

Ewa Furmańczyk¹, Mirosława Włodarczyk^{1*}

¹Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego
ul. I. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

Wpłynęło w lipcu 2011 r.

1. Wprowadzenie. 2. Genomy prokariotyczne. 3. *Borrelia burgdorferi* – ogólna charakterystyka. 4. Genom *Borrelia burgdorferi*. 4.1. Chromosom. 4.2. Plazmidy. 4.2.1. Plazmid cp26. 4.2.2. Rodzina plazmidów cp32. 4.2.3. Plazmid lp56. 4.2.4. Plazmid lp54. 4.2.5. Plazmid lp36. 4.2.6. Plazmid lp25. 4.2.7. Plazmidy z grupy lp28. 4.2.8. Pozostałe replikony liniowe. 5. Pangenom *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. 6. *Borrelia burgdorferi* a inne gatunki *Borrelia*. 7. Ewolucja i współistnienie replikonów genomu *B. burgdorferi*. 8. Podsumowanie

Genome structure of *Borrelia burgdorferi*; genetic information in individual replicons

Abstract: *Borrelia burgdorferi* is an etiological agent of Lyme disease. Genome of this bacterium was sequenced in 1997. It contains of linear chromosome and at least 21 linear and circular plasmids. The chromosome appears to be very constant in gene order and content across the genus. Plasmids, which contain many paralogous sequences and pseudogenes, carry most of the genes that encode surface proteins that interact with *B. burgdorferi* hosts. Plasmid content varies among strains but one plasmid – cp26 is always present. It suggests that cp26 genes encode functions critical for survival. One of them is *resT* which is necessary for replication of linear structures including chromosome. This review presents short characteristic of these structures, their role in *B. burgdorferi* life cycle and their maintenance across different strains and the whole genus.

1. Introduction. 2. Prokaryotic genomes. 3. *Borrelia burgdorferi* – general information. 4. Genome of *Borrelia burgdorferi* B31. 4.1. The chromosome. 4.2. Plasmids. 4.2.1. cp26 plasmid. 4.2.2. cp32 plasmid family. 4.2.3. lp56 plasmid. 4.2.4. lp54 plasmid. 4.2.5. lp36 plasmid. 4.2.6. lp25 plasmid. 4.2.7. lp28 plasmid group. 4.2.8. The other linear replicons. 5. Pangenome of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. 6. *Borrelia burgdorferi* against other *Borrelia* species. 7. Evolution and coexistence of different replicons of *B. burgdorferi* genome. 8. Summary

Słowa kluczowe: *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia*, chromosom, genom, plazmid

Key words: *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia*, chromosome, genome, plasmid

1. Wprowadzenie

Termin genom został po raz pierwszy użyty, jak podają Lederberg i McCray w artykule z *The Scientists* [44], przez Hansa Winklera w 1920 roku. Zaproponował go „for the haploid chromosome set, which, together with the pertinent protoplasm, specifies the material foundation of species”, co można swobodnie przetłumaczyć jako pojedynczy zestaw chromosomów, który, wraz z otaczającą go peryplazmą, stanowi o formie istnienia gatunku.

Obecnie genom definiuje się jako całość informacji genetycznej zapisanej w DNA organizmu odpowiedzialnej za jego strukturę i funkcjonowanie oraz przekazywanie cech potomnym pokoleniom. Nie jest poprawne nazywanie genomu kolekcją wszystkich genów organizmu, gdyż na kompletną informację genetyczną składają się nie tylko geny, ale także regiony niekodujące i niebędące częściami genów, lecz istotne dla regulacji ich funkcjonowania.

Tak sformułowana ogólna definicja stosuje się do genomów organizmów eukariotycznych i prokariotycznych

oraz wirusów, w których przypadku informacja genetyczna może być zawarta w DNA lub RNA. Mimo pełnienia jednakowej funkcji, strukturalna organizacja genomu organizmów eukariotycznych i prokariotycznych jest zdecydowanie odmienna.

2. Genomy prokariotyczne

W przypadku bakterii przez wiele lat panował pogląd, że cała informacja genetyczna komórki zawarta jest w jednym chromosomie, co prowadziło do uważania terminów chromosom i genom za synonimy.

Dogmat ten ustalony na podstawie klasycznych analiz mikroskopowych i genetycznych, oznaczeń fizykochemicznych, molekularnych, ale też potwierdzony wynikiem zakończonego w roku 1997 sekwencjonowania genomu pierwszego szczepu *Escherichia coli* głosił, że cała informacja genetyczna tej bakterii to zawarta w rejonie tzw. nukleoidu, pojedyncza dwuniciowa cząsteczka DNA w formie kowalentnie zamkniętego koła, zwana chromosomem bakteryjnym, a więc

* Autor korespondencyjny: Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, ul. I. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel. 22 5541406; e-mail: miraw@biol.uw.edu.pl

w dzisiejszym rozumieniu stanowiąca jego kompletny genom [7, 9, 11, 12, 40]. Chromosom *E. coli* składa się z około 4,6 Mbp co odpowiada DNA długości blisko 1,5 mm, z czego wynika konieczność odpowiedniej kondensacji – uporządkowanego upakowania w obszarze nukleoidu, które zapewnia wydajną replikację i segregację. Temu zagadnieniu poświęcane są dziesiątki prac poczynając od połowy ubiegłego wieku do dziś (przykłady: [43, 57, 64, 72, 74, 77]).

Chociaż *E. coli* była pierwszą bakterią, której projekt sekwencjonowania genomu został podjęty, przed jego ukończeniem w roku 1997 [7] poznano i opublikowano sekwencje nukleotydowe 5 innych genomów bakteryjnych (*Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Helicobacter pylori* i *Synechocystis* sp.). Wszystkie te genomy występowały w formie kolistych, pojedynczych chromosomów, co zgodne było z przekonaniem, że jest to forma typowa dla bakterii [28, 29, 36, 42, 73].

Jednak okazało się, że genom prokariotyczny może zawierać więcej niż jeden chromosom (pierwsze sygnały pochodziły z badań nad *Rhodobacter sphaeroides* z wykorzystaniem techniki PFGE) i nieś – oprócz chromosomu jeden lub więcej plazmidów (patrz praca przeglądowa [24]), a chromosom może oprócz „klasycznej” kolistej mieć formę liniową, co okazało się charakterystyczne dla rodzajów *Borrelia* i *Streptomyces*) [5, 26]. Okazało się także, że wielkość genomów prokariotycznych jest znacznie, choć mniej niż eukariotycznych, zróżnicowana [23, 75].

Ważne było też wykazanie, że różne szczepy należące do tego samego gatunku bakteryjnego znacząco różnią się pulą niesionych genów co doprowadziło do wprowadzenia przed kilku laty dodatkowego pojęcia: pangenu (pan-genome) [47, 56, 63, 70, 71]. Pangenom to suma informacji genetycznej wspólnej dla wszystkich reprezentantów gatunku (core genome – konserwowany rdzeń genomu) oraz informacji uzupełniającej, specyficznej tylko dla konkretnych szczepów (dispensable genome – genom niosący geny dodatkowe w tym charakterystyczne dla gatunku). Pierwsza analiza typu pangenu przeprowadzona została dla gatunku *Streptococcus agalactiae* [70]. Z reguły mamy do czynienia z tzw. pangenuami otwartymi, gdyż poznanie sekwencji nukleotydowej kolejnego szczepu z danego gatunku może do znanego już zestawu genów dostarczyć kolejne.

Postępy genomiki, zwłaszcza osiągnięcia ostatniej dekady, pozwoliły zweryfikować dogmat dotyczący struktury genomu prokariotycznego, który ukształtował się na podstawie analizy genetycznej *E. coli*. Te ogólne problemy dotyczące genomów prokariotycznych zostały bardzo pogładowo omówione i doskonale zilustrowane w artykule Dziewita i Bartosika [23] nie jest więc celowe przywoływanie szczegółowych danych

z tego zakresu. Autorzy zasygnalizowali, że spośród genomów złożonych z wielu replikonów najbardziej skomplikowaną organizację strukturalną ma genom gatunku *Borrelia burgdorferi* i on właśnie będzie przedmiotem naszego opisu.

3. *Borrelia burgdorferi* – ogólna charakterystyka

Borrelia burgdorferi została po raz pierwszy wyizolowana z ciała kleszcza (rodzaj *Ixodes*) w roku 1982 i uznana za czynnik etiologiczny jednostki chorobowej zwanej boreliozą lub chorobą z Lyme znanej od roku 1975 [52].

Bakteria ta bytuje w jelicie kleszcza, skąd poprzez układ krwionośny może przemieszczać się do innych tkanek, organów, m.in. ślinianek. Ssaki, łącznie z człowiekiem, ulegają zakażeniu w wyniku przedostania się śliny lub wymiocin zakażonego kleszcza przez barierę skórną podczas ukąszenia. Borelioza z Lyme to choroba przewlekła, układowa, charakteryzująca się objawami skórnymi (rumień wędrujący), neurologicznymi, kardiologicznymi czy stawowymi. Obraz kliniczny choroby jest bardzo zróżnicowany, a w przebiegu choroby można wyróżnić kilka etapów [46, 51].

B. burgdorferi to gatunek reprezentujący rodzinę *Spirochaetales* w obrębie rzędu *Spirochaetales*. Pod względem morfologicznym jest to krętek o dość długich (15–20 µm) i cienkich (0,2–0,3 µm) komórkach. Komórki są ruchliwe, posiadające tzw. rzęski peryplazmatyczne, zakotwiczone w biegunach komórki, które poruszając się w przestrzeni peryplazmatycznej w przeciwnych kierunkach wprawiają komórkę w ruch obrotowy [50]. Ze względu na dwuwarstwowość osłon komórkowych krętki te bywają zaliczane do bakterii gramujemnych, co jednak nie jest słuszne z uwagi na znaczące różnice w architekturze błony zewnętrznej (np. bardzo nieliczne białka transbłonowe) i jej składzie chemicznym (np. brak fosfodwutyloaminy i lipopolisacharydu, obecność licznych glikolipidowych antygenów, których jednocukrowym składnikiem jest galaktoza) [6].

