

Ilona Mączka¹, Stanisława Tylewska-Wierzbanowska^{1*}

Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny,
Samodzielna Pracownia Riketsji Chlamydii i Krętków Odzwierzęcych, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa

Wpłynęło w styczniu 2010 r.

1. Struktura *Borrelia burgdorferi*. 2. Genom *Borrelia burgdorferi* sensu lato. 3. Metazoonoza – zoonoza przenoszona przez wektor. 4. Cykl rozwojowy kleszcza *Ixodes ricinus*. 5. Rezerwuariat krętków *B. Burgdorferi*. 6. Wpływ czynników środowiska na przemiany *B. burgdorferi* w kleszczu. 7. Białko powierzchniowe C – OspC. 8. Adhezyny bakteryjne a receptory gospodarza. 9. Umieszczenie *B. burgdorferi* w późnej fazie u ssaka. 10. Białko vlsE. 11. Rozwój odpowiedzi immunologicznej w zakażeniu *B. burgdorferi*. 12. Reakcje autoimmunologiczne. 13. Podsumowanie

Life cycle of *Borrelia burgdorferi* spirochets in the environment

Abstract: *Borrelia burgdorferi* sensu lato spirochetes are long, spiral Gram-negative bacteria. The life cycle of *B. burgdorferi* in the environment can be divided into several stages. Each of them is essential for the survival of these microorganisms. The first stage of the life cycle takes place in a hungry tick, second in the blood and/or body fluids of warm-blooded animals, the third stage inside the mammalian cells, and the fourth one is connected with the death of the infected host cells and the release of the bacteria into the bloodstream, from where they can be sucked again by ticks and the cycle repeats.

Lyme borreliosis, caused by *B. burgdorferi* spirochetes, is a meta-zoonosis transmitted by arthropod vectors. Ticks of the genus *Ixodes* are the most competent vector of the disease. Following outer membrane lipoproteins: OspA, OspB until OspF and decorin-binding proteins DbpA and DbpB have been described. Their role in the life cycle of *B. burgdorferi* has only been partly elucidated. The first step of colonization of specific sites by pathogenic bacteria in the binding of bacterial adhesion proteins to receptors (decorin, glycosaminoglycan, fibronectin, integrins) present on the surface of the target tissues of the host. *B. burgdorferi* spirochetes are very motile bacteria which can easily spread throughout the body to various, often very distant organs. Even a normal and efficient immune system is unable to eliminate *B. burgdorferi* bacteria since they are able to disguise and hide protecting themselves against the host immune system. Outer membrane proteins *B. burgdorferi* undergo antigenic variation depending on environmental conditions, such as temperature, pH, and availability of nutrients.

1. Structure of *Borrelia burgdorferi*. 2. Genome of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. 3. Meta-zoonosis – zoonosis transmitted by a vector. 4. Development cycle of the tick *Ixodes ricinus*. 5. Reservoir of *B. burgdorferi* spirochetes. 6. Environmental impact on the changes of *B. burgdorferi* in ticks. 7. Outer surface protein C – OspC. 8. Bacterial adhesins and host receptors. 9. *B. burgdorferi* site in the late phase in a mammal. 10. Protein vlsE. 11. Development of immune response to infection with *B. burgdorferi*. 12. Autoimmune reactions. 13. Summary

Słowa kluczowe: *Borrelia burgdorferi*, osp, vlsE

Key words: *Borrelia burgdorferi*, osp, vlsE

1. Struktura *Borrelia burgdorferi*

Czynnik etiologiczny boreliozy z Lyme, krętki *Borrelia burgdorferi* sensu lato, są w opinii wielu badaczy najbardziej fascynującymi i jednocześnie zagadkowymi bakteryjnymi patogenami [8]. Drobnoustroje te wykształciły wyróżniające je wśród innych bakterii wyjątkowe mechanizmy interakcji ze swoim gospodarzem [4]. Są to długie, ruchliwe bakterie Gram-ujemne [18]. Komórka ich jest wydłużona, silnie skręcona, z przebiegającym pod błoną wewnętrzną włóknem osiowym [22]. Kiedyś uważano, że liczba skrętów występujących w komórce jest cechą stałą, charakterystyczną dla danego gatunku. Obecnie wiadomo, że kształt komórki, jej skręty, są cechami zmiennymi, zależnymi w znacznym stopniu od środowiska, w którym

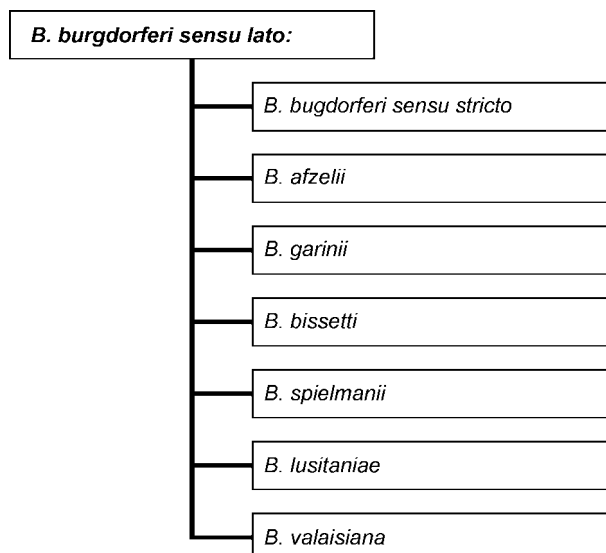
znajduje się bakteria. Kształt komórki i zdolność ruchu umożliwiają im penetrację środowisk o różnej strukturze i gęstości, w tym także tkanki łącznej. Są to bakterie mikroaerofilne, żyjące w różnych okresach swego cyklu życiowego jako pasożyty zewnątrz- albo wewnątrzkomórkowe [18]. Ściana komórkowa krętków ma budowę charakterystyczną dla bakterii Gram-ujemnych. W błonie zewnętrznej występują liczne białka będące silnymi antygenami i biorące udział w kolonizacji, penetracji tkanek oraz odpowiedzi immunologicznej gospodarza na zakażenie. Są to lipoproteiny łączące się N-końcem z cząsteczkami kwasów tłuszczowych błony plazmatycznej. Lipoproteiny te odgrywają ważną rolę w adaptacji krętków do środowiska na różnych etapach cyklu życiowego oraz są związane z ich chorobotwórczością i przebiegiem

