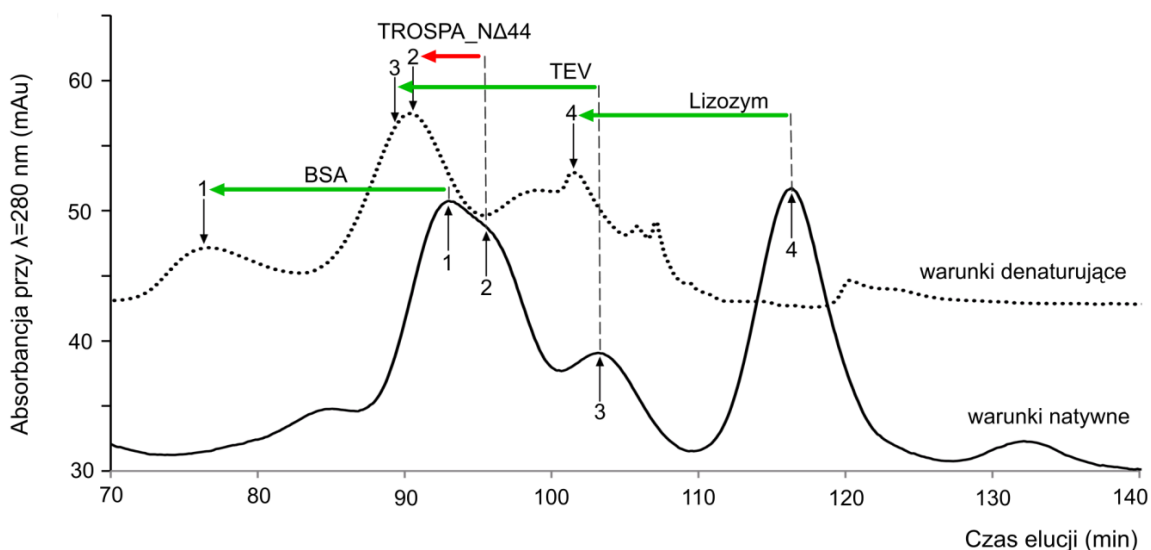


Rycina 4.13. Zmiany R_h białka TROSPA_N Δ 44 w zależności od temperatury lub obecności związku denaturującego.

A., **B.** Rozkład wielkości R_h TROSPA_N Δ 44 w różnych temperaturach. **C.** Krzywe denaturacyjne opisujące wymiary hydrodynamiczne TROSPA_N Δ 44 w funkcji stężenia GuHCl lub mocznika. Wartości R_h na wykresach w punkcie B i C stanowią wartość średnią uzyskaną z pomiarów przeprowadzonych w 2 powtórzeniach biologicznych oraz 13 technicznych.

4.7.3. Sączenie molekularne białka TROSPA_NΔ44 w warunkach natywnych i denaturujących

W celu porównania rozmiarów białka TROSPA_NΔ44 w roztworze z białkami o znanej strukturze, przeprowadzono chromatografię sitową (sączenie molekularne; SEC), która pozwala rozdzielić cząsteczki w zależności od ich rozmiarów hydrodynamicznych. Rozdział chromatograficzny białek przeprowadzono w obecności czynnika redukującego TCEP, aby zapobiec tworzeniu niespecyficznym mostków dwusiarczkowych pomiędzy resztami Cys155, w warunkach natywnych oraz denaturujących (8 M mocznik) (Rozdział 3.2.13.5). Jako wzorce zastosowano trzy białka globularne: surowiczą albuminę wołową (BSA, ang. *bovine serum albumin*), proteazę TEV oraz lizozym (Rycina 4.14).



Rycina 4.14. Chromatogram przedstawiający profil elucyjny białka TROSPA_NΔ44 oraz 3 molekularnych wzorców w warunkach natywnych (linia ciągła) oraz denaturujących (linia kropkowana).

Czarne strzałki wskazują czas wypływu białek z kolumny: 1- surowicza albumina wołowa (BSA; MW= 66,5 kDa) - monomer, 2- TROSPA_NΔ44 (MW= 12,53 kDa), 3- proteaza TEV (MW= 27 kDa), 4- lizozym (MW= 14,3 kDa). Różnicę w czasie elucji białka w warunkach natywnych i denaturujących zaznaczono czerwoną (TROSPA_NΔ44) lub zieloną strzałką (BSA, TEV, Lizozym). Warunki natywne: 25 mM Tris-HCl pH 7,9; 200 mM NaCl; 1 mM TCEP pH 7,9; Warunki denaturujące: 25 mM Tris-HCl pH 7,9; 200 mM NaCl; 1 mM TCEP pH 7,9; 8 M mocznik. Analizę frakcji prowadzono za pomocą SDS-PAGE.

Podczas sączenia molekularnego białek w warunkach natywnych TROSPA_NΔ44 (12,53 kDa) wypływała z kolumny zaraz za BSA (66,5 kDa), natomiast znacznie szybciej niż proteaza TEV (27 kDa), która posiada ponad dwukrotnie większą masę, czy też lizozym (14,3 kDa) o masie molowej zbliżonej do TROSPA_NΔ44. Oznacza to, że TROSPA_NΔ44 migrowała w kolumnie jak białko globularne o masie wynoszącej około 50 – 60 kDa, co pokrywa się z wynikami DLS i świadczy o zwiększonej objętości hydrodynamicznej i małej gęstości białka (Rozdział 4.7.2). Co więcej, sączenie molekularne TROSPA_NΔ44 w warunkach nieredukujących (bez TCEP) wykazało, że niewielka frakcja białka tworzy dimery, które powstają najprawdopodobniej wskutek formowania niespecyficznych mostków disiarczkowych pomiędzy umiejscowionymi na powierzchni białka resztami cysteiny (dane niezamieszczone w tej pracy).

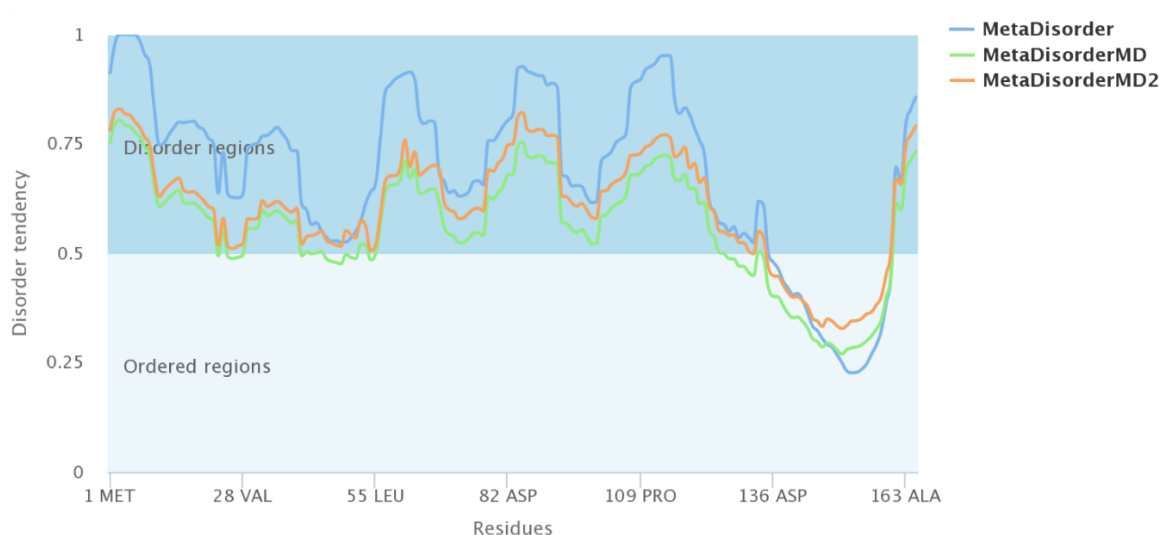
Aby sprawdzić, czy duże rozmiary hydrodynamiczne TROSPA_NΔ44 nie wynikają z oligomeryzacji cząsteczek białka przeprowadzono sączenie molekularne w warunkach redukujących i denaturujących (Rycina 4.14). Szczegółowa analiza frakcji za pomocą SDS-PAGE wykazała, że TROSPA_NΔ44 nie tworzy oligomerów. Ponadto, okazało się, że BSA, TEV oraz lizozym w wyniku denaturacji wypływały z kolumny około 14-16 minut wcześniej niż w warunkach natywnych, podczas gdy dla TROSPA_NΔ44 różnica ta wynosiła około 5 minut. Wynika z tego, że TROSPA_NΔ44 ulega denaturacji w niewielkim stopniu, co świadczy o obecności w TROSPA_NΔ44 szczątkowej struktury, która ulega całkowitemu rozpadowi pod wpływem 8 M mocznika.

4.7.4. Analiza sekwencji aminokwasowej TROSPA metodami bioinformatycznymi

4.7.4.1. Przewidywanie stopnia nieuporządkowania

Zaobserwowane podczas pomiarów DLS (Rozdział 4.7.2) oraz chromatografii żelowej (Rozdział 4.7.3) zwiększone wartości parametrów hydrodynamicznych TROSPA_NΔ44 (R_h , objętość hydrodynamiczna) wskazują na nieuporządkowanie jego łańcucha polipeptydowego. W celu identyfikacji rejonów nieustrukturyzowanych w TROSPA zastosowano przewidywanie stopnia nieuporządkowania białka na podstawie jego sekwencji aminokwasowej przy użyciu serwera MetaDisorder. Narzędzie to dokonuje metaanalizy danych wygenerowanych przez 13 programów służących do przewidywania rejonów białka, które nie posiadają stabilnej struktury trzeciorzędowej: DisEMBL [233], DISOPRED2 [234], DISpro [235], Globplot [236], iPDA [237], IUPred [238], PDISORDER [239], Poodle-S [240], Poodle-L [241], PrDOS [242], Spritz [243], DisPSSMP [244] oraz RONN [245]. Skuteczność algorytmu MetaDisorder została potwierdzona w międzynarodowych zawodach CASP8 oraz CASP9 (ang. *Critical Assessment of protein Structure Prediction*).

Wynik przeprowadzonej analizy wskazuje, że TROSPA jest białkiem w większości pozbawionym stabilnej struktury trzeciorzędowej i można je zaliczyć do białek inherentnie nieuporządkowanych – IDP (ang. *Intrinsically Disordered Proteins*) (Rycina 4.15). Stopień nieuporządkowania białka w zależności od użytej metody wynosi od 72% do 84%. Ustrukturyzowany rejon TROSPA znajduje się w pobliżu końca karboksylowego białka i obejmuje odcinek od Val-126 lub Thr-135 do Gln-160. Wyniki te pokrywają się z faktem, iż ponad 55% reszt aminokwasowych wchodzących w skład zewnątrzkomórkowej części TROSPA postrzeganych jest jako faworyzujące stan strukturalnego nieporządku (ang. *disorder-promoting*; Arg, Gly, Gln, Ser, Glu, Lys, Pro oraz Ala), natomiast tylko 21% reszt to tzw. aminokwasy sprzyjające uporządkowaniu (ang. *order-promoting*; Ile, Leu, Val, Trp, Tyr, Phe, Cys oraz Asn) [246].



Rycina 4.15. Wykres prezentujący prawdopodobieństwo wystąpienia rejonów nieuporządkowanych w białku TROSPA.

Przewidywania stopnia nieuporządkowania białka przeprowadzono za pomocą programu MetaDisorder, z wykorzystaniem trzech algorytmów [209]. Wartość prawdopodobieństwa powyżej 0,5 wskazuje na tendencję do tworzenia w danym rejonie fragmentów nieustrukturyzowanych.

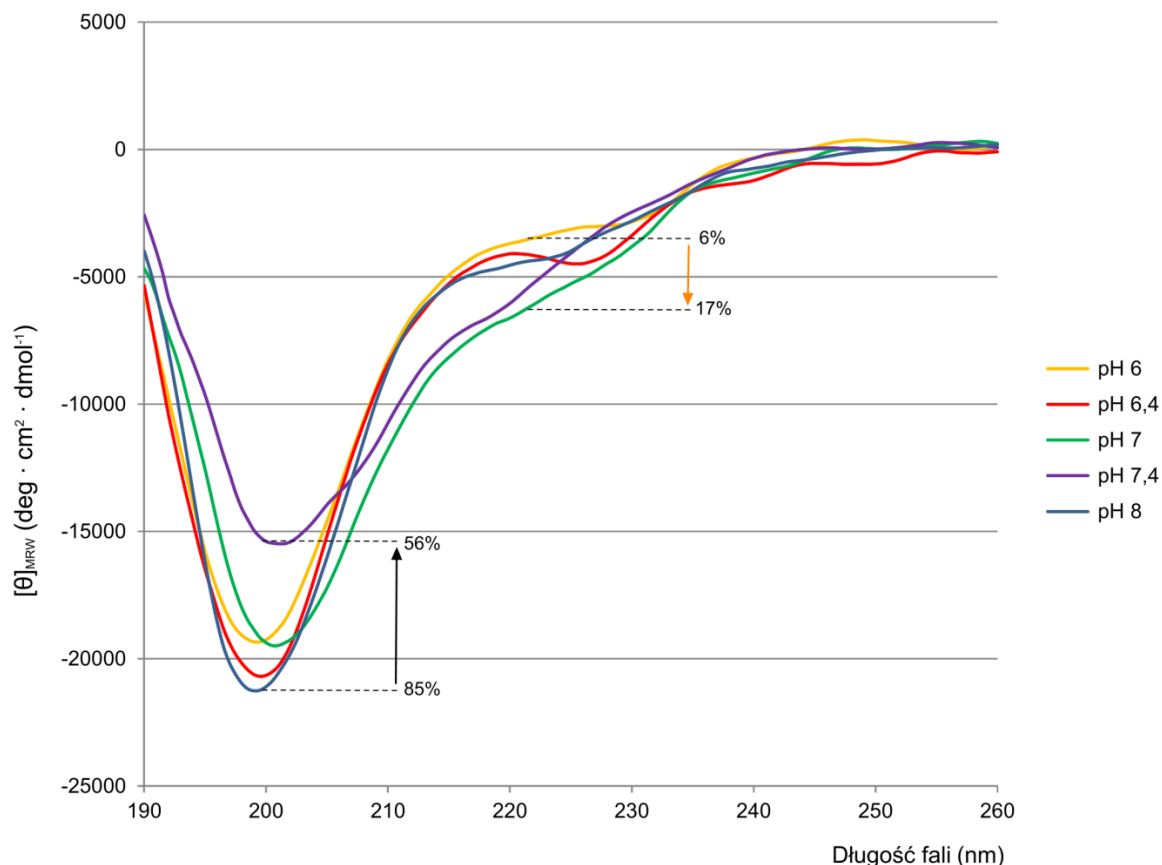
4.7.4.2. Analiza hydrofobowości, średniego wypadkowego ładunku oraz punktu izoelektrycznego

Białka IDP charakteryzują się niską hydrofobowością oraz stosunkowo wysokim wypadkowym ładunkiem w pH 7, z czego wynika skrajnie niska lub skrajnie wysoka wartość punktu izoelektrycznego (pI) [247,248]. W celu wyznaczenia powyższych parametrów dla TROSPA oraz TROSPA_NΔ44, dokonano obliczenia średniej hydrofobowości (ang. *mean hydrophobicity*), średniego wypadkowego ładunku (ang. *mean net charge*) oraz pI dla obydwu białek. Średnią hydrofobowość obliczano poprzez zsumowanie hydrofobowości wszystkich aminokwasów znormalizowanej w skali od 0 do 1 (znormalizowano metodą opisaną przez Kyte i Doolittle [249], za pomocą programu ProtScale [210]), a następnie podzielenie uzyskanej sumy przez całkowitą liczbę aminokwasów w białku. Natomiast średni wypadkowy ładunek obliczano przez podzielenie wypadkowego ładunku białka w pH 7,0 przez liczbę jego aminokwasów. Teoretyczną wartość pI wyznaczano przy użyciu programu Compute pI/Mw [210].

Uzyskane wartości średniej hydrofobowości i średniego wypadkowego ładunku dla TROSPA oraz TROSPA_NΔ44 wyniosły odpowiednio 0,5268 i 0,077 oraz 0,4999 i 0,065. Otrzymane wyniki stanowią wartości pośrednie pomiędzy wartościami charakterystycznymi dla białek ustrukturyzowanych oraz IDP. Z drugiej strony pI dla TROSPA oraz TROSPA_NΔ44 wyniosły odpowiednio 3,83 i 4,03, które stanowią wartości typowe dla białek inherentnie nieuporządkowanych [247,250].

4.7.5. Analiza struktury TROSPA_NΔ44 metodą dichroizmu kołowego

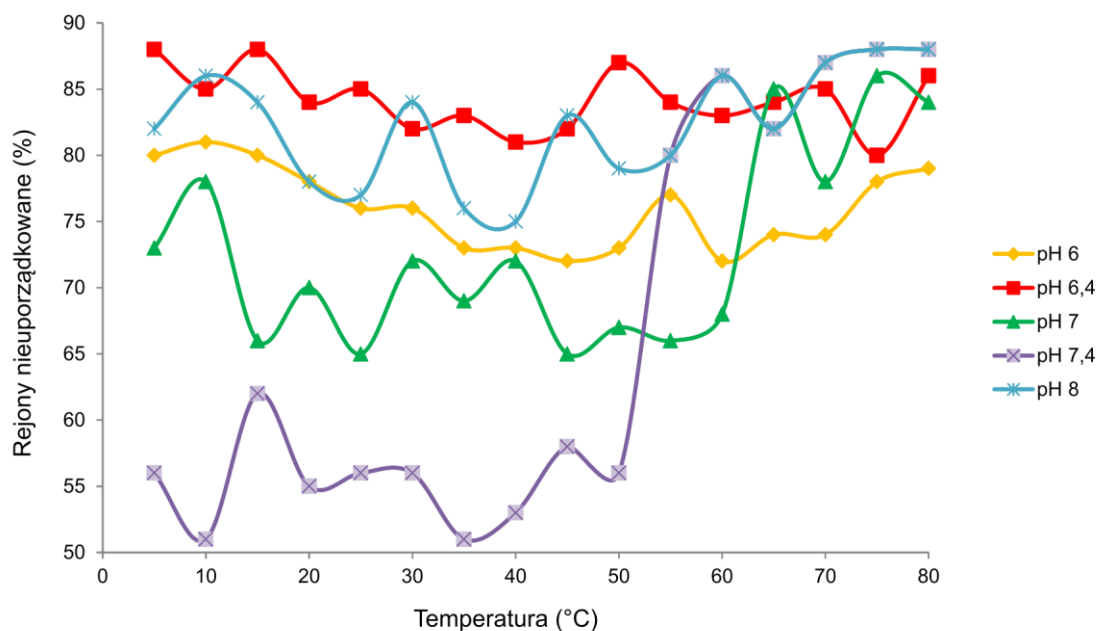
W celu scharakteryzowania zawartości struktur drugorzędowych w białku TROSPA_NΔ44 przeprowadzono pomiary dichroizmu kołowego (CD) w roztworach o różnym pH, w zakresie temperatur od 5°C do 80°C. Wartość średniej eliptyczności molowej na resztę aminokwasową $[\theta]_{MRW}$ przy długości fali około 200 nm traktowano jako wskaźnik zawartości rejonów nieuporządkowanych w białku, natomiast sygnał $[\theta]_{MRW}$ przy $\lambda=222$ nm stanowił miarę zawartości helisy α [251]. We wszystkich badanych warunkach pH oraz temperatury widma TROSPA_NΔ44 wykazywały silny sygnał negatywny przy długości fali 200 nm, co świadczy o wysokim stopniu nieuporządkowania jego łańcucha polipeptydowego. Co więcej, obserwowany w zakresie pH 8 – 7,4 wzrost wartości $[\theta]_{200}$ z -21100 do -15400 deg · cm² · dmol⁻¹ oznacza, że maleje ilość rejonów nieustrukturyzowanych w białku (Rycina 4.16). Jednocześnie zaobserwowano wzrost zawartości helisy α w pH 7 oraz 7,4, o czym świadczy malejąca wartość $[\theta]_{222}$: z -3500 do -6100 deg · cm² · dmol⁻¹. Oznacza to, że TROSPA_NΔ44 w zależności od pH środowiska przechodzi dynamicznie z konformacji kłębka statystycznego (ang. *random coil*) do struktury stopionej globuli typu PMG (ang. *premolten globule*) [229].



Rycina 4.16. Widmo dichroizmu kołowego (CD) dla TROSPA_NΔ44 w zależności od pH, w temperaturze 25°C.

Średnią eliptyczność molową na resztę aminokwasową $[\theta]_{MRW}$ ($\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$) przedstawiono w funkcji długości fali λ . Intensywny sygnał negatywny w okolicach $\lambda=200$ nm świadczy o wysokiej zawartości rejonów nieuporządkowanych w białku, podczas gdy sygnał przy $\lambda=222$ nm jest wyznacznikiem obecności helis α . W pH 7,4 wartość $[\theta]_{200}$ znacząco rośnie, co jest sygnałem porządkowania się białka (zmniejsza się stopień nieuporządkowania z 85 do 56% - czarna strzałka). Z kolei $[\theta]_{222}$ osiąga najniższe wartości w pH 7 oraz 7,4, co świadczy o zwiększeniu zawartości helis α w strukturze TROSPA_NΔ44 w danym zakresie pH (z 6 do 17% - pomarańczowa strzałka). Procenty oznaczają zawartość struktur drugorzędowych obliczoną w programie CONTIN-LL.

Aby szczegółowo określić udział struktur drugorzędowych w białku TROSPA_NΔ44 przeprowadzono analizę widm CD w programie CONTIN-LL. Program ten wybrano z uwagi na jego wysoką skuteczność dla białek nieustrukturyzowanych [252]. Stwierdzono, że w pH zbliżonym do fizjologicznego (pH 7 oraz 7,4) następuje wzrost ustrukturyzowania TROSPA_NΔ44, co powoduje, że blisko połowa białka zawiera elementy struktury drugorzędowej (Rycina 4.17 oraz Tabela 4.7).



Rycina 4.17. Procentowa zawartość rejonów nieuporządkowanych w TROSPA_NΔ44, w zależności od pH oraz temperatury.

Obliczono na podstawie wyników CD za pomocą programu CONTIN-LL dostępnego na serwerze DICHROWEB.

Tabela 4.7. Procentowa zawartość struktur drugorzędowych w białku TROSPA_NΔ44 w środowisku o różnym pH w zakresie temperatur od 5°C do 80°C.

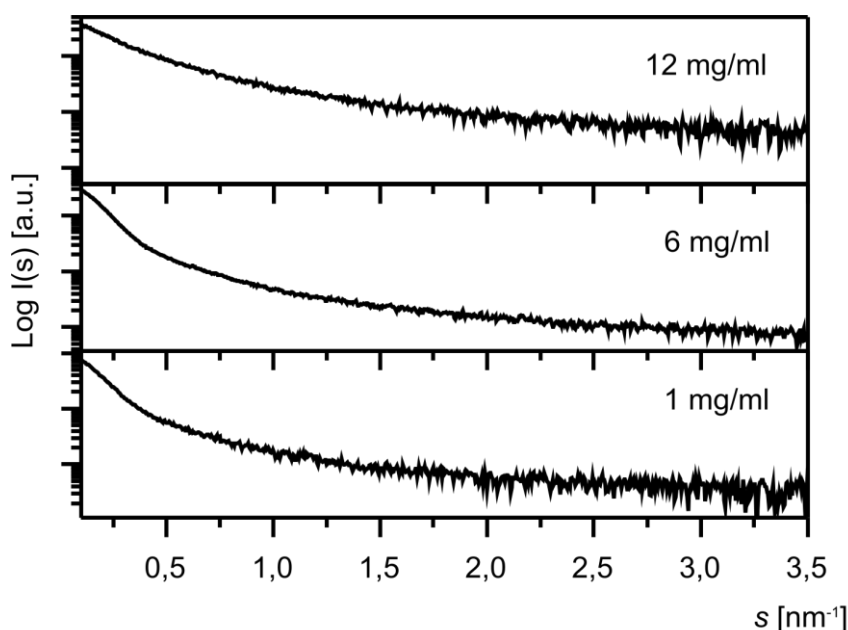
Obliczono za pomocą programu CONTIN-LL dostępnego na serwerze DICHROWEB wykorzystując zestaw danych dla 48 białek. Wszystkie wartości znormalizowanego średniego odchylenia kwadratowego (ang. *normalized root mean square deviation*) mieściły się w akceptowalnych granicach $<0,1$ i wynosiły średnio 0,047.