Bakterie te żyją w różnych okresach swego cyklu życiowego jako pasożyty zewnątrz lub wewnątrz komórkowe, można je także hodować *in vitro*, lecz ich wymagania pokarmowe w podłożu hodowlanym są bardzo złożone, a czas generacji wydłużony. Złożone wymagania pokarmowe wynikają z ich ograniczonego „wyposażenia enzymatycznego”. Okazało się, że dla *B. burgdorferi* głównym źródłem energii jest glukoza [30] lecz końcowym produktem jej przemian jest kwas mlekowy, gdyż bakteria ta nie dysponuje enzymami cyklu Krebsa oraz oksydacyjnej fosforylacji. Nieobecne są także liczne enzymy związane z biosyntezą aminokwasów, kwasów tłuszczowych, nukleotydów i wielu kofaktorów reakcji enzymatycznych [30]. Te i inne obserwacje bioche-

miczne potwierdzone zostały po określeniu sekwencji nukleotydowej genomu, lecz omawianie ich wykracza poza zaplanowane ramy opracowania.

4. Genom *Borrelia burgdorferi*

Pierwsze obserwacje struktury materiału genetycznego czynnika etiologicznego boreliozy z Lyme pochodziły z analiz elektroforetycznych prowadzonych różnymi technikami. Dzięki nim dowiedziono (z wykorzystaniem PFGE) obecność w komórce dwuniciowej liniowej cząsteczki DNA o wielkości 900 kpz, którą utożsamiono z chromosomem bakteryjnym. Dalsze analizy potwierdzały unikalność organizacji materiału genetycznego *B. burgdorferi*. Już w tych wczesnych badaniach zaobserwowano obecność kilku liniowych i kolistych plazmidów [1, 4, 26], a niektóre eksperymenty dowodziły, że liniowe plazmidy *B. burgdorferi* mają kowalencyjnie zamknięte końce [2].

Sekwencję nukleotydów w genomie *B. burgdorferi* B31 określono w 1997 roku. Okazało się, że genom ten składa się z liniowego chromosomu o długości 910 725 pz i nie mniej niż 17 liniowych i kolistych plazmidów, których długość w sumie przekraczała 533 000 pz, co razem dawało ponad 1,4 Mpz. Jednocześnie pojawiła się hipoteza, że szczep poddany sekwencjonowaniu mógł w wyniku pasażowania utracić trzy plazmidy. Wnioski takie wyciągnięto przez porównanie z innymi izolatami tego szczepu [30]. W 2000 roku Casjens ze współpracownikami [16] dokonał powtórnej analizy genomu tej bakterii, w wyniku której uzyskano sekwencję liniowego chromosomu, dwunastu liniowych oraz dziewięciu kolistych plazmidów (szczegóły w tabeli I).

4.1. Chromosom

Chromosom *B. burgdorferi* stanowi liniowy replikon o zamkniętych końcach typu struktury spinki do włosów. Na jego końcach występują krótkie odwrócone powtórzenia [15]. Dokładnej analizie sekwencji genomu Fraser i wsp. [30] poświęcili osobny artykuł „Genomic sequence of a Lyme disease spirochaetes, *Borrelia burgdorferi*”, z którego pochodzi większość informacji zawarta w tym rozdziale.

Chromosom zawiera 851 potencjalnych otwartych ramek odczytu [91]. W chwili obecnej 59% z nich ma przypisaną określoną funkcję, 12% wykazuje homologię z białkami innych bakterii o niepoznanej dotąd funkcji. Pozostałe 29% to zupełnie nowe niespotykane w innych bakteriach geny. Najprawdopodobniej są one związane z wirulencją *B. burgdorferi*. Replikon ten zawiera 23 geny strukturalnych RNA. Pomimo dość niskiej zawartości par GC (28,6%) w sekwencji nukleotydowej występują

Tabela I
Zestawienie replikonów wchodzących w skład genomu *B. burgdorferi* (na podstawie: [14])

Replikon	Struktura	Wielkość w pz	Udział par GC (%)
Chromosom	liniowa	910 725	28,6
cp9	kolista	9 386	23,9
cp26	kolista	26 498	26,5
cp32-1	kolista	30 750	29,4
cp32-3	kolista	30 223	28,9
cp32-4	kolista	30 299	29,3
cp32-6	kolista	29 838	29,3
cp32-7	kolista	30 800	29,1
cp32-8	kolista	30 885	29,1
cp32-9	kolista	30 651	29,3
lp5	liniowa	5 228	23,8
lp17	liniowa	16 928	23,1
lp21	liniowa	18 901	20,7
lp25	liniowa	24 177	23,4
lp28-1	liniowa	28 250	32,3
lp28-2	liniowa	29 766	31,6
lp28-3	liniowa	28 601	25,0
lp28-4	liniowa	27 323	24,5
lp36	liniowa	36 849	26,9
lp38	liniowa	38 829	26,1
lp54	liniowa	53 541	28,2
lp56	liniowa	52 971	27,3

Nazwy poszczególnych plazmidów zostały utworzone od skrótów nazw angielskich charakteryzujących strukturę plazmidu oraz od przybliżonej wielkości poszczególnych replikonów, podanych w kpz, a ustalonych na podstawie analiz elektroforetycznych.

cp – skrót od ang. circular plasmid

lp – skrót od ang. linear plasmid

wszystkie kodony. W wypadku gdy jeden aminokwas jest określony przez więcej niż jeden kodon obserwuje się częstsze użycie odpowiednika bogatego w pary AU.

Doświadczenia wykonane przez Picardeau i wsp. [17, 58] dowiodły, że replikacja chromosomu *B. burgdorferi* ma charakter dwukierunkowy symetryczny, nie doprowadziły jednak do poznania szczegółowego mechanizmu. Udało się jedynie ustalić z pewnym przybliżeniem miejsce rozpoczęcia replikacji. Znajduje się ono mniej więcej w połowie długości chromosomu (458 kpz), najprawdopodobniej w obszarze o wielkości 240 pz, pomiędzy genami *dnaA* i *dnaN*. W miejscu tym obserwuje się zmianę polaryzacji nici oraz sekwencje, do których mogłoby się wiązać białko regulatorowe DnaA, co wydaje się być charakterystyczne dla obszaru inicjacji replikacji [34, 58]. Istnieją dwa hipotetyczne modele, według których mogłoby zachodzić powielanie liniowego chromosomu. Obydwa opierają się na założeniu istnienia dwuniciowej, kolistej formy pośredniej, różnią

się jednak mechanizmem jej powstania. Niezależnie od przyjętego modelu, efekt replikacji w obydwu przypadkach jest identyczny [13, 69].

Zauważono, że prawy telomer chromosomu wykazuje pewne podobieństwo do sekwencji plazmidów liniowych (lp17 i lp28-3), jest więc możliwe, że w przeszłości doszło do zjawiska wymiany telomerów pomiędzy tymi replikonami.

W chromosomie *B. burgdorferi* wyróżniono trzy ORFy (*dnaE*, *dnaN*, *dnaX*) charakteryzujące się dużą homologią do czterech (odpowiednio: α , β , γ , τ) z dziesięciu polipeptydów tworzących polimerazę III DNA u *E. coli*. Wskazuje to na zredukowaną liczbę genów biorących udział w procesie replikacji. Poza tym odnotowano obecność genów kodujących: helikazę (*dnaB*), prymazę (*dnaG*), polimerazę I DNA (*polA*) i białko DnaA. *B. burgdorferi* posiada też geny topoizomeraz: jedną typu I (*topA*) oraz dwie typu II (gyrazę i topoizomerazę IV). Ich obecność w genomie bakterii o liniowym chromosomie wydaje się dziwna. Być może biorą one udział w replikacji chromosomu, w którym występują koliste formy przejściowe wymagające rozdziału. Prawdopodobnie mogą także uczestniczyć we wprowadzaniu pojedynczych nacięć podczas tego procesu. W chromosomie *B. burgdorferi* kodowanych jest szereg enzymów oraz białek, które mogą brać udział w procesach naprawy DNA m.in. polimeraza I, ligaza, endonukleaza III, kompleks białek endonukleazy UvrABC, helikaza (UvrD), MutL, MutS (brak trzeciego z białek (MutH), które bierze udział w odróżnianiu nici matrycowej od nowo zsyntetyzowanej wynika z nieobecności genu kodującego metylazę Dam).

B. burgdorferi jest zdolna do rekombinacji homologicznej, czego dowodem jest obecność dużego zestawu genów umożliwiających ten proces (*recA*, *recBCD*, *recG*, *recJ*, *sbcC*, *sbcD* oraz *ruvAB*). W chromosomie nie zidentyfikowano genu *lexA*, tak więc u tej bakterii najprawdopodobniej nie funkcjonuje typowy system SOS. Analiza replikonu wykazała obecność genów kodujących wszystkie trzy podjednostki rdzenia polimerazy RNA (α , β oraz β'), a także trzech czynników σ : σ^{70} stanowiącego czynnik podstawowy u *E. coli* oraz σ^{54} i σ^{38} . Zaobserwowano także obecność genów: *nusA*, *nusB*, *nusG* oraz *rho* regulujących proces terminacji transkrypcji.

Geny rRNA u *B. burgdorferi* są zablokowane w operon umiejscowiony pomiędzy 434 000 pz a 447 000 pz. Cechami unikatowymi dla tej bakterii są tandemiczne powtórzenia zestawu genów dla 23S rRNA i 5S rRNA oraz ich oddzielenie od genu dla 16S rRNA odcinkiem o długości 22 pz. Porządek ten wydaje się być konserwowany u innych gatunków z rodzaju *Borrelia* [54]. W skład operonu wchodzi także geny kodujące tRNA dla alaniny i izoleucyny. Wszystkie jednostki za wyjątkiem tRNA dla izoleucyny są transkrybowane w tym samym kierunku. W skład operonu wchodzi ponadto

cztery niespokrewnione geny. Jeden z nich koduje glikozylazę 3-metyloadeniny, drugi zawiera prawdopodobnie sekwencje charakterystyczne dla białek będących hydro-lazami, a funkcje pozostałych są nieznane.

W chromosomie odnotowano obecność 31 tRNA ze specyficznością dla wszystkich aminokwasów. Są one zorganizowane w siedem zgrupowań i 13 pojedynczych genów. Zidentyfikowano też wszystkie syntetazy tRNA prócz syntetazy glutaminylo-tRNA. Obecny jest natomiast enzym, który umożliwia przekształcenie tRNA^{Glu} w tRNA^{Gln} w wyniku reakcji transamidacji. Badania wykazały, że syntetaza lizylo-tRNA *B. burgdorferi* zalicza się do pierwszego typu tych enzymów, który jest charakterystyczny dla *Archaea*, nie stwierdzono natomiast obecności syntetazy lizylo-tRNA typu II właściwej bakteriom i organizmom eukariotycznym [38].