* Autor korespondencyjny: Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, Samodzielna Pracownia Riketsji Chlamydii i Krętków Odzwierzęcych, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa, tel./fax: 0-22 542 12 50, stylewska@pzh.gov.pl

odpowiedzi immunologicznej gospodarza na zakażenie. W błonie zewnętrznej wykryto grupę lipoprotein – oznaczanych skrótem OspA (outer surface protein A), OspB, aż do OspF [18]. Jednak ich funkcje są słabo poznane. Dotychczas opisano rolę OspA, OspB, OspC oraz białek wiążących dekorynę (decorin binding proteins) DbpA i DbpB występujących również w błonie zewnętrznej. Wspomniane białka kodowane są na plazmidach, a ich ekspresja zależy od warunków w jakich znajduje się bakteria [20].

2. Genom *Borrelia burgdorferi sensu lato*

Genom krętków *Borrelia burgdorferi sensu lato* jest złożony i zróżnicowany. Zwykle w komórce tych bakterii występuje znacznie więcej pozachromosomalnego DNA [22] niż u jakichkolwiek innych drobnoustrojów. Mimo, iż genom *B. burgdorferi* jest to jednym z najmniejszych genomów bakteryjnych, mający około 1,5 Mbp, w skład jego wchodzi chromosom (910 kbp) i zespół plazmidów (600 kbp) – 9 plazmidów kolistych i 12 plazmidów liniowych [6, 10, 18, 22]. Dotychczas została poznana całkowita sekwencja genomu szczepu B31MI *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. Zawiera on 853 geny chromosomalne i 898 plazmidowych. Znane są biologiczne funkcje 59% genów zlokalizowanych na chromosomie i tylko 4% genów na plazmidach. Wiedza na temat funkcji większości genów zawartych w genomie tych bakterii jest znikoma [6]. Wyniki prac nad genomem *B. burgdorferi* sugerują, że krętki mają jedynie szczątkowe mechanizmy własnego metabolizmu i są niemal całkowicie uzależnione od gospodarza w zakresie przemiany tłuszczów, białek, węglowodanów, aminokwasów i żelaza [25]. Dopasowują swój metabolizm do zupełnie innych substancji odżywczych występujących u kleszczy i kręgowców, co powoduje zarówno znaczne zmiany biologiczne, jak i zmiany w składzie antygenowym [24]. Ciągłe braki informacji wyjaśniających przebieg kolejnych faz infekcji boreliozowej, takich jak: mechanizm transportu bakterii *B. burgdorferi* wewnątrz naczyń czy też rodzaj czynników umożliwiających krętkom opuszczenie systemu naczyniowego [13]. W obrębie tego gatunku wyróżniono 15 genogatunków (*B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. bissetti*, *B. spielmanii*, *B. lusitaniae*, *B. valaisiana*, *B. sinica*, *B. californiensis*, *B. andersonii*, *B. turoli*, *B. japonica*, *B. tanukii*, *B. bissettii*, *B. hermsii*), z których 7 jest chorobotwórczych dla człowieka – rys. 1 [26–28]. W warunkach *in vitro* krętki *B. burgdorferi sensu lato* rosną bardzo wolno i jedynie w bogatych podłożach [4]. Do hodowli krętków stosuje się podłoże BSK (Barbour’a – Stoenner’a – Kelly’ego) oraz jego modyfikacje, które



Rys. 1. Genogatunki *B. burgdorferi sensu lato* chorobotwórcze dla człowieka

w swym składzie zawierają około 60 składników takich jak aminokwasy, elektrolity, witaminy; ponadto są wzbogacone surowicą króliczą [29]. Uzyskanie widocznego wzrostu bakterii wymaga kilku tygodni a nawet miesięcy hodowli, ponieważ czas między kolejnymi podziałami komórki tych krętków wynosi 14–16 godzin [4,18]; dla porównania *E. coli* dzieli się średnio co 20 minut. Z tej przyczyny izolacja czynnika etiologicznego nie jest stosowana w rutynowym postępowaniu diagnostycznym mającym na celu rozpoznanie zakażenia. Ze wzrostem *in vitro*, w dostępnych obecnie płynnych podłożach bakteriologicznych, wiąże się postępująca utrata plazmidów [3], a w konsekwencji utrata zjadliwości hodowanych krętków [4]. Z tych powodów manipulacje genetyczne i techniki molekularne stosowane w badaniach innych bakterii są mało przydatne w przypadku krętków [4].