T (°C)	Helisa α (%)					Harmonijka β (%)					Zwrot (%)					Rejony nieuporządkowane (%)				
	pH 6	pH 6,4	pH 7	pH 7,4	pH 8	pH 6	pH 6,4	pH 7	pH 7,4	pH 8	pH 6	pH 6,4	pH 7	pH 7,4	pH 8	pH 6	pH 6,4	pH 7	pH 7,4	pH 8
5	4	5	8	10	4	8	2	7	19	7	8	5	12	15	7	80	88	73	56	82
10	4	6	7	10	5	9	5	5	22	4	7	4	10	17	5	81	85	78	51	86
15	5	5	8	8	4	8	3	12	14	6	7	5	14	16	6	80	88	66	62	84
20	6	6	9	10	7	9	5	9	19	7	8	6	13	16	7	78	84	70	55	78
25	6	6	17	10	8	10	3	5	18	9	9	6	13	16	7	76	85	65	56	77
30	6	6	9	8	5	10	6	7	18	3	8	6	13	18	8	76	82	72	56	84
35	7	6	9	16	7	11	4	9	17	12	10	7	13	16	6	73	83	69	51	76
40	7	7	8	15	8	11	6	7	16	10	9	7	13	16	7	73	81	72	53	75
45	7	6	17	13	6	11	5	5	12	4	10	7	14	17	8	72	82	65	58	83
50	7	6	16	13	7	11	3	5	14	9	9	4	12	17	6	73	87	67	56	79
55	7	6	16	6	6	8	6	6	5	5	8	4	12	9	9	77	84	66	80	80
60	8	6	17	4	4	11	5	3	4	4	9	6	12	6	6	72	83	68	86	86
65	7	7	7	7	7	10	4	2	4	4	10	5	6	7	7	74	84	85	82	82
70	8	6	15	7	7	11	3	1	2	2	8	6	6	5	5	74	85	78	87	87
75	7	7	7	5	5	7	7	0	2	2	9	6	7	4	4	78	80	86	88	88
80	7	6	7	5	5	7	4	0	5	5	7	4	8	2	2	79	86	84	88	88

4.7.6. Analiza struktury TROSPA_NΔ44 metodą małokątowego rozpraszania promieni rentgenowskich (SAXS)

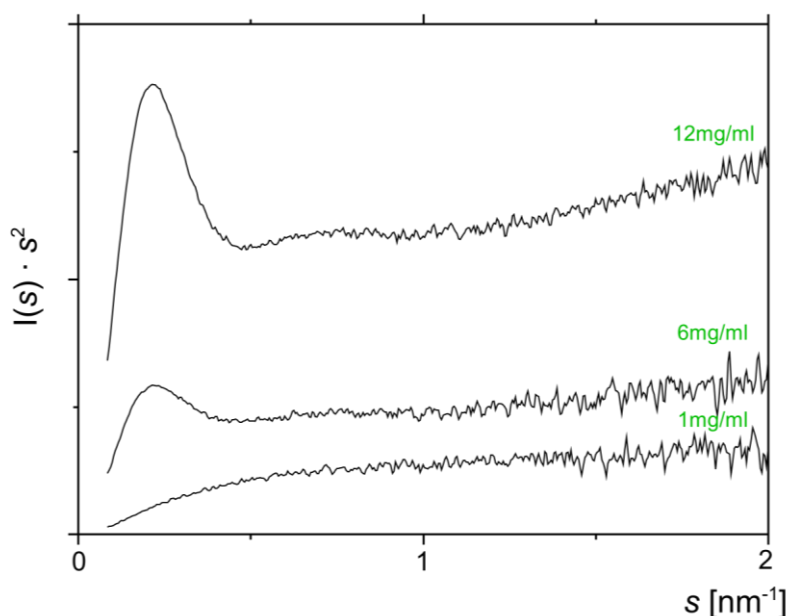
Małokątowe rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego (ang. *Small Angle X-ray Scattering* - SAXS) jest powszechnie używaną techniką umożliwiającą badanie struktury białka w roztworze. Eksperyment SAXS, polega na naświetleniu promieniowaniem rentgenowskim o długości ok. 1 Å kapilary, w której znajduje się badany roztwór. Intensywność promieniowania rozproszonego jest rejestrowana w funkcji wektora rozpraszania s ($s=4\pi\sin\theta/\lambda$), gdzie 2θ jest kątem pomiędzy promieniowaniem padającym, a rozproszonym, natomiast λ stanowi długość fali promieniowania rentgenowskiego. W analizie SAXS wykorzystuje się efekt rozpraszania przez biocząsteczki, dlatego od intensywności rozpraszania badanej próbki odejmuje się intensywność rozpraszania rozpuszczalnika [253].

Krzywe rozpraszania SAXS dla białka TROSPA_NΔ44 pokazano na Rycinie 4.18.



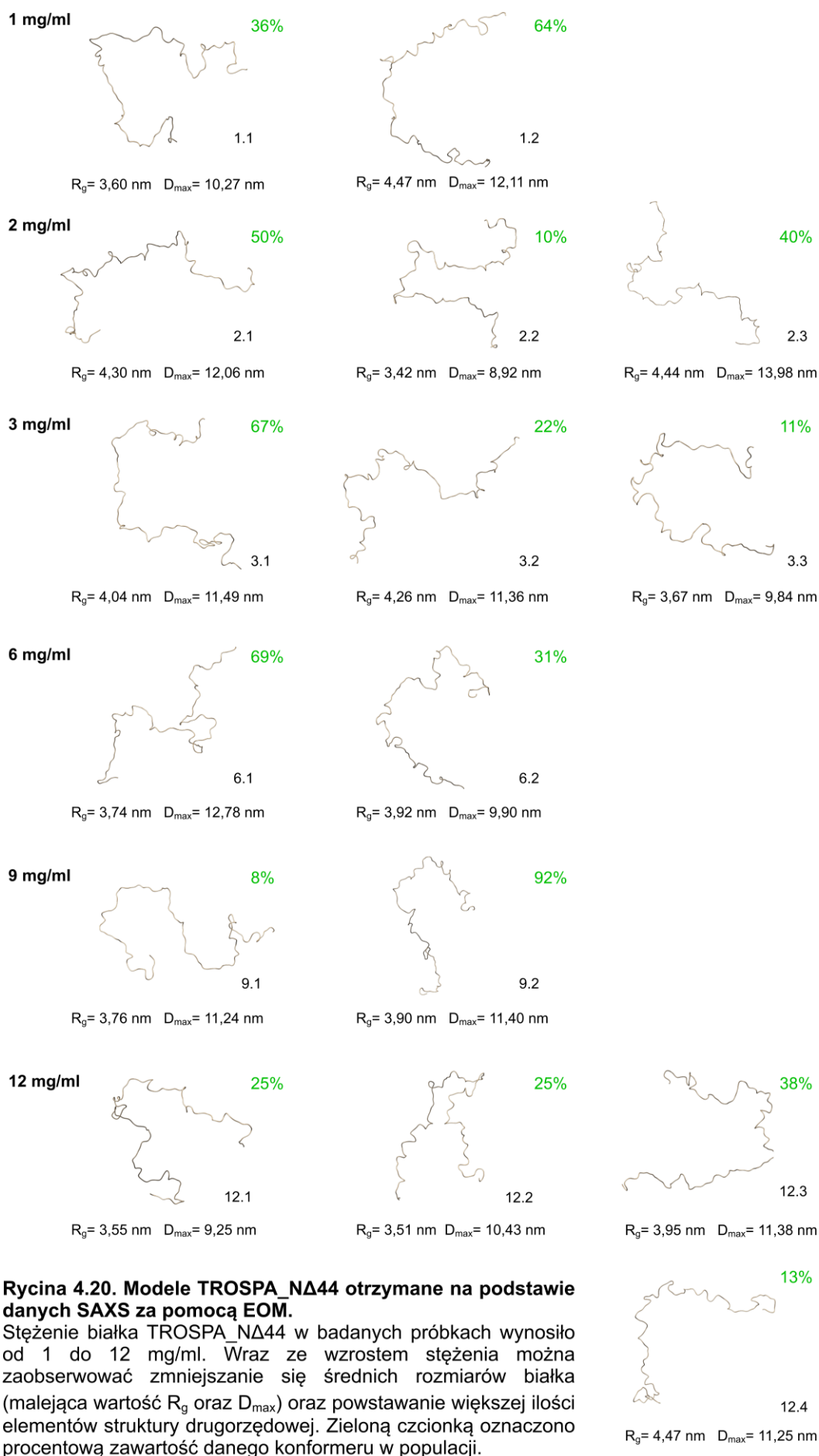
Rycina 4.18. Krzywe rozpraszania SAXS dla białka TROSPA_NΔ44 w stężeniach od 1, 6 i 12 mg/ml.

Przedstawienie krzywej rozpraszania w postaci tzw. wykresu Kratky'ego ($I(s) \cdot s^2$ w funkcji s) umożliwia analizę stopnia uporządkowania struktury przestrzennej białka [254]. W przypadku białek uporządkowanych takich jak lizozym czy izomeraza glukozy, na wykresie Kratky'ego widoczna jest parabola z wyraźnym maksimum, natomiast w przypadku białek inherentnie nieuporządkowanych wykres Kratky'ego ma postać hiperbolicznego plateau [254,255]. W niższych stężeniach białka TROSPA_NΔ44 (1 mg/ml), widoczne jest wyraźne, hiperboliczne plateau (Rycina 4.19). Natomiast przy wyższych stężeniach (6 i 12 mg/ml) obserwowane jest tworzenie się maksimum, które wskazuje na wzrost ustrukturyzowania TROSPA_NΔ44 [254].

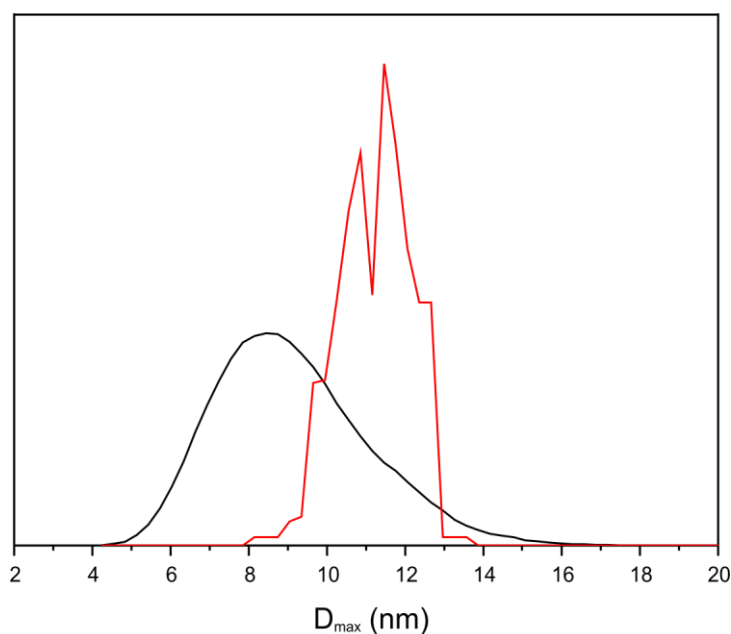


Rycina 4.19. Wykres Kratky'ego dla rosnących stężeń białka TROSPA_NΔ44.

Na podstawie danych SAXS można dokonać charakterystyki strukturalnej białek IDP oraz układów elastycznych stosując algorytm EOM (ang. *Ensemble Optimization Method*) [196]. EOM tworzy zestaw modeli, które łącznie dają obserwowaną krzywą rozpraszania. W wyniku wykorzystania tej metody otrzymano reprezentatywne modele TROSPA_NΔ44 przedstawione na Rycinie 4.20, natomiast w Tabeli 4.8 zestawiono parametry strukturalne ww. modeli.



Duże wartości R_g oraz D_{max} tj. maksymalnej odległości pomiędzy atomami w cząsteczce, które zostały wyznaczone dla modeli TROSPA_NΔ44 wygenerowanych przez EOM, potwierdzają, że białko to należy do klasy białek inherentnie nieuporządkowanych. Ponadto, analiza otrzymanych modeli TROSPA_NΔ44 wskazuje na istnienie co najmniej kilku populacji białka, różniących się wartościami R_g i D_{max} (Rycina 4.21) Parametry te wykazują wyraźny rozkład dwumodalny i dla populacji o bardziej zwartej strukturze R_g i D_{max} wynoszą odpowiednio 3,4 – 3,7 nm oraz 9,0 – 10,0 nm, dla drugiej natomiast, zawierającej bardziej wydłużone cząsteczki R_g i D_{max} wynoszą odpowiednio 3,9 – 4,5 nm oraz 11,4 – 14,0 nm.



Rycina 4.21. Przykładowy obraz rozkładu maksymalnej długości (D_{max}) cząsteczek białka TROSPA_NΔ44 otrzymany metodą EOM.

Czarna linia pokazuje obraz uśredniony, natomiast czerwona – obraz dla populacji, z której wygenerowano struktury 1.1 i 1.2 przedstawione na Rycinie 4.20.

Jednym ze sposobów określenia stopnia upakowania łańcucha polipeptydowego białka jest porównanie jego promienia żyrcji z promieniem hydrodynamicznym. Dla białek globularnych o zwartej strukturze stosunek R_g/R_h wynosi w przybliżeniu 0,77, podczas gdy dla białek całkowicie rozwiniętych $R_g/R_h \approx 1,40$ [254,256]. W przypadku TROSPA_NΔ44 w roztworze o pH 7,9 i temperaturze 20°C stosunek R_g/R_h wynosi około 1,26, co potwierdza niewielką zawartość elementów strukturalnych w białku, w podanych wyżej

warunkach (Tabela 4.8). Analiza danych SAXS koreluje zatem z danymi uzyskanymi z pomiarów CD, które wskazują na śladową zawartość struktur drugorzędowych w pH 7,9.

Tabela 4.8. Parametry strukturalne białka TROSPA_NΔ44 obliczone za pomocą metody EOM.

Stężenie białka TROSPA_NΔ44	Średni R_g (nm)	Średnie D_{max} (nm)	Stosunek R_g/R_h^*
1 mg/ml	4,15	11,43	1,31
2 mg/ml	4,27	12,52	1,34
3 mg/ml	4,05	11,73	1,27
6 mg/ml	3,80	11,89	1,19
9 mg/ml	3,89	11,39	1,22
12 mg/ml	3,80	10,72	1,20

*przy R_h wynoszącym średnio 3,19 nm (pH 7,9; T=20°C)

4.7.7. Badania struktury kompleksu TROSPA_NΔ44 – OspA_NΔ6

Metodę SAXS zastosowano również w celu scharakteryzowania struktury kompleksu TROSPA_NΔ44–OspA_NΔ6. Do badań wykorzystano (utworzonego wcześniej, w Zakładzie Biologii Molekularnej i Systemowej ICHB PAN) mutanta delecyjnego białka OspA_NΔ6 pozbawionego 6 aminokwasów z końca aminowego ze względu na jego lepszą rozpuszczalność w stosunku do pełnej długości OspA oraz brak tendencji do agregacji. Rozpuszczalną formę mutantu delecyjnego OspA_NΔ6 w postaci białka fuzyjnego HisTag-NusA-OspA_NΔ6 wyprodukowano w komórkach *E. coli* BL21-Star przy użyciu wektora pMCSG48. Oczyszczanie OspA_NΔ6 prowadzono analogicznie jak w przypadku TROSPA_NΔ44, z zastosowaniem chromatografii INiAC oraz sączenia molekularnego (Rozdział 4.4.2). Oczyszczone białko OspA_NΔ6 było pozbawione znacznika fuzyjnego HisTag-NusA.

Krzywe SAXS dla białka TROSPA_NΔ44, OspA_NΔ6 i kompleksu TROSPA_NΔ44–OspA_NΔ6 zostały przedstawione na Rycinie 4.22, natomiast

funkcje rozkładu odległości wewnątrzcząsteczkowych $p(r)$ oraz wykresy Kratky'ego zostały pokazane odpowiednio na Rycinie 4.23 oraz 4.24. Funkcja $p(r)$ (ang. *pair-distance distribution function*) jest reprezentacją krzywej rozpraszania w przestrzeni rzeczywistej. Opisuje ona rozkład odległości pomiędzy parami atomów zawartych w objętości cząsteczki. Funkcja $p(r)$ jest używana do analizy danych z pomiarów SAXS, gdzie służy do opisywania zbioru sparowanych odległości pomiędzy wszystkimi elektronami i jest bardzo użytecznym narzędziem do wizualizacji zmian konformacyjnych makrocząsteczki. Funkcja $p(r)$ może być wyrażona wzorem:

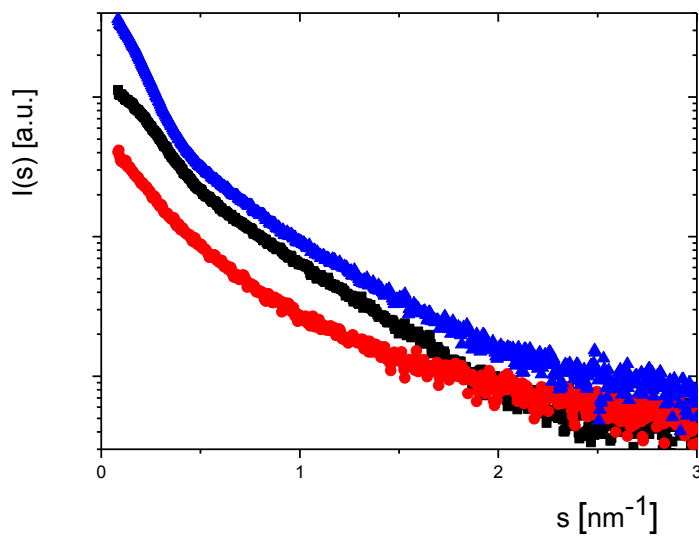
$$p(r) = \frac{r^2}{2\pi^2} \int_0^\infty s^2 I(s) \frac{\sin sr}{sr} dr,$$

gdzie: $p(r)$ - funkcja rozkładu odległości wewnątrzcząsteczkowych, s - wektor rozpraszania, $I(s)$ - intensywność promieniowania rozproszonego, r - odległość pomiędzy wybranymi dwoma punktami wewnątrz cząsteczki.

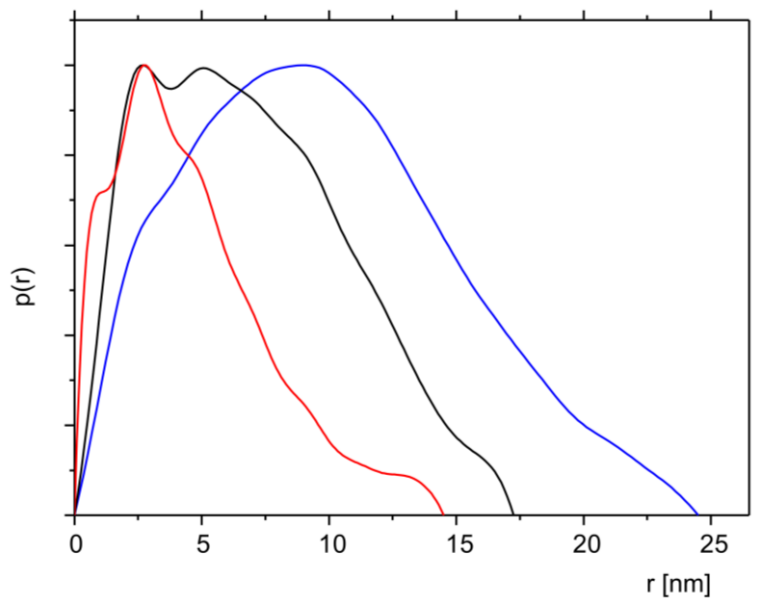
Funkcja $p(r)$ dla białka OspA_NΔ6 jest asymetryczna, co wskazuje na wydłużony kształt cząsteczki (Rycina 4.23) [257,258]. Widoczne podwójne maksimum funkcji $p(r)$ świadczy o istnieniu dimeru OspA_NΔ6, połączonego elastycznym łącznikiem [257,259]. O obecności dimeru OspA_NΔ6 świadczy również wartość D_{\max} , która wynosi 17,5 nm, podczas gdy D_{\max} uzyskana dla monomeru OspA_NΔ17 wynosiła 8,5 nm, co stanowi wartość dwukrotnie mniejszą [114].

Dla białek globularnych funkcja $p(r)$ ma kształt symetryczny, z maksimum w okolicach połowy wartości D_{\max} ($D_{\max}/2$). Z drugiej strony cząsteczki posiadające formę spłaszczoną również wykazują symetryczny kształt funkcji $p(r)$, jednakże posiada ona szerokie maksimum, które jest dodatkowo przesunięte w kierunku odległości r mniejszej niż $D_{\max}/2$ [195,258].

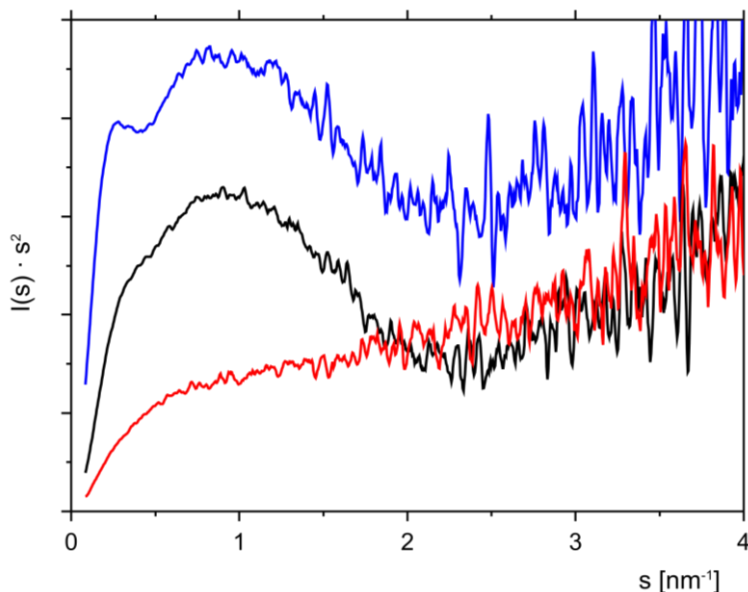
Symetryczny kształt funkcji $p(r)$ dla kompleksu TROSPA_NΔ44–OspA_NΔ6 w stosunku molowym 1:1, ze stosunkowo szerokim maksimum wynoszącym około 9 nm, czyli poniżej wartości $D_{\max}/2$ (~12 nm), wskazuje, iż kompleks ten posiada kształt spłaszczonej globuli [195,258]. Wielkość D_{\max} dla kompleksu jest prawie o 10 nm większa niż dla dimeru OspA_NΔ6 (Rycina 4.23).



Rycina 4.22. Krzywe eksperymentalne SAXS dla TROSPA_NΔ44 (czerwona), OspA_NΔ6 (czarna) i kompleksu TROSPA_NΔ44–OspA_NΔ6 (niebieska).



Rycina 4.23. Znormalizowana funkcja rozkładu odległości wewnątrzcząsteczkowych $p(r)$ dla TROSPA_NΔ44 (czerwona), OspA_NΔ6 (czarna) oraz kompleksu TROSPA_NΔ44–OspA_NΔ6 (niebieska; stosunek molowy 1:1).



Rycina 4.24. Wykres Kratki'ego dla TROSPA_NΔ44 (czerwona), OspA_NΔ6 (czarna) oraz kompleksu TROSPA_NΔ44–OspA_NΔ6 (niebieska; stosunek molowy 1:1).

Dla białek ustrukturyzowanych wykres Kratki'ego ma postać paraboli, natomiast w przypadku IDP wykres Kratki'ego ma postać funkcji logarytmicznie wzrastającej. Dla białek wielodomenowych lub kompleksu białek widoczne jest załamanie paraboli [195,255]. Nieregularna parabola w przypadku OspA_NΔ6 oraz wyraźne załamanie lewego ramienia paraboli kompleksu TROSPA_NΔ44–OspA_NΔ6 wskazują na strukturę globularną o charakterze wielodomenowym [254,260].

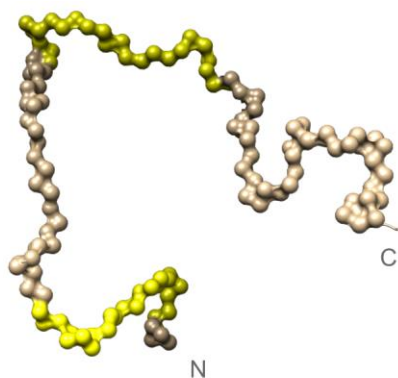
Z krzywych SAXS wyznaczono masę i objętość białek [195,261]. Masa cząsteczkowa (MW) TROSPA_NΔ44 wyznaczona z danych SAXS wynosi 13,4 kDa, podczas gdy masa wyznaczona za pomocą spektrometrii MALDI-ToF wynosi 12,53 kDa (Rycina 4.6), co potwierdza, że białko to występuje w roztworze w postaci monomeru. Masa OspA_NΔ6 występującego w roztworze w stężeniu 1,5 mg/ml wynosi 30,2 kDa (teoretyczna MW=28,98 kDa), natomiast przy wyższych stężeniach białka (≥ 3 mg/ml) wynosi ona około 60 kDa, co wskazuje na tworzenie się dimeru OspA_NΔ6. MW wyznaczona dla kompleksu TROSPA_NΔ44–OspA_NΔ6 wynosi 89,3 kDa i wskazuje na obecność kompleksu składającego się z dimeru OspA_NΔ6 oraz dołączonych do niego dwóch cząsteczek TROSPA_NΔ44. Objętości wyznaczone z danych SAXS wynoszą odpowiednio: TROSPA_NΔ44 - 43,1 nm³, dimer OspA_NΔ6 - 131,9 nm³ oraz objętość kompleksu – 242 nm³. Objętość cząsteczki OspA wyznaczona z modeli krystalograficznych w programie CRY SOL wynosi około 60 nm³, co stanowi w przybliżeniu połowę wartości obliczonej na podstawie danych SAXS [204]. Fakt ten potwierdza obecność dimeru OspA_NΔ6 w

roztworze. Natomiast dane SAXS potwierdzają tworzenie się kompleksu TROSPA_NΔ44–OspA_NΔ6 w stosunku stechiometrycznym 2:2.