Analiza chromosomu nie wykazała obecności enzymów cyklu kwasu cytrynowego oraz genów łańcucha oddechowego. Pozwala to sądzić, że pirogronian powstały w wyniku przemian katabolicznych glukozy ulega dalszym przekształceniom w wyniku fermentacji, co potwierdza odnalezienie genu dehydrogenazy mleczanowej (*ldh*) oraz kinazy octanowej (*ackA*). Pozostaje to w zgodzie z mikroaerofilną naturą bakterii. Zidentyfikowano geny szlaku pentozofosforanowego. Jest on źródłem siły redukującej. Stwierdzono także obecność enzymów pozwalających na włączenie innych cukrów: glicerolu, fruktozy, maltozy i glukozoaminy w cykl glikolizy. Potencjał błonowy u *B. burgdorferi* jest utrzymywany przez syntetazę ATP, która przeprowadza reakcję w przeciwnym kierunku i działa tu jako ATPaza. Geny kodujące syntetazę ATP są częścią siedmioskładnikowego operonu. Wykazują one większe podobieństwo do odpowiedników występujących u *Eukaryota* oraz należących do *Archaea* niż do sekwencji bakteryjnych.

W chromosomie obecne są geny kodujące enzymy umożliwiające przemiany kwasów tłuszczowych, jednak nie zaobserwowano enzymów odpowiedzialnych za wydłużanie kwasów tłuszczowych. Obecne są też geny warunkujące cykl przemian prowadzący do uzyskania aktywowanej jednostki izoprenu, a także geny kodujące enzymy związane z syntezą i przemianami nukleozydotrifosforanów.

B. burgdorferi nie posiada enzymów umożliwiających syntezę N-acetyloglukozoaminy, która jest składnikiem ściany komórkowej. Jej dodatek do pożywki jest więc wymagany dla wzrostu bakterii [3]. W chromosomie znajdują się natomiast geny warunkujące rozkład chityny, która jest polimerem N-acetyloglukozoaminy, a zarazem składnikiem kutykuli kleszcza będącego gospodarzem *B. burgdorferi*. Wydaje się prawdopodobne, że chityna może być źródłem węgla i energii dla bakterii podczas przebywania w ciele kleszcza.

W chromosomie znajduje się 46 otwartych ramek odczytu kodujących białka wiążące oraz transportujące,

odpowiadające 16 transporterom błonowym. Ta stosunkowo mała ilość przENOŚNIKÓW jest kompensowana przez ich szeroką specyficznOŚĆ substratowĄ. Wyróżniono wśród nich permeazy, transportery typu ABC, system translokacji grupowej i pompę oporności wielolekowej. Nie zaobserwowano systemów transportujących kwasy tłuszczowe, NAD/NADH czy nukleotydy jednak wydaje się, że powinny być one obecne. Być może odbiegają one sekwencją od już znanych przENOŚNIKÓW. Transport glukozy, fruktozy i dwucukrów najprawdopodobniej odbywa się za pośrednictwem systemu fosfotransferazowego. Ryboza, galaktoza i oligopeptydy są z kolei najpewniej transportowane do wnętrza komórki poprzez transportery typu ABC.

W chromosomie odnotowano obecność 54 genów odpowiedzialnych za zdolność ruchu oraz chemotaksję. Są one zablokowane w osiem operonów liczących od 2 do 25 genów. Ruchliwość oraz zdolność jej modulacji pod wpływem czynników zewnętrznych jest cechą niezwykle ważną dla *B. burgdorferi* – geny te stanowią aż 6% całego chromosomu. Nie jest to zaskakujące jeżeli wziąć pod uwagę tryb życia bakterii i budowę aparatu ruchu. Analiza wykazała, że w chromosomie znajduje się kilka kopii genów biorących udział w chemotaksji (*cheR*, *cheW*, *cheA*, *cheY* i *cheB*). Być może jest to związane z różnym stopniem ekspresji tych genów w zależności od warunków środowiska. Istnieje także hipoteza, która dopuszcza, że rzęski na każdym biegunie komórki podlegają regulacji za pomocą innych produktów ekspresji genów *che*.

Istotnym elementem kodowanym w chromosomie są białka powierzchniowe. Okazało się, że w przypadku *B. burgdorferi* prawie wszystkie zidentyfikowane dotąd tego typu białka należą do klasy lipoprotein i stanowią ponad 8% sekwencji kodującej chromosomu. Odnotowano natomiast obecność tylko dwóch z trzech enzymów koniecznych do powstania lipoproteiny z białka zsyntetyzowanego w wyniku translacji. Inne doświadczenia sugerują jednak obecność kompletu enzymów, być może trzeci z nich (*lnt*) odznacza się zbyt niskim podobieństwem sekwencji do obecnie znanych homologów. *B. burgdorferi* zawiera zestaw genów, których produkty umożliwiają transport lipoprotein przez błonę wewnętrzną. Jest to system sekrecji homologiczny do systemu z *E. coli*.

Pomimo obserwacji sugerujących, że ekspresja genów *B. burgdorferi* zależy od wielu różnych czynników, nie udało się zidentyfikować wielu typowych systemów regulacji. Co prawda odnotowano obecność homologów białek szoku cieplnego (*groES*, *groEL*, *grpE*, *dnaJ*, *hslV*, *dnaK*, i *htpG*), jednak nie odnaleziono właściwego im czynnika σ , który kontroluje ten proces u *E. coli*. Nie wiadomo więc do końca w jaki sposób odbywa się ta regulacja. W chromosomie obecne są też geny, których produkty biorą udział w modulacji odpowiedzi na dro-

dze układu dwuskładnikowego. Z analiz tych wynika, że systemy regulacyjne u *B. burgdorferi* znacznie odbiegają od dotąd poznanych.

4.2. Plazmidy

Na zsekwencjonowany genom *B. burgdorferi* B31 składa się prócz liniowego chromosomu 9 kolistych i 12 liniowych plazmidów. Replikony te zawierają w sumie 782 otwarte ramki odczytu, a średni udział sekwencji kodujących waha się od 30% do 92%. Inne izolaty odznaczają się podobnym, acz nie identycznym, zestawem replikonów. Analizy pokazują, że mogą one nieść co najmniej trzy dodatkowe plazmidy [14, 65].

Wcześniejsze doświadczenia badające strukturę plazmidów wykazały, że replikony liniowe u *B. burgdorferi* odznaczają się dużą komplementarnością zasad wzdłuż sekwencji oraz posiadają kowalencyjnie zamknięte końce [2]. Badania molekularne wykazały duże podobieństwo kilku plazmidów. Na ich podstawie wyróżniono rodzinę cp32 oraz rodzinę lp28. Wiele podobieństw pomiędzy innymi pozachromosomowymi replikonami jest zapewne wynikiem tasowania materiału genetycznego. Plazmidy liniowe wykazują dużo większy potencjał rekombinacyjny o czym świadczy ich niezwykle podobieństwo. Analizy sugerują, że wiele replikonów liniowych powstało na skutek duplikacji i rearanżacji przypadkowych sekwencji. Dowodzi tego ogromna liczba genów tworząca rodziny paralogiczne [14, 16]. Analizy molekularne znanych sekwencji telomerów struktur liniowych wykazały duże podobieństwo zarówno pomiędzy plazmidami oraz plazmidami i chromosomem. Wyróżniono siedem grup podobieństw. Zauważono, że tylko prawy koniec plazmidu lp54 nie wykazuje podobieństwa do żadnej innej sekwencji. Tak duża zgodność telomerów może być wynikiem licznych rearanżacji pomiędzy fragmentami plazmidów. Istnieje hipoteza według której prawy koniec chromosomu miały pochodzić z któregoś z plazmidów [16]. Zauważono również podobieństwo telomerów plazmidów liniowych do sekwencji poxwirusów [37].

4.2.1. Plazmid cp26

Replikon cp26 to jedyny plazmid, którego utraty nigdy nie zaobserwowano. Liczy on 26 498 pz, zawiera 29 ORFów, a ponieważ jest obecny we wszystkich izolatach przypuszczano, że zawiera w swojej sekwencji geny niezbędne dla funkcjonowania *B. burgdorferi*. Doświadczenia prowadzone przez Byram i współpracowników [10] wytypowały gen *resT* kodujący resolwazę telomerów, która wydaje się być konieczna dla prawidłowej replikacji chromosomu bakteryjnego oraz innych liniowych replikonów *B. burgdorferi*. Prawdopodobnie *resT* nie jest jedynym genem niezbędnym do funkcjonowania

tej bakterii obecnym na plazmidzie cp26. Dotychczas udało się przypisać funkcję do 15 ORFów obecnych w cp26. Zidentyfikowano zespół genów (*BBB10*, *BBB11*, *BBB12*, *BBB13*) odpowiedzialnych za utrzymanie plazmidu w komórce. Wykazano obecność genów kodujących: hipotetyczny transporter chitobiozy (*BBB04*, *BBB05*, *BBB06*), guaniny czy ksantyny (*BBB22*, *BBB23*), element permeazy oligopeptydów (*BBB16*), a także element systemu fosfotransferazowego (*BBB29*) [10]. Z istotnych genów wirulencji obecnych na replikonie cp26 należy wymienić gen *ospC* kodujący lipoproteinę powierzchniową. Ekspresja tego białka wzrasta znacząco w przypadku kiedy kleszcz, w ciele którego znajduje się *B. burgdorferi*, odżywia się krwią, a temperatura otoczenia osiągnie 32–37°C [66]. Wykazano, że białko to jest niezbędne do zainfekowania myszy [35].