3. Metazoonoza – zoonoza przenoszona przez wektor

Borelioza z Lyme, choroba wywoływana przez krętki *B. burgdorferi sensu lato* jest zoonozą występującą na całej półkuli północnej i tak, jak inne choroby odzwierzęce, rozprzestrzeniające się z udziałem wektora, zalicza się do grupy metazoonoz [14,18]. Przenosicielem zakażenia z jednego osobnika na drugiego, są kleszcze z rodzaju *Ixodes* [14]. Zakażenie przenoszone jest wśród kręgowców przez zwierzęta bezkręgowce, nazywane w tych przypadkach wektorem. Oznacza to, że drobnoustroj chorobotwórczy wymaga zarówno gospodarza kręgowca jak i bezkręgowca dla zamknięcia pełnego cyklu życiowego. Udział kleszczy w przenoszeniu zakażenia determinuje zgodną z ich

cyklem życiowym sezonowość występowania zachowań jak również ich zasięg geograficzny, który pokrywa się z zasięgiem występowania przenoszących zakażenie kleszczy [22]. Istnieje wysoka swoistość gatunkowa wektora przenoszącego zakażenie, którym są tylko kleszcze z rodzaju *Ixodes*. W Ameryce Północnej jest to przede wszystkim *Ixodes scapularis*, w Europie *Ixodes ricinus* i w Azji *Ixodes persulcatus* [14].

4. Cykl rozwojowy kleszcza *Ixodes ricinus*

Cykl rozwojowy kleszcza *I. ricinus* trwa ok. 2–3 lata. Kleszcze te w swoim cyklu przechodzą przeobrażenie: z jaj wyklują się larwy, przechodzą po pierwszym żerowaniu w nimfę, która po kolejnym posiłku osiąga stadium dojrzałe [15]. Kleszcze w każdym stadium rozwojowym muszą wyssać krew kręgowca, aby móc dokonywać dalszych przeobrażeń do postaci dorosłej. Kleszcze zakażają się bakteriami *B. burgdorferi*, kiedy piją krew zakażonych zwierząt. Krętki *B. burgdorferi* przekazywane są transowarialnie i transstadialnie kleszczom, które zakażają zwierzęta, na których żerują. Jest to możliwe dzięki przemieszczaniu się bakterii z hemolimfą z przewodu pokarmowego do różnych tkanek, w tym ślinianek i narządów rozrodczych. Zakażenie utrzymuje się nie tylko w kolejnych stadiach kleszcza, ale również w następnych jego pokoleniach. Larwy i nimfy zakażają drobne ptaki i ssaki. Nimfy i postacie dorosłe kleszczy zakażają większe ssaki. Człowiek może być zakażony zarówno przez larwy, nimfy jak i postacie dorosłe kleszczy [14].

5. Rezerwuar krętków *B. burgdorferi*

Rezerwuar zwierzęcy choroby jest bardzo zróżnicowany. Dla utrzymania krążenia drobnoustroju w środowisku wystarczający jest jeden gatunek gospodarza, co stwierdzono przeprowadzając badania na małej, bezludnej wyspie na Bałtyku u wybrzeży Szwecji, na której jedynymi zwierzętami lądowymi są zające i one stanowią tam główny i jedyny rezerwuar krętków *B. burgdorferi*. W innych warunkach krętki te mogą bytować cyklicznie w różnych gatunkach zwierząt, jak np. w drobnych gryzoniach, jaszczurkach, następnie jeleniowatych, innych dużych ssakach bądź ptakach. Zmiana gatunku gospodarza jest przede wszystkim związana z dostępnością danego żywiciela, ponieważ kleszcze w różnych stadiach bytują na różnych piętrach ekosystemu, a tym samym bardziej dostępne są albo małe gryzonie albo ptaki albo jeleniowate czy inne duże zwierzęta. Ma to swoje odbicie w swoistym cyklu krążenia drobnoustroju w środowisku, w adap-

tacji do wektora, którym są kleszcze rodzaju *Ixodes* oraz w przejściu do gospodarza, tj. kręgowców, w tym różnych gatunków ssaków i ptaków, a także gadów [23]. Krętki *B. burgdorferi sensu lato* nie wykazują szczególnego powinowactwa do wybranych gatunków gospodarza; ograniczałoby to zasięg ich występowania i możliwość rozprzestrzeniania się tylko do określonych niszy ekologicznych. Wykazano, że gospodarzem mogą być zasadniczo wszystkie gatunki kręgowców lądowych (gady, ptaki, ssaki), które są żywicielami kleszczy [23]. W zależności od warunków, kleszcze pasożytują na każdym dostępnym żywicielu, przenosząc podczas żerowania krętki. Uważa się, że każdy żywiciel kleszcza może być jednocześnie rezerwuarem krętków *B. burgdorferi*.

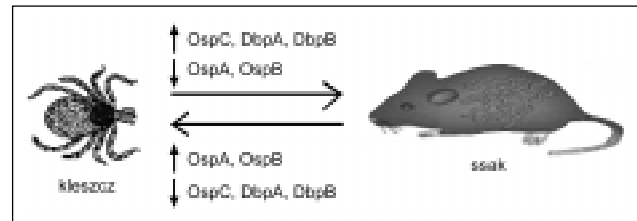
6. Wpływ czynników środowiska na przemiany *B. burgdorferi* w kleszczu