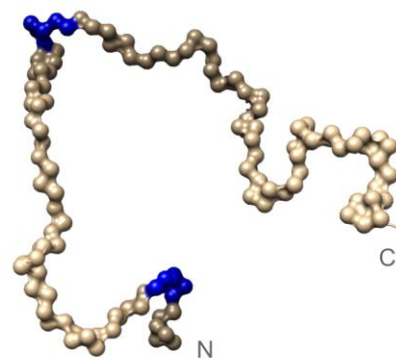
4.7.8. Identyfikacja elementów molekularnego rozpoznania (MoRFs)

Sekwencję aminokwasową TROSPA_NΔ44 analizowano w celu zlokalizowania tzw. elementów molekularnego rozpoznania – MoRFs (ang. *Molecular Recognition Features*). MoRFs to krótkie, nieustrukturyzowane rejony białka, które pod wpływem kontaktu z partnerem podlegają przejściu ze stanu nieuporządkowanego do uporządkowanego (ang. *disorder-to-order transition*). Jak sama nazwa wskazuje są one zaangażowane w molekularne rozpoznawanie, które jest pierwszym etapem procesu wiązania się białek [262]. Do identyfikacji MoRFs w TROSPA_NΔ44 wykorzystano dwa narzędzia bioinformatyczne - MoRF_{PRED} oraz ANCHOR [212,213]. Przewidziane elementy MoRFs, duplikacje, a także wprowadzone mutacje substytucyjne (Rozdział 4.5) zaznaczono na modelu TROSPA_NΔ44 na Rycinie 4.25.

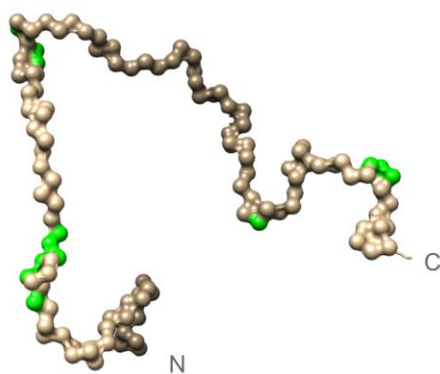
MoRF_{PRED} odnalazł 7 fragmentów MoRF: T71, A73, 77-80: VVSS, 98-99: TA, L101, T135 oraz 151-154: ASYL, natomiast ANCHOR zidentyfikował dwa takie miejsca: 49-55: LSLPLQL oraz 100-105: SLSMLP. Oprócz tego, w TROSPA_NΔ44 znaleziono dwa 24-aminokwasowe zduplikowane fragmenty (46-69 oraz 98-121), które różnią się zaledwie jednym aminokwasem (Rycina 4.25). Wysokie podobieństwo sekwencji może świadczyć o istotnym znaczeniu strukturalnym oraz funkcjonalnym reszt aminokwasowych wchodzących w skład tych fragmentów [221]. Analiza powtarzających się sekwencji w białkach wykazała, że w większości przypadków stanowią one regiony nieuporządkowane, które mogą podlegać strukturyzacji pod wpływem wiązania się z innym białkiem. Co więcej, zaobserwowano, że u eukariontów 72,3% takich powtórzeń w białkach błonowych występuje w stanie strukturalnego nieuporządkowania [263]. Jest zatem możliwe, że zidentyfikowany 24-aminokwasowy fragment TROSPA nie posiada stabilnej struktury. Jego charakterystyczny skład aminokwasowy, gdzie 71% reszt stanowią polarne, nienaładowane reszty Ser, Thr oraz Gln poprzedzielane resztami Ala i Pro wskazuje, że może on pełnić funkcję elastycznego łącznika oddzielającego ustrukturyzowane fragmenty białka TROSPA_NΔ44 [264,265].



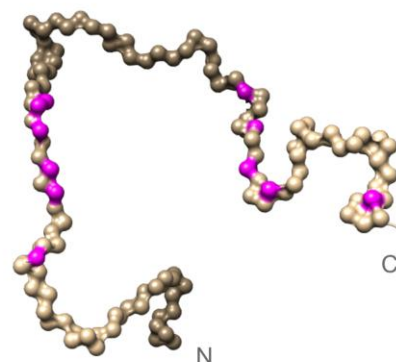
Zduplikowane fragmenty:
 46-69: TASLSLPLQLSPRSLPQSSLSATA
 98-121: TASLSMLPQLSPRSLPQSSLSATA



MoRFy wg ANCHOR:
 49-55: LSLPLQL
 100-105: SLSMLP



MoRFy wg MoRF_{PRED}:
 T71, A73, 77-80: VVSS, 98-99: TA,
 L101, T135 oraz 151-154: ASYL



Wprowadzane mutacje substytucyjne:
 D75N, D82N, E84Q, D87N, E89Q,
 D90N, E123Q, D129N, D132N,
 D136N, D159N

Rycina 4.25. Na modelu TROSPA_NΔ44 zaznaczono:

zduplikowane 24-aminokwasowe fragmenty białka, elementy molekularnego rozpoznania (MoRF) przewidziane metodami bioinformatycznymi oraz wprowadzone mutacje substytucyjne ujemnie naładowanych reszt kwasu glutaminowego (E) i asparaginowego (D) (Rozdział 4.5). Jako model TROSPA_NΔ44 wykorzystano strukturę 1.1 wygenerowaną przez EOM (Rycina 4.20).

4.7.9. Modelowanie struktury kompleksu białek TROSPA_NΔ44 - OspA *in silico*

Modele strukturalne kompleksu TROSPA_NΔ44–OspA uzyskano w sześciu eksperymentach *in silico*, w których dokowano strukturę krystalograficzną OspA (PDB: 1OSP) z *B. burgdorferi* [109,266] do konformerów TROSPA_NΔ44 uzyskanych w programie EOM na podstawie

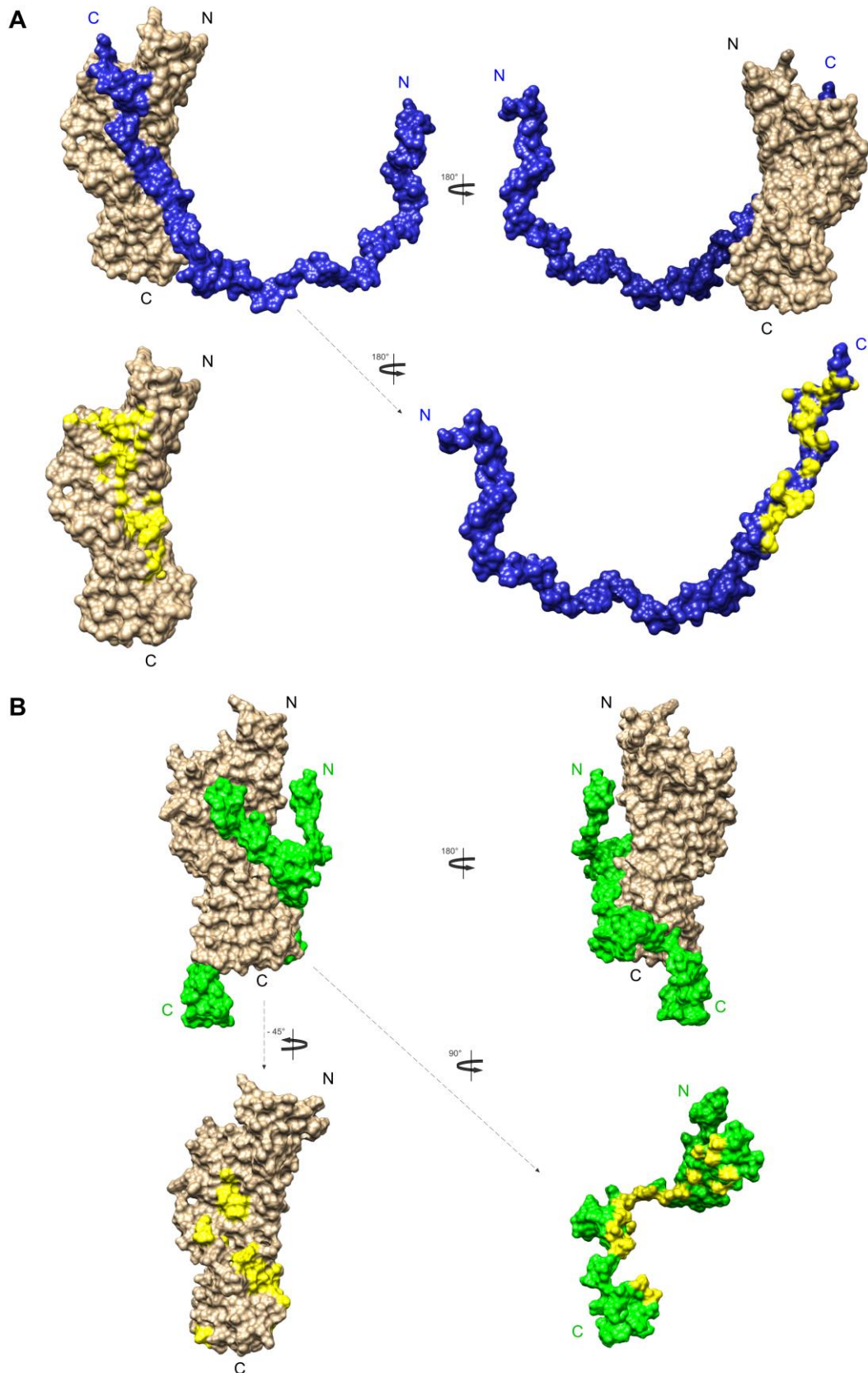
danych SAXS. Jako modele TROSPA_NΔ44 wykorzystano najbardziej reprezentatywne tj. stanowiące najliczniejszą populację w próbce konformery o numerach 1.2, 2.1, 3.1, 6.1, 9.2, 12.3 oraz dodatkowo stanowiące ponad $\frac{1}{3}$ populacji konformery nr 1.1 i 2.3 (Rycina 4.20). Dokowania dokonywano bez wskazywania przewidywanego miejsca oddziaływania białek. Spośród trzech serwerów do dokowania molekularnego: ClusPro 2.0, GRAMM-X oraz Hex najlepiej dopasowane modele tj. posiadające największą liczbę wiązań wodorowych oraz największą powierzchnię kontaktu pomiędzy białkami uzyskano na serwerze obliczeniowym ClusPro 2.0, dlatego też został on wybrany do dokowania wszystkich konformerów TROSPA_NΔ44. Funkcja oceniająca ClusPro 2.0 (ang. *scoring function*) weryfikuje wygenerowane modele wykorzystując 3 kryteria: (i) dopasowanie cząsteczek na zasadzie komplementarności kształtów, (ii) oddziaływania elektrostatyczne oraz (iii) energię swobodną desolvatacji. W wyniku dokowania na serwerze ClusPro 2.0 otrzymano sumarycznie 160 struktur kompleksu TROSPA_NΔ44–OspA, które zostały najwyżej ocenione przez funkcję oceniającą ClusPro 2.0. Następnie spośród nich wybrano dwa modele, które najlepiej odzwierciedlały uzyskane dotychczas dane eksperymentalne dotyczące miejsc w TROSPA oraz OspA biorących udział we wiązaniu się tych dwóch białek. W tym celu ustanowiono 3 kryteria: (i) oddziaływanie TROSPA_NΔ44 z resztami aminokwasowymi z OspA: 236-237 (Val-Phe) oraz 242-244 (Thr-Ile-Thr), których substytucja powodowała osłabienie wiązania się OspA z ekstraktem z jelit kleszcza w badaniach *in vitro* (Rycina 1.4) [115], (ii) brak oddziaływania OspA z 7-aminokwasowym C-końcowym fragmentem TROSPA, który był statystycznie nieistotny dla tworzenia kompleksów TROSPA_NΔ44–OspA w badaniach *in vitro* (Rycina 4.7B) oraz (iii) oddziaływanie OspA z resztami aminokwasowymi TROSPA_NΔ44 (Glu 84, 89 i 123 oraz Asp 82, 87, 129, 132, 136 i 159), których mutacje osłabiają wiązanie TROSPA–OspA w badaniach *in vitro* (Rycina 4.8B). Wybrane modele zrównoważono za pomocą dynamiki molekularnej w 0,1 M NaCl (3.2.19), W celu relaksacji struktury kompleksu oraz poprawy oddziaływań pomiędzy białkami. Otrzymano po 2000 konformacji dla każdego z 2 modeli, z których ostatecznie wybrano po jednym, stanowiącym model reprezentatywny dla klastrów o największej liczbie obsadzeń w trajektorii dynamiki molekularnej,

tj. model reprezentujący konformacje występujące najczęściej w trakcie symulacji dynamiki molekularnej.

Zaproponowane dwa modele kompleksu TROSPA_NΔ44–OspA przedstawiono na Rycinie 4.26. Modele A i B uzyskano w oparciu o konformery TROSPA_NΔ44 o numerach odpowiednio 1.1 oraz 9.2 (Rycina 4.20).

W modelu A fragmenty OspA, które zaangażowane są w oddziaływanie z TROSPA_NΔ44, to przede wszystkim centralna β-kartka oraz znajdująca się na końcu karboksylowym β-beczułka. Liczba kontaktów pomiędzy białkami, na które składają się oddziaływania niekowalencyjne takie jak wiązania wodorowe, oddziaływania hydrofobowe oraz oddziaływania van der Waalsa wynosi 266. Wśród nich występuje 15 wiązań wodorowych, w tym 7 mostków solnych. W oddziaływaniu pomiędzy białkami bierze udział 25 aminokwasów TROSPA_NΔ44 oraz 38 aminokwasów OspA, co stanowi odpowiednio 21% i 14% reszt aminokwasowych z poszczególnych białek. Wśród nich przeważają aminokwasy polarne, które stanowią 59% (16% aminokwasy naładowane dodatnio, 14% - ujemnie, 29% - pozbawione ładunku), podczas gdy reszty hydrofobowe 41%. W rejonie 229-247, wchodzącym w skład C-końcowej β-beczułki OspA, białko TROSPA_NΔ44 oddziałuje z 5 aminokwasami, w tym z konserwatywną resztą Val236. Oprócz fragmentu OspA 229-247, TROSPA_NΔ44 wiąże się również z będącym częścią centralnej β-kartki rejonem 85-103, który podobnie jak odcinek 229-247 wykazywał wysokie powinowactwo do ekstraktu z jelit kleszcza w badaniach *in vitro* [115]. W rejonie 85-103 TROSPA_NΔ44 wiąże się z 7 aminokwasami, w tym z konserwatywnymi resztami Lys85 i Lys87. Oprócz tego, TROSPA_NΔ44 oddziałuje z naładowanymi resztami Arg139, Glu160 oraz Lys189, które tworzą prawdopodobną kieszeń wiążącą ligand (LBP, ang. *ligand binding pocket*).

W modelu A fragment TROSPA_NΔ44, który zaangażowany jest w oddziaływanie z OspA, obejmuje reszty 128-163 i zawiera w sobie MoRFy: Thr135 oraz 151-154:ASYL (Rycina 4.25). Za pośrednictwem motywu ASYL TROSPA_NΔ44 oddziałuje z 8 aminokwasami z OspA, w tym z 4 konserwatywnymi resztami Ser67, Lys69, Ser73 oraz Gly74. Trzy ujemnie naładowane reszty kwasu asparaginowego TROSPA_NΔ44 (136, 139 i 159) tworzą 4 mostki solne z resztami lizyny OspA (Asp136 i Asp132 z Lys239 oraz 2 mostki pomiędzy Asp159 i Lys87).



Rycina 4.26. Modele kompleksu TROSPA_NΔ44–OspA, które najlepiej odzwierciedlają otrzymane dane eksperymentalne.

Modele uzyskano za pomocą dokowania molekularnego konformerów TROSPA_NΔ44 (wygenerowanych przez EOM) do struktury krystalograficznej OspA (PDB: 1OSP). Modele A i B uzyskano w oparciu o strukturę TROSPA_NΔ44 o numerze odpowiednio 1.1 oraz 9.2 (Rycina 4.20). TROSPA_NΔ44 w modelu A oznaczono kolorem niebieskim, natomiast w modelu B – zielonym. TROSPA_NΔ44 obrócono o 180° (A) lub 90° (B) w celu zobrazowania miejsc biorących udział w oddziaływaniu TROSPA_NΔ44–OspA (zaznaczono kolorem żółtym).

W modelu B TROSPA_NΔ44 częściowo oplata OspA, wiążąc się z białkiem bakteryjnym przede wszystkim w rejonie C-końcowej β-beczułki oraz centralnej β-kartki. Liczba kontaktów pomiędzy białkami wynosi 154, w tym 13 wiązań wodorowych i 6 mostków solnych. W oddziaływaniach pomiędzy białkami bierze udział 21 aminokwasów TROSPA_NΔ44 oraz 26 aminokwasów OspA, co stanowi odpowiednio 17% i 10% reszt aminokwasowych z poszczególnych białek. Wśród nich aminokwasy polarne stanowią 74% (15% aminokwasy naładowane dodatnio, 17% - ujemnie, 43% - pozbawione ładunku), natomiast hydrofobowe – 26%. Oznacza to, że w obydwu modelach (A i B), wśród oddziaływań, które prowadzą do utworzenia kompleksu przeważają oddziaływania polarne.

W rejonie 229-247, wchodzącym w skład OspA, białko TROSPA_NΔ44 oddziałuje z 5 aminokwasami, w tym z 2 konserwatywnymi resztami Val236 oraz Thr244. Oddziaływanie pomiędzy Val236_{OspA} i Arg110 jest dodatkowo wzmocnione przez resztę Glu261_{OspA}, która tworzy 2 mostki solne z Arg110. Oprócz fragmentu OspA 229-247, TROSPA_NΔ44 wiąże się również z rejonem centralnej β-kartki oraz znajdującej się na końcu karboksylowym nici β21 oraz helisy α.

W modelu B fragment TROSPA_NΔ44, który zaangażowany jest w oddziaływanie z OspA obejmuje 9 aminokwasów wchodzących w skład zduplikowanego fragmentu 98-121 (Rycina 4.25). Wśród nich występują 2 reszty Leu będące częścią przewidywanego rejonu MoRF 100-105:SLSMLP (Rycina 4.25). Oprócz tego, w oddziaływanie z OspA zaangażowane są również inne MoRFy: Thr71, Ser79, Thr98 oraz Leu101. Co więcej, w modelu B z OspA oddziałują także fragmenty 90-91, 133-139 oraz 159-161, zawierające ujemnie naładowane reszty, których mutacje osłabiały wiązanie z OspA w badaniach *in vitro*. Spośród nich Asp90 tworzy mostek solny z Lys135_{OspA}, Asp136 tworzy 2 mostki solne z Lys273_{OspA}, natomiast Asp159 oddziałuje z Ala208_{OspA} i Ala209_{OspA} za pomocą 3 wiązań wodorowych.

Dodatkowo sprawdzono, iż obecność grup cukrowych dołączonych do Ser56 w modelu A lub Ser56 i Ser142 (Rozdział 4.6.2) w modelu B nie stwarzałyby zawady przestrzennej w oddziaływaniu TROSPA_NΔ44-OspA. Natomiast reszta węglowodanowa dołączona do Ser142 w modelu A, pomimo tego, iż Ser142 nie bierze udziału w oddziaływaniu, mogłaby spowodować

zawadę przestrzenną i w rezultacie słabsze wiązanie TROSPA_NΔ44 w rejonie centralnej β -kartki OspA.

Średnice oraz objętości modeli kompleksów wraz z otoczką hydratacyjną wyznaczono w programie Crystol [204]. Średnica kompleksu, która w przybliżeniu odpowiada wartości D_{\max} [204,267] wynosi dla modelu A 12,7 nm, natomiast dla modelu B 10,8 nm. Objętość kompleksu w przypadku modelu A wynosi 98,5 nm³, natomiast dla modelu B – 70,2 nm³. Biorąc pod uwagę powyższe wartości, przewidywane D_{\max} oraz objętość dla kompleksu składającego się z dimeru OspA (utworzonego przez połączenie OspA wzdłuż swojej krótszej osi) oraz 2 cząsteczek TROSPA_NΔ44, w modelu A wynosiłyby odpowiednio 25,3 nm oraz 197,1 nm³, natomiast dla modelu B - 21,7 nm oraz 140,4 nm³. Oznacza to, iż model A lepiej koreluje z danymi SAXS, gdzie dla kompleksu TROSPA_NΔ44–OspA_NΔ6 składającego się z dimeru OspA oraz 2 cząsteczek TROSPA_NΔ44 D_{\max} oraz objętość wynosiły odpowiednio około 24 nm oraz 242 nm³ (Rozdział 4.7.7).

5. Dyskusja

5.1. Namnażanie fragmentów genów kleszcza zawierających odcinki kodujące białka z rodziny Salp15 (Iric-1, Iric-2 oraz Iric-3)

Salp15 Iric-1, Iric-2 oraz Iric-3 to białka kleszcza odgrywające istotną rolę w oddziaływaniach pomiędzy roztoczem a patogenną bakterią *B. burgdorferi* (patrz Rozdział 1.3.3). Niestety jak dotąd struktura tych białek pozostaje nieznana, głównie ze względu na niską wydajność ich produkcji w systemach eukariotycznych oraz trudności w uzyskaniu aktywnego białka w bakteriach [169]. W ramach niniejszych badań próbowano otrzymać aktywną formę Salp15 Iric-1 w komórkach *E. coli*. Produkcja tego białka u kleszcza zachodzi głównie podczas jego żerowania. Najprostsza droga pozyskania kodującej je sekwencji powinna zatem polegać na izolacji mRNA z żerujących kleszczy i specyficznej amplifikacji cDNA. Niestety z powodu braku odpowiedniego materiału biologicznego zrezygnowano z tego podejścia. W zamian postanowiono wykorzystać DNA genomowy z *I. ricinus*, wcześniej pokazano bowiem, że geny kodujące białka z rodziny Salp15 pozbawione są intronów [165].

W pierwszym etapie badań wyizolowano genomowy DNA kleszcza *I. ricinus*. Następnie zaprojektowano startery na podstawie sekwencji cDNA Salp15 Iric-1, Iric-2 oraz Iric-3 dostępnych w bazie danych *GenBank*. Pomimo zastosowania różnych warunków reakcji PCR, pojedynczy prążek DNA udało się otrzymać jedynie przy użyciu starterów zaprojektowanych na podstawie cDNA Salp15 Iric-2. Dlatego też, pozostałe produkty wycinano z żelu, a następnie oczyszczano i klonowano. Analiza produktów sekwencjonowania wykazała, że żaden z 58 zbadanych klonów nie zawierał DNA podobnego do sekwencji kodującej białka z rodziny Salp15. Wydaje się, że jedną z przyczyn może być obecność inhibitorów polimerazy DNA w wyizolowanym materiale genetycznym kleszcza. Wykazano bowiem, że oczyszczony DNA zawiera znaczne ilości polisacharydów i/lub pozostałości białek, które mogą zmniejszać wydajność reakcji PCR [268,269]. Co więcej, z niewiadomych przyczyn DNA genomowy kleszczy twardych (ang. *hard ticks*) jest wysoce podatny na degradację [268–270]. Wydaje się zatem, że dostępne w literaturze protokoły nie są optymalne. Być może należałoby zmodyfikować metodykę izolacji DNA

genomowego kleszcza, np. poprzez przecięcie poprzeczne egzoszkieletu kleszcza przed przystąpieniem do ekstrakcji DNA. W najnowszych badaniach do izolacji kwasów nukleinowych z kleszczy stosowano zestaw GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific). Umożliwił on otrzymanie dobrej jakości DNA [271,272]. Niestety w chwili, gdy rozpoczynano opisane w tej pracy badania zestaw ten nie był dostępny.

5.2. Produkcja oraz badanie aktywności białka Salp15

Badania strukturalne Salp15 są utrudnione ze względu na bardzo niską wydajność produkcji białka. Jak dotąd większość badań Salp15 prowadzono z wykorzystaniem białka wyprodukowanego w komórkach S2 z *Drosophila melanogaster*. Zastosowanie tego systemu pozwalało uzyskać zaledwie 50 ng białka z mililitra hodowli [148,169]. Dlatego też, postanowiono wyprodukować aktywną formę Salp15 w systemie bakteryjnym, który umożliwia otrzymywanie większych ilości białka.