4.2.2. Rodzina cp32

Rodzina cp32 składa się z 13 kolistych replikonów, jednak w zsekwencjonowanym szczepie B31 jest ona reprezentowana tylko przez 7 plazmidów. Ich wielkość waha się w granicach od 29 838 pz do 30 885 pz. Zawierają od 38 do 45 ORFów, co stanowi średnio 92% ich całej sekwencji. Replikony wykazują homologię względem siebie prawie wzdłuż całej swej długości. Wyróżniono trzy regiony gdzie obserwuje się większą różnorodność sekwencji. Znajdują się one w obszarach: 17 kpz, 22 kpz oraz 27 kpz, co odpowiada kolejno: genowi *mlp* (kodującemu lipoproteinę), prawdopodobnemu zestawowi genów związanemu z segregacją plazmidów potomnych oraz genowi *erp*, również kodującemu lipoproteinę [16].

Występowanie zróżnicowania wśród tych genów warunkuje różnorodność, a zarazem zmienność białek istotnych dla cyklu życiowego *B. burgdorferi*. Ekspresja lipoprotein powierzchniowych Erp wzrasta w czasie infekowania gospodarza ssaczego. Ich funkcją jest wiązanie czynnika H, znajdującego się w surowicy gospodarza, podczas aktywacji dopełniacza na drodze alternatywnej. Wiązanie czynnika H przez białko Erp nie pozwala na rozpoznanie bakterii jako obcej komórki i chroni ją tym samym przed odpowiedzią układu immunologicznego [67].

Współistnienie wielu wariantów lipoprotein kodowanych na plazmidach z rodziny cp32 jest możliwe zapewne dzięki istnieniu niewielkich różnic w genach odpowiedzialnych za utrzymanie replikonu w komórce.

Mimo tak wielu podobieństw pomiędzy poszczególnymi członkami rodziny cp32 istnieją też geny specyficzne tylko dla części z nich. Do takich przypadków należą m.in. geny *bdr* czy *rev* [16]. Gen *revA* koduje białko powierzchniowe wiążące fibronektynę [8], natomiast produktem genu *bdr* jest białko o niepoznanej

dotąd funkcji, sugeruje się jednak, że nie jest ono prezentowane na powierzchni komórki bakteryjnej [80].

Do innych znanych genów obecnych na plazmidach z rodziny cp32 należą m.in. geny *blyAB* kodujące cholinę lub system cholinowy pochodzenia bakteriofagowego [20].

Istnieje hipoteza, według której rodzina cp32 powstała wskutek zjawiska rekombinacji. Wyróżniono cztery typy plazmidów cp32, odmienne względem siebie w dwóch rejonach znajdujących się w obszarze 2–5 kpz oraz około 17 kpz. W każdym z tych dwóch miejsc istnieją dwa warianty sekwencji. Najprostszym zjawiskiem tłumaczącym istnienie wspomnianych już czterech typów byłaby rekombinacja.

Sugeruje się, że plazmidy z rodziny cp32 mogą być profagami ϕ BB-1. Przemawia za tym fakt konserwowania ułożenia genów oraz podobna wielkość wszystkich plazmidów z grupy cp32. Analizy molekularne sugerują obecność operonu związanego z cyklem litycznym. Jednak stan obecnej wiedzy nie pozwala jednoznacznie ustosunkować się do tej hipotezy [25].

Z rodziną cp32 zdają się być związane trzy plazmidy: cp9, lp54 oraz lp56). Plazmid cp9 powstał najprawdopodobniej w wyniku delecji fragmentu o długości około 21 kpz z plazmidu cp32 posiadającego gen *rev*, gdyż jego obecność odnotowano w tym plazmidzie. Ponadto doszło do kilku pojedynczych delecji, inwersji i wymian genowych. Replikon ten zawiera 11 otwartych ramek odczytu, z czego dwie mają przypisaną funkcję. Gen *epmA* koduje białko powierzchniowe [16]. W 2000 roku odkryto replikon podobnej wielkości oraz wykazujący pewne podobieństwo do plazmidu cp9. Plazmid ten zawiera inny allel genu *epmA*. Nadano mu nazwę cp9-2 oraz postulowano zmianę nazwy dla plazmidu z cp9 na cp9-1 [48].

Replikony lp56 i lp54 powstały w wyniku bardziej skomplikowanych zdarzeń. Odgrywają one też większą rolę w wirulencji *B. burgdorferi*, zostaną więc omówione oddzielnie.

4.2.3. Plazmid lp56

Plazmid lp56 zawiera w swojej sekwencji kopię plazmidu z rodziny cp32. Nie jest ona identyczna z żadną dotychczas poznaną, ale wykazuje pewne podobieństwo do replikonów cp32-4, cp32-6 czy cp32-9. Najprawdopodobniej doszło do otworzenia kolistej struktury cp32 i włączenia jej w sekwencję liniowego przodka lp56 tak, że obecnie lokuje się ona pomiędzy 6585 pz a 36 935 pz. Wydaje się, że zdarzenie to miało miejsce stosunkowo niedawno [16]. Miejsca integracji przodków lp56 wykazują się krótkim podobieństwem rzędu 2 pz. Sugeruje to, że zdarzenie to nie nastąpiło na drodze rekombinacji homologicznej. Brak wyraźnych odwróconych powtórzeń w obszarze integracji raczej wyklucza udział

integraz. Wydaje się, że w tym procesie nie pośredniczyły też transpozazy nie zauważono bowiem obecności terminalnych powtórzeń, które mogłyby być przez nie wygenerowane [14].

Replikon zawiera 82 ORFy, osiem pseudogenów. Wśród genów o przypisanej funkcji tylko cztery są charakterystyczne dla plazmidu lp56, pozostałe występują także na plazmidach z rodziny cp32. Gen *BBQ67* koduje metylotransferazę DNA wykazującą specyficzność do adeniny, która może stanowić składnik systemu restrykcyjnego. Odnotowano też obecność białka zewnątrz błonowego będącego produktem genu *BBQ03*, antygeny P35 (produkt *BBQ05*) oraz genu *BBQ08* związanego z utrzymaniem plazmidu w komórce [16].

4.2.4. Plazmid lp54

Ostatnim plazmidem wykazującym duże podobieństwo do rodziny cp32 jest replikon lp54. Zauważono, że składa się on z dziewięciu bloków wykazujących homologię do cp32. Są one ułożone w tej samej orientacji i kolejności na obu replikonach. Wydaje się, że również w tym przypadku doszło do rozerwania kolistej struktury cp32 i włączenia jej w sekwencję liniowego przodka. Obecność kilku zestawów genów rozdzielonych innymi sekwencjami świadczy o licznych późniejszych insercjach, co pozwala stwierdzić, że powstanie tego plazmidu jest starsze ewolucyjnie niż powstanie replikonu lp56.

Plazmid ten zawiera 76 otwartych ramek odczytu, z czego 26 ma swoje paralogi w rodzinie cp32. Interesujący wydaje się fakt, że lipoproteiny *Erp* i *Mlp* występujące w plazmidach cp32 zostały zastąpione w tym replikonie przez niehomologiczne lipoproteiny kodowane przez geny *dbpAB* oraz *ospAB* [16].

Analizy molekularne dowiodły, że plazmid lp54 zawiera najwięcej genów, których ekspresja jest warunkowana przez temperaturę otoczenia. Sugeruje to duży udział tego replikonu w modulacji cyklu życiowego *B. burgdorferi*. Zidentyfikowano na nim kilka genów istotnych zarówno dla przeżycia w ciele kleszcza jak i w stałocieplnym gospodarzu [55].

Do ważnych białek zapewniających powodzenie infekcji w wektorze, a kodowanych na lp54 należą białka *OspA* i *OspB*. Ich ekspresja podczas przebywania *B. burgdorferi* w ciele kleszcza utrzymuje się na wysokim poziomie. To lipoproteiny pełniące rolę adhezyn w jelicie kleszcza. Badania dowodzą, że uszkodzenie tych genów osłabia zdolności kolonizacyjne [78].

W infekcji gospodarza ssaczego biorą udział białka *DbpA* i *DbpB*, które także są adhezynami pośredniczącymi w wiązaniu się do włókien kolagenowych i komórek eukariotycznych [27].

Większość zidentyfikowanych genów koduje białka powierzchniowe i lipoproteiny. Odnotowano jednak

obecność kilku genów, których produkty mogą być istotne dla zdobywania substancji odżywczych przez *B. burgdorferi*. Przykładem może być transporter oligopeptydów typu ABC (*BBA34*) i poryna błony zewnętrznej (gen – *oms28*). Plazmid lp54 koduje też enzym odpowiedzialny za syntezę TMP (*thyX*) [30].

4.2.5. Plazmid lp36

Plazmid lp36 o długości 36 849 pz zawiera 54 otwarte ramki odczytu. Doświadczenia przeprowadzone w 2007 r. wykazały, że wprowadzenie, drogą iniekcji, bakterii pozbawionych tego replikonu nie jest w stanie wywołać infekcji u myszy. Brak plazmidu nie ma wpływu na przetrwanie w ciele kleszcza, lecz obniża stopień infekcyjności *B. burgdorferi* podczas przenoszenia bakterii z wektora na gospodarza. Sugeruje się, że jednym z genów za to odpowiedzialnych jest *adeC* kodujący deaminazę adeniny, enzymu związanego z odzyskiwaniem i metabolizmem adeniny [41]. Innym genem obecnym na replikonie lp36 istotnym w cyklu życiowym *B. burgdorferi* jest *BBK32* kodujący białko wiążące fibronektynę [59].

4.2.6. Plazmid lp25

Plazmid lp25 składa się z 24 177 pz i zawiera 32 otwarte ramki odczytu. Znamy potencjalną funkcję tylko kilku z nich. Najistotniejszym białkiem kodowanym na tym replikonie jest enzym potrzebny do syntezy NADu (*PncA*). Enzym ten jest wymagany do przeżycia w ciele myszy, nie jest natomiast konieczny do wzrostu *in vitro*. Zauważono jednak, że szczepy pozbawione plazmidu lp25 odznaczają się słabszym wzrostem oraz dużo mniejszym stopniem infekcyjności [60].

4.2.7. Plazmidy z grupy lp28

Do grupy replikonów określanych mianem lp28 zalicza się plazmidy, których wielkość waha się od 26 921 pz do 29 766 pz. Największym udziałem sekwencji kodujących odznacza się lp28-2 (86%). Pozostałe trzy plazmidy są prawdopodobnie w trakcie intensywnej ewolucji co odzwierciedla dużo mniejszy odsetek sekwencji kodujących [16].