Cykl życiowy-krążenie krętków *B. burgdorferi* w środowisku można podzielić na kilka etapów, z których każdy jest niezbędny do przeżycia drobnoustroju: pierwsza, wstępna faza to bytowanie w kleszczu (głodnym i podczas posiłku), druga faza to rozwój we krwi lub płynach ustrojowych zwierząt ciepłokrwistych, trzecia faza to okres bytowania w komórce gospodarza-ssaka, czwarta faza, ostatni etap to śmierć zakażonej komórki gospodarza i uwolnienie bakterii do krwi, skąd znów trafiają do kleszcza i cykl powtarza się. Krążenie krętków w tak zróżnicowanych warunkach jest możliwe dzięki adaptacji do nowego środowiska (organizm kleszcza-organizm ssaka). Szybkie przystosowanie się do nowych warunków następuje w wyniku selektywnej ekspresji poszczególnych genów [22]. Pochodzące ze środowiska sygnały, takie jak zmiany temperatury (23–37°C), zmiany pH czy różnice w dostępności substancji odżywczych i chemicznych determinują zwiększenie lub zmniejszenie ekspresji poszczególnych genów [21]. W warunkach laboratoryjnych badano wpływ pH na profil białkowy błony zewnętrznej krętków. Wykazano, że zmiany pH w podłożu hodowlanym prowadzą do zmian w składzie białkowym zewnętrznej warstwy ściany komórkowej krętków. Przesunięcie pH od wartości 6 do 7 i następnie do 8 powodowało zmianę co najmniej 7 białek. W przypadku pięciu badanych białek (białka o masie cząsteczkowej 24, 35, 43, 45, 54 kDa), były one produkowane albo wyłącznie albo w znacznie większych ilościach w pH 6 i 7. Przejście do pH 8 powodowało zahamowanie wytwarzania białka 24, czyli OspC, natomiast w tych warunkach następowało zwiększenie produkcji białka p42. Wytwarzanie lipoprotein błony zewnętrznej OspC i OspE/F (Erps) regulują zmiany temperatury [5]. Najbardziej radykalne zmiany

środowiska, w którym bytują krętki następują w chwili ich przejścia z kleszcza do organizmu ssaka. Powoduje to ekspresję genów kodujących lipoproteiny, z których większość, w liczbie nie spotykanej u innych bakterii, ekspozycja jest na powierzchni komórki i ma bezpośredni kontakt ze środowiskiem zewnętrznym [21]. W głodnym kleszczu krętki związane są z powierzchnią komórek nabłonkowych jelita i w tym czasie w większości nie ulegają podziałom. Kolonizacja jelita kleszcza przez krętki jest związana z białkami powierzchniowymi OspA i OspB [18]. OspA jest głównym białkiem odpowiedzialnym za adhezję krętków do jelita kleszcza. Wykazano, że białko to łączy się z glikoproteiną TROSPA (tick receptor OspA), występującą na powierzchni nabłonków w świetle jelita kleszcza i w przestrzeniach międzykomórkowych. Interakcja OspA – TROSPA i kolonizacja powierzchni jelita przez krętki są hamowane przez przeciwciała anty-TROSPA jak również podczas posiłku kleszcza [4]. OspB wspomaga kolonizację i przeżycie bakterii w jelicie. Lipoproteiny OspA i B są produkowane do czasu rozpoczęcia żerowania [18]. Z chwilą rozpoczęcia żerowania następuje gwałtowny wzrost stężenia OspC. W tym czasie następuje zahamowanie produkcji OspA, głównej lipoproteiny obecnej u krętków bytujących w głodnym kleszczu, a w to miejsce narasta OspC [4].

7. Białko powierzchniowe C – OspC

Krętki rozpoczynają syntezę OspC podczas żerowania kleszcza kiedy jeszcze znajdują się w jego jelicie. Dopiero podczas posiłku (larwy, nimfy i postaci dorosłej) krętki ulegają podziałom, przechodząc przez ścianę jelita do hemolimfy i wędrują do ślinianek skąd są wprowadzane do skóry ssaka. Podziały komórek krętków i migracja ich w kleszczu wydają się być związane z fizjologiczną adaptacją, która przygotowuje je do wzrostu w organizmie ssaka i związana jest ze zmianą ekspresji lipoprotein na powierzchni krętków [4]. Wytwarzanie OspC jest zależne od temperatury i zachodzi tylko w temperaturze 32–37°C. Wskazuje to, że pochodzące ze środowiska dwa sygnały – wzrost temperatury i dopływ pokarmu wywołują ogromne zmiany w błonie zewnętrznej tych bakterii. Szybka synteza OspC w żerującym kleszczu może odgrywać podstawową rolę w rozwoju zakażenia u ssaków, w tym także u człowieka [7]. Białko powierzchniowe OspC jest kluczowym czynnikiem zjadliwości *B. burgdorferi* podczas zakażenia myszy, natomiast nie ma znaczenia w kleszczach. Rola OspC nie jest do końca jasna. Wykazano związek pomiędzy wzrostem tej lipoproteiny a wędrowką krętków do ślinianek oraz udział jej w adhezji bakterii do powierzchni tkanek tego gruczołu i znajdującego się w ślinie białka Salp15. OspC

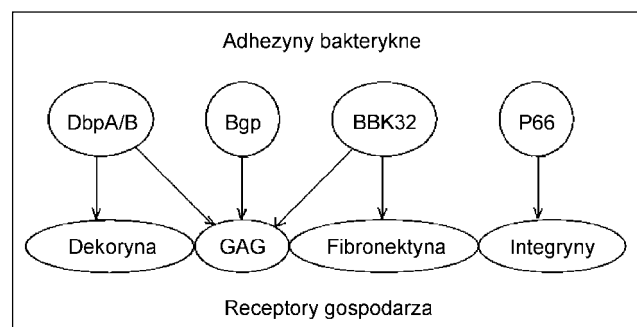


Rys. 2. Uproszczony schemat cyklu życia *Borrelia burgdorferi*. Ekspresja genów kodujących białka dramatycznie zmienia się podczas transmisji bakterii z kleszczy do ssaka czego przykładem są zmiany regulacji wymienionych białek. Szczegóły dotyczące poszczególnych białek są zawarte w tekście.

