

Dominik Lewandowski¹, Anna Urbanowicz¹, Marek Figlerowicz^{1*}

¹Pracownia Biologii Molekularnej i Systemowej, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań

Wpłynęło w maju 2012 r.

1. Wprowadzenie. 2. *Borrelia burgdorferi* – podstawowe informacje. 3. Kleszcz jako pasożyt. 4. Kolonizacja kleszcza przez *B. burgdorferi*. 5. Białka kleszcza wykorzystywane przez *B. burgdorferi* podczas zakażenia organizmu gospodarza. 6. Podsumowanie

Molecular interactions between *Borrelia burgdorferi* ticks and mammals

Abstract: Over the last decade, the incidence of tick-borne diseases has been rapidly increasing in Poland. Lyme disease cases are especially frequent. They disease in caused by *Borrelia burgdorferi* spirochetes. The enzootic cycle of the Lyme disease pathogen involves both a mammalian host and an *Ixodes* tick vector. *B. burgdorferi* enters the tick during its feeding on an infected vertebrate. To survive in the vector and to enter the host, spirochetes utilize their lipoproteins anchored in the external bacterial membrane and tick-encoded proteins. *B. burgdorferi* is so well adapted to the vector that it is also capable of employing tick strategies to more effectively infect mammalian hosts.

Tick-*Borrelia* interaction is a very interesting and complex example of parasitism. Better understanding of the mechanisms underlying this phenomenon is indispensable for the development effective strategies of Lyme disease prophylactics and treatment. Here, we describe how *B. burgdorferi* alters gene expression depending on the tick or vertebrate environment. We also characterize the key bacterial and vector proteins necessary for spirochete for effective colonization of the tick.

1. Introduction. 2. *B. burgdorferi* characteristics. 3. Ticks as a parasites. 4. Tick colonization by *B. burgdorferi*. 5. Tick proteins exploited by *B. burgdorferi* during host infestation. 6. Summary

Słowa kluczowe: *B. burgdorferi*, białka powierzchniowe, borelioza, kleszcz

Key words: *B. burgdorferi*, outer-surface proteins, Lyme disease, tick

1. Wprowadzenie

Kleszcze to pasożyty zewnętrzne, żywiące się krwią wielu gatunków kręgowców. Podczas żerowania kleszcze mogą wprowadzić do organizmu gospodarza różne czynniki chorobotwórcze (bakterie, wirusy, pierwotniaki) wywołujące zoonozy np.: boreliozę, odkleszczowe zapalenie mózgu, tularemie, ehrlichiozę, babeszjozę, czy mykoplazmozę. W ciągu ostatniej dekady nastąpił w