Szczepy pozbawione lp28-1 są zdolne jedynie do krótkotrwałej infekcji myszy. Świadczy to o istotnym wpływie tego replikonu na wirulencję *B. burgdorferi*. Jest to prawdopodobnie związane z regionem *vlsE* składającym się z części podlegającej ekspresji oraz dwóch wyciszonych kaset *vls*. Regiony ciche rekombinują z *vlsE*, co pozwala na istnienie kilku wariantów białka *VlsE*. Proces ten ma miejsce tylko gdy bakteria znajduje się w ciele gospodarza stałocieplnego i pozwala uniknąć odpowiedzi układu immunologicznego. Obecność tego

regionu stwierdzono dotychczas u wszystkich patogen-nych *B. burgdorferi* [61]. Plazmid lp28-1 koduje ponadto lipoproteinę Erp.

Inne plazmidy z grupy lp28 nie są prawdopodobnie niezbędne dla przetrwania w ciele kleszcza lub myszy, jednak niosą geny dające potencjalną przewagę selekcyjną podczas wzrostu. Na przykład plazmid lp28-4 koduje pompę oporności wielolekowej (BBI26) i enzym biorący udział w przemianach adeniny (BBI06), a replikon lp28-3 zawiera gen, którego produktem jest poryna błony zewnętrznej (Oms28) [30].

Zauważono, że plazmid lp28-2 zawiera pełną kopię genu wykazującą podobieństwo do genu transpozazy, jednak nie jest on otoczony odwróconymi powtórzeniami. Powyżej tej sekwencji znajduje się potencjalne miejsce wiązania rybosomu, natomiast poniżej kodonu stop zidentyfikowano strukturę typu szpilki do włosów. Ta transpozaza może stanowić funkcjonalne białko umożliwiające tak duże rearanżacje w genomie *B. burgdorferi*. Sugeruje się, że lp28-2 koduje też helikazę DNA biorącą udział w replikacji [16].

4.2.8. Pozostałe replikony liniowe

Liniowy replikon o długości 5 228 pz (lp5) wykazuje dużą homologię do replikonu o wielkości 18 753 pz (lp21). Tylko jeden z 6 jego genów nie ma swojego odpowiednika na lp21. Wydaje się, że lp21 powstał na drodze integracji elementu o długości 12,8 kpz do lp5. Ten fragment charakteryzuje się obecnością regionu o wielkości 11 kpz złożonego z powtórzeń o długości 63 pz. Na razie nie udało się ustalić ich funkcji. Wiele genów obecnych na tych dwóch replikonach jest prawdopodobnie fragmentami innych genów obecnych na pozostałych plazmidach *B. burgdorferi*. Nie stwierdzono aby którykolwiek z tych replikonów był wymagany dla prawidłowego przebiegu cyklu życiowego bakterii.

Kolejnym stosunkowo mało poznanym plazmidem jest lp17. Liczy on 16 829 pz i zawiera 25 otwartych ramek odczytu. Na razie nie udało się poznać funkcji żadnej z nich [16]. Być może replikon ten nie jest niezbędny dla zajęcia prawidłowego cyklu życiowego bakterii.

Plazmid lp38 o długości 38 829 pz zawiera 52 otwarte ramki odczytu. Badania dowodzą, że nie jest on czynnikiem niezbędnym dla przetrwania w którymkolwiek gospodarzu, jednak jego obecność zwiększa poziom wirulencji *B. burgdorferi*. Na replikonie tym jest kodowana lipoproteina powierzchniowa – OspD [53]. Nie jest to jedyny gen w genomie kodujący białko o takich właściwościach. Jego obecność zwiększa więc jedynie różnorodność, co pozwala na efektywniejsze unikanie odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Obecny stan wiedzy sugeruje, że plazmid ten nie jest konieczny do wzrostu bakterii *in vivo*, jednak niesie geny mogące

dawać pewną przewagę selekcyjną, czego przykładem może być białko wiążące ATP będące składnikiem transportera typu ABC kodowane przez gen *BBJ26* [30].

5. Pangenom *Borrelia burgdorferi sensu stricto*

Po zsekwencjonowaniu genomu szczepu B31 rozpoczęła się era badań porównawczych, która ma na celu m.in. poznanie pangenomu *B. burgdorferi*, czyli zestawu wszystkich genów danego gatunku. Dotyczy ona zarówno składu genomu jak i poziomu ekspresji poszczególnych genów u różnych izolatów *B. burgdorferi* często różniących się poziomem infekcyjności. W 2003 roku Iyer ze współpracownikami [39] przeprowadził doświadczenie opierające się na zbadaniu obecności wszystkich plazmidów za wyjątkiem liniowych replikonów: lp5 i lp21 oraz kolistego plazmidu cp9 wśród 21 izolatów *B. burgdorferi*. Bakterie zostały wyizolowane od chorych na boreliozę z Lyme z próbki skóry pobranej na obrzeżu rumienia lub z próbki krwi. Wśród izolatów wyróżniono 5 par próbek pobranych z dwóch miejsc od tego samego chorego. Tylko w jednym przypadku zauważono zmianę profilu plazmidowego. Dotyczyła ona plazmidu cp32-8, jednak wydaje się, że nie ma ona wpływu na stopień infekcyjności gospodarza stałocieplnego. Badania te sugerują, że do najczęściej spontanicznie traconych replikonów należą plazmidy: lp56, lp38 oraz fragment lp28-1 (brak ich u około 33% przebadanych próbek). Jednak jedna trzecia prób odznacza się obecnością wszystkich plazmidów uwzględnionych w doświadczeniu.

Podobne doświadczenia, przeprowadzili już wcześniej w 2000 roku Purer i Norris [61]. Badali różnorodność 19 izolatów pod kątem występowania plazmidów poznanych podczas sekwencjonowania szczepu B31. Badania te sugerują istnienie korelacji pomiędzy obecnością plazmidów lp25 i lp28-1 a stopniem infekcyjności, jednak zależność ta w wypadku lp28-1 jest znacznie słabsza. Zauważono, że istnieje grupa replikonów, która jest obecna we wszystkich izolatach, bez względu na ich stopień infekcyjności oraz grupa plazmidów, której utrata nie jest w jakikolwiek sposób związana z obniżeniem stopnia infekcyjności.

Obecnie w bazie NCBI znajduje się 14 zdeponowanych sekwencji genomowych różnych szczepów *B. burgdorferi* [65]. Wszystkie one charakteryzują się obecnością liniowego chromosomu o długości od 887 933 pz do 1 019 864 pz oraz różnym zestawem kolistych i liniowych plazmidów (szczegóły w Tabeli II) (zaskakująca informacja o kolistej strukturze chromosomu *B. burgdorferi* ZS7 [90] została zweryfikowana poprzez kontakt e-mailowy z dr. Casjensem). Ogółem, badając pangenom *B. burgdorferi*, odkryto 38 plazmidów, 15 z nich ma charakter liniowy, a 23 kolisty. Istnieje grupa

pozachromosomowych replikonów, której obecność stwierdzono w każdym dotąd zsekwencjonowanym szczepie *B. burgdorferi*. Zalicza się tu plazmidy: lp17, lp36, lp54 i cp26. Należy zwrócić też uwagę na plazmid lp28-4, którego obecności nie zaobserwowano tylko w szczepie *B. burgdorferi* CA-11.2a. Okazuje się, że szczep ten posiada jednak replikon lp36-28-4 na którym może znajdować się część genów z plazmidu lp28-4. Można więc wysnuć hipotezę, że plazmid lp28-4 również należy do grupy replikonów niezbędnych dla funkcjonowania *B. burgdorferi*.

Badania nad pangenomem dowiodły, że w skład genomów poszczególnych szczepów *B. burgdorferi* wchodzi replikony podobnej wielkości jak te zsekwencjonowane w szczepie B31. Zidentyfikowano dwa nowe plazmidy – cp18 i cp18-2, powstałe najprawdopodobniej przez delecję fragmentu 14 kbp z plazmidu będącego przodkiem rodziny cp32, gdyż wykazują one duży stopień homologii do replikonów zaliczanych do tej rodziny [68]. Już w 1994 roku dokonano odkrycia i zsekwencjonowania małego kryptycznego plazmidu cp8.3 wyizolowanego ze szczepu *B. burgdorferi* Ip21. Replikon ten liczy 8 303 bp i jest niestabilny w warunkach *in vitro*. Jego cechą charakterystyczną jest obecność w sekwencji dwóch prawie identycznych, kopii odwróconych powtórzeń o długości 184 bp okalających sekwencję o długości 2 675 bp zawierającą trzy ORFy. Sugeruje się, że część sekwencji odwróconych powtórzeń może stanowić sygnał inicjacji transkrypcji i translacji dla znajdujących się pomiędzy nimi ORFów. Nigdzie indziej w genomie *B. burgdorferi* Ip21 nie stwierdzono obecności podobnych powtórzeń [22]. Poza tym odnotowano więcej wariantów znanych już plazmidów: odkryto kolejne plazmidy należące do rodzin cp32 oraz rodziny lp28; zidentyfikowano też dwa nowe warianty plazmidu cp9.

W 2003 dokonano porównania sekwencji genomu szczepu B31 z częściowo zsekwencjonowanymi genomami szczepów JD1 oraz N40. Okazało się, że największą różnorodnością odznaczają się geny kodujące białka biorące udział w procesie wirulencji – głównie OspC. Badacze sugerują, że głównym źródłem tej różnorodności może być proces rekombinacji. Wykazano również, że większość plazmidów ewoluuje w tempie około 2–4 razy szybszym niż sekwencja chromosomu. Ciekawym spostrzeżeniem jest fakt, że plazmidy cp26 i lp54, które wydają się być niezbędne dla wzrostu *B. burgdorferi*, zmieniają się w tempie podobnym do chromosomu [62].

6. *Borrelia burgdorferi* a inne *Borrelia*

Rodzaj *Borrelia* skupia mikroorganizmy chorobotwórcze będące patogenami ssaków. Łączy je podobny cykl życiowy, jednak objawy wywoływane przez poszczególne mikroorganizmy są różne – stanowią odrębne

jednostki chorobowe. W rodzaju *Borrelia* wyróżnia się grupę bakterii wywołującą boreliozę – tzw. *Borrelia burgdorferi sensu lato* skupiającą: *B. burgdorferi*, *B. afzelii* oraz *B. garinii*; ale także *B. recurrentis* czy *B. hermsii* powodujące dur powrotny.