w połączeniu z białkiem Salp15 kleszcza jest czynnikiem zjadliwości koniecznym dla zainicjowania zakażenia u ssaka [10]. Białko Salp15 hamuje odpowiedź immunologiczną ssaka przez supresję funkcji komórek dendrytycznych oraz zahamowanie produkcji cytokin prozapalnych [18]. Przyłączenie na powierzchni komórki *B. burgdorferi* tego białka chroni je przed odpowiedzią humoralną atakowanego kręgowca. Jest to ważne immunomodulujące białko śliny kleszczy rodzaju *Ixodes*, którego celem są limfocyty T [10]. W jego obecności następuje zahamowanie aktywacji limfocytów B. Słabo prezentowany w hodowli i w ciele kleszcza OspC, a intensywnie – w ciele ssaka staje się znacznie bardziej polimorficzny w sekwencjach i reaktywności w porównaniu z OspA. Zmienność antygenowa OspC może zapewniać uniknięcie jego eliminacji w początkowym okresie zakażenia, dłuższe utrzymanie się patogenu we krwi oraz odpowiadać za zróżnicowaną lokalizację narządową.

8. Adhezyny bakteryjne a receptory gospodarza

Krętki, aby móc skolonizować wiele różnych tkanek muszą wykształcić nowe struktury, które mogłyby pomóc w przeżyciu i uniknięciu mechanizmów obron-



Rys. 3. Interakcje zachodzące pomiędzy bakteryjnymi adhezyjnami a receptorami gospodarza.
DbpA/B – białka wiążące dekorynę; DbpA i DbpB
Bgp, BBK32, P66 – adhezyny na powierzchni krętków
GAG – glikozaminoglikan

nych gospodarza. Kolonizacja określonych miejsc przez bakterie chorobotwórcze jest związana ze zdolnością rozpoznania charakterystycznych cząsteczek i ich ugrupowań – miejsc receptorowych na powierzchni tkanek docelowych gospodarza [9]. Na powierzchni krętka są to adhezyjny bakteryjne: DbpA, DbpB, Bgp, BBK32, P66 i łączą się odpowiednio z receptorami gospodarza takimi jak: dekoryna, glikozaminoglikany, fibronektyna, integryny [4].

8.1. Fibronektyna

Fibronektyna jest złożona glikoproteina obecna w osoczu i macierzy pozakomórkowej z wieloma miejscami receptorowymi dla różnych substancji, takich jak heparyna, żelatyna, integryna i innych składników osocza i tkanek. Wykazano, że wiązanie się *B. burgdorferi* z macierzą pozakomórkową zachodzi poprzez fibronektynę. Zidentyfikowano kilka białek łączących się z fibronektyną (o różnej masie cząsteczkowej), ale najlepiej scharakteryzowane jest białko BBK32, lipoproteina błony zewnętrznej. Wytwarzanie jej rozpoczyna się wraz z żerowaniem kleszcza i kontynuowane jest u ssaka [4]. Przeciwciała dla tej lipoproteiny wykrywa się u chorych na boreliozę z Lyme.

8.2. Dekoryna

W tkankach człowieka a także myszy krętka związane są przede wszystkim z tkanką łączną, głównie z jej włóknami kolagenowymi. *B. burgdorferi* nie łączy się z komercyjnymi preparatami kolagenu, ale tylko z natywnym typu I i dekoryną. Wydaje się, że dekoryna pomaga w rozprzestrzenianiu się zakażenia i w przeżyciu krętków w tkankach bogatych w tę substancję. Dekoryna to proteoglikan łączący się z kolagenem, jest składnikiem tkanki łącznej w wielu narządach. Dekoryna składa się z białka korowego (core protein) o masie cząsteczkowej 36 kDa z przyłączonymi 3 oligosacharydami i z glikozaminoglikanami (GAGs). Dekoryna jest dobrze rozpoznawana przez lipoproteiny DbpA i DbpB (*decorin binding protein*) *B. burgdorferi* obecne na powierzchni krętka w czasie bakteriemii. Proteoglikany są wszechobecne w tkankach ssaków i są związane z receptorami adhezyn dla wielu chorobotwórczych bakterii. Obecność DbpA i DbpB w krętkach związana jest z zakażeniem ssaków. Nie stwierdza się ich obecności podczas bytowania krętków w kleszczach [4].

8.3. Integryny

Kolejnym przykładem receptorów są integryny. Krętki *B. burgdorferi* łączą się z integrynami, które pośredniczą w interakcji adhezyjnej między różnymi

komórkami oraz komórkami a macierzą pozakomórkową, a także przewodzą sygnały między środowiskiem wewnątrz- i zewnątrzkomórkowym [4]. Adhezja do płytek krwi zachodzi przez swoistą dla nich integrynę $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$. Jest to główny receptor dla fibrynogenu i jest odpowiedzialny przede wszystkim za tworzenie się agregatów płytek w uszkodzonych miejscach endotelium. Krętki rozpoznając receptor $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ łączą się tylko z aktywnymi płytkami [4]. Inny receptor integrynowy $\alpha_m\beta_2$ występujący na powierzchni neutrofilii i makrofagów jest rozpoznawany przez cząsteczki mannozy występujące na powierzchni bakterii. Rola tego procesu nie jest znana [2].