Niepowodzeniem zakończyły się próby otrzymania cDNA Salp15 Iric-1 (zwanego dalej Salp15) za pomocą PCR, w której jako matrycę zastosowano DNA genomowe kleszcza. Odpowiedni cDNA uzyskano zatem metodą syntezy chemicznej (*GeneArt*). Dodatkowo przeprowadzono optymalizację kodonów uwzględniającą dostępność poszczególnych izotypów tRNA w *E. coli*. Wykorzystane w niniejszych badaniach narzędzia bioinformatyczne (PrediSi oraz Phobius) nie wykazały, by w sekwencji aminokwasowej Salp15 obecne były fragmenty mogące negatywnie wpływać na wydajność produkcji tego białka w komórkach bakteryjnych (domeny transbłonowe, peptydy sygnałne). Dlatego też zdecydowano się wyprodukować białko pełnej długości. Utworzono dwa konstrukty umożliwiające otrzymanie fuzyjnych białek Salp15: (i) ze znacznikiem histydynowym (HisTag) i białkiem NusA oraz (ii) z samym znacznikiem HisTag. Okazało się, że białko HisTag-NusA-Salp15 było wydajnie syntetyzowane w *E. coli* (szczep SHuffle), podczas gdy HisTag-Salp15 powstawało w małych ilościach i było nierozpuszczalne. Usunięcie fragmentu HisTag-NusA za pomocą proteazy TEV skutkowało wytrącaniem się Salp15 z roztworu, dlatego do badania aktywności z konieczności wykorzystano pełnej długości białko HisTag-NusA-Salp15. Po oczyszczeniu za pomocą metod

chromatograficznych, zbadano jego zdolność do wiązania się z OspC. Testy immunoenzymatyczne ELISA wykazały, że białko HisTag-NusA-Salp15 nie wiąże się z lipoproteiną OspC niezależnie od tego, z którego gatunku *Borrelia* ona pochodziła (*B. afzelii*, *B. garinii* czy *B. burgdorferi* s.s.). Na podstawie powyższych wyników stwierdzono, że Salp15 połączone z białkiem fuzyjnym HisTag-NusA pozbawione jest zdolności do tworzenia kompleksów z OspC. Można zatem sądzić, że po połączeniu ze znacznikiem HisTag i białkiem NusA, Salp15 nie przyjmuje natywnej struktury trzeciorzędowej. Fakt ten może być następstwem tworzenia niewystępujących w natywnym białku mostków disiarczkowych. Salp15 z *I. ricinus* zawiera bowiem 7 cystein, za sprawą których może teoretycznie powstać 105 izomerów białka przy założeniu, że wszystkie cysteiny mogą brać udział w formowaniu 3 mostków disiarczkowych (cystyny) [273]. Przykładem białka, które również może tworzyć 105 możliwych izomerów cystynowych jest rybonukleaza A. Spośród nich tylko jeden stanowi formę natywną [274]. Wydaje się zatem, że samo wykorzystanie szczepu SHuffle *E. coli*, który sprzyja powstawaniu mostków disiarczkowych oraz produkuje izomerazę disiarczkową DsbC, może być niewystarczające do wyprodukowania poprawnie zwiniętego Salp15 [217,275]. Co więcej, uzyskane wyniki wskazują, że zastosowanie białka NusA, jako partnera fuzyjnego przyczyniło się do utrzymania w formie rozpuszczalnej nieprawidłowo zwiniętego Salp15, które po odcięciu NusA ulegało wytrąceniu z roztworu. Podobnie w badaniach grupy Nassal'a produkcja Salp15 w fuzji ze znacznikiem histydynowym, MPB (ang. *maltose-binding protein*), GST (ang. *glutathione-S-transferase*) lub Trx (ang. *thioredoxin*), w szczepie SHuffle, nie spowodowała znaczącego zwiększenia rozpuszczalności białka fuzyjnego. Dopiero połączenie Salp15 ze zmodyfikowaną izomerazą disiarczkową DsbA pozwoliło w ubiegłym roku wyprodukować aktywną formę białka Salp15, zdolną do oddziaływania z OspC [169]. Z drugiej strony, przyczyną niewłaściwego zwijania białka Salp15 może być również obecność peptydu sygnałnego w produkowanym białku. Przeprowadzone przez grupę Fikrig'a badania wykazały, że Salp15 najprawdopodobniej zawiera hydrofobową sekwencję sygnałną na końcu aminowym, toteż niewykluczone jest oddziaływanie peptydu sygnałnego z hydrofobowym rdzeniem białka [168]. Proces ten może uniemożliwić prawidłowe zwijanie się białka fuzyjnego, a po odcięciu NusA prowadzić do

nieodwracalnej agregacji i wytrącania się Salp15 z roztworu. Zjawisko takie zaobserwowano u białka prekursorowego MBP – preMBP, które ulega prawidłowemu zwijaniu dopiero po odcięciu peptydu sygnałowego [276]. Być może, aby uzyskać aktywne białko Salp15 w bakteriach, należałoby wyprodukować wariant Salp15 pozbawiony peptydu sygnałowego oraz posiadający zwiększającą wydajność translacji białko fuzyjne takie jak DsbA, czy też NusA.

5.3. Produkcja oraz badanie aktywności białka TROSPA

Pełnej długości białko TROSPA z *I. ricinus* oraz warianty lipoproteiny OspA z trzech najczęściej występujących na terenie Europy gatunków borrelii (*B. afzelii*, *B. garinii* oraz *B. burgdorferi* s.s.) wyprodukowano w *E. coli*, a następnie oczyszczono z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa INiAC. W kolejnym etapie badań sprawdzano zdolność TROSPA do wiązania OspA za pomocą testów ELISA. Skuteczność testów ELISA została wcześniej potwierdzona podczas badań oddziaływań białek TROSPA, OspA oraz Salp15 [103,108,115,119,127,165,168]. Metodę tą wybrano również ze względu na dostępność odpowiednich przeciwciał specyficznie wiążących OspA i OspC. Do zalet testów immunoenzymatycznych należą wysoka czułość oraz łatwość przeprowadzenia analiz.

Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że TROSPA oddziałuje z wszystkimi trzema typami OspA, jednakże siła tego oddziaływania jest różna dla każdej pary białek i jest największa w przypadku oddziaływania TROSPA i OspA z *B. burgdorferi* s.s. (Rycina 4.6). Uzyskane wyniki pozwalają sądzić, że TROSPA z *I. ricinus* umożliwia kolonizację jelita różnym gatunkom borrelii, aczkolwiek efektywność tego procesu jest różna, w zależności od gatunku bakterii. Podobne rezultaty opublikowali w swoich badaniach Pal i współpracownicy. Zauważyli oni, że z ekstraktem z jelit kleszcza wiąże się zarówno białko OspA pochodzące ze szczepu 25015 *B. burgdorferi* s.s., (OspA₂₅₀₁₅), jak i ze szczepu N40 (OspA_{N40}), jednakże wariant OspA₂₅₀₁₅ tworzył bardziej stabilny kompleks [115]. Różnica ta została wychwycona w obrębie jednego gatunku, nie powinno zatem dziwić różne powinowactwo do TROSPA obserwowane dla białek OspA pochodzących z odmiennych

gatunków *Borrelia*. Zastanawiające jest jednak, czy różnica ta jest warunkowana wyłącznie różnym powinowactwem TROSPA do OspA w zależności od gatunku krętka, czy może ona również być następstwem różnego powinowactwa białek OspA względem siebie. Pokazano bowiem, że lipoproteiny OspA mają zdolność łączenia się ze sobą, dzięki czemu liczba OspA, a co za tym idzie ilość krętków przylegająca do komórek jelita kleszcza może być wielokrotnie zwiększona [115]. Zestawiając ze sobą wysoką zachowawczość TROSPA oraz zmienność OspA można wysunąć hipotezę, że efektywność kolonizacji wektora w większej mierze zależy od typu OspA produkowanego przez *B. burgdorferi*. Oznaczałoby to, że rodzaj produkowanego przez bakterię OspA może wpływać na lokalną dominację danego gatunku/szczepu *Borrelia*. Badania przeprowadzone we wschodniej części Polski wskazują, iż w rejonie tym kleszcze najczęściej zakażone są *B. burgdorferi* s.s. (62,8%). Obserwacja ta dotyczy zarówno zakażeń pojedynczych, jak i współzakażeń, co koreluje z opisanymi w niniejszej pracy wynikami [277]. Podobny wynik uzyskano dla nimf *I. ricinus* z terenów południowej Polski, gdzie dominującym gatunkiem była *B. burgdorferi* s.s. (61%) [69]. Co jednak ciekawe, u osobników dorosłych kleszcza przeważał gatunek *B. garinii* (45,4%), natomiast *B. burgdorferi* s.s. odpowiedzialny był za 31,3% infekcji. Obserwacja ta wydaje się istotna w kontekście ponad 14-krotnie wyższego poziomu ekspresji TROSPA u nimf w porównaniu do osobników dorosłych [108]. Być może zatem, w stadium nimfy o zasiedlaniu kleszczy przez dany gatunek borrelii decyduje głównie typ OspA produkowany przez bakterię, natomiast u osobników dorosłych proces ten warunkowany jest również przez inne, nieznane dotychczas mechanizmy.

5.4. Rejony TROSPA istotne dla oddziaływania TROSPA-OspA

Aby lepiej poznać molekularne uwarunkowania oddziaływania pomiędzy białkami TROSPA i OspA przygotowano serię mutantów delecyjnych oraz substytucyjnych białka TROSPA. Projektując mutanty delecyjne korzystano zarówno z danych literaturowych [108], jak i przeprowadzonych wcześniej analiz bioinformatycznych wskazujących na obecność w TROSPA domeny transbłonowej i peptydu sygnałnego (Rycina 4.7A). Dodatkowo utworzono

mutanta pozbawionego 7 aminokwasów z końca karboksylowego, ze względu na zaobserwowaną podczas oczyszczania białka tendencję do degradacji. Wydaje się, że jej przyczyną mogła być obecność w roztworze chlorowodoru tris(2-karboksyetylo)fosfiny (TCEP), który stosowano aby zapobiec niespecyficznemu dimeryzacji białka TROSPA_NΔ44 poprzez tworzenie mostków disiarczkowych. Indukowane przez TCEP cięcie łańcucha polipeptydowego w okolicach reszty cysteinowej obserwowali także inni badacze [278]. W przyszłości należałoby zatem stwierdzić, czy zastosowanie zamiast TCEP innego czynnika redukującego takiego jak np. β-merkaptoetanol lub ditiotreitrol (DTT) wpływa na stabilność białka. Innym rozwiązaniem może być wprowadzenie mutacji substytucyjnej w TROSPA_NΔ44 polegającej na zamianie reszty Cys155 na alaninę lub serynę [279].

Aby zweryfikować postawioną na wstępie hipotezę, że domena transbłonowa obecna na końcu aminowym TROSPA nie bierze udziału we wiązaniu TROSPA-OspA, analizowano powinowactwo mutantów delecyjnych TROSPA do OspA za pomocą testów ELISA. Wykazały one, że żaden z wariantów TROSPA, pomimo braku całej lub części domeny transbłonowej, nie utracił zdolności wiązania lipoproteiny OspA (Rycina 4.7B). Tym samym, dowiedziono, że domena transbłonowa nie odgrywa istotnej roli w tworzeniu kompleksów pomiędzy białkami TROSPA i OspA. Co więcej, zademonstrowano, że delecja 7-aminokwasowego fragmentu białka znajdującego się na końcu karboksylowym TROSPA również nie wpływa na wiązanie białka OspA.

Przeprowadzone w ramach niniejszych badań analizy bioinformatyczne wykazały, że białka TROSPA oraz OspA posiadają znacząco różne punkty izoelektryczne. TROSPA jest białkiem kwaśnym, natomiast OspA – zasadowym. Fakt ten powoduje, iż w pH zbliżonym do fizjologicznego, białka te obdarzone są przeciwnymi ładunkami. Wysłunięto zatem przypuszczenie, że w oddziaływaniach pomiędzy TROSPA a OspA istotną rolę odgrywają oddziaływania elektrostatyczne. Aby zweryfikować tę hipotezę wyprodukowano mutanty TROSPA, w których ujemnie naładowane reszty aminokwasowe zostały zamienione na reszty pozbawione ładunku. Następnie analizowano powinowactwo otrzymanych mutantów do białka OspA. Uzyskane wyniki nie dały jednoznacznej odpowiedzi na temat natury oddziaływania pomiędzy

białkami TROSPA i OspA. Chociaż wszystkie mutanty, mające zmniejszony wypadkowy ładunek ujemny, oddziaływały z OspA znacząco słabiej niż typ dziki, to jednak żaden z nich nie utracił zdolności do wiązania białka bakteryjnego. Oznacza to, iż oddziaływania elektrostatyczne nie są jedynymi odpowiedzialnymi za tworzenie kompleksu TROSPA-OspA. Ponadto można przypuszczać, że podobnie jak ma to miejsce w przypadku wielu innych nieuporządkowanych białek, oddziaływania odpychające pomiędzy obdarzonymi jednoimiennym ładunkiem resztami aminokwasowymi stabilizują nieustrukturyzowane rejony TROSPA [280]. Stwierdzono, że usunięcie tego typu reszt aminokwasowych sprzyja lokalnemu porządkowaniu łańcuchów polipeptydowych [281]. Jeżeli proces taki ma miejsce w przypadku otrzymanych mutantów TROSPA, wówczas dochodzić może do częściowego zamaskowania rejonów MoRF i tym samym osłabienia wiązania TROSPA-OspA.

Niewykluczone, że wpływ na oddziaływanie TROSPA-OspA mają także modyfikacje potranslacyjne białka TROSPA. Pokazano bowiem, że u *I. scapularis* natywne białko TROSPA podlega glikozylacji [108]. Aby przetestować wpływ glikozylacji na tworzenie kompleksów pomiędzy TROSPA i OspA, postanowiono wyprodukować białko TROSPA w komórkach owadzych. Miało to na celu uzyskanie białka jak najbardziej zbliżonego do natywnego TROSPA pochodzącego z kleszcza *I. ricinus*. Następnie porównano zdolność do wiązania OspA białek otrzymanych w systemie eukariotycznym i prokariotycznym. Pozbawione domeny transbłonowej białko TROSPA_Δ50 wyprodukowano w bakterjach oraz w komórkach owadzych, a następnie oczyszczono i porównano zdolności obu białek do wiązania OspA. Poczynione obserwacje sugerują, iż TROSPA_Δ50 podlega glikozylacji w zastosowanym eukariotycznym systemie ekspresyjnym. Modyfikowane potranslacyjnie białko TROSPA_Δ50 nie wykazywało jednak większego powinowactwa względem OspA, w porównaniu z białkiem produkowanym w bakterjach. Oznacza to, iż dołączone do łańcucha polipeptydowego TROSPA_Δ50 modyfikacje najprawdopodobniej nie odgrywają istotnej roli w oddziaływaniach TROSPA_Δ50-OspA. Jedną z funkcji grup cukrowych może być ochrona rozwiniętego łańcucha TROSPA przed proteazami obecnymi w jelicie kleszcza [282]. Glikany obecne w pobliżu błony komórkowej mogą również warunkować

właściwą ekspozycję tych motywów TROSPA, które uczestniczą w wiązaniu innych białek [283,284].

5.5. Struktura białka TROSPA_NΔ44

Uzyskane dane eksperymentalne oraz przeprowadzone analizy bioinformatyczne wskazują, że będąca obiektem niniejszych badań zewnątrzkomórkowa część TROSPA jest białkiem nieuporządkowanym (białko typu IDP). Wydaje się, że skrócona forma białka TROSPA, która podobnie jak TROSPA_NΔ44 byłaby pozbawiona kotwiczącej w błonie komórek nabłonka jelitowej domeny transbłonowej, może także występować w naturze. Pal i współpracownicy znaleźli bowiem białko TROSPA również na powierzchni komórek *B. burgdorferi* [108]. Biorąc pod uwagę dostępne dane literaturowe stwierdzić można, że TROSPA jest jak dotąd jedynym zidentyfikowanym białkiem nieuporządkowanym biorącym udział w oddziaływaniach pomiędzy wektorem i patogenem.

Zgodnie z definicją, białka IDP mogą pełnić istotne funkcje biologiczne pomimo tego, iż w warunkach fizjologicznych przyjmują wiele dynamicznie zmieniających się, alternatywnych konformacji, zarówno na poziomie struktury drugo- jak i trzeciorzędowej [221,247,264]. Podczas wiązania się z partnerem lub pod wpływem zmieniających się warunków środowiska niektóre białka IDP mogą przechodzić ze stanu nieuporządkowanego do uporządkowanego (ang. *disorder-to-order transition*) [250].

Jedną z cech białek IDP jest charakterystyczny skład aminokwasowy, na który składa się niska zawartość reszt hydrofobowych (brak oddziaływań hydrofobowych prowadzących do zwijania łańcucha) oraz wysoki wypadkowy ładunek prowadzący do wzajemnego odpychania się reszt aminokwasowych [247]. Z przeprowadzonych analiz wynika, że wartość średniej hydrofobowości TROSPA_NΔ44 (0,4999) nie jest typowa dla IDP, ale lokuje się na granicy pomiędzy białkami o stabilnej strukturze, a IDP [247]. Niektóre zidentyfikowane nieuporządkowane białka lub domeny charakteryzują się jednak podobną średnią hydrofobowością, np. wynosi ona 0,4805 dla N-końcowego fragmentu czynnika transkrypcyjnego TAFII-230 [285], 0,4541 dla α -synukleiny [286], czy też 0,4552 dla domeny transaktywatora transkrypcji Vmw65 wirusa opryszczki

[287]. Co więcej, wykazano, że korelacja pomiędzy hydrofobowością lub wypadkowym ładunkiem, a stopniem nieuporządkowania białka nie zawsze jest ścisła i jednoznaczna. W niektórych przypadkach stopień uporządkowania białka jest mniejszy niż wynikałoby to z wyznaczonych parametrów [288].

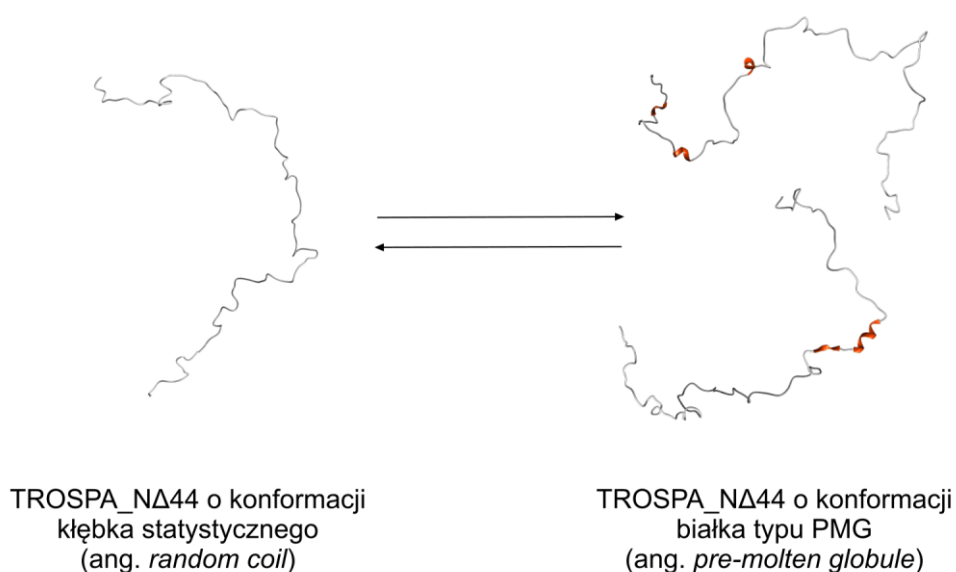
Bardziej szczegółowe analizy składu aminokwasowego wskazują, że IDPs posiadają niewielką zawartość tzw. aminokwasów sprzyjających porządkowaniu, natomiast w większości są zbudowane z reszt faworyzujących stan strukturalnego nieuporządkowania. TROSPA_NΔ44 w 21% składa się z pierwszej grupy aminokwasów i aż w 55% z drugiej grupy, czyli aminokwasów promujących brak uporządkowania [246,289,290]. Cechą charakterystyczną IDP oraz rejonów nieuporządkowanych jest również niska zawartość aminokwasów aromatycznych. Z drugiej strony, reguła ta nie dotyczy rejonów funkcjonalnych tych białek, które często są wzbogacone w reszty Tyr, Trp oraz Phe [291,292]. TROSPA_NΔ44 zawiera 5 reszt aromatycznych, które znajdują się w pobliżu końca karboksylowego białka w rejonie 140-157. Fragment 140-157 zawiera się w odcinku TROSPA_NΔ44 przewidzianym bioinformatycznie jako uporządkowany (126/135 – 160; Rozdział 4.7.4.1). Może to świadczyć o istotnej roli fragmentu 140-157 w oddziaływaniu TROSPA_NΔ44 z partnerami białkowymi.

Duża elastyczność łańcucha polipeptydowego TROSPA_NΔ44 jest przypuszczalnie przyczyną problemów z jego krystalizacją. Pomimo zastosowania około 600 różnych warunków nie udało się uzyskać kryształów białka. Wydaje się, że aby zwiększyć szansę ich powstania należy najpierw zidentyfikować warunki sprzyjające porządkowaniu się struktury białka TROSPA_NΔ44. Aby zbadać zmiany konformacyjne oraz tworzenie struktur przejściowych w TROSPA_NΔ44 podczas tworzenia kompleksu z OspA można by również zastosować spektroskopię NMR [293,294].

Cechą charakterystyczną białek IDP są duże w stosunku do ich masy molowej rozmiary hydrodynamiczne. Parametrem, który je opisuje jest promień hydrodynamiczny R_h . Wartość R_h może być wyznaczona za pomocą szeregu metod takich jak SAXS, NMR z impulsowym gradientem pola magnetycznego (ang. *Pulsed Field Gradient NMR*), SEC oraz DLS [221]. Właściwości hydrodynamiczne TROSPA_NΔ44 wyznaczone na podstawie wyników DLS ($2,91 \text{ nm} \leq R_h \leq 3,45 \text{ nm}$) i SEC wskazują, że białko to występuje w postaci

monomeru o silnie wydłużonym kształcie. Szeroki zakres wartości przyjmowanych przez R_h , a także stosunkowo szeroki pik elucyjny TROSPA_NΔ44 podczas SEC wskazują, że białko to może przybierać wiele różnych konformacji [231,232]. Co więcej, wartości R_h są mniejsze niż dla całkowicie zdenaturowanej cząsteczki TROSPA_NΔ44 ($R_h \sim 4,9$ nm) za pomocą czynników chaotropowych, takich jak mocznik, czy też chlorowodorek guanidyny. Oznacza to, iż białko nie jest w pełni zdenaturowane, lecz zawiera szczątkowe elementy struktury drugorzędowej i przybiera szereg różnych konformacji mieszczących się pomiędzy strukturą stopionej globuli typu PMG (ang. *premolten globule-like*), a konformacją kłębka statystycznego [231,295] (Rycina 5.1).

Badania DLS wskazują, że wraz ze wzrostem temperatury do 80°C TROSPA_NΔ44 nie podlega oligomeryzacji lub agregacji typowej dla posiadających hydrofobowy rdzeń białek globularnych, co jest cechą typową dla IDP [227,232].



Rycina 5.1. Białko TROSPA_NΔ44 występujące w roztworze o pH 7,9 jako zbiór wielu, mniej lub bardziej licznych konformerów.

Wykorzystano wygenerowane przez EOM modele TROSPA_NΔ44 o numerze 1.1 (po lewej), 3.2 (na górze, po prawej) oraz 6.2 (na dole, po prawej). Kolorem pomarańczowym zaznaczono struktury drugorzędowe.

DLS został również wykorzystany do monitorowania zmian R_h cząsteczki podczas denaturacji TROSPA_NΔ44 za pomocą chlorowodoru guanidyny lub mocznika. W obu przypadkach krzywa denaturacyjna odzwierciedla stopniowe rozwijanie łańcucha polipeptydowego TROSPA_NΔ44, wskazując, że pomiędzy stanem natywnym a zdenaturowanym występują jeszcze formy pośrednie TROSPA_NΔ44. Powyższe obserwacje pokrywają się z wynikami uzyskanymi za pomocą CD, SEC, SAXS oraz przewidywania rejonów nieuporządkowanych wskazując, iż pomimo znacznego nieuporządkowania łańcucha polipeptydowego, TROSPA_NΔ44 zawiera elementy struktury drugorzędowej [296,297].

W celu szczegółowego scharakteryzowania struktury drugorzędowej TROSPA_NΔ44, białko to poddano analizie spektralnej w zakresie dalekiego UV z zastosowaniem spektroskopii dichroizmu kołowego (CD). Spektroskopia CD jest doskonałym narzędziem do monitorowania nieznacznych zmian w organizacji przestrzennej białka, które mogą dotyczyć jego niewielkiego fragmentu. Dlatego też, technikę tą wykorzystano również do badania zmian w strukturze TROSPA_NΔ44 w zależności od temperatury oraz pH środowiska.

Zarejestrowane widma CD TROSPA_NΔ44 są typowe dla białek o wysokim stopniu nieuporządkowania łańcucha polipeptydowego. Ponadto, wyniki CD wskazują, że struktura II-rzędowa TROSPA_NΔ44 jest ściśle związana z pH środowiska. W pH 7,4 (i temperaturze nieprzekraczającej 40°C) TROSPA_NΔ44 jest ustrukturyzowane średnio w 45%, podczas gdy zarówno w niższym (pH 6; 6,4; 7), jak i wyższym pH (pH 8) stopień uporządkowania białka jest mniejszy i wynosi średnio 16 - 29%. Co ciekawe, taką samą zawartość rejonów uporządkowanych w TROSPA_NΔ44 (16 - 28%) wskazała analiza bioinformatyczna za pomocą MetaDisorder. Tak duże zmiany strukturalne w odpowiedzi na zmianę pH świadczą o dużej elastyczności i zmienności konformacyjnej łańcucha TROSPA_NΔ44. Obserwowany w pH 7,4 wzrost zawartości struktur drugorzędowych w TROSPA_NΔ44 (do 45%) można skojarzyć z faktem, iż takie właśnie pH panuje w kolonizowanym przez bakterie jelicie kleszcza i w takim pH dochodzi do oddziaływań TROSPA-OspA [108,298,299]. A zatem wydaje się, że zmiany konformacyjne w TROSPA_NΔ44 mogą być czynnikiem koniecznym w procesie rozpoznawania i wiązania się obu białek. Co więcej, zmniejszenie zawartości struktur

drugorzędowych w TROSPA_NΔ44 w pH 6,4 i 7 może mieć związek z odłączaniem się OspA od TROSPA *in vivo* i przechodzeniem borrelii do hemocelu. Wykazano bowiem, że podczas przedostawania się *B. burgdorferi* z jelita do gruczołów ślinowych kleszcza pH wynosi około 6,8 (przy temperaturze wynoszącej 37°C) [298,300].