Obecnie w bazie NCBI znajduje się 10 sekwencji genomowych oraz 2 sekwencje chromosomowe mikroorganizmów z rodzaju *Borrelia* z wyłączeniem *B. burgdorferi* (zestawienie z *B. burgdorferi* w Tabeli III). Wszystkie one charakteryzują się obecnością liniowego chromosomu, którego wielkość waha się od 889 kbp do blisko 1012 kbp. Analizy porównawcze ukazują, że skład genomy chromosomu jak i samo ułożenie genów są mocno konserwowane wewnątrz rodzaju *Borrelia*. Wydaje się też, że występowanie dużej liczby plazmidów jest cechą charakterystyczną dla mikroorganizmów z tego rodzaju. Największą liczbą plazmidów (21) odznacza się *B. burgdorferi*. Natomiast trudno jest jednoznacznie wskazać gatunek czy szczep o najmniejszej liczbie pozachromosomowych replikonów. Tabela III ukazuje, że *B. garinii* PBI zawiera tylko dwa plazmidy, jednak wynika to jedynie z niedoskonałości metod badawczych. Trudności te wynikają z dużego podobieństwa niektórych fragmentów sekwencji oraz z występowania powtórzeń w genomie [32]. Podobne problemy towarzyszyły już sekwencjonowaniu materiału genetycznego *B. burgdorferi* B31. W przypadku *B. hermsii* w pełni znamy tylko sekwencję chromosomu, jednak wiadomo, że gatunek ten posiada kolisty replikon o wielkości 32 kbp zawierający wiele ortologów ORFów zlokalizowanych na plazmidach z rodziny cp32 u *B. burgdorferi* oraz plazmidy należące do rodziny lp28. Materiał genetyczny *B. hermsii* wykazuje też hybrydyzację, w różnym stopniu, do wszystkich pozachromosomowych replikonów *B. burgdorferi* B31 [19, 79]. Pozwala to przypuszczać, że na genom tego gatunku składa się również wiele plazmidów.

W każdym zsekwencjonowanym genomie znajduje się replikon wykazujący pewne podobieństwo do plazmidu cp26. Zawsze zawiera on gen *resT* kodujący resolwazę telomerów, która jest niezbędna dla prawidłowej replikacji liniowych replikonów. Równie często w poznanych genomach występuje plazmid lp54 lub jego odpowiednik. Jego obecności nie zaobserwowano tylko u *B. duttonii* Ly i *B. recurrentis* A1 – obydwa gatunki należą do grupy wywołującej dur powrotny. Nieobecność wspomnianego replikonu może świadczyć o występowaniu na nim genów specyficznych tylko dla wywoływania boreliozy.

Obydwa w pełni zsekwencjonowane gatunki z rodzaju *Borrelia* wywołujące dur powrotny charakteryzują się odmiennym zestawem pozachromosomowych replikonów w stosunku do innych poznanych genomów tej grupy mikroorganizmów. Nawet odpowiednik plazmidu cp26 zawierający gen *resT* odznacza się strukturą liniową

Tabela III
Porównanie genomów mikroorganizmów z rodzaju *Borrelia* (na podstawie [45, 32, 33, 81–90])

Gatunek / szczep	Wielkość chromosomu w pz	Udział par GC (%) w chromosomie	Liczba plazmidów	Udział plazmidów liniowych	Plazmidy
<i>B. burgdorferi</i> B31	910 725	28%	21	12/21	cp9, cp26, cp32-1, cp32-3, cp32-4, cp32-6, cp32-7, cp32-8, cp32-9, lp5, lp17, lp21, lp25, lp28-1, lp28-2, lp28-3, lp28-4, lp36, lp38, lp54, lp56
<i>B. afzelii</i> ACA-1	903 516	28%	14	8/14	cp32-3, lp28-1, lp17, cp32-4, lp28-3, lp28-7, cp32-1, lp28-2, lp32-10, lp38, lp54, cp32-5, lp28-4, cp26
<i>B. afzelii</i> PKo	905 394	28%	8 ¹	6/8	lp60, lp60-2, lp34, lp32, cp30, lp28, cp27, lp25
<i>B. garinii</i> PBi	904 246	28%	2 ²	1/2	cp26, lp54
<i>B. garinii</i> Far04	889 112	28%	7	6/7	lp36, lp17, lp28-1, lp25, lp54, cp26, lp32-10
<i>B. garinii</i> PBr	903 870	28%	11	8/11	lp25, lp36, cp32-5, lp28-4, cp26, cp32-10, lp28-3, lp54, lp17, lp28-1, lp28-7
<i>B. spielmanii</i> A14S	1 011 570	28%	8	7/8	lp38, lp28-8, lp36, lp17, lp54, lp28-4, lp28-3, cp26
<i>B. valaisiana</i> VS116	913 294	28%	11	6/11	cp26, lp54, cp32-2-7, cp32-10, lp36, lp25, cp9, lp17, lp28-3, cp32-5, lp28-8
<i>Borrelia</i> sp. SV1	951 833	28%	9	5/9	lp32-12, cp32-3, lp28-2, lp17, cp32-4, cp32-7, cp26, lp28-4, lp54
<i>B. duttonii</i> Ly	931 674	27%	16	15/16	pl15, pl165, pl23, pl23b, pl26, pl27, pl28, pl35, pl36, pl40, pl41, pl42, pl70, pl31, pl32, pl11
<i>B. hermsii</i> DAH	922 307	29%	– ³	– ³	–
<i>B. recurrentis</i> A1	930 981	27%	7	7/7	pl23, pl33, pl35, pl37, pl53, pl6, pl124
<i>B. turicatae</i> 91E135	917 330	29%	– ³	– ³	–

¹ W pełni odtworzono sekwencję 8 plazmidów; plazmid lp31 składa się z trzech niezłożonych bloków genów.

² Sekwencjonowanie prowadzono przy użyciu metody shotgun. W pełni odtworzono jedynie sekwencję dwóch plazmidów – odpowiedników cp26 i lp54.

³ Brak danych, w bazie NCBI zdeponowane zostały tylko sekwencje chromosomów poszczególnych gatunków z rodzaju *Borrelia*, pozostała część genomu jest w trakcie sekwencjonowania.

i mniejszym rozmiarem (ok. 23 kbp). Najprawdopodobniej różnice te są skorelowane z rodzajem choroby, którą jest w stanie wywołać dany patogen. Gatunki zaliczane do *Borrelia burgdorferi sensu lato* posiadają zwykle podobny profil plazmidów. Wspólną cechą wszystkich mikroorganizmów należących do rodzaju *Borrelia* o zsekwencjonowanych dotąd genomach pozostaje liniowy chromosom oraz szeroki zestaw pozachromosomowych replikonów wśród których zazwyczaj większy udział mają plazmidy liniowe.

7. Kwestia ewolucji i współistnienia replikonów genomu *B. burgdorferii*

Pomimo upływu ponad 10 lat od poznania genomu *B. burgdorferi* niezwykła jego struktura wciąż budzi wiele emocji. Towarzyszą one zwłaszcza zagadnieniom powstania i współwystępowania tak wielu, często bardzo podobnych do siebie, replikonów.

Liczne analizy molekularne wykazały istnienie w genomie pięciu genów związanych ze zdolnością do przetrwania plazmidów w komórce oraz ich replikacją. Okazuje się, że każdy z pozachromosomowych elementów *B. burgdorferi* zawiera od jednego do czterech z tych genów. Ich produkty należą do pięciu rodzin paralogicznych (PF32, PF49, PF50, PF57, PF63). Są one utożsamiane z białkami inicjującymi replikację (PF57/ PF63), inne wykazują homologię do ParA. Doświadczenia *in vitro* wykazały też, że białka te mogą oddziaływać między sobą. Do tej pory nie udało się jednak ustalić mechanizmów rządzących rozdziałem plazmidów oraz samym procesem replikacji. Wydaje się, że istnienie tylu replikonów jest możliwe dzięki występowaniu białek pełniących podobne funkcje jednak wykazujących stosunkowo odległe podobieństwo na poziomie sekwencji [18, 21].

Jak już wcześniej wspomniano analizy molekularne wykazały duże podobieństwo większości telomerów replikonów liniowych, a jednocześnie zróżnicowanie

sekwencji w pobliżu telomerów wśród plazmidów pochodzących z różnych izolatów *B. burgdorferi*. Niedawno dowiedziano też, że resolwaza telomerów jest zdolna do tworzenia fuzji pomiędzy różnymi replikonami liniowymi, co umożliwia, w pewnych warunkach, zajście kolejnych zjawisk genetycznych (rekombinacje, delekcje). Wydaje się, że proces ten pełni kluczową rolę jeżeli chodzi o ewolucję replikonów liniowych *B. burgdorferi*.

8. Podsumowanie

Wielkości poznanych genomów bakterii patogenych wahają się od 580 kbp u *Mycoplasma genitalium* do 6300 kbp u *Pseudomonas aeruginosa*. Większość bakterii patogennych charakteryzuje się stosunkowo małym genomem. Wynika to z przystosowania się do stabilnego i zasobnego w źródło węgla, energii i azotu środowiska, jakie stanowi dla nich organizm gospodarza. Mikroorganizmy te zredukowały swój genom do absolutnego niezbędnego minimum. Jest to zwłaszcza dobrze zauważalne w przypadku gatunków będących obligatoryjnymi patogenami [49, 76]. *B. burgdorferi* prawdopodobnie pod tym względem nie jest wyjątkiem. Tak niezwykle uorganizowany genom składający się z liniowego chromosomu, tak nieczęsto spotykanego u *Bacteria*, oraz bogatego zestawu plazmidów o strukturze zarówno kolistej jak i liniowej wzbudza jednak duże zainteresowanie i rodzi wiele pytań. Niestety większość z nich pozostaje wciąż bez odpowiedzi.