8.4. Glikozaminoglikany – GAG

Glikozaminoglikany (GAG, *glycosaminoglycan*) zbudowane są z powtarzających się nierozgałęzionych podjednostek dwusacharydowych. Występują one we wszystkich tkankach. W dystrybucji patogenu znaczenie ma zdolność łączenia się krętków z glikozaminoglikanami takimi jak heparyna, siarczan heparyny, siarczan dermatanu [4].

9. Umiejscowienie *B. burgdorferi* w późnej fazie u ssaka

B. burgdorferi jako bardzo ruchliwe bakterie z łatwością rozprzestrzeniają się po całym organizmie do bardzo różnych i odległych od miejsca wniknięcia narządów [22]. Spiralna budowa krętka umożliwia mu łatwiejsze poruszanie się w środowisku tkanek [18]. Krętki najczęściej związane są ze ścianą naczyń i otaczającą ją tkanką łączną. Prawdopodobnie wynikiem tego jest ostre zapalenie ściany naczyń. W odległych od miejsca wniknięcia rejonach na skórze, w stawach, sercu i tkance nerwowej mimo dobrze rozwiniętej odpowiedzi immunologicznej może rozwinąć się przewlekłe zakażenie [22]. Krętki *B. burgdorferi* wyposażone są w receptory glikozaminoglikanów, zatem łączą się one z tkankami o znacznej ich zawartości, np. w stawach, sercu i osierdziu, mózgu i oponach mózgowych. Wewnątrzkomórkową lokalizację krętków wykazano głównie w późnej lub przetrwałej fazie zakażenia. Stwierdzono je w fibroblastach, skórze, komórkach maziówki, komórkach śródbłonna [24]. Nawet normalny i sprawny układ immunologiczny gospodarza nie jest w stanie wyeliminować bakterii *B. burgdorferi*, ponieważ maskuje się ona i ukrywa, aby ochronić się przed jego działaniem [22]. W badaniach *in vitro* *B. burgdorferi* przylegają do fibroblastów, wpuklając się głęboko w powierzchnię komórki [24]. Dzięki ruchom skrętnym owijają się w błonę komórkową i wnikają do wnętrza komórki otoczone

bloną plazmatyczną. Ukrycie takie pozwala uchronić się przed odpowiedzią komórkową, a także humoralną gospodarza.

Większość autorów zwraca uwagę na obecność pozakomórkową *B. burgdorferi* w zakażonym organizmie, z możliwością przetrwania w takich miejscach, gdzie obce antygeny nie wywołują odpowiedzi immunologicznej. Takimi miejscami mogą być mózg czy oko. Przebywanie żywych bakterii wewnątrz komórek i w miejscach niedostępnych dla komórek układu immunologicznego wiąże się z niebezpieczeństwem nawrotu choroby po wydostaniu się krętków z ukrycia. W takich sytuacjach w późnym okresie choroby może niekiedy dojść do produkcji przeciwciał typowych dla wczesnych stadiów choroby [13].

10. Białko VlsE

Zmienność antygenowa jest efektywną strategią mikroorganizmów służącą ucieczce przed niszczącymi mechanizmami układu immunologicznego. *B. burgdorferi* dysponuje zmiennymi antygenami nazwanymi vls (variable major protein-like sequence) [10], które pozwalają przetrwać bakterii przez lata w organizmie człowieka mimo odpowiedzi immunologicznej. Dla przeżycia w myszach i uniknięcia odpowiedzi immunologicznej gospodarza absolutnie konieczny jest plazmid liniowy 28-1 z genami vls kodującymi białka VlsE [17]. VlsE (variable major protein – like sequence, expressed) jest nowo scharakteryzowanym białkiem błonowym *B. burgdorferi*. Występuje ono na powierzchni komórki bakteryjnej i maskuje inne powierzchniowe antygeny. Gwałtowny wzrost ekspresji genu vlsE umożliwia rozwój przewlekłego zakażenia u myszy z pełnosprawnym układem immunologicznym. VlsE podlega antygenowej zmienności. Wysoko heterogenne białko VlsE zawiera konserwatywne, wspólne dla wszystkich genogatunków epitopy [17]. Struktura trójwymiarowa jego jest taka, że część zmienna zwrócona jest na zewnątrz i zakrywa a tym samym chroni przed atakiem przeciwciał część stałą. Wytwarzane przeciwciała są skierowane przeciw zmiennej części VlsE. Białko VlsE podlega ekspresji pod wpływem reakcji immunologicznych gospodarza-kręgowca [17]. Utrata plazmidu 28-1 wiąże się z utratą zjadliwości krętków [1].

11. Rozwój odpowiedzi immunologicznej w zakażeniu *B. burgdorferi*

Rozwój odpowiedzi immunologicznej w zakażeniu *B. burgdorferi* przebiega w kilku etapach. Pierwszy etap, w którym nie wykrywa się swoistych przeciw-

ciał, trwa około trzech tygodni od momentu zakażenia. W tym czasie funkcjonują wrodzone nieswoiste mechanizmy obrony polegające na działaniu komórek żernych (makrofagów, granulocytów), lizozymu, interferonu, układu dopełniacza komórek cytotoksycznych. W drugim etapie rozwija się odpowiedź nabyta, czyli następuje rozpoznanie obcych antygenów i przygotowanie do rozpoczęcia pełnej swoistej odpowiedzi immunologicznej. Powstają zarówno limfocyty B produkujące swoiste przeciwciała, jak i limfocyty T z receptorami wiążącymi obcy antygen. Etap ten ma wielkie znaczenie dla rozwoju pełnej i prawidłowej odpowiedzi immunologicznej [13]. Głównym elementem patogenezy przewlekłego stanu zapalnego jest więc gromadzenie się w tkance okołonaczyniowej nacieku, składającego się z monocytów, makrofagów i limfocytów. Fagocytujące komórki uwalniają cytokiny prozapalne, przede wszystkim interleukiny 1 i 6 oraz czynnik martwicy nowotworów (TNF- α), które są w głównej mierze odpowiedzialne za zgłaszane przez chorych objawy.