Wysoki stopień nieuporządkowania, duże w stosunku do masy molowej rozmiary ($3,42 \text{ nm} \leq R_g \leq 4,47 \text{ nm}$) oraz duża elastyczność łańcucha polipeptydowego TROSPA_NΔ44 zostały również potwierdzone metodą SAXS. Pomiar SAXS, podobnie jak SEC oraz DLS, potwierdziły, że TROSPA_NΔ44 występuje w roztworze w postaci monomeru. Wysokie wartości parametrów strukturalnych takich jak R_h , R_g , D_{\max} oraz funkcja $p(r)$ wskazują, że cząsteczki TROSPA_NΔ44 są silnie wydłużone. Pokazano, że TROSPA_NΔ44 występuje w postaci zespołu strukturalnie zróżnicowanych, podlegających wzajemnym przekształceniom konformacji, przypominających tzw. „chmurę białkową”, w której pozycje poszczególnych atomów oraz kąty torsyjne łańcucha głównego podlegają znaczącym zmianom w czasie [301]. Strukturę TROSPA_NΔ44 opisano za pomocą ograniczonej liczby reprezentatywnych konformerów, wykorzystując w tym celu program EOM. Wygenerowane przez EOM modele TROSPA_NΔ44 wykazują rozkład dwumodalny, wskazując na istnienie dwóch populacji różniących się stopniem zwinięcia łańcucha polipeptydowego. Co ciekawe, wraz ze wzrostem stężenia białka do 12 mg/ml, liczba populacji TROSPA_NΔ44 rośnie do czterech. Towarzyszy temu zmniejszanie się rozmiarów cząsteczek oraz wzrost upakowania łańcucha. Zachowanie takie występuje u IDP, które podlegają porządkowaniu (ang. *disorder-to-order transition*) na przykład pod wpływem kontaktu z ligandem lub zmiany pH. Może ono również świadczyć o tworzeniu się elementów PSE (ang. *preformed structural elements*), które są przejściowo formowane w białku w stanie niezwiązanym oraz uczestniczą w molekularnym rozpoznaniu ligandu, jako tzw. miejsca pierwotnego kontaktu. Po zakotwiczeniu się w odpowiednim rejonie ustrukturyzowanego partnera, PSE ułatwiają dopasowanie i oddziaływanie pozostałych miejsc wiążących. PSE wykazują z reguły silną preferencję do przyjmowania określonej konformacji, która nawet po związaniu z ligandem nie ulega znaczącej zmianie [246,302].

Przeprowadzone metodą SAXS badania białka OspA_NΔ6 wykazały, że jest ono podobnie jak jego krótsza, opisywana w literaturze forma OspA_NΔ17, białkiem o stabilnej strukturze trzeciorzędowej [109,111,114]. Białko to w roztworze tworzy dimer, który powstaje najprawdopodobniej poprzez oddziaływanie hydrofobowe elementów lipidowych białek. Wykazano bowiem, że natywna forma białka OspA zawiera modyfikację potranslacyjną w postaci tripalmitynianu glicerolu dołączonej do reszty cysteiny [266]. Powstawania dimeru nie zaobserwowano we wcześniejszych badaniach, w których nieposiadająca części tłuszczowej OspA_NΔ17 występowała w postaci monomeru [114]. Fragmenty lipidowe są zlokalizowane na końcu aminowym OspA_NΔ6, co sprawia, że białka są ułożone względem siebie jak „głowa do głowy”. Przepuszczalnie, takie ułożenie cząsteczek OspA odzwierciedla do pewnego stopnia sytuację, jaka występuje w naturze, gdzie białka te są ułożone blisko siebie oraz zakotwiczone w zewnętrznej błonie komórkowej *B. burgdorferi* [303]. Na podstawie przeprowadzonych analiz stwierdzić można, że TROSPA_NΔ44 oddziałuje z dimerem OspA_NΔ6, tworząc kompleks w stosunku stechiometrycznym 2:2, który posiada kształt spłaszczonej i wydłużonej globuli.

5.6. Struktura kompleksu TROSPA_NΔ44-OspA

Dokowanie uzyskanych na podstawie danych SAXS konformerów TROSPA_NΔ44 do struktury krystalograficznej OspA_NΔ17 (zwanej dalej OspA) pozwoliło na zaproponowanie modelu opisującego architekturę kompleksu TROSPA_NΔ44-OspA. W modelu A kompleksu, TROSPA_NΔ44 zawiera niewielką ilość elementów struktury drugorzędowej i przyjmuje podobną konformację jak białko niezwiązane. Niektóre IDP, podobnie jak TROSPA_NΔ44 w modelu A, nie zwiększają znacząco zawartości elementów strukturalnych nawet w stanie związanym, tworząc z białkami uporządkowanymi „rozmyte kompleksy” (ang. *fuzzy complexes*) [304–306]. Istotne funkcje białka mogą wynikać bezpośrednio z plastyczności oraz podatności łańcucha białkowego na odkształcanie, co sprawia, że znajduje się on w nieustannym ruchu (ang. *entropic chain*) [289,307]. Z drugiej strony, w modelu B, TROSPA_NΔ44 zawiera więcej struktur drugorzędowych, a jego łańcuch

polipeptydowy jest bardziej upakowany, co pokrywa się z obserwowanym na widmie CD porządkiem się TROSPA_NΔ44 w pH 7,4. Niemniej jednak, biorąc pod uwagę dane SAXS dotyczące objętości kompleksu oraz jego maksymalnych wymiarów (D_{max}), które lepiej korelują z modelem A, nie można wykluczyć, że TROSPA_NΔ44 nie podlega znaczącemu zwijaniu pod wpływem wiązania z OspA i posiada w kompleksie wydłużony kształt.

W modelu A motyw wiążący OspA, który obejmuje reszty 128 – 163, pokrywa się z rejonem w TROSPA_NΔ44 przewidzianym bioinformatycznie jako uporządkowany. Odcinek ten znajduje się na końcu karboksylowym pomiędzy Val-126/Thr-135 a resztą Gln-160. Wykazano, że takie ustrukturyzowane fragmenty, otoczone przez rejony nieuporządkowane, często zawierają elementy wiążące [248,308,309]. Wyraźne załamanie krzywej prezentującej prawdopodobieństwo wystąpienia rejonów nieuporządkowanych w TROSPA_NΔ44, w segmencie 126-160 (Rycina 4.15), a także występowanie w tym odcinku elementów MoRF (T135 oraz 151-154: ASYL) może świadczyć, że tworzy on motyw podlegający strukturyzacji pod wpływem wiązania się z partnerem [248,310].

Charakterystyczny skład aminokwasowy zduplikowanego fragmentu 98-121 w TROSPA_NΔ44, w którym zawierają się głównie reszty polarne, a także fakt, iż odcinek ten znajduje się przed rejonem przewidzianym jako uporządkowany (126-160) wskazują, że fragment 98-121 może pełnić rolę elastycznego łącznika [246,264], tak jak przewiduje to model A. Występowanie w TROSPA_NΔ44 elastycznego łącznika, zapewniałoby duży zasięg oraz dynamikę wiązania białka OspA [311]. Ustrukturyzowana domena TROSPA w rejonie 126-160, która byłaby poprzedzona elastycznym łącznikiem, mogłaby umożliwiać wiązanie wielu różnych partnerów (ang. *one-to-many binding mechanism*) [312,313], takich jak OspA, czy też nieznanne białko powierzchniowe *Babesia bigemina*. Oddziaływanie TROSPA z różnymi białkami byłoby również możliwe dzięki mechanizmowi tzw. polimorfizmu konformacyjnego, według którego dany rejon nieuporządkowanego białka może przybierać różne konformacje w zależności od związanego partnera lub warunków środowiska [314,315]. W badaniach CD wykazano bowiem, że struktura drugorzędowa TROSPA_NΔ44 zmienia się znacząco w zależności od pH środowiska. Zjawisko takie zostało zaobserwowane m. in. w przypadku

białka p53, w którym znajdujący się na końcu karboksylowym fragment przybiera strukturę helisy α , nici β lub dwóch różnie ukształtowanych zwrotów w zależności od partnera białkowego z jakim się wiąże (ang. *chameleon sequence*) [316].

Zgodnie z modelem A MoRFy Thr135 lub 151-154:ASYL mogą stanowić miejsca pierwotnego kontaktu (ang. *primary contact site*), czyli krótkie elementy molekularnego rozpoznania, które są bardziej wyeksponowane niż pozostałe regiony, dzięki czemu jako pierwsze wchodzi w kontakt z OspA [317]. Z kolei w modelu B rozwinięty łańcuch TROSPA_N Δ 44 mógłby w pierwszej kolejności wiązać się słabo za pośrednictwem ujemnie naładowanych reszt Asp159 i Asp136, a następnie podlegać strukturyzacji w miarę zbliżania się OspA do właściwego miejsca wiązania (ang. *fly-casting mechanism*) [311], tworzonego przez MoRFy takie jak 100-105:SLSMLP, Thr98, Ser79 i/lub Thr71. W tej sytuacji zduplikowany fragment 98-121 obecny w TROSPA_N Δ 44 mógłby pełnić rolę miejsca wiążącego, które podlega ustrukturyzowaniu pod wpływem wiązania z ligandem.

Wydaje się, że wiązanie białka OspA przez TROSPA_N Δ 44 może być procesem kilkietapowym. Ponieważ obydwa białka obdarzone są znaczącymi różnoimiennymi ładunkami, można przypuszczać, że w pierwszym etapie tworzenia kompleksu dochodzi do przyciągania elektrostatycznego (oddziaływania dalekiego zasięgu). W obydwu wygenerowanych modelach 1/3 reszt biorących udział w oddziaływaniu stanowią aminokwasy naładowane. W kolejnych etapach powstawałyby oddziaływania hydrofobowe, van der Waalsa oraz wiązania wodorowe, co zapewniałoby większą stabilność kompleksu.

Analiza sekwencji aminokwasowej TROSPA wskazuje, że zawiera ono miejsca potencjalnych modyfikacji potranslacyjnych, w tym m. in. O-glikozylacji [108]. Obecność reszt cukrowych dołączonych do łańcuchów bocznych TROSPA może nie mieć wpływu na plastyczność jego konformacji [284]. Oznacza to, iż TROSPA typu dzikiego pomimo dołączonych grup węglowodanowych może wykazywać dużą swobodę konformacyjną, umożliwiającą dopasowanie struktury do wiążanego białka [246,318]. Glikozylacja stabilizuje rozciągniętą konformację łańcucha polipeptydowego i zapobiega powstawaniu elementów struktury drugorzędowej [284]. Oznacza to, iż przyłączenie reszt cukrowych do grupy hydroksylowej Ser56 oraz Ser142, nie

powinno wpływać negatywnie na elastyczność TROSPA_NΔ44. Wydaje się jednak, że rodzaj przyłączonej grupy cukrowej może wpływać na konformację TROSPA. Wykazano bowiem, że ten sam fragment danego białka może mieć dołączone różne grupy cukrowe, co prowadzi do tzw. mikroheterogenności struktury białka [319].

6. Wnioski

Zaprezentowane w niniejszej rozprawie badania podsumować można następującymi wnioskami:

- Wyprodukowane w bakterjach białko TROSPA z *I. ricinus* wykazuje zdolność do wiązania OspA pochodzącego z trzech różnych gatunków *Borrelia*: *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* oraz *B. afzelii*.
- Najefektywniej kompleks TROSPA z OspA tworzy się w przypadku, gdy białko bakteryjne pochodzi z *B. burgdorferi* s.s., natomiast mniej efektywnie, gdy źródłem białka bakteryjnego jest *B. garinii* oraz *B. afzelii*.
- Domena transbłonowa obecna na końcu aminowym TROSPA nie bierze udziału w tworzeniu kompleksu TROSPA-OspA. Usunięcie domeny transbłonowej powoduje znaczne zwiększenie rozpuszczalności białka TROSPA.
- Pomimo istotnej roli, oddziaływania elektrostatyczne nie są jedynym czynnikiem odpowiedzialnym za tworzenie kompleksu TROSPA-OspA.
- Nie wydaje się by modyfikacje potranslacyjne, którym podlega białko TROSPA odgrywały znaczącą rolę w procesie tworzenia kompleksu TROSPA-OspA.
- Zewnątrzkomórkowy fragment TROSPA (TROSPA_N Δ 44) jest nieuporządkowany i występuje w roztworze jako zbiór różnorodnych konformerów (mniej lub bardziej licznych) które w zależności od warunków otoczenia (np. pH) przyjmują cechy charakterystyczne dla stanu opisywanego, jako stopiona globula typu PMG (ang. *premolten globule-like*) i/lub kłębek statystyczny. Oznacza to, że TROSPA_N Δ 44 zawiera jedynie szczątkowe elementy struktury drugorzędowej i

przybiera szereg różnych konformacji, przypomina zatem tzw. „chmurę białkową”.

- TROSPA jest pierwszym zidentyfikowanym białkiem IDP biorącym udział w oddziaływaniach pomiędzy wektorem i patogenem.
- TROSPA_NΔ44 występuje w roztworze w postaci silnie wydłużonych monomerów, o czym świadczą wysokie, w stosunku do masy molowej, wartości parametrów charakteryzujących strukturę białka (R_h , R_g , D_{max} oraz funkcja $p(r)$).
- TROSPA_NΔ44 wiąże się z dimerem OspA_NΔ6, tworząc kompleks w stosunku stechiometrycznym 2:2.
- TROSPA_NΔ44 zawiera zduplikowane fragmenty (46-69 oraz 98-121), które pełnią prawdopodobnie rolę łącznika, zapewniającego elastyczność rejonowi 126-160 przewidzianemu bioinformatycznie jako uporządkowany.

7. Streszczenie

Pasożytniczy tryb życia kleszczy sprawił, iż stały się one nosicielami wielu patogenów, w tym krętków *Borrelia burgdorferi*, odpowiedzialnych za rozwój boreliozy. W Europie, bakterie *B. burgdorferi* najczęściej przenoszone są przez kleszcze pospolite - *Ixodes ricinus*. Wykazano, że białkiem niezbędnym do kolonizacji roztoczy przez krętki jest receptor TROSPA (ang. *tick receptor for OspA*). Bakterie, występujące w spożytej przez kleszcza krwi, wiążą się z zakotwiczoną w błonie komórek nabłonkowych glikoproteiną TROSPA i w ten sposób zasiedlają przewód pokarmowy wektora. Ze strony borrelii w oddziaływaniach tych uczestniczy białko OspA (ang. *outer surface protein A*), występujące na powierzchni zewnętrznej błony komórkowej bakterii. Podstawowym celem badań prezentowanych w niniejszej rozprawie było lepsze poznanie strukturalnych i funkcjonalnych uwarunkowań oddziaływań zachodzących pomiędzy kleszczem a patogenną bakterią. Jako główny obiekt badań wybrano kompleks TROSPA-OspA.

Przeprowadzone na wstępie doświadczenia potwierdziły prawdziwość wcześniejszych doniesień dotyczących roli TROSPA w oddziaływaniach kleszcz-bakteria. Wykazano bowiem, że wyprodukowane w systemie bakteryjnym białko TROSPA wykazuje zdolność do wiązania OspA pochodzącego z trzech różnych gatunków *Borrelia* (*B. afzelii*, *B. garinii* oraz *B. burgdorferi* s.s.). Stwierdzono, iż w procesie powstawania kompleksu TROSPA-OspA istotną rolę odgrywają oddziaływania elektrostatyczne. Zgodnie z przewidywaniami, nie stwierdzono by w procesie tym uczestniczyła domena transbłonowa białka TROSPA. W kolejnym etapie badań porównano aktywność białka TROSPA produkowanego w komórkach owadzych i w *E. coli*. W rezultacie zaobserwowano, że modyfikacje potranslacyjne, którym ulega białko produkowane w układzie eukariotycznym, nie wpływają w istotny sposób na powstawanie kompleksu TROSPA-OspA.

Wyniki badań strukturalnych dowiodły, że uczestniczącą w wiązaniu OspA, zewnątrzkomórkową część TROSPA (TROSPA_N Δ 44) zaliczyć można do klasy białek nieuporządkowanych (ang. *intrinsically disordered protein*, IDP). TROSPA_N Δ 44 jest zatem pierwszym zidentyfikowanym białkiem IDP, które bierze udział w oddziaływaniu pomiędzy wektorem i patogenem. Pokazano, iż w

zależności od pH środowiska TROSPA_NΔ44 może przybierać konformację stopionej globuli typu PMG (ang. *premolten globule-like*) lub kłębka statystycznego. Pomiar małokątowego rozpraszania promieniowania rentgenowskiego (ang. *small angle X-ray scattering*, SAXS) wykazały, że cząsteczka białka TROSPA_NΔ44 jest silnie wydłużona i występuje w roztworze w postaci licznych, dynamicznie przekształcających się konformerów. Na podstawie uzyskanych wyników stworzono szereg modeli kompleksu TROSPA_NΔ44-OspA, a następnie wybrano dwa, które najlepiej odpowiadały otrzymanym danym eksperymentalnym.

8. Summary

The parasitic lifestyle of ticks caused that they have become vectors of many pathogens, including *Borrelia burgdorferi* that is responsible for the development of Lyme disease (borreliosis). In Europe, *B. burgdorferi* spirochetes are predominantly transmitted by the castor bean tick – *Ixodes ricinus*. It has been shown that two factors are indispensable for vector colonization by spirochetes: a bacterial outer surface protein A (OspA) and the tick receptor for OspA (TROSPA - a glycoprotein anchored in the membrane of gut epithelial cells). Spirochetes present in ingested blood, bind through OspA to TROSPA and thereby colonize tick's digestive tract. The major goal of these studies was to better understand structural and functional requirements of tick-pathogenic bacteria interactions. As the main object of the investigations the TROSPA-OspA complex was taken.

Preliminary experiments confirmed the veracity of previous reports on the role of TROSPA in the tick-*Borrelia* interactions. It was demonstrated that TROSPA produced in bacterial system is capable of binding OspA from three different *Borrelia* species (*B. afzelii*, *B. garinii* and *B. burgdorferi* s.s.). It was found that electrostatic interactions play an important role in the TROSPA-OspA binding. As expected, there was no evidence that the N-terminal transmembrane domain of TROSPA is involved in the TROSPA-OspA complex formation. In the next stage of the study, the activities of TROSPA produced both in *E. coli* and in eukaryotic cells were compared. As a result, it was found that the post-translational modifications of TROSPA produced in eukaryotic system do not significantly affect TROSPA-OspA complex formation.

Structural investigations showed that the extracellular part of TROSPA (TROSPA_N Δ 44), which is involved in OspA binding, is an intrinsically disordered protein (IDP). Consequently, TROSPA_N Δ 44 can be considered the first identified IDP that is engaged in vector and pathogenic microorganism interactions. It was showed that depending on the pH, TROSPA_N Δ 44 can exist in two different states: premolten globule (PMG) or random coil. Small angle X-ray scattering (SAXS) studies demonstrated that TROSPA_N Δ 44 has a highly elongated shape and exist in a solution as a set of conformers that undergo dynamic transformations. Based on the obtained results, a number of TROSPA_N Δ 44-OspA complex models were created. Two of them were selected as the models that best-fit the experimental results.

9. Wykaz prac naukowych powstałych podczas realizacji pracy doktorskiej

Prezentowany w niniejszej rozprawie materiał naukowy został częściowo opublikowany w poniższych pracach:

a) czasopisma naukowe znajdujące się na tzw. liście filadelfijskiej:

1. Urbanowicz A, **Lewandowski D**, Jodynis-Liebert J, Sadowski C, Figlerowicz M; "*Functional insights into recombinant TROSPA protein from Ixodes ricinus*"; PLoS ONE 8(10): e76848. doi:10.1371/journal.pone.0076848
2. Urbanowicz A*, **Lewandowski D***, Szpotkowski K, Figlerowicz M; "*Tick receptor for outer surface protein A from Ixodes ricinus - the first intrinsically disordered protein involved in vector-microbe recognition*"; Nature Scientific Reports – po drugiej rundzie recenzji
(* równy udział autorów)
3. **Lewandowski D**, Urbanowicz A, Figlerowicz M; „*Molekularne podłoże oddziaływań pomiędzy Borrelia burgdorferi, kleszczem i kręgowcem*”; Advances in Microbiology, 2013, vol. 52(1), 9-16.

b) czasopisma recenzowane nieznajdujące się na tzw. liście filadelfijskiej:

4. **Lewandowski D**, Urbanowicz A, Figlerowicz M; „*The fruitful coexistence of Borrelia burgdorferi and Ixodes ticks*”; Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology, 2013, 94(1):31-33. doi: 10.5114/bta.2013.46432

c) monografie pokonferencyjne nierecenzowane:

5. **Lewandowski D**, Urbanowicz A, Szpotkowski K, Kamel K, Jaskólski M, Figlerowicz M; "*TROSPA - an intrinsically disordered protein involved in the tick colonization by Borrelia*", 2014, 1st Congress BIO2014 (Book of abstracts, 2014), s. 109

6. **Lewandowski D**, Urbanowicz A, Szpotkowski K, Kamel K, Jaskólski M, Figlerowicz M; "*TROSPA - an intrinsically disordered protein involved in the tick colonization by Borrelia*", 2015, EMBO – Young Scientists Forum 2015 (Book of Abstracts), s.127

d) zgłoszenia patentowe:

Urbanowicz A, Figlerowicz M, **Lewandowski D**, "*Lyme disease vaccine, genetic construct, recombinant protein, method for designing genetic construct, method for producing vaccine, method for producing recombinant proteins, use of recombinant proteins in the production of Lyme disease vaccine*", 2013, międzynarodowe zgłoszenie patentowe PCT/PL2013/000133 (US 20150093408 A1, EP2908852A1)

10. Finansowanie



Program Międzynarodowe Projekty Doktoranckie „*Structural biology of plants and microbes*” realizowany przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej dzięki wsparciu Unii Europejskiej, Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego, w ramach Działania 1.2: „Wzmocnienie potencjału kadrowego nauki” Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka 2007-2013.



Projekt „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski” realizowany dzięki wsparciu Unii Europejskiej, Europejskiego Funduszu Społecznego, w ramach Poddziałania 8.2.2 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki.



Wsparcie Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach dotacji KNOW.