Do dziś nie jesteśmy w stanie jednoznacznie stwierdzić w jaki sposób chromosom *Borrelia* stał się liniowy. Wszystkie inne mikroorganizmy zaliczane do typu *Spirochaetes* posiadają chromosom kolisty, więc taką strukturę musiał mieć też przodek rodzaju *Borrelia*. Czy linearyzacja chromosomu miała jakiś cel czy była po prostu utrwalonym efektem ewolucji? Ten temat pozostanie zapewne dla naukowców przez jeszcze jakiś czas zagadką. Istnieje natomiast hipoteza ukazująca możliwą drogę zmiany struktury chromosomu. Analizy molekularne dowiodły mianowicie, że na telomerach chromosomu mikroorganizmów z rodzaju *Borrelia* występują charakterystyczne sekwencje o długości 25 pz. Podobne sekwencje odnaleziono u wirusa wywołującego afrykańską gorączkę świń, należącego do rodziny *Asfarviridae*. Okazało się ponadto, że zawartość par AT w genomie tego wirusa jest bardzo podobna do zawartości par AT u *Borrelia* spp. Prawdopodobne jest, że w przeszłości doszło do zdarzenia integracji genomu wirusa do chromosomu przodka *Borrelia*. Fakt, że wirus wywołujący afrykańską gorączkę świń i *Borrelia* spp. są przenoszone przez stawonogi zwiększa możliwość zajścia tego zdarzenia genetycznego. Oczywiście jest to tylko hipoteza. W chromosomach *Borrelia* spp. nie stwierdzono obecności innego materiału genetycznego pochodzącego od

tego wirusa co oznaczałoby, gdyby ta hipoteza okazała się prawdziwa, że w późniejszym czasie uległ on delekcji. Drugą hipotezą jest konwergencja, która doprowadziła do powstania podobnych struktur u dwóch niespokrewnionych bytów [13].

Kolejną cechą wyróżniającą *B. burgdorferi* spośród innych patogenów jest niezwykle pofragmentowany genom składający się z co najmniej 20 plazmidów. Bakterie patogenne zawierają zwykle nie więcej niż jeden pozachromosomowy replikon. Zawarte są na nim głównie geny związane z czynnikami wirulencji. Nie są to geny niezbędne dla funkcjonowania bakterii jednak mogą zapewnić im znaczną przewagę w kontakcie z organizmem gospodarza, by zapewnić im większą mobilność zostały zlokalizowane na plazmidach. Przeciętna bakteria chorobotwórcza odznacza się stosunkowo prostym cyklem życiowym ograniczonym zwykle do jednego typu gospodarza, być może z tego wynika tak mały zestaw pozachromosomowych replikonów.

Należy pamiętać, że *B. burgdorferi* odznacza się bardziej skomplikowanym cyklem życiowym, opartym o gospodarza ssaczego oraz wektor pod postacią stawonoga. Bakteria ta musi być przystosowana do życia w środowisku o stałej temperaturze (ssak), jak i w warunkach zmiennych (stawonóg). Trzeba mieć również na uwadze, że każdy z organizmów gospodarza charakteryzuje się odmiennym zestawem receptorów będących miejscem adhezji dla patogenu, więc bakteria powinna posiadać informację genetyczną umożliwiającą istnienie dwóch różnych dróg sukcesji organizmu gospodarza. Kolonizacja organizmu kleszcza jest możliwa m.in. dzięki ekspresji białek OspA i OspB, które pełnią rolę adhezyn w jelicie kleszcza. Kiedy stawonóg odżywia się krwią pod wpływem zmiany temperatury oraz przyływu substancji odżywczych dochodzi do zmiany ekspresji genów *B. burgdorferi*. W miejsce OspA i OspB zaczyna być produkowane OspC, które jest niezbędne do zainfekowania myszy (gospodarza ssaczego). Równocześnie bakteria przemieszcza się do ślinianek kleszcza by przedostać się do organizmu gospodarza. Dalsze etapy kolonizacji są możliwe dzięki całej grupie białek, które wiążą się z specyficznymi receptorami w ciele ssaka (np. białka DbpA i DbpB z dekoryną czy białko RevA z fibronektyną). Aby stabilnie utrzymać się w gospodarzu bakteria unika odpowiedzi układu odpornościowego poprzez dynamiczne zmiany antygenów powierzchniowych (kasety *vls*) czy przez wiązanie się lipoprotein Erp z czynnikiem H w surowicy co hamuje układ dopełniacza. Eksperymentalnie udowodniono, że do przeżycia w ciele myszy niezbędny jest enzym, kodowany przez gen *pncA*, związany z syntezą NADu. Istnieje też szereg innych genów, które mogą dawać pewną przewagę selekcyjną. Kodują one m.in. transportery oligopeptydów, chitobiozy czy poryny błony zewnętrznej [69].

Informacje te znajdują się często na osobnych plazmidach, co być może ma na celu złagodzenie skutków utraty któregokolwiek z replikonów. Analizując sekwencję plazmidów *B. burgdorferi* można zauważyć, że wiele replikonów jest ze sobą powiązanych, gdyż wykazują duże wzajemne podobieństwo. Istnieją hipotezy sugerujące, że wiele plazmidów powstało na skutek duplikacji czy rearanżacji pewnych sekwencji. Utrzymywanie w genomie tak podobnych sekwencji może mieć na celu zapewnienie pewnej zmienności pozwalającej na uniknięcie odpowiedzi układu immunologicznego gospodarza. Jest to oczywiście na razie tylko hipoteza, jednak wciąż pozostaje pytanie czy do zapewnienia takiego procesu potrzeba aż tylu replikonów.

9. Piśmiennictwo

- Barbour A.G.: Plasmid analysis of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. *J. Clin. Microbiol.* **26**, 475–478 (1988)
- Barbour A.G., Garon C.F.: Linear plasmids of the bacterium *Borrelia burgdorferi* have covalently closed ends. *Science*, **237**, 409–411 (1987)
- Barbour A.G., Hayes S.F.: Biology of *Borrelia* species. *Microbiol. Rev.* **50**, 381–400 (1986)
- Baril C., Richaud C., Baranton G., Saint Girons I.S.: Linear chromosome of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. *J. Clin. Microbiol.* **26**, 475–478 (1989)
- Bentley S.D., Hopwood D.A. i wsp.: Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, **417**, 141–147 (2002)
- Bergstrom S., Zückert W.R.: Structure, function and biogenesis of the *Borrelia* cell envelope. w: *Borrelia*. Molecular Biology, Host Interaction and Pathogenesis (red. D.S. Samuels, J.D. Radolf), Caister Acad. Press, 2010
- Blattner F.R., Shao Y. i wsp.: The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, **277**, 1453–1462 (1997)
- Brissette C.A., Bykowski T., Cooley A.E., Bowman A., Stevenson B.: *Borrelia burgdorferi* RevA binds fibronectin. *Infect. Immun.* **77**, 2802–2012 (2009)
- Brock T.D.: The bacterial nucleus: a history. *Microbiol. Rev.* **52**, 397–411 (1988)
- Byram R., Stewart P.E., Rosa P.: The essential nature of the ubiquitous 26-kilobase circular replicon of *Borrelia burgdorferi*. *J. Bacteriol.* **186**, 3561–3569 (2004)
- Cairns J.: The chromosome of *Escherichia coli*. *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* **28**, 43–46 (1963)
- Cairns J.: The bacterial chromosome and its manner of replication as seen by autoradiography. *J. Mol. Biol.* **6**, 208–213 (1963a)
- Casjens S.: Evolution of the linear DNA replicons of the *Borrelia* spirochetes. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 529–534 (1999)
- Casjens S.: *Borrelia* genomes in the year 2000. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2**, 401–410 (2000)
- Casjens S., Murphy M., DeLange M., Sampson L., van Vugt R., Huang W.M.: Telomers of the linear chromosomes of Lyme disease: spirochaetes nucleotide sequence and possible exchange with linear plasmid telomers. *Mol. Microbiol.* **26**, 581–596 (1997)
- Casjens S., Palmer N., van Vugt R., Huang W.M., Stevenson B., Rosa P., Lathigra R., Sutton G., Peterson J., Dodson R.J., Haft D., Hickey E., Gwinn M., White O., Fraser C.M.: A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extra-chromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Mol. Microbiol.* **35**, 490–516 (2000)
- Chaconas G.: Replication of the *B. burgdorferi* genome and scrambling of the linear replicons through reverse telomere resolution. w: *Borrelia*. Molecular Biology, Host Interaction and Pathogenesis (red. D.S. Samuels, J.D. Radolf), Caister Acad. Press, 2010
- Chaconas G., Kobryn K.: Structure, function, and evolution of linear replicons in *Borrelia*. *Annu. Rev. Microbiol.* **64**, 185–202 (2010)
- Dai Q., Restrepo B.I., Porcella S.F., Raffel S.J., Schwan T.G., Barbour A.G.: Antigenic variation by *Borrelia hermsii* occurs through recombination between extragenic repetitive elements on linear plasmids. *Mol. Microbiol.* **60**, 1329–1343 (2006)
- Damman C.J., Eggers C.H., Samuels D.S., Oliver D.B.: Characterization of *Borrelia burgdorferi* BlyA and BlyB proteins: a prophage-encoded holing-like system. *J. Bacteriol.* **182**, 6791–6797 (2000)
- Deneke J., Chaconas G.: Purification and properties of the plasmid maintenance proteins from the *Borrelia burgdorferi* linear plasmid lp17. *J. Bacteriol.* **190**, 3992–4000 (2008)
- Dunn J.J., Buchstein S.R., Butler L.L., Fisenne S., Polin D.S., Lade B.N., Luft B.J.: Complete nucleotide sequence of a circular plasmid from the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *J. Bacteriol.* **176**, 2706–2717 (1994)
- Dziewit Ł., Bartosik D.: Genomy prokariotyczne w świetle analiz genomicznych. *Post. Mikrobiol.* **50**, 87–96 (2011)
- Egan E.S., Fogel M.A., Waldor M.K.: Divided genomes: negotiating the cell cycle in prokaryotes with multiple chromosomes. *Mol. Microbiol.* **56**, 1129–1138 (2005)
- Eggers C.H., Casjens S., Hayes S.F., Garon C.F., Damman C.F., Oliver D.B., Samuels D.S.: Bacteriophages of spirochetes. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2**, 365–373 (2000)
- Ferdows M.S., Barbour A.G.: Megabase-sized linear DNA in the bacterium *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 5969–5973 (1989)
- 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)
- Fleischmann R.D., Venter J.C. i wsp.: Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, **269**, 496–512 (1995)
- Fraser C.M., Venter J.C. i wsp.: The minimal genome complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science*, **270**, 397–403 (1995)
- Fraser C.M., Venter J.C. i wsp.: Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature*, **390**, 580–586 (1997)
- Gherardini F., Boylan J., Lawrence K., Skare J.: Metabolism and physiology of *Borrelia*. w: *Borrelia*. Molecular Biology, Host Interaction and Pathogenesis (red. D.S. Samuels, J.D. Radolf), Caister Acad. Press, 2010
- Glöckner G., Lehmann R., Romualdi A., Pradella S., Schulte-Spechtel U., Schilhabel M., Wilske B., Sühnel J., Platzer M.: Comparative analysis of the *Borrelia garinii* genome. *Nucleic Acids Res.* **32**, 6038–6046 (2004)
- Glöckner G., Schulte-Spechtel U., Schilhabel M., Felder M., Sühnel J., Wilske B., Platzer M.: Comparative genome analysis: selection pressure on the *Borrelia vls* cassettes is essential for infectivity. *BMC Genomics*, **7**, 211 (2006)