Z najnowszych doniesień wynika, że krętki posiadają nie tylko zdolność aktywowania metalopeptydaz i innych enzymów proteolitycznych organizmu gospodarza prowadząc do destrukcji zewnątrzkomórkowego macierzy, ale mogą także za pośrednictwem produkowanych przez siebie białek błonowych, tzw. Erp, w istotny sposób wpływać na działanie dopełniacza. Białka Erp aktywują bowiem inhibitor H dopełniacza przez co hamują jego kaskadę, czyniąc krętki odpornymi na mechanizmy niszczące komplementu [11, 12]. Białka CRASP-1 wiążące dopełniacz oraz OspE/F (Erp) wiążące czynnik H regulujący czynność układu dopełniacza powodują jego zahamowanie, następnie dochodzi do indukcji cytokin przeciwzapalnych IL-10 i zahamowanie cytokin prozapalnych [10].

12. Reakcje autoimmunologiczne

W postaciach, w których obecne są nieaktywne krętki (postacie atypowe, latentne) lub fragmenty zdegradowanych krętków, istotną rolę odgrywają antygeny, stanowiące nadal cel dla układu immunologicznego. Powodują zarówno powstanie kompleksów immunologicznych, miejscowe zapalenie naczyń, miejscową produkcję cytokin, jak i stwarzają możliwość powstania molekularnej mimikry, sprzyjając przedłużaniu się procesu chorobowego [24]. Zjawisko mimikry molekularnej polega na strukturalnym podobieństwie determinantów antygenowych czynnika sprawczego (drobnoustrój) do epitopów niektórych białek gospodarza. Podobieństwo to inicjuje immunologiczną reakcję krzyżową, w wyniku której dochodzi do niszczenia zarówno czynnika sprawczego, jak

i komórek własnych organizmu mających podobne epitopy. Mechanizm mimikry molekularnej jest powszechnie uważany za wstęp do wielu procesów autoimmunizacyjnych. U *B. burgdorferi* zachodzi wytwarzanie przeciwciał dla antygeny OspA, które wiążą się także z bardzo podobnymi epitopami białkowymi antygeny hLFA-1 (białka powierzchniowego limfocytów). Reakcje autoimmunologiczne w stawach są wynikiem reakcji krzyżowych między białkowymi epitopami OspA eksponowanymi na limfocytach T i antygenami hLFA-1 [16]. Konsekwencją powyższych reakcji było niepowodzenie przy produkcji szczepionki przeciwko boreliozie. W grudniu 1999 Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków dopuściła szczepionkę przeciwko boreliozie (LYMErix) produkcji GlaxoSmithKline opartą na białku powierzchniowym A (OspA) *B. burgdorferi*. Setki zaszczepionych osób zgłosiło autoimmunologiczne działanie niepożądane i został wniesiony pozew zbiorowy przeciwko GlaxoSmithKline. Prowadzone są badania nad drugą generacją tej szczepionki – wolnej od powyższych reakcji, ale wciąż dającej pełne działanie ochronne. Jednocześnie trwają prace nad szczepionką przeciwko kleszczom, która mogłaby zapobiec wszystkim chorobom przenoszonym przez kleszcze.

13. Podsumowanie

Podczas złożonego cyklu życiowego krętek *B. burgdorferi* musi rozpoznawać środowisko zewnętrzne i poruszać się w nim. Musi także przylegać i uwalniać się w różnych rodzajach tkanek oraz unikać strawienia w jelicie kleszcza. Krętki muszą też chronić się przed aktywnością układu odpornościowego zarówno kleszcza jak i ssaka. Większość genów i kodowane przez nie białka, których ekspresja zmienia się w zależności od czynników środowiskowych (temperatury, pH, różnych substancji odżywczych), zlokalizowane są na plazmidach. Wskazuje to, że plazmidy są ważnym magazynem genów odpowiedzialnych za przenoszenie zakażenia na gospodarza-ssaka. Organizm żywiciela nie jest w stanie wyeliminować czynnika chorobotwórczego ze względu na zdolność białek powierzchniowych w szczególności vlsE i OspC do modyfikacji sekwencji DNA. Prowadzone są intensywne badania naukowe nad wyjaśnieniem etiopatogenezy boreliozy z Lyme i opracowaniem skutecznej terapii tej choroby, nadal jednak istnieje bardzo wiele niewiadomych.