11. Literatura

1. Lampman R. Diseases of Public Health. In: Levensgood JM, editor. Ecology and animal health. Uppsala : Baltic University Press, 2012; 2012. p. 380.
2. Gratz NG. Emerging and resurging vector-borne diseases. *Annu Rev Entomol.* 1999;44: 51–75. doi:10.1146/annurev.ento.44.1.51
3. Radolf JD, Caimano MJ, Stevenson B, Hu LT. Of ticks, mice and men: understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes. *Nat Rev Microbiol.* Nature Publishing Group; 2012;10: 87–99. doi:10.1038/nrmicro2714
4. Kiss T, Cadar D, Spînu M. Tick prevention at a crossroad: new and renewed solutions. *Vet Parasitol.* Elsevier B.V.; 2012;187: 357–66. doi:10.1016/j.vetpar.2012.02.010
5. Wielinga PR, Gaasenbeek C, Fonville M, de Boer A, de Vries A, Dimmers W, et al. Longitudinal analysis of tick densities and *Borrelia*, *Anaplasma*, and *Ehrlichia* infections of *Ixodes ricinus* ticks in different habitat areas in The Netherlands. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72: 7594–7601. doi:10.1128/AEM.01851-06
6. Bacon RM, Kugeler KJ, Mead PS. Surveillance for Lyme disease--United States, 1992–2006. *MMWR Surveill Summ Morb Mortal Wkly report Surveill Summ / CDC.* 2008;57: 1–9. doi:ss5710a1 [pii]
7. Adlhoch C, Poggensee G. Lyme borreliosis: analysis of reported cases from 2007 to 2009 in six federal lands of Eastern Germany. *Epid Bull.* 2010;12: 101–107.
8. Semenza JC, Menne B. Climate change and infectious diseases in Europe. *The Lancet Infectious Diseases.* 2009. pp. 365–375. doi:10.1016/S1473-3099(09)70104-5
9. Sood SK, O'Connell S, Weber K. The Emergence and Epidemiology of Lyme Borreliosis in Europe and North America. *Lyme Borreliosis in Europe and North America: Epidemiology and Clinical Practice.* 2011. pp. 1–35. doi:10.1002/9780470933961.ch1
10. Czarkowski MP, Cieleba E, Kondej B, Staszewska E. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce w 2013 roku. 2014.
11. Estrada-Pena A, Jongejan F. Ticks feeding on humans: A review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission. *Exp Appl Acarol.* 1999;23: 685–715. doi:10.1023/A:1006241108739
12. Apanaskevich DA, Olivier JH. Life cycles and natural history of ticks. In: Sonenshine DE, Roe MR, editors. *Biology of Ticks vol1.* OUP USA; 2013. pp. 59–73. Available: <http://books.google.pl/books?id=ucg4AAAAQBAJ>
13. Mejlou HA, Jaenson TGT. Questing behaviour of *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol.* 1997;21: 747–754. doi:10.1023/A:1018421105231
14. Ribeiro JM. Role of saliva in tick/host interactions. *Exp Appl Acarol.* 1989;7: 15–20. doi:10.1007/BF01200449
15. Valenzuela JG, Francischetti IMB, Pham VM, Garfield MK, Mather TN, Ribeiro JMC. Exploring the salivome of the tick *Ixodes scapularis*. *J Exp Biol.* 2002;205: 2843–2864.
16. Brossard M, Wikel SK. Tick immunobiology. *Parasitology.* 2004;129 Suppl: S161–S176. doi:10.1017/S0031182004004834
17. Nuttall PA, Labuda M. Tick-host interactions: saliva-activated transmission. *Parasitology.* 2004;129 Suppl: S177–S189. doi:10.1017/S0031182004005633
18. Wikel SK. Tick modulation of host immunity: An important factor in pathogen transmission. *International Journal for Parasitology.* 1999. pp. 851–859. doi:10.1016/S0020-7519(99)00042-9
19. Jones LD, Hodgson E, Nuttall PA. Enhancement of virus transmission by tick salivary glands. *J Gen Virol.* 1989;70: 1895–1898. doi:10.1099/0022-1317-70-7-1895
20. Shaw MK, Tilney LG, McKeever DJ. Tick salivary gland extract and interleukin-2 stimulation enhance susceptibility of lymphocytes to infection by *Theileria parva* sporozoites. *Infect Immun.* 1993;61: 1486–1495.
21. Labuda M, Jones LD, Williams T, Nuttall PA. Enhancement of tick-borne encephalitis virus transmission by tick salivary gland extracts. *Med Vet Entomol.* 1993;7: 193–196.
22. Krocová Z, Macela A, Hernychová L, Kroca M, Pechová J, Kopecký J. Tick salivary gland extract accelerates proliferation of *Francisella tularensis* in the host. *J Parasitol.* 2003;89: 14–20. doi:10.1645/0022-3395(2003)089[0014:TSGEAP]2.0.CO;2
23. Hajnická V, Kocakova P, Slovak M, Labuda M, Fuchsberger N, Nuttall PA. Inhibition of the antiviral action of interferon by tick salivary gland extract. *Parasite Immunol.* 2000;22: 201–206. doi:10.1046/j.1365-3024.2000.00296.x

24. Sukumaran B, Narasimhan S, Anderson JF, DePonte K, Marcantonio N, Krishnan MN, et al. An *Ixodes scapularis* protein required for survival of *Anaplasma phagocytophilum* in tick salivary glands. *J Exp Med*. 2006;203: 1507–1517. doi:10.1084/jem.20060208
25. Zeidner NS, Schneider BS, Nuncio MS, Gern L, Piesman J. Coinoculation of *Borrelia* spp. with tick salivary gland lysate enhances spirochete load in mice and is tick species-specific. *J Parasitol*. 2002;88: 1276–1278. doi:10.1645/0022-3395(2002)088[1276:COBSWT]2.0.CO;2
26. Macháčková M, Oborník M, Kopecký J. Effect of salivary gland extract from *Ixodes ricinus* ticks on the proliferation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto* in vivo. *Folia Parasitol (Praha)*. 2006;53: 153–158.
27. Horká H, Černá-Kýčková K, Skallová A, Kopecký J. Tick saliva affects both proliferation and distribution of *Borrelia burgdorferi* spirochetes in mouse organs and increases transmission of spirochetes to ticks. *Int J Med Microbiol*. 2009;299: 373–380. doi:10.1016/j.ijmm.2008.10.009
28. Schmelz M. Itch and pain. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2010. pp. 171–176. doi:10.1016/j.neubiorev.2008.12.004
29. Ribeiro JM, Makoul GT, Levine J, Robinson DR, Spielman A. Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. *J Exp Med*. 1985;161: 332–344. doi:10.1084/jem.161.2.332
30. Francischetti IMB, Sa-Nunes A, Mans BJ, Santos IM, Ribeiro JMC. The role of saliva in tick feeding. *Front Biosci*. 2009;14: 2051–2088. doi:10.2741/3363
31. Ribeiro JM, Mather TN. *Ixodes scapularis*: salivary kininase activity is a metallo dipeptidyl carboxypeptidase. *Exp Parasitol*. 1998;89: 213–221. doi:10.1006/expr.1998.4296
32. Sangamnatdej S, Paesen GC, Slovak M, Nuttall PA. A high affinity serotonin- and histamine-binding lipocalin from tick saliva. *Insect Mol Biol*. 2002;11: 79–86. doi:10.1046/j.0962-1075.2001.00311.x
33. Theilgaard-Mönch K, Knudsen S, Follin P, Borregaard N. The transcriptional activation program of human neutrophils in skin lesions supports their important role in wound healing. *J Immunol*. 2004;172: 7684–7693. doi:10.4049/jimmunol.172.12.7684
34. Kazimírová M, Štibrániová I. Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013;3: 43. doi:10.3389/fcimb.2013.00043
35. Wikel SK. Tick-Host Interactions. In: Sonenshine DE, Roe M, editors. *Biology of Ticks*. Oxford University Press; 2013. pp. 88–128.
36. Maxwell SS, Stoklasek TA, Dash Y, Macaluso KR, Wikel SK. Tick modulation of the in-vitro expression of adhesion molecules by skin-derived endothelial cells. *Ann Trop Med Parasitol*. 2005;99: 661–672. doi:10.1179/136485905X51490
37. Beaufays J, Adam B, Menten-Dedoyart C, Fieves L, Grosjean A, Decrem Y, et al. Ir-LBP, an *Ixodes ricinus* tick salivary LTB4-binding lipocalin, interferes with host neutrophil function. *PLoS One*. 2008;3. doi:10.1371/journal.pone.0003987
38. Fukumoto S, Sakaguchi T, You M, Xuan X, Fujisaki K. Tick troponin I-like molecule is a potent inhibitor for angiogenesis. *Microvasc Res*. 2006;71: 218–221. doi:10.1016/j.mvr.2006.02.003
39. Islam MK, Tsuji N, Miyoshi T, Alim MA, Huang X, Takeshi H, et al. The Kunitz-like modulatory protein haemangin is vital for hard tick blood-feeding success. *PLoS Pathog*. 2009;5. doi:10.1371/journal.ppat.1000497
40. Ramachandra RN, Wikel SK. Modulation of host-immune responses by ticks (Acari: Ixodidae): effect of salivary gland extracts on host macrophages and lymphocyte cytokine production. *J Med Entomol*. 1992;29: 818–826.
41. Cavassani KA, Aliberti JC, Dias AR V, Silva JS, Ferreira BR. Tick saliva inhibits differentiation, maturation and function of murine bone-marrow-derived dendritic cells. *Immunology*. 2005;114: 235–245. doi:10.1111/j.1365-2567.2004.02079.x
42. Gillespie RD, Dolan MC, Piesman J, Titus RG. Identification of an IL-2 binding protein in the saliva of the Lyme disease vector tick, *Ixodes scapularis*. *J Immunol*. 2001;166: 4319–4326.
43. Déruaz M, Frauenschuh A, Alessandri AL, Dias JM, Coelho FM, Russo RC, et al. Ticks produce highly selective chemokine binding proteins with antiinflammatory activity. *J Exp Med*. 2008;205: 2019–2031. doi:10.1084/jem.20072689
44. Peterková K, Vančová I, Hajnická V, Slovák M, Šimo L, Nuttall PA. Immunomodulatory

- arsenal of nymphal ticks. *Med Vet Entomol.* 2008;22: 167–171. doi:10.1111/j.1365-2915.2008.00726.x
45. Mans BJ. Evolution of vertebrate hemostatic and inflammatory control mechanisms in blood-feeding arthropods. *J Innate Immun.* 2011;3: 41–51. doi:10.1159/000321599
 46. Sá-Nunes A, Bafica A, Lucas DA, Conrads TP, Veenstra TD, Andersen JF, et al. Prostaglandin E2 is a major inhibitor of dendritic cell maturation and function in *Ixodes scapularis* saliva. *J Immunol.* 2007;179: 1497–1505. doi:10.1016/j.cyto.2007.07.138
 47. Ribeiro JM, Makoul GT, Robinson DR. *Ixodes dammini*: evidence for salivary prostacyclin secretion. *J Parasitol.* 1988;74: 1068–1069.
 48. Dai J, Narasimhan S, Zhang L, Liu L, Wang P, Fikrig E. Tick histamine release factor is critical for *Ixodes scapularis* engorgement and transmission of the Lyme disease agent. *PLoS Pathog.* 2010;6. doi:10.1371/journal.ppat.1001205
 49. Chmelar J, Calvo E, Pedra JHF, Francischetti IMB, Kotsyfakis M. Tick salivary secretion as a source of antihemostatics. *Journal of Proteomics.* 2012. pp. 3842–3854. doi:10.1016/j.jprot.2012.04.026
 50. Cho YK, Manjunatha Kini R. Molecular diversity of anticoagulants from haematophagous animals. *Thrombosis and Haemostasis.* 2009. pp. 437–453. doi:10.1160/TH09-04-0221
 51. Francischetti IMB. Platelet aggregation inhibitors from hematophagous animals. *Toxicon.* 2010. pp. 1130–1144. doi:10.1016/j.toxicon.2009.12.003
 52. Klaska I, Nowak JZ. Rola układu dopełniacza w fizjologii i patologii. *Postepy Hig Med Dosw.* 2007;61: 167–177.
 53. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol.* 2010;11: 785–797. doi:10.1038/ni.1923
 54. Valenzuela JG, Charlab R, Mather TN, Ribeiro JM. Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis*. *J Biol Chem.* 2000;275: 18717–18723. doi:10.1074/jbc.M001486200
 55. Tyson K, Elkins C, Patterson H, Fikrig E, De Silva A. Biochemical and functional characterization of Salp20, an *Ixodes scapularis* tick salivary protein that inhibits the complement pathway. *Insect Mol Biol.* 2007;16: 469–479. doi:10.1111/j.1365-2583.2007.00742.x
 56. Daix V, Schroeder H, Praet N, Georgin JP, Chiappino I, Gillet L, et al. *Ixodes* ticks belonging to the *Ixodes ricinus* complex encode a family of anticomplement proteins. *Insect Mol Biol.* 2007;16: 155–166. doi:10.1111/j.1365-2583.2006.00710.x
 57. Schroeder H, Daix V, Gillet L, Renaud JC, Vanderplasschen A. The paralogous salivary anti-complement proteins IRAC I and IRAC II encoded by *Ixodes ricinus* ticks have broad and complementary inhibitory activities against the complement of different host species. *Microbes and Infection.* 2007. pp. 247–250. doi:10.1016/j.micinf.2006.10.020
 58. Schuijt TJ, Coumou J, Narasimhan S, Dai J, Deponce K, Wouters D, et al. A tick mannose-binding lectin inhibitor interferes with the vertebrate complement cascade to enhance transmission of the Lyme disease agent. *Cell Host Microbe.* 2011;10: 136–146. doi:10.1016/j.chom.2011.06.010
 59. Willadsen P. Immunity to Ticks. *Adv Parasitol.* 1980;18: 293–313. doi:10.1016/S0065-308X(08)60402-9
 60. Hewetson R, Nolan J. Resistance of cattle to cattle tick, *Boophilus microplus*. I. The development of resistance to experimental infestation. *Aust J Agric Res.* 1968;19: 323–333. Available: <http://www.publish.csiro.au/paper/AR9680323> \n http://www.publish.csiro.au/view/journals/dsp_journal_retrieve_citation.cfm?ct=AR9680323.ris
 61. Bell JF, Stewart SJ, Wikel SK. Resistance to tick-borne *Francisella tularensis* by tick-sensitized rabbits: Allergic klendusity. *Am J Trop Med Hyg.* 1979;28: 876–880.
 62. Nazario S, Das S, De Silva AM, Deponce K, Marcantonio N, Anderson JF, et al. Prevention of *Borrelia burgdorferi* transmission in guinea pigs by tick immunity. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;58: 780–785.
 63. Wikel SK, Ramachandra RN, Bergman DK, Burkot TR, Piesman J. Infestation with pathogen-free nymphs of the tick *Ixodes scapularis* induces host resistance to transmission of *Borrelia burgdorferi* by ticks. *Infect Immun.* 1997;65: 335–338.
 64. Burke GS, Wikel SK, Spielman A, Telford SR, McKay K, Krause PJ, et al. Hypersensitivity to ticks and Lyme disease risk. *Emerg Infect Dis.* 2005;11: 36–41. doi:10.3201/eid1101.040303
 65. Krause PJ, Grant-Kels JM, Tahan SR, Dardick KR, Alarcon-Chaidez F, Bouchard K, et

- al. Dermatologic changes induced by repeated *Ixodes scapularis* bites and implications for prevention of tick-borne infection. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2009;9: 603–610. doi:10.1089/vbz.2008.0091
66. Franke J, Hildebrandt A, Dorn W. Exploring gaps in our knowledge on Lyme borreliosis spirochaetes - Updates on complex heterogeneity, ecology, and pathogenicity. *Ticks and Tick-borne Diseases.* 2013. pp. 11–25. doi:10.1016/j.ttbdis.2012.06.007
67. Takano A, Goka K, Une Y, Shimada Y, Fujita H, Shiino T, et al. Isolation and characterization of a novel *Borrelia* group of tick-borne borreliae from imported reptiles and their associated ticks. *Environ Microbiol.* 2010;12: 134–146. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.02054.x
68. Derdakova M, Lencakova D. Association of genetic variability within the *Borrelia burgdorferi* sensu lato with the ecology, epidemiology of Lyme borreliosis in Europe. *Ann Agric Env Med.* 2005;12: 165–172. doi:12165 [pii]
69. Lenčáková D, Hizo-Teufel C, Peťko B, Schulte-Spechtel U, Stanko M, Wilske B, et al. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. OspA types in *Ixodes ricinus* ticks from selected localities in Slovakia and Poland. *Int J Med Microbiol.* 2006;296: 108–118. doi:10.1016/j.ijmm.2005.12.012
70. Zygnier W, Jaros S, Wedrychowicz H. Prevalence of *Babesia canis*, *Borrelia afzelii*, and *Anaplasma phagocytophilum* infection in hard ticks removed from dogs in Warsaw (central Poland). *Vet Parasitol.* 2008;153: 139–142. doi:10.1016/j.vetpar.2008.01.036
71. Radolf JD, Samuels DS. *Borrelia: Molecular Biology, Host Interaction and Pathogenesis* [Internet]. Radolf JD, Samuels SD, editors. Caister Academic Press; 2010. Available: <http://books.google.pl/books?id=1iHDRzSIcl0C>
72. Kung F, Anguita J, Pal U. *Borrelia burgdorferi* and tick proteins supporting pathogen persistence in the vector. *Future Microbiol.* 2013;8: 41–56. doi:10.2217/fmb.12.121
73. Lenhart TR, Akins DR. *Borrelia burgdorferi* locus BB0795 encodes a BamA orthologue required for growth and efficient localization of outer membrane proteins. *Mol Microbiol.* 2010;75: 692–709. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.07015.x
74. Seifert SN, Khatchikian CE, Zhou W, Brisson D. Evolution and population genomics of the Lyme borreliosis pathogen, *Borrelia burgdorferi*. *Trends Genet.* 2015;31: 201–207. doi:10.1016/j.tig.2015.02.006
75. Schutzer SE, Fraser-Liggett CM, Casjens SR, Qiu WG, Dunn JJ, Mongodin EF, et al. Whole-genome sequences of thirteen isolates of *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Bacteriology.* 2011. pp. 1018–1020. doi:10.1128/JB.01158-10
76. Fraser CM, Casjens S, Huang WM, Sutton GG, Clayton R, Lathigra R, et al. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature.* 1997;390: 580–586. doi:10.1038/37551
77. Kurtenbach K, Hanincová K, Tsao JI, Margos G, Fish D, Ogden NH. Fundamental processes in the evolutionary ecology of Lyme borreliosis. *Nat Rev Microbiol.* 2006;4: 660–669. doi:10.1038/nrmicro1475
78. Magnarelli LA, Anderson JF. Ticks and biting insects infected with the etiologic agent of Lyme disease, *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol.* 1988;26: 1482–1486.
79. Hubálek Z, Halouzka J. Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe, a review. *Eur J Epidemiol.* 1997;13: 951–957. doi:10.1023/A:1007426304900
80. Rollend L, Fish D, Childs JE. Transovarial transmission of *Borrelia* spirochetes by *Ixodes scapularis*: A summary of the literature and recent observations. *Ticks Tick Borne Dis.* 2013;4: 46–51. doi:10.1016/j.ttbdis.2012.06.008
81. Richter D, Debski A, Hubalek Z, Matuschka F-R. Absence of Lyme disease spirochetes in larval *Ixodes ricinus* ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2012;12: 21–7. doi:10.1089/vbz.2011.0668
82. Kraiczy P, Stevenson B. Complement regulator-acquiring surface proteins of *Borrelia burgdorferi*: Structure, function and regulation of gene expression. *Ticks and Tick-borne Diseases.* 2013. pp. 26–34. doi:10.1016/j.ttbdis.2012.10.039
83. Gern L, Estrada-Peña A, Frandsen F, Gray JS, Jaenson TG, Jongejan F, et al. European reservoir hosts of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Zentralbl Bakteriol.* 1998;287: 196–204. doi:10.1016/S0934-8840(98)80121-7
84. Hanincová K, Kurtenbach K, Diuk-Wasser M, Brei B, Fish D. Epidemic spread of Lyme borreliosis, northeastern United States. *Emerg Infect Dis.* 2006;12: 604–611. doi:10.3201/eid1204.051016
85. Couper D, Margos G, Kurtenbach K, Turton S. Prevalence of *Borrelia* infection in ticks

- from wildlife in south-west England. *Vet Rec.* 2010;167: 1012–1014. doi:10.1136/vr.c5285
86. Ogden NH, Lindsay LR, Hanincová K, Barker IK, Bigras-Poulin M, Charron DF, et al. Role of migratory birds in introduction and range expansion of *Ixodes scapularis* ticks and of *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in Canada. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74: 1780–1790. doi:10.1128/AEM.01982-07
 87. Ouyang Z, Blevins JS, Norgard M V. Transcriptional interplay among the regulators Rrp2, RpoN and RpoS in *Borrelia burgdorferi*. *Microbiology.* 2008;154: 2641–2658. doi:10.1099/mic.0.2008/019992-0
 88. Caimano MJ, Iyer R, Eggers CH, Gonzalez C, Morton EA, Gilbert MA, et al. Analysis of the RpoS regulon in *Borrelia burgdorferi* in response to mammalian host signals provides insight into RpoS function during the enzootic cycle. *Mol Microbiol.* 2007;65: 1193–1217. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05860.x
 89. Hyde JA, Shaw DK, Smith R, Trzeciakowski JP, Skare JT. 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. *Mol Microbiol.* 2009;74: 1344–1355. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06951.x
 90. Ouyang Z, Deka RK, Norgard M V. BosR (BB0647) controls the RpoN-RpoS regulatory pathway and virulence expression in *Borrelia burgdorferi* by a novel DNA-binding mechanism. *PLoS Pathog.* 2011;7. doi:10.1371/journal.ppat.1001272
 91. Lybecker MC, Samuels DS. Temperature-induced regulation of RpoS by a small RNA in *Borrelia burgdorferi*. *Mol Microbiol.* 2007;64: 1075–1089. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05716.x
 92. Miller CL, Karna SLR, Seshu J. *Borrelia* host adaptation Regulator (BadR) regulates rpoS to modulate host adaptation and virulence factors in *Borrelia burgdorferi*. *Mol Microbiol.* 2013;88: 105–124. doi:10.1111/mmi.12171
 93. He M, Zhang JJ, Ye M, Lou Y, Yang XF. Cyclic Di-GMP receptor PlzA controls virulence gene expression through RpoS in *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun.* 2014;82: 445–452. doi:10.1128/IAI.01238-13
 94. Lybecker MC, Abel CA, Feig AL, Samuels DS. Identification and function of the RNA chaperone Hfq in the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Mol Microbiol.* 2010;78: 622–635. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07374.x
 95. Karna SLR, Sanjuan E, Esteve-Gassent MD, Miller CL, Maruskova M, Seshu J. CsrA modulates levels of lipoproteins and key regulators of gene expression critical for pathogenic mechanisms of *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun.* 2011;79: 732–744. doi:10.1128/IAI.00882-10
 96. He M, Ouyang Z, Troxell B, Xu H, Moh A, Piesman J, et al. Cyclic di-gmp is essential for the survival of the lyme disease spirochete in ticks. *PLoS Pathog.* 2011;7. doi:10.1371/journal.ppat.1002133
 97. Kostick JL, Szkotnicki LT, Rogers EA, Bocci P, Raffaelli N, Marconi RT. The diguanylate cyclase, Rrp1, regulates critical steps in the enzootic cycle of the Lyme disease spirochetes. *Mol Microbiol.* 2011;81: 219–231. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07687.x
 98. Sze CW, Smith A, Choi YH, Yang X, Pal U, Yu A, et al. Study of the response regulator rrp1 reveals its regulatory role in chitobiose utilization and virulence of *Borrelia burgdorferi* Toxic Shock. *Infect Immun.* 2013;81: 1775–1787. doi:10.1128/IAI.00050-13
 99. Schwan TG, Piesman J. Temporal changes in outer surface proteins A and C of the Lyme disease-associated spirochete, *Borrelia burgdorferi*, during the chain of infection in ticks and mice. *J Clin Microbiol.* 2000;38: 382–388.
 100. Scheckelhoff MR, Telford SR, Wesley M, Hu LT. *Borrelia burgdorferi* intercepts host hormonal signals to regulate expression of outer surface protein A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104: 7247–7252. doi:10.1073/pnas.0607263104
 101. He M, Oman T, Xu H, Blevins J, Norgard M V., Yang XF. Abrogation of ospAB constitutively activates the Rrp2-RpoN-RpoS pathway (sigmaN-sigmaS cascade) in *Borrelia burgdorferi*. *Mol Microbiol.* 2008;70: 1453–1464. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06491.x
 102. Yang XF, Pal U, Alani SM, Fikrig E, Norgard M V. Essential role for OspA/B in the life cycle of the Lyme disease spirochete. *J Exp Med.* 2004;199: 641–648. doi:10.1084/jem.20031960
 103. Pal U, Montgomery RR, Lusitani D, Voet P, Weynants V, Malawista SE, et al. Inhibition of *Borrelia burgdorferi*-tick interactions in vivo by outer surface protein A antibody. *J*