34. Grigoriev A.: Analyzing genomes with cumulative skew diagrams. *Nucleic Acids Res.* **26**, 2286–2290 (1998)
35. Grimm D., Tilly K., Byram R., Stewart P.E., Krum J.G., Bueschel D.M., Schwan T.G., Policastro P.F., Elias A.F., Rosa P.A.: Outer-surface protein C of the Lyme disease spirochete: a protein induced in ticks for infection of mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 3142–3147 (2004)
36. Himmelreich R., Hilbert H., Plagens H., Pirkl E., Li B.C., Herrmann R.: Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* **24**, 4420–4449 (1996)
37. Hinnebusch J., Barbour A.G.: Linear plasmid of *Borrelia burgdorferi* have a telomeric structure and sequence similar to those of a eukaryotic virus. *J. Bacteriol.* **173**, 7233–7239 (1991)
38. Ibbra M., Bono J.L., Rosa P.A., Soll D.: Archaeal-type lysyl-tRNA synthetase in the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 14383–14388 (1997)
39. Iyer R., Kalu O., Purser J., Norris S., Stevenson B., Schwartz I.: Linear and circular plasmid content in *Borrelia burgdorferi* clinical isolates. *Infect. Immun.* **71**, 3699–3706 (2003)
40. Jacob F., Wollman E.L.: Sexuality and the Genetics of Bacteria. Academic Press Inc., New York, 1961
41. Jewett M.W., Lawrence K., Bestor A.C., Tilly K., Grimm D., Shaw P., VanRaden M., Gherardini F., Rosa P.A.: The critical role of the linear plasmid lp36 in the infectious cycle of *Borrelia burgdorferi*. *Mol. Microbiol.* **64**, 1358–1374 (2007)
42. Kaneko T., Tabata S. i wsp.: Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* **3**, 109–136 (1996)
43. Kois A., Świątek M., Zakrzewska-Czerwińska J.: Struktura chromosomu bakteryjnego. *Post. Hig. Med. Dośw.* **61**, 534–540 (2007)
44. Lederberg J., McCray A.T.: ‘Ome sweet’ omics – a genealogical treasury of words. *The Scientist*, **15**, 8
45. Lescot M., Drancourt M. i wsp.: The genome of *Borrelia recurrentis*, the agent of deadly louse-borne relapsing fever, is a degraded subset of tick-borne *Borrelia duttonii*. *PLoS Genet.* **4**: e1000185 (2008)
46. Marques A.R.: Lyme disease: a review. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **10**, 13–20 (2010)
47. Medini D., Donati C., Tettelin H., Massignani V., Pappuoli R.: The microbial pan-genome. *Curr. Opin. Genet. Develop.* **15**, 589–594 (2005)
48. Miller J.C., Bono J.L., Babb K., El-Hage N., Casjens S., Stevenson B.: A second allele of *eppA* in *Borrelia burgdorferi* strain B31 is located on the previously undetected circular plasmid cp9-2. *J. Bacteriol.* **182**, 6254–6258 (2000)
49. Moreno R.: Genome evolution within the *alpha* Proteobacteria: why do some bacteria not possess plasmids and others exhibit more than one different chromosome? *FEMS Microbiol. Rev.* **22**, 255–275 (1998)
50. Motaleb M.A., Corum L., Bono J.L., Elias A.F., Rosa P., Samuels D.S., Charon N.W.: *Borrelia burgdorferi* periplasmic flagella have both skeletal and motility functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 10899–10904 (2000)
51. Murray T.S., Shapiro E.D.: Lyme disease. *Clin. Lab. Med.* **30**, 311–328 (2010)
52. Nau R., Christen H.J., Eiffert H.: Lyme disease – current state of knowledge. *Dtsch. Arztebl Int.* **106**, 72–81 (2009)
53. Norris S.J., Carter C.J., Howell J.K., Barbour A.G.: Low-passage-associated proteins of *Borrelia burgdorferi* B31: characterization and molecular cloning of OspD, a surface-exposed, plasmid-encoded lipoprotein. *Infect. Immun.* **60**, 4662–4672 (1992)
54. Ojaimi C., Davidson B.E., Saint Girons I., Old I.G.: Conservation of gene arrangement and an unusual organization of rRNA genes of the linear chromosomes of the Lyme disease spirochaetes *Borrelia burgdorferi*, *B. garinii* and *B. afzelii*. *Microbiology*, **140**, 2931–2940 (1994)
55. Ojaimi C., Schwartz I. i wsp. Profiling of temperature-induced changes in *Borrelia burgdorferi* gene expression by using whole genome arrays. *Infect. Immun.* **71**, 1689–1705 (2003)
56. Pallen M.J., Wren B.W.: Bacterial pangenomics. *Nature*, **449**, 835–842 (2007)
57. Pettijohn D.E., Worcel A.: Prokaryotic DNA in nucleoid structure. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **2**, 175–202 (1976)
58. Picardeau M., Lobry J.R., Hinnebusch B.J.: Physical mapping of an origin of bidirectional replication at the centre of the *Borrelia burgdorferi* linear chromosome. *Mol. Microbiol.* **32**, 437–445 (1999)
59. Probert W.S., Johnson B.J.: Identification of a 47 kDa fibronectin-binding protein expressed by *Borrelia burgdorferi* isolate B31. *Mol. Microbiol.* **30**, 1003–1015 (1998)
60. Purser J.E., Lawrenz M.B., Caimano M.J., Radolf J.D., Norris S.J.: A plasmid-encoded nicotinamidase (PncA) is essential for infectivity of *Borrelia burgdorferi* in a mammalian host. *Mol. Microbiol.* **48**, 753–764 (2003)
61. Purser J.E., Norris S.J.: Correlation between plasmid content and infectivity in *Borrelia burgdorferi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 13865–13870 (2000)
62. Qiu W.G., Schutzer S.E., Bruno J.F., Attie O., Xu Y., Dunn J.J., Fraser C.M., Casjens S.R., Luft B.J.: Genetic exchange and plasmid transfers in *Borrelia burgdorferi sensu stricto* revealed by three-way genome comparisons and multilocus sequence typing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 14150–14155 (2004)
63. Rasko D.A., J. Ravel J. i wsp.: The pangenomic structure of *Escherichia coli*: comparative genome analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. *J. Bacteriol.* **190**, 6881–6893 (2008)
64. Rocha E.P.: The organization of the bacterial genome. *Annu. Rev. Genet.* **42**, 211–233 (2008)
65. Schutzer S.E., Fraser-Liggett C.M., Casjens S.R., Qiu W-G, Dunn J.J., Mongodin E.F., Luft B.J.: Whole-genome sequences of thirteen isolates of *Borrelia burgdorferi*. *J. Bacteriol.* **193**, 1018–1020 (2011)
66. Schwan T.G., Piesman, J., Golde, W., 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)
67. Skotarczak B. Adaptation factors of *Borrelia* for host and vector. *Ann. Agric. Environ. Med.* **16**, 1–8 (2009)
68. Stevenson B., Casjens S., van Vugt R., Porcella S.F., Tilly K., Bono J.L., Rosa P.: Characterization of cp18, a natural truncated member of the cp32 family of *Borrelia burgdorferi* plasmids. *J. Bacteriol.* **179**, 4285–4291 (1997)
69. Stewart P.E., Byram R., Grimm D., Tilly K., Rosa P.A.: The plasmids of *Borrelia burgdorferi*: essential genetic elements of a pathogen. *Plasmid*, **53**, 1–13 (2005)
70. Tettelin H., Frase C.M. i wsp.: Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial “pan-genome”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 13950–13955 (2005)
71. Tettelin H., Riley D., Cattuto C., Medini D.: Comparative genomics: the bacterial pan-genome. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**, 472–477 (2008)
72. Thanbichler M., Violler P.H., Shapiro L.: The structure and function of the bacterial chromosome. *Curr. Opin. Genet. Develop.* **15**, 153–162 (2005)

73. Tomb J.F., Venter J.C. i wsp.: The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, **388**, 539–547 (1997)
74. Toro E., Shapiro L.: Bacterial chromosome organization and segregation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**(2) a000349 (2010)
75. Trevors J.T.: Genome size in bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **69**, 293–303 (1996)
76. Węgrzyn G.: The minimal genom paradox. *J. Appl. Genet.* **42**, 385–392 (2001)
77. Worcel A., Burgi E.: On the structure of the folded chromosome of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **71**, 127–147 (1971)
78. Yang X.F., Pal U., Alani S.M., Fikrig E., Norgard M.V.: Essential role for OspA/B in the life cycle of the Lyme disease spirochete. *J. Exp. Med.* **199**, 641–648 (2004)
79. Zhong J., Barbour A.G.: Cross-species hybridization of a *Borrelia burgdorferi* DNA array reveals infection- and culture-associated genes of the unsequenced genome of the relapsing fever agent *Borrelia hermsii*. *Mol. Microbiol.* **51**, 729–748 (2004)
80. Zückert W.R., Meyer J., Barbour A.G.: Comparative analysis and immunological characterization of *Borrelia* Brd protein family. *Infect. Immun.* **67**, 3257–3266 (1999)
81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genome&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=5900>
82. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genome&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=5956>
83. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genome&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=5904>
84. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genome&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=5898>
85. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genome&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=5748>
86. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genome&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=22309>
87. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genome&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=22889>
88. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genome&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=22733>
89. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genome&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=5744>
90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genome&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=23501>
91. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genome&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=132>