Piśmiennictwo

1. Carroll J.A., Garon C.F., Schwan T.G.: Effects of environmental pH on membrane proteins in *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* **67**, 3181–3187 (1999)

2. Chmielewski T., Tylewska-Wierzbanowska S.: Szczepionka przeciwko boreliozie z Lyme (w) Wakcynologia, red. Magdzik W., Naruszewicz-Lesiuk D., Zieliński A. α -medica press, Bielsko-Biała, 2005, s. 308

3. Cinco M., Murgia., Perticarari S., Presani G.: Surface receptors of neutrophils towards *B. burgdorferi*. *Wien. Klin. Wochenschr.* **110**, 866–869 (1998)

4. Coburn J.: Adhesion mechanism of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* **2**, 171–179 (2001)

5. Coburn J., Fischer J.R., Leong J.M.: Solving a sticky problem: new genetic approaches to host cell adhesion by the Lyme disease spirochete. *Mol. Microbiol.* **57**, 1182–1195 (2005)

6. Fischer J.R., Parveen N., Magoun L., Leong J.M.: Decorin-binding proteins A and B confer distinct mammalian cell type-specific attachment by *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 7307–7312 (2003)

7. Fraser C.M., Casjens S., Huang W.M. I wsp.: Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature*, **390**, 580–586, 1997 (praca jest dziełem 38 autorów)

8. Grimm D., Elias A.F., Tilly K., Rosa P.A.: Plasmid stability during *in vitro* propagation of *Borrelia burgdorferi* assessed at a clonal level. *Infect. Immun.* **71**, 3138–3145 (2003)

9. Gutkowski K., Hartleb M.: Pierwotna marskość żółciowa – dylematy etiopatogenetyczne. *Przegląd Gastroenterologiczny*, **3**, 125–130 (2008)

10. Hovius J.W.R., vanDam A.P., Fikrig E.: Tick-host-pathogen interactions in Lyme disease. *Science Direct, Trends in Parasitology*, **23**, 434–438 (2007)

11. Kajfasz P.: Borelioza. *Polski Przegląd Medycyny Lotniczej*, **12**, 379–384 (2006)

12. Lakwa K., Klimeczak M., Witecka-Knysz E., Zajkowska J., Pancewicz S., Kondrusik M., Grzegorzczuk S., Świerzbńska R., Hermanowska-Szpakowicz T.: Borelioza: dlaczego diagnostyka jest tak trudna? *Diagnosta Laboratoryjny*, **13**, 11–13 (2007)

13. Lawrens M.B., Wooten R.M., Morris S.J.: Effects of vlsE complementation on the infectivity of *Borrelia burgdorferi* lacking the linear plasmid lp-28. *Infect. Immun.* **72**, 6577–6585 (2004)

14. Liang F.T., Nelson F.K., Fikrig E.: Molecular adaptation of *Borrelia burgdorferi* in the murine host. *J. Exp. Med.* **196**, 275–280 (2002)

15. Ohnishi J., Schneider B., Messner W.B., Piesman J., de Silva A.M.: Genetic variation at the vlsE locus of *Borrelia burgdorferi* within ticks and mice over the course of single transmission cycle. *J. Bacteriol.* **185**, 4432–4441 (2003)

16. Pal U., Fikrig E.: Adaptation of *Borrelia burgdorferi* in the vector and vertebrate host. *Microb. Infect.* **5**, 659–666 (2003)

17. Schwan T., Piesman J., Golde W.T., Dolan M.C., Rosa P.A.: Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 2909–2913 (1995)

18. Singh S.K., Girschick H.J.: Molecular survival strategies of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Lancet. Infect. Dis.* **9**, 575–83 (2004)

19. Steere A.C., Coburn J., Glickstein L.: The emergency of Lyme disease. *J. Clin. Invest.* **113**, 1093–1101 (2004)

20. Stevenson B., El-Hage N., Hines M.A., Miller J.C. Babb K.: Differential binding of host complement inhibitor factor H by *Borrelia burgdorferi* Erp surface proteins: a possible

- mechanism underlying the expansive host range of Lyme disease spirochetes. *Infect. Immun.* **70**, 491–497 (2002)
21. Terekhova D., Iyer R., Wormser G.P., Schwartz I.: Comparative genome hybridization reveals substantial variation among clinical isolates of *Borrelia burgdorferi sensu stricto* with different pathogenic properties. *J. Bacteriol.* **188**, 6124–6134 (2006)
 22. Vukadinov J., Sević S., Canak G., Madle-Smardzija N., Turkulov V., Dober R.: Lyme disease – new findings on its physiopathology, diagnosis, therapy and prevention. *Medicinski Pregled.* **55**, 207 (2002)
 23. Zygnier W., Wędrychowicz H.: Biologia kleszczy właściwych jako wektora chorób zakaźnych i pasożytniczych. *Post. Mikrobiol.* **47**, 293–297 (2008)
 24. Lyme disease microbiology, from *Wikipedia, the free encyclopedia*, http://en.wikipedia.org/wiki/Lyme_disease_microbiology (21 stycznia 2010 roku, data ostatniego sprawdzenia adresu)
 25. Zajkowska J.M., Pancewicz S.A.: Wybrane aspekty patogeny i diagnostyki boreliozy. *Pol. Prz. Neurol.* **3**, **2**, 166–122 (2007)
 26. Chu C.-Y., Liu W., Jiang B.-G. i wsp.: Novel genospecies of *Borrelia burgdorferi sensu lato* from rodents and ticks in southwestern China. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 3130–3133 (2008) (praca jest dziełem 11 autorów)
 27. Rauter C., Hartung T.: Prevalence of *Borrelia burgdorferi sensu lato* genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe: a metaanalysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 7203–7216 (2005)
 28. Ristanovic E.S., Kitamura K., Masuzawa T. i wsp.: Molecular characterization of *Borrelia burgdorferi sensu lato* strains isolated in the area of Belgrade, Serbia. *Brazil. J. Microbiol.* **38**, 14–16 (2007)
 29. Pollack R.J., Telford III S.R., Spielman A.: Standardization of Medium for Culturing Lyme Disease Spirochetes. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 1251–1255 (1993)