- Immunol. 2001;166: 7398–7403.
104. Fikrig E, Pal U, Chen M. OspB antibody prevents *Borrelia burgdorferi* colonization of *Ixodes scapularis*. *Infect* 2004; 3–8. doi:10.1128/IAI.72.3.1755
 105. Battisti JM, Bono JL, Rosa PA, Schrupf ME, Schwan TG, Policastro PF. Outer surface protein A protects Lyme disease spirochetes from acquired host immunity in the tick vector. *Infect Immun*. 2008;76: 5228–5237. doi:10.1128/IAI.00410-08
 106. Fuchs H, Wallich R, Simon MM, Kramer MD. The outer surface protein A of the spirochete *Borrelia burgdorferi* is a plasmin(ogen) receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91: 12594–12598. doi:10.1073/pnas.91.26.12594
 107. Coleman JL, Gebbia JA, Piesman J, Degen JL, Bugge TH, Benach JL. Plasminogen is required for efficient dissemination of *B. burgdorferi* in ticks and for enhancement of spirochetemia in mice. *Cell*. 1997;89: 1111–1119. doi:10.1016/S0092-8674(00)80298-6
 108. Pal U, Li X, Wang T, Montgomery RR, Ramamoorthi N, Desilva AM, et al. TROSPA, an *Ixodes scapularis* receptor for *Borrelia burgdorferi*. *Cell*. 2004;119: 457–468. doi:10.1016/j.cell.2004.10.027
 109. Li H, Dunn JJ, Luft BJ, Lawton CL. Crystal structure of Lyme disease antigen outer surface protein A complexed with an Fab. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94: 3584–3589. doi:10.1073/pnas.94.8.3584
 110. Makabe K, Tereshko V, Gawlak G, Yan S, Koide S. Atomic-resolution crystal structure of *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A via surface engineering. *Protein Sci*. 2006;15: 1907–1914. doi:10.1110/ps.062246706
 111. Pawley NH, Koide S, Nicholson LK. Backbone Dynamics and Thermodynamics of *Borrelia* Outer Surface Protein A. *J Mol Biol*. 2002;324: 991–1002. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836(02)01146-4
 112. Koide S, Bu Z, Risal D, Pham TN, Nakagawa T, Tamura A, et al. Multistep denaturation of *Borrelia burgdorferi* OspA, a protein containing a single-layer β -sheet. *Biochemistry*. 1999;38: 4757–4767. doi:10.1021/bi982443+
 113. Pham TN, Koide S. NMR studies of *Borrelia burgdorferi* OspA, a 28 kDa protein containing a single-layer beta-sheet. *J Biomol NMR*. 1998;11: 407–414.
 114. Bu Z, Koide S, Engelman DM. A solution SAXS study of *Borrelia burgdorferi* OspA, a protein containing a single-layer beta-sheet. *Protein Sci*. 1998;7: 2681–2683.
 115. Pal U, de Silva a M, Montgomery RR, Fish D, Anguita J, Anderson JF, et al. Attachment of *Borrelia burgdorferi* within *Ixodes scapularis* mediated by outer surface protein A. *J Clin Invest*. 2000;106: 561–9. doi:10.1172/JCI9427
 116. Kurtti TJ, Munderloh UG, Krueger DE, Johnson RC, Schwan TG. Adhesion to and invasion of cultured tick (Acarina: Ixodidae) cells by *Borrelia burgdorferi* (Spirochaetales: Spirochaetaceae) and maintenance of infectivity. *J Med Entomol*. 1993;30: 586–596.
 117. Thomas DD, Comstock LE. Interaction of Lyme disease spirochetes with cultured eucaryotic cells. *Infect Immun*. 1989;57: 1324–1326.
 118. Garcia-Monco JC, Fernandez-Villar B, Benach JL. Adherence of the Lyme disease spirochete to glial cells and cells of glial origin. *J Infect Dis*. 1989;160: 497–506.
 119. Mlynarcik P, Pulzova L, Bencurova E, Kovac A, Dominguez MA, Hresko S, et al. Deciphering the interface between a CD40 receptor and borrelial ligand OspA. *Microbiol Res*. Elsevier; 2015;170: 51–60.
 120. Pulzova L, Kovac A, Mucha R, Mlynarcik P, Bencurova E, Madar M, et al. OspA-CD40 dyad: ligand-receptor interaction in the translocation of neuroinvasive *Borrelia* across the blood-brain barrier. *Scientific Reports*. 2011. doi:10.1038/srep00086
 121. Konnai S, Yamada S, Imamura S, Nishikado H, Githaka N, Ito T, et al. Identification of TROSPA homologue in *Ixodes persulcatus* Schulze, the specific vector for human Lyme borreliosis in Japan. *Ticks Tick Borne Dis*. Elsevier GmbH.; 2012;3: 75–77. doi:10.1016/j.ttbdis.2012.02.001
 122. de Silva AM, Telford SR, Brunet LR, Barthold SW, Fikrig E. *Borrelia burgdorferi* OspA is an arthropod-specific transmission-blocking Lyme disease vaccine. *J Exp Med*. 1996;183: 271–275. doi:10.1084/jem.183.1.271
 123. Nadelman RB, Wormser GP. Lyme borreliosis. *The Lancet*. 1998. pp. 557–565. doi:10.1016/S0140-6736(98)01146-5
 124. Brunner JL, LoGiudice K, Ostfeld RS. Estimating reservoir competence of *Borrelia burgdorferi* hosts: prevalence and infectivity, sensitivity, and specificity. *J Med Entomol*. 2008;45: 139–147. doi:10.1603/0022-2585(2008)45[139:ERCOBB]2.0.CO;2
 125. Horackova J, Golovchenko M, Rudenko N, Grubhoffer L. Identification of *Ixodes ricinus*

- receptor for OspA (TROSPA) that is required for spirochetal colonization. 2007.
126. Antunes S, Galindo RC, Almazán C, Rudenko N, Golovchenko M, Grubhoffer L, et al. Functional genomics studies of *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* ticks in response to infection with the cattle protozoan parasite, *Babesia bigemina*. *Int J Parasitol.* 2012;42: 187–195. doi:10.1016/j.ijpara.2011.12.003
 127. Merino O, Antunes S, Mosqueda J, Moreno-Cid JA, Pérez de la Lastra JM, Rosario-Cruz R, et al. Vaccination with proteins involved in tick-pathogen interactions reduces vector infestations and pathogen infection. *Vaccine.* Elsevier Ltd; 2013;31: 5889–5896. doi:10.1016/j.vaccine.2013.09.037
 128. Yang X, Hegde S, Shroder DY, Smith AA, Promnares K, Neelakanta G, et al. The lipoprotein La7 contributes to *Borrelia burgdorferi* persistence in ticks and their transmission to naïve hosts. *Microbes Infect.* 2013;15: 729–737. doi:10.1016/j.micinf.2013.06.001
 129. Pitzer JE, Sultan SZ, Hayakawa Y, Hobbs G, Miller MR, Motaleb MA. Analysis of the *Borrelia burgdorferi* cyclic-di-GMP-binding protein PlzA reveals a role in motility and virulence. *Infect Immun.* 2011;79: 1815–1825. doi:10.1128/IAI.00075-11
 130. Manuscript A, Zhang X, Yang X, Kumar M, Pal U. BB0323 function is essential for *Borrelia burgdorferi* virulence and persistence through tick-rodent transmission cycle. *J Infect Dis.* 2009;200: 1318–1330. doi:10.1086/605846
 131. Von Lackum K, Stevenson B. Carbohydrate utilization by the Lyme borreliosis spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *FEMS Microbiol Lett.* 2005;243: 173–179. doi:10.1016/j.femsle.2004.12.002
 132. Pappas CJ, Iyer R, Petzke MM, Caimano MJ, Radolf JD, Schwartz I. *Borrelia burgdorferi* requires glycerol for maximum fitness during the tick phase of the enzootic cycle. *PLoS Pathog.* 2011;7. doi:10.1371/journal.ppat.1002102
 133. Pal U, Fikrig E. Tick Interactions. In: Radolf JD, Samuels SD, editors. *Borrelia: Molecular Biology, Host Interaction and Pathogenesis.* Horizon Scientific Press; 2010.
 134. Revel AT, Blevins JS, Almazán C, Neil L, Kocan KM, de la Fuente J, et al. bptA (bbe16) is essential for the persistence of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, in its natural tick vector. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102: 6972–7. doi:10.1073/pnas.0502565102
 135. Li X, Pal U, Ramamoorthi N, Liu X, Desrosiers DC, Eggers CH, et al. The Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi* requires BB0690, a Dps homologue, to persist within ticks. *Mol Microbiol.* 2007;63: 694–710. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05550.x
 136. Samuels DS. Gene regulation in *Borrelia burgdorferi*. *Annu Rev Microbiol.* 2011;65: 479–99. doi:10.1146/annurev.micro.112408.134040
 137. Coburn J, Cugini C. Targeted mutation of the outer membrane protein P66 disrupts attachment of the Lyme disease agent, *Borrelia burgdorferi*, to integrin α v β 3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100: 7301–7306. doi:10.1073/pnas.1131117100
 138. Pinne M, Thein M, Denker K, Benz R, Coburn J, Bergström S. Elimination of channel-forming activity by insertional inactivation of the p66 gene in *Borrelia burgdorferi*. *FEMS Microbiol Lett.* 2007;266: 241–249. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00529.x
 139. Kenedy MR, Akins DR. The OspE-related proteins inhibit complement deposition and enhance serum resistance of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete. *Infect Immun.* 2011;79: 1451–1457. doi:10.1128/IAI.01274-10
 140. Siegel C, Hallström T, Skerka C, Eberhardt H, Uzonyi B, Beckhaus T, et al. Complement factor H-related proteins CFHR2 and CFHR5 represent novel ligands for the infection-associated CRASP proteins of *Borrelia burgdorferi*. *PLoS One.* 2010;5. doi:10.1371/journal.pone.0013519
 141. Kumar M, Kaur S, Kariu T, Yang X, Bossis I, Anderson JF, et al. *Borrelia burgdorferi* BBA52 is a potential target for transmission blocking Lyme disease vaccine. *Vaccine.* 2011;29: 9012–9019. doi:10.1016/j.vaccine.2011.09.035
 142. Gilmore RD, Howison RR, Dietrich G, Patton TG, Clifton DR, Carroll JA. The bba64 gene of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent, is critical for mammalian infection via tick bite transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107: 7515–7520. doi:10.1073/pnas.1000268107
 143. Dunham-Ems SM, Caimano MJ, Pal U, Wolgemuth CW, Eggers CH, Balic A, et al. Live imaging reveals a biphasic mode of dissemination of *Borrelia burgdorferi* within ticks. *J Clin Invest.* 2009;119: 3652–3665. doi:10.1172/JCI39401
 144. Zhang L, Zhang Y, Adusumilli S, Liu L, Narasimhan S, Dai J, et al. Molecular interactions

- that enable movement of the Lyme disease agent from the tick gut into the hemolymph. *PLoS Pathog.* 2011;7: e1002079. doi:10.1371/journal.ppat.1002079
145. Coleman JL, Sellati TJ, Testa JE, Kew RR, Furie MB, Benach JL. *Borrelia burgdorferi* binds plasminogen, resulting in enhanced penetration of endothelial monolayers. *Infect Immun.* 1995;63: 2478–2484.
 146. Nogueira SV, Smith AA, Qin JH, Pal U. A surface enolase participates in *Borrelia burgdorferi*-plasminogen interaction and contributes to pathogen survival within feeding ticks. *Infect Immun.* 2012;80: 82–90. doi:10.1128/IAI.05671-11
 147. Schuijt TJ, Hovius JWR, Van Burgel ND, Ramamoorthi N, Fikrig E, Van Dam AP. The tick salivary protein Salp15 inhibits the killing of serum-sensitive *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates. *Infect Immun.* 2008;76: 2888–2894. doi:10.1128/IAI.00232-08
 148. Ramamoorthi N, Narasimhan S, Pal U, Bao F, Yang XF, Fish D, et al. The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. *Nature.* 2005;436: 573–577. doi:10.1038/nature03812
 149. Tilly K, Krum JG, Bestor A, Jewett MW, Grimm D, Bueschel D, et al. *Borrelia burgdorferi* OspC protein required exclusively in a crucial early stage of mammalian infection. *Infect Immun.* 2006;74: 3554–3564. doi:10.1128/IAI.01950-05
 150. Grimm D, Tilly K, Byram R, Stewart PE, Krum JG, Bueschel DM, et al. Outer-surface protein C of the Lyme disease spirochete: a protein induced in ticks for infection of mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101: 3142–3147. doi:10.1073/pnas.0306845101
 151. Önder Ö, Humphrey PT, McOmber B, Korobova F, Francella N, Greenbaum DC, et al. OspC is potent plasminogen receptor on surface of *borrelia burgdorferi*. *J Biol Chem.* 2012;287: 16860–16868. doi:10.1074/jbc.M111.290775
 152. Lagal V, Portnoi D, Faure G, Postic D, Baranton G. *Borrelia burgdorferi* sensu stricto invasiveness is correlated with OspC-plasminogen affinity. *Microbes Infect.* 2006;8: 645–652. doi:10.1016/j.micinf.2005.08.017
 153. Earnhart CG, Rhodes DVL, Smith AA, Yang X, Tegels B, Carlyon JA, et al. Assessment of the potential contribution of the highly conserved C-terminal motif (C10) of *Borrelia burgdorferi* outer surface protein C in transmission and infectivity. *Pathog Dis.* 2014;70: 176–184. doi:10.1111/2049-632X.12119
 154. Marconi RT, Samuels DS, Garon CF. Transcriptional analyses and mapping of the ospC gene in Lyme disease spirochetes. *J Bacteriol.* 1993;175: 926–932.
 155. Yang XF, Lybecker MC, Pal U, Alani SM, Blevins J, Revel AT, et al. Analysis of the ospC regulatory element controlled by the RpoN-RpoS regulatory pathway in *Borrelia burgdorferi*. *J Bacteriol.* 2005;187: 4822–4829. doi:10.1128/JB.187.14.4822-4829.2005
 156. Elias AF, Bono JL, Carroll JA, Stewart P, Tilly K, Rosa P. Altered stationary-phase response in a *Borrelia burgdorferi* rpoS mutant. *J Bacteriol.* 2000;182: 2909–2918. doi:10.1128/JB.182.10.2909-2918.2000
 157. Eicken C, Sharma V, Klabunde T, Owens RT, Pikas DS, Hook M, et al. Crystal structure of Lyme disease antigen outer surface protein C from *Borrelia burgdorferi*. *J Biol Chem.* 2001;276: 10010–10015. Available: <Go to ISI>://WOS:000167996400059
 158. Kumaran D, Eswaramoorthy S, Luft BJ, Koide S, Dunn JJ, Lawson CL, et al. Crystal structure of outer surface protein C (OspC) from the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Embo J.* 2001;20: 971–978. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11230121
 159. Earnhart CG, Buckles EL, Marconi RT. Development of an OspC-based tetravalent, recombinant, chimeric vaccinogen that elicits bactericidal antibody against diverse Lyme disease spirochete strains. *Vaccine.* 2007;25: 466–480. doi:10.1016/j.vaccine.2006.07.052
 160. Earnhart CG, Leblanc D V., Alix KE, Desrosiers DC, Radolf JD, Marconi RT. Identification of residues within ligand-binding domain 1 (LBD1) of the *Borrelia burgdorferi* OspC protein required for function in the mammalian environment. *Mol Microbiol.* 2010;76: 393–408. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07103.x
 161. Garg R, Juncadella IJ, Ramamoorthi N, Ashish, Ananthanarayanan SK, Thomas V, et al. Cutting edge: CD4 is the receptor for the tick saliva immunosuppressor, Salp15. *J Immunol.* 2006;177: 6579–6583. doi:10.4049/jimmunol.177.10.6579
 162. Anguita J, Ramamoorthi N, Hovius JWR, Das S, Thomas V, Persinski R, et al. Salp15, an *Ixodes scapularis* salivary protein, inhibits CD4+ T cell activation. *Immunity.* 2002;16:

- 849–859. doi:10.1016/S1074-7613(02)00325-4
163. Hovius JWR, De Jong MAWP, Dunnen J Den, Litjens M, Fikrig E, Van Der Poll T, et al. Salp15 binding to DC-SIGN inhibits cytokine expression by impairing both nucleosome remodeling and mRNA stabilization. *PLoS Pathog.* 2008;4. doi:10.1371/journal.ppat.0040031
 164. Wang X, Huang Y, Niu SB, Jiang BG, Jia N, Van Der Geest L, et al. Genetic diversity of Salp15 in the *Ixodes ricinus* complex (Acari: Ixodidae). *PLoS One.* 2014;9. doi:10.1371/journal.pone.0094131
 165. Liu J, Renneker S, Beyer D, Kullmann B, Seitzer U, Ahmed J, et al. Identification and partial characterization of a Salp15 homolog from *Ixodes ricinus*. *Ticks Tick Borne Dis.* 2014;5: 318–322. doi:10.1016/j.ttbdis.2013.12.004
 166. Schwarz A, von Reumont BM, Erhart J, Chagas AC, Ribeiro JMC, Kotsyfakis M. De novo *Ixodes ricinus* salivary gland transcriptome analysis using two next-generation sequencing methodologies. *FASEB J.* 2013;27: 4745–4756.
 167. Dai J, Wang P, Adusumilli S, Booth CJ, Narasimhan S, Anguita J, et al. Antibodies against a Tick Protein, Salp15, Protect Mice from the Lyme Disease Agent. *Cell Host Microbe.* 2009;6: 482–492. doi:10.1016/j.chom.2009.10.006
 168. Hovius JW, Schuijt TJ, de Groot KA, Roelofs JJTH, Oei GA, Marquart JA, et al. Preferential protection of *Borrelia burgdorferi sensu stricto* by a Salp15 homologue in *Ixodes ricinus* saliva. *J Infect Dis.* 2008;198: 1189–1197. doi:10.1086/591917
 169. Kolb P, Vorreiter J, Habicht J, Bentrop D, Wallich R, Nassal M. Soluble cysteine-rich tick saliva proteins Salp15 and Iric-1 from *E. coli*. *FEBS Open Bio.* Elsevier; 2015;5: 42–55. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221154631400117X>
 170. Juncadella IJ, Garg R, Bates TC, Olivera ER, Anguita J. The *Ixodes scapularis* salivary protein, salp15, prevents the association of HIV-1 gp120 and CD4. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;367: 41–6. doi:10.1016/j.bbrc.2007.12.104
 171. Das S, Banerjee G, DePonte K, Marcantonio N, Kantor FS, Fikrig E. Salp25D, an *Ixodes scapularis* antioxidant, is 1 of 14 immunodominant antigens in engorged tick salivary glands. *J Infect Dis.* 2001;184: 1056–1064. doi:10.1086/323351
 172. Narasimhan S, Sukumaran B, Bozdogan U, Thomas V, Liang X, DePonte K, et al. A Tick Antioxidant Facilitates the Lyme Disease Agent's Successful Migration from the Mammalian Host to the Arthropod Vector. *Cell Host Microbe.* 2007;2: 7–18. doi:10.1016/j.chom.2007.06.001
 173. Guo X, Booth CJ, Paley MA, Wang X, DePonte K, Fikrig E, et al. Inhibition of neutrophil function by two tick salivary proteins. *Infect Immun.* 2009;77: 2320–2329. doi:10.1128/IAI.01507-08
 174. Kotsyfakis M, Horka H, Salat J, Andersen JF. The crystal structures of two salivary cystatins from the tick *Ixodes scapularis* and the effect of these inhibitors on the establishment of *Borrelia burgdorferi* infection in a murine model. *Mol Microbiol.* 2010;77: 456–470.
 175. Wormser GP, Dattwyler RJ, Shapiro ED, Halperin JJ, Steere AC, Klempner MS, et al. The clinical assessment, treatment, and prevention of lyme disease, human granulocytic anaplasmosis, and babesiosis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2006;43: 1089–1134. doi:10.1086/508667
 176. Schuijt TJ, Hovius JW, van der Poll T, van Dam AP, Fikrig E. Lyme borreliosis vaccination: The facts, the challenge, the future. *Trends in Parasitology.* 2011. pp. 40–47. doi:10.1016/j.pt.2010.06.006
 177. Chang YF, Appel MJG, Jacobson RH, Shin SJ, Harpending P, Straubinger R, et al. Recombinant OspA protects dogs against infection and disease caused by *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun.* 1995;63: 3543–3549.
 178. Poland GA. Vaccines against lyme disease: What happened and what lessons can we learn? *Clin Infect Dis.* 2011;52. doi:10.1093/cid/ciq116
 179. Stricker RB, Johnson L. Lyme disease vaccination: Safety first. *The Lancet Infectious Diseases.* 2014. p. 12. doi:10.1016/S1473-3099(13)70319-0
 180. Schuijt TJ, Narasimhan S, Daffre S, DePonte K, Hovius JWR, van't Veer C, et al. Identification and characterization of *Ixodes scapularis* antigens that elicit tick immunity using yeast surface display. *PLoS One.* 2011;6. doi:10.1371/journal.pone.0015926
 181. Merino O, Almazán C, Canales M, Villar M, Moreno-Cid JA, Galindo RC, et al. Targeting the tick protective antigen subolesin reduces vector infestations and pathogen infection by *Anaplasma marginale* and *Babesia bigemina*. *Vaccine.* 2011;29: 8575–8579.

- doi:10.1016/j.vaccine.2011.09.023
182. de la Fuente J, Maritz-Olivier C, Naranjo V, Ayoubi P, Nijhof AM, Almazán C, et al. Evidence of the role of tick subolesin in gene expression. *BMC Genomics*. 2008;9: 372. doi:10.1186/1471-2164-9-372
 183. Almazán C, Kocan KM, Bergman DK, Garcia-Garcia JC, Blouin EF, De La Fuente J. Identification of protective antigens for the control of *Ixodes scapularis* infestations using cDNA expression library immunization. *Vaccine*. 2003;21: 1492–1501. doi:10.1016/S0264-410X(02)00683-7
 184. Almazán C, Kocan KM, Blouin EF, De La Fuente J. Vaccination with recombinant tick antigens for the control of *Ixodes scapularis* adult infestations. *Vaccine*. 2005;23: 5294–5298. doi:10.1016/j.vaccine.2005.08.004
 185. Antunes S, Merino O, Mosqueda J, Moreno-Cid JA, Bell-Sakyi L, Fragkoudis R, et al. Tick capillary feeding for the study of proteins involved in tick-pathogen interactions as potential antigens for the control of tick infestation and pathogen infection. *Parasit Vectors*. 2014;7: 42.
 186. Gough JM, Kemp DH. Localization of a low abundance membrane protein (Bm86) on the gut cells of the cattle tick *Boophilus microplus* by immunogold labeling. *J Parasitol*. 1993;79: 900–907. doi:10.2307/3283728
 187. Cunha RC, Andreotti R, Leite FPL. *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*: expression and characterization of Bm86-CG in *Pichia pastoris*. *Rev Bras Parasitol Vet = Brazilian J Vet Parasitol*. 2011;20: 103–10. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21722483>
 188. De La Fuente J, Rodríguez M, Montero C, Redondo M, García-García JC, Méndez L, et al. Vaccination against ticks (*Boophilus* spp.): The experience with the Bm86-based vaccine Gavac((TM)). *Genetic Analysis - Biomolecular Engineering*. 1999. pp. 143–148. doi:10.1016/S1050-3862(99)00018-2
 189. Odongo D, Kamau L, Skilton R, Mwaura S, Nitsch C, Musoke A, et al. Vaccination of cattle with TickGARD induces cross-reactive antibodies binding to conserved linear peptides of Bm86 homologues in *Boophilus decoloratus*. *Vaccine*. 2007;25: 1287–1296. doi:10.1016/j.vaccine.2006.09.085
 190. Trimnell AR, Davies GM, Lissina O, Hails RS, Nuttall PA. A cross-reactive tick cement antigen is a candidate broad-spectrum tick vaccine. *Vaccine*. 2005;23: 4329–4341. doi:10.1016/j.vaccine.2005.03.041
 191. Neelakanta G, Sultana H. Transmission-Blocking Vaccines: Focus on Anti-Vector Vaccines against Tick-Borne Diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2014; doi:10.1007/s00005-014-0324-8
 192. Urbanowicz A, Lewandowski D, Jodynis-Liebert J, Sadowski C, Figlerowicz M. Functional insights into recombinant TROSPA protein from *Ixodes ricinus*. *PLoS One*. 2013;8: e76848. doi:10.1371/journal.pone.0076848
 193. MAX Lab, Lund, Szwecja [Internet]. Available: <https://www.maxlab.lu.se/>
 194. DESY, Hamburg, Niemcy [Internet]. Available: <http://www.embl-hamburg.de/biosaxs/>
 195. Konarev P V., Volkov V V., Sokolova A V., Koch MHJ, Svergun DI. PRIMUS: A Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *J Appl Crystallogr*. 2003;36: 1277–1282. doi:10.1107/S0021889803012779
 196. Bernado P, Mylonas E, Petoukhov M V, Blackledge M, Svergun DI. Structural characterization of flexible proteins using small-angle X-ray scattering. *J Am Chem Soc*. 2007;129: 5656–5664. doi:10.1021/ja069124n
 197. Li Y, Zhang Y. REMO: A new protocol to refine full atomic protein models from C-alpha traces by optimizing hydrogen-bonding networks. *Proteins Struct Funct Bioinforma*. 2009;76: 665–676. doi:10.1002/prot.22380
 198. Comeau SR, Gatchell DW, Vajda S, Camacho CJ. ClusPro: An automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes. *Bioinformatics*. 2004;20: 45–50. doi:10.1093/bioinformatics/btg371
 199. Tovchigrechko A, Vakser IA. GRAMM-X public web server for protein-protein docking. *Nucleic Acids Res*. 2006;34. doi:10.1093/nar/gkl206
 200. Macindoe G, Mavridis L, Venkatraman V, Devignes MD, Ritchie DW. HexServer: An FFT-based protein docking server powered by graphics processors. *Nucleic Acids Res*. 2010;38. doi:10.1093/nar/gkq311
 201. Cornell WD, Cieplak P, Bayly CI, Gould IR, Merz KM, Ferguson DM, et al. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *J Am Chem Soc*. 1995;117: 5179–5197. doi:10.1021/ja00124a002

202. Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, Berendsen HJC. GROMACS: Fast, flexible, and free. *Journal of Computational Chemistry*. 2005. pp. 1701–1718. doi:10.1002/jcc.20291
203. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. 2004;25: 1605–1612. doi:10.1002/jcc.20084
204. Svergun D, Barberato C, Koch MH. CRY SOL - A program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *J Appl Crystallogr*. 1995;28: 768–773. doi:10.1107/S0021889895007047
205. Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol*. 2001;305: 567–580. doi:10.1006/jmbi.2000.4315
206. Cserző M, Wallin E, Simon I, von Heijne G, Elofsson A. Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Protein Eng*. 1997;10: 673–676. doi:10.1093/protein/10.6.673
207. Käll L, Krogh A, Sonnhammer ELL. Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction-the Phobius web server. *Nucleic Acids Res*. 2007;35. doi:10.1093/nar/gkm256
208. Hiller K, Grote A, Scheer M, Münch R, Jahn D. PrediSi: Prediction of signal peptides and their cleavage positions. *Nucleic Acids Res*. 2004;32. doi:10.1093/nar/gkh378
209. Kozłowski LP, Bujnicki JM. MetaDisorder: a meta-server for the prediction of intrinsic disorder in proteins. *BMC Bioinformatics*. 2012. p. 111. doi:10.1186/1471-2105-13-111
210. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *The Proteomics Protocols Handbook*. 2005. pp. 571–607. doi:10.1385/1-59259-890-0:571
211. Putnam C. Protein calculator v3.4 [Internet]. Available: <http://protcalc.sourceforge.net/>
212. Disfani FM, Hsu WL, Mizianty MJ, Oldfield CJ, Xue B, Keith Dunker A, et al. MoRFpred, a computational tool for sequence-based prediction and characterization of short disorder-to-order transitioning binding regions in proteins. *Bioinformatics*. 2012;28. doi:10.1093/bioinformatics/bts209
213. Dosztányi Z, Mészáros B, Simon I. ANCHOR: Web server for predicting protein binding regions in disordered proteins. *Bioinformatics*. 2009;25: 2745–2746. doi:10.1093/bioinformatics/btp518
214. Hovius JWR, Ramamoorthi N, Van't Veer C, de Groot KA, Nijhof AM, Jongejan F, et al. Identification of Salp15 homologues in Ixodes ricinus ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2007;7: 296–303. doi:10.1089/vbz.2006.0624
215. Lebouille G, Rochez C, Louahed J, Rutti B, Brossard M, Bollen A, et al. Isolation of Ixodes ricinus salivary gland mRNA encoding factors induced during blood feeding. *Am J Trop Med Hyg*. 2002;66: 225–233.
216. Waugh DS. Making the most of affinity tags. *Trends in Biotechnology*. 2005. pp. 316–320. doi:10.1016/j.tibtech.2005.03.012
217. Lobstein J, Emrich CA, Jeans C, Faulkner M, Riggs P, Berkmen M. SHuffle, a novel Escherichia coli protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. *Microbial Cell Factories*. 2012. p. 56. doi:10.1186/1475-2859-11-56
218. Tompa P, Tompa P. Intrinsically unstructured proteins. *Trends Biochem Sci*. 2002;27: 527–533. doi:10.1016/S0968-0004(02)02169-2
219. Receveur-Bréhot V, Bourhis JM, Uversky VN, Canard B, Longhi S. Assessing protein disorder and induced folding. *Proteins Struct Funct Genet*. 2006;62: 24–45. doi:10.1002/prot.20750
220. Zeelen JP. Interpretation of the Crystallization Drop Results. *Protein Crystallization*. Bergfors, . Internat'l University Line; 2009. pp. 179–194.
221. Dziejczak-Letka A, Ożyhar A. Białka inherentnie nieuporządkowane. *Postepy Biochem*. 2012; 100–109. Available: http://postepybiochemii.pl/pdf/1_2012/10_1_2012.pdf
222. Kätzel U, Vorbau M, Stintz M, Gottschalk-Gaudig T, Barthel H. Dynamic Light Scattering for the Characterization of Polydisperse Fractal Systems: II. Relation between Structure and DLS Results. *Part Part Syst Charact*. 2008;25: 19–30. doi:10.1002/ppsc.200700005
223. Jachimaska B, Wasilewska M, Adamczyk Z. Characterization of globular protein solutions by dynamic light scattering, electrophoretic mobility, and viscosity measurements. *Langmuir*. 2008;24: 6866–6872. doi:10.1021/la800548p

224. Nicholls A, Sharp KA, Honig B. Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins*. 1991;11: 281–296. doi:10.1002/prot.340110407
225. Ptitsyn OB, Pain RH, Semisotnov G V, Zerovnik E, Razgulyaev OI. Evidence for a molten globule state as a general intermediate in protein folding. *FEBS Lett*. 1990;262: 20–24. doi:10.1016/0014-5793(90)80143-7
226. Uversky VN, Ptitsyn OB. Further evidence on the equilibrium “pre-molten globule state”: four-state guanidinium chloride-induced unfolding of carbonic anhydrase B at low temperature. *J Mol Biol*. 1996;255: 215–228. doi:10.1006/jmbi.1996.0018
227. Uversky VN. Intrinsically disordered proteins and their environment: Effects of strong denaturants, temperature, pH, Counter ions, membranes, binding partners, osmolytes, and macromolecular crowding. *Protein Journal*. 2009. pp. 305–325. doi:10.1007/s10930-009-9201-4
228. Neyroz P, Zambelli B, Ciurli S. Intrinsically disordered structure of *Bacillus pasteurii* UreG as revealed by steady-state and time-resolved fluorescence spectroscopy. *Biochemistry*. 2006;45: 8918–30. doi:10.1021/bi060227s
229. Uversky VN. Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics. *Protein Sci*. 2002;11: 739–756. doi:10.1110/ps.4210102
230. Sickmeier M, Hamilton JA, LeGall T, Vacic V, Cortese MS, Tantos A, et al. DisProt: The database of disordered proteins. *Nucleic Acids Res*. 2007;35. doi:10.1093/nar/gkl893
231. Uversky VN, Dunker AK. Understanding protein non-folding. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. 2010. pp. 1231–1264. doi:10.1016/j.bbapap.2010.01.017
232. Tompa P, Fersht A. Indirect Techniques for Recognizing and Characterizing Protein Disorder. In: Tompa P, Fersht A, editors. *Structure and Function of Intrinsically Disordered Proteins*. CRC Press; 2010. pp. 37–38.
233. Linding R, Jensen LJ, Diella F, Bork P, Gibson TJ, Russell RB. Protein disorder prediction: Implications for structural proteomics. *Structure*. 2003;11: 1453–1459. doi:10.1016/j.str.2003.10.002
234. Ward JJ, McGuffin LJ, Bryson K, Buxton BF, Jones DT. The DISOPRED server for the prediction of protein disorder. *Bioinformatics*. 2004;20: 2138–2139. doi:10.1093/bioinformatics/bth195
235. Cheng J, Sweredoski MJ, Baldi P. Accurate prediction of protein disordered regions by mining protein structure data. *Data Min Knowl Discov*. 2005;11: 213–222. doi:10.1007/s10618-005-0001-y
236. Linding R, Russell RB, Neduva V, Gibson TJ. GlobPlot: Exploring protein sequences for globularity and disorder. *Nucleic Acids Res*. 2003;31: 3701–3708. doi:10.1093/nar/gkg519
237. Su CT, Chen CY, Hsu CM. IPDA: Integrated protein disorder analyzer. *Nucleic Acids Res*. 2007;35. doi:10.1093/nar/gkm353
238. Dosztányi Z, Csizmok V, Tompa P, Simon I. IUPred: Web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. *Bioinformatics*. 2005;21: 3433–3434. doi:10.1093/bioinformatics/bti541
239. SoftBerry. PDISORDER [Internet]. Available: <http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=pdisorder&group=programs&subgroup=propt>
240. Shimizu K, Hirose S, Noguchi T. POODLE-S: Web application for predicting protein disorder by using physicochemical features and reduced amino acid set of a position-specific scoring matrix. *Bioinformatics*. 2007;23: 2337–2338. doi:10.1093/bioinformatics/btm330
241. Hirose S, Shimizu K, Kanai S, Kuroda Y, Noguchi T. POODLE-L: A two-level SVM prediction system for reliably predicting long disordered regions. *Bioinformatics*. 2007;23: 2046–2053. doi:10.1093/bioinformatics/btm302
242. Ishida T, Kinoshita K. PrDOS: Prediction of disordered protein regions from amino acid sequence. *Nucleic Acids Res*. 2007;35. doi:10.1093/nar/gkm363
243. Vullo A, Bortolamil O, Pollastri G, Tosatto SCE. Spritz: A server for the prediction of intrinsically disordered regions in protein sequences using kernel machines. *Nucleic Acids Res*. 2006;34. doi:10.1093/nar/gkl166
244. Su C-T, Chen C-Y, Ou Y-Y. Protein disorder prediction by condensed PSSM considering propensity for order or disorder. *BMC Bioinformatics*. 2006;7: 319. doi:10.1186/1471-

- 2105-7-319
245. Yang ZR, Thomson R, McNeil P, Esnouf RM. RONN: The bio-basis function neural network technique applied to the detection of natively disordered regions in proteins. *Bioinformatics*. 2005;21: 3369–3376. doi:10.1093/bioinformatics/bti534
 246. Uversky VN. Intrinsically disordered proteins from A to Z. *Int J Biochem Cell Biol*. 2011;43: 1090–1103. doi:10.1016/j.biocel.2011.04.001
 247. Uversky VN, Gillespie JR, Fink AL. Why are “natively unfolded” proteins unstructured under physiologic conditions? *Proteins*. 2000;41: 415–427. doi:10.1002/1097-0134(20001115)41:3<415::AID-PROT130>3.0.CO;2-7 [pii]
 248. Oldfield CJ, Cheng Y, Cortese MS, Brown CJ, Uversky VN, Bunker a. K. Comparing and combining predictors of mostly disordered proteins. *Biochemistry*. 2005;44: 1989–2000. doi:10.1021/bi047993o
 249. Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*. 1982;157: 105–132. doi:10.1016/0022-2836(82)90515-0
 250. Tompa P, Fersht A. Prediction of Disorder. *Structure and Function of Intrinsically Disordered Proteins*. CRC Press; 2009. pp. 103–121.
 251. Chemes LB, Alonso LG, Noval MG, de Prat-Gay G. Circular dichroism techniques for the analysis of intrinsically disordered proteins and domains. *Methods Mol Biol (Clifton, NJ)*. 2012;895: 387–404. doi:10.1007/978-1-61779-927-3
 252. Sreerama N, Woody RW. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal Biochem*. 2000;287: 252–260. doi:10.1006/abio.2000.4880
 253. Petoukhov M V., Franke D, Shkumatov A V., Tria G, Kikhney AG, Gajda M, et al. New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis. *J Appl Crystallogr*. 2012;45: 342–350. doi:10.1107/S0021889812007662
 254. Receveur-Brechot V, Durand D. How random are intrinsically disordered proteins? A small angle scattering perspective. *Curr Protein Pept Sci*. 2012;13: 55–75. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3394175&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 255. Bernadó P, Svergun DI. Structural analysis of intrinsically disordered proteins by small-angle X-ray scattering. *Molecular BioSystems*. 2012. p. 151. doi:10.1039/c1mb05275f
 256. Permyakov SE, Millett IS, Doniach S, Permyakov EA, Uversky VN. Natively Unfolded C-Terminal Domain of Caldesmon Remains Substantially Unstructured after the Effective Binding to Calmodulin. *Proteins Struct Funct Genet*. 2003;53: 855–862. doi:10.1002/prot.10481
 257. Svergun DI, Koch MHJ. Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution. *Reports on Progress in Physics*. 2003. pp. 1735–1782. doi:10.1088/0034-4885/66/10/R05
 258. Mertens HDT, Svergun DI. Structural characterization of proteins and complexes using small-angle X-ray solution scattering. *J Struct Biol*. 2010;172: 128–141. doi:10.1016/j.jsb.2010.06.012
 259. Salter JD, Krucinska J, Raina J, Smith HC, Wedekind JE. A hydrodynamic analysis of APOBEC3G reveals a monomer-dimer-tetramer self-association that has implications for anti-HIV function. *Biochemistry*. 2009;48: 10685–10687. doi:10.1021/bi901642c
 260. Durand D, Vivès C, Cannella D, Pérez J, Pebay-Peyroula E, Vachette P, et al. NADPH oxidase activator p67phox behaves in solution as a multidomain protein with semi-flexible linkers. *J Struct Biol*. 2010;169: 45–53. doi:10.1016/j.jsb.2009.08.009
 261. Rambo RP, Tainer JA. Characterizing flexible and intrinsically unstructured biological macromolecules by SAS using the Porod-Debye law. *Biopolymers*. 2011;95: 559–571. doi:10.1002/bip.21638
 262. Kotta-Loizou I, Tsaousis GN, Hamodrakas SJ. Analysis of Molecular Recognition Features (MoRFs) in membrane proteins. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics*. 2013;1834: 798–807. doi:10.1016/j.bbapap.2013.01.006
 263. Jorda J, Xue B, Uversky VN, Kajava A V. Protein tandem repeats - The more perfect, the less structured. *FEBS J*. 2010;277: 2673–2682. doi:10.1111/j.1742-464X.2010.07684.x
 264. Dyson HJ, Wright PE. Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6: 197–208. doi:10.1038/nrm1589
 265. Tompa P. Intrinsically unstructured proteins evolve by repeat expansion. *BioEssays*. 2003. pp. 847–855. doi:10.1002/bies.10324

266. Dunn JJ, Lade BN, Barbour AG. Outer surface protein A (OspA) from the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*: high level expression and purification of a soluble recombinant form of OspA. *Protein Expr Purif.* 1990;1: 159–168. doi:10.1016/1046-5928(90)90011-M
267. Svergun DI. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophys J.* 1999;76: 2879–2886. doi:10.1016/S0006-3495(99)77443-6
268. Hill C, Gutierrez J. A method for extraction and analysis of high quality genomic DNA from ixodid ticks. *Med Vet Entomol.* 2003;17: 224–227. Available: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2915.2003.00425.x/full>
269. Hubbard MJ, Cann KJ, Wright DJM. Validation and rapid extraction of nucleic acids from alcohol-preserved ticks. *Exp Appl Acarol.* 1995;19: 473–478. doi:10.1007/BF00048266
270. Halos L, Jamal T, Vial L, Maillard R, Suau A, Le Menach A, et al. Determination of an efficient and reliable method for DNA extraction from ticks. *Vet Res.* 2004;35: 709–713. doi:10.1051/vetres:2004038
271. Ammazalorso AD, Zolnik CP, Daniels TJ, Kolokotronis SO. To beat or not to beat a tick: Comparison of DNA extraction methods from ticks (*Ixodes scapularis*). *PeerJ Prepr.* 2015;No. e1042.
272. Crowder CD, Rounds M a, Phillipson C a, Picuri JM, Matthews HE, Halverson J, et al. Extraction of total nucleic acids from ticks for the detection of bacterial and viral pathogens. *J Med Entomol.* 2010;47: 89–94. doi:10.1603/033.047.0112
273. Witt D. Recent developments in disulfide bond formation. *Synthesis.* 2008. pp. 2491–2509. doi:10.1055/s-2008-1067188
274. Ruoppolo M, Vinci F, Klink TA, Raines RT, Marino G. Contribution of individual disulfide bonds to the oxidative folding of ribonuclease A. *Biochemistry.* 2000;39: 12033–12042. doi:10.1021/bi001044n
275. de Marco A. Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact.* 2009;8: 26. doi:10.1186/1475-2859-8-26
276. Beena K, Udgaonkar JB, Varadarajan R. Effect of Signal Peptide on the Stability and Folding Kinetics of Maltose Binding Protein. *Biochemistry.* 2004;43: 3608–3619. doi:10.1021/bi0360509
277. Cisak E, Wójcik-Fatla A, Stojek NM, Chmielewska-Badora J, Zwoliński J, Buczek A, et al. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* genospecies in *Ixodes ricinus* ticks from Lublin region (eastern Poland). *Ann Agric Environ Med.* 2006;13: 301–306. Available: [http://www.researchgate.net/publication/6604824_Prevalence_of_Borrelia_burgdorferi_genospecies_in_Ixodes_ricinus_ticks_from_Lublin_region_\(eastern_Poland\)](http://www.researchgate.net/publication/6604824_Prevalence_of_Borrelia_burgdorferi_genospecies_in_Ixodes_ricinus_ticks_from_Lublin_region_(eastern_Poland))
278. Liu P, O'Mara BW, Warrack BM, Wu W, Huang Y, Zhang Y, et al. A Tris (2-Carboxyethyl) Phosphine (TCEP) Related Cleavage on Cysteine-Containing Proteins. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2010;21: 837–844. doi:10.1016/j.jasms.2010.01.016
279. Derewenda ZS. Application of protein engineering to enhance crystallizability and improve crystal properties. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr.* 2010;66: 604–615. doi:10.1107/S090744491000644X
280. Mao AH, Crick SL, Vitalis A, Chicoine CL, Pappu R V. Net charge per residue modulates conformational ensembles of intrinsically disordered proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107: 8183–8138. doi:10.1073/pnas.0911107107
281. Ashbaugh HS, Hatch HW. Natively unfolded protein stability as a coil-to-globule transition in charge/hydrophobicity space. *J Am Chem Soc.* 2008;130: 9536–42. doi:10.1021/ja802124e
282. Rudd PM, Elliott T, Cresswell P, Wilson I a, Dwek R a. Glycosylation and the immune system. *Science.* 2001;291: 2370–2376. doi:10.1126/science.291.5512.2370
283. Kuttner-Kondo L, Medof ME, Brodbeck W, Shoham M. Molecular modeling and mechanism of action of human decay-accelerating factor. *Protein Eng.* 1996;9: 1143–9.
284. Beckham GT, Bomble YJ, Matthews JF, Taylor CB, Resch MG, Yarbrough JM, et al. The O-glycosylated linker from the *Trichoderma reesei* Family 7 cellulase is a flexible, disordered protein. *Biophys J.* 2010;99: 3773–3781. doi:10.1016/j.bpj.2010.10.032
285. Liu D, Ishima R, Tong KI, Bagby S, Kokubo T, Muhandiram DR, et al. Solution structure of a TBP-TAF(II)230 complex: Protein mimicry of the minor groove surface of the TATA box unwound by TBP. *Cell.* 1998;94: 573–583. doi:10.1016/S0092-8674(00)81599-8
286. Weinreb PH, Zhen W, Poon AW, Conway KA, Lansbury PT. NACP, a protein implicated

- in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry*. 1996;35: 13709–13715. doi:10.1021/bi961799n
287. Donaldson L, Capone JP. Purification and characterization of the carboxyl-terminal transactivation domain of Vmw65 from herpes simplex virus type 1. *J Biol Chem*. 1992;267: 1411–1414.
 288. He B, Wang K, Liu Y, Xue B, Uversky VN, Dunker AK. Predicting intrinsic disorder in proteins: an overview. *Cell Res*. 2009;19: 929–49. doi:10.1038/cr.2009.87
 289. Dunker a. K, Lawson JD, Brown CJ, Williams RM, Romero P, Oh JS, et al. Intrinsically disordered protein. *J Mol Graph Model*. 2001;19: 26–59. doi:10.1016/S1093-3263(00)00138-8
 290. Vacic V, Uversky VN, Dunker AK, Lonardi S. Composition Profiler: a tool for discovery and visualization of amino acid composition differences. *BMC Bioinformatics*. 2007;8: 211. doi:10.1186/1471-2105-8-211
 291. Fuxreiter M, Tompa P, Simon I. Local structural disorder imparts plasticity on linear motifs. *Bioinformatics*. 2007;23: 950–956. doi:10.1093/bioinformatics/btm035
 292. Vacic V, Oldfield CJ, Mohan A, Radivojac P, Cortese MS, Uversky VN, et al. Characterization of molecular recognition features, MoRFs, and their binding partners. *J Proteome Res*. 2007;6: 2351–2366. doi:10.1021/pr0701411.Characterization
 293. Tompa P, Fersht A. Nuclear Magnetic Resonance. Structure and function of intrinsically disordered proteins. CRC Press; 2010. pp. 73–85.
 294. Salmon L, Nodet G, Ozenne V, Yin G, Jensen MR, Zweckstetter M, et al. NMR characterization of long-range order in intrinsically disordered proteins. *J Am Chem Soc*. 2010;132: 8407–8418. doi:10.1021/ja101645g
 295. Bourhis J-M, Johansson K, Receveur-Bréchet V, Oldfield CJ, Dunker KA, Canard B, et al. The C-terminal domain of measles virus nucleoprotein belongs to the class of intrinsically disordered proteins that fold upon binding to their physiological partner. *Virus Res*. 2004;99: 157–167. doi:10.1016/j.virusres.2003.11.007
 296. Dev S, Suroli A. Dynamic light scattering study of peanut agglutinin: size, shape and urea denaturation. *J Biosci*. 2006;31: 551–6. doi:10.1007/BF02708406
 297. Hua L, Zhou R, Thirumalai D, Berne BJ. Urea denaturation by stronger dispersion interactions with proteins than water implies a 2-stage unfolding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105: 16928–16933. doi:10.1073/pnas.0808427105
 298. Revel AT, Talaat AM, Norgard M V. DNA microarray analysis of differential gene expression in *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99: 1562–1567. doi:10.1073/pnas.032667699
 299. Schwan TG, Piesman J, Golde WT, Dolan MC, Rosa P a. Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92: 2909–2913. doi:10.1073/pnas.92.7.2909
 300. De Silva AM, Fikrig E. Growth and migration of *Borrelia burgdorferi* in Ixodes ticks during blood feeding. *Am J Trop Med Hyg*. 1995;53: 397–404. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7485694>
 301. Dunker a. K, Uversky VN. Drugs for “protein clouds”: Targeting intrinsically disordered transcription factors. *Curr Opin Pharmacol*. 2010;10: 782–788. doi:10.1016/j.coph.2010.09.005
 302. Fuxreiter M, Simon I, Friedrich P, Tompa P. Preformed structural elements feature in partner recognition by intrinsically unstructured proteins. *J Mol Biol*. 2004;338: 1015–26. doi:10.1016/j.jmb.2004.03.017
 303. Brandt ME, Riley BS, Radolf JD, Norgard M V. Immunogenic integral membrane proteins of *Borrelia burgdorferi* are lipoproteins. *Infect Immun*. 1990;58: 983–991.
 304. Borg M, Mittag T, Pawson T, Tyers M, Forman-Kay JD, Chan HS. Polyelectrostatic interactions of disordered ligands suggest a physical basis for ultrasensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104: 9650–5. doi:10.1073/pnas.0702580104
 305. Mittag T, Orlicky S, Choy W-Y, Tang X, Lin H, Sicheri F, et al. Dynamic equilibrium engagement of a polyvalent ligand with a single-site receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105: 17772–7. doi:10.1073/pnas.0809222105
 306. Mittag T, Marsh J, Grishaev A, Orlicky S, Lin H, Sicheri F, et al. Structure/function implications in a dynamic complex of the intrinsically disordered Sic1 with the Cdc4 subunit of an SCF ubiquitin ligase. *Structure*. 2010;18: 494–506. doi:10.1016/j.str.2010.01.020
 307. Nagy a, Grama L, Huber T, Bianco P, Trombitás K, Granzier HL, et al. Hierarchical

- extensibility in the PEVK domain of skeletal-muscle titin. *Biophys J.* 2005;89: 329–336. doi:10.1529/biophysj.104.057737
308. Oldfield CJ, Cheng Y, Cortese MS, Romero P, Uversky VN, Dunker AK. Coupled folding and binding with alpha-helix-forming molecular recognition elements. *Biochemistry.* 2005;44: 12454–12470. doi:10.1021/bi050736e
309. Garner E, Romero P, Dunker A, Brown C, Obradovic Z. Predicting Binding Regions within Disordered Proteins. *Genome Inform Ser Workshop Genome Inform.* 1999;10: 41–50. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11072341>
310. Cheng Y, Oldfield CJ, Meng J, Romero P, Uversky VN, Dunker KA. Mining alpha-helix-forming molecular recognition features with cross species sequence alignments. *Biochemistry.* 2007;46: 13468–13477. doi:10.1021/bi7012273
311. Shoemaker BA, Portman JJ, Wolynes PG. Speeding molecular recognition by using the folding funnel: the fly-casting mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97: 8868–73. doi:10.1073/pnas.160259697
312. Dunker a. K, Cortese MS, Romero P, Iakoucheva LM, Uversky VN. Flexible nets: The roles of intrinsic disorder in protein interaction networks. *FEBS J.* 2005;272: 5129–5148. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04948.x
313. Uversky VN, Oldfield CJ, Dunker a. K. Showing your ID: Intrinsic disorder as an ID for recognition, regulation and cell signaling. *J Mol Recognit.* 2005;18: 343–384. doi:10.1002/jmr.747
314. Takano K, Katagiri Y, Mukaiyama A, Chon H, Matsumura H, Koga Y, et al. Conformational contagion in a protein: structural properties of a chameleon sequence. *Proteins.* 2007;68: 617–25. doi:10.1002/prot.21451
315. Guo J, Jaromczyk JW, Xu Y. Analysis of chameleon sequences and their implications in biological processes. *Proteins.* 2007;67: 548–58. doi:10.1002/prot.21285
316. Oldfield CJ, Meng J, Yang JY, Yang MQ, Uversky VN, Dunker AK. Flexible nets: disorder and induced fit in the associations of p53 and 14-3-3 with their partners. *BMC Genomics.* 2008;9 Suppl 1: S1. doi:10.1186/1471-2164-9-S1-S1
317. Csizsók V, Bokor M, Bánki P, Klement E, Medzihradszky KF, Friedrich P, et al. Primary contact sites in intrinsically unstructured proteins: the case of calpastatin and microtubule-associated protein 2. *Biochemistry.* 2005;44: 3955–64. doi:10.1021/bi047817f
318. Dunker a K, Obradovic Z. The protein trinity--linking function and disorder. *Nat Biotechnol.* 2001;19: 805–806. doi:doi: 10.1038/nbt0901-805
319. Roth Z, Yehezkel G, Khalaila I. Identification and Quantification of Protein Glycosylation. *Int J Carbohydr Chem.* 2012;2012: 1–10. doi:10.1155/2012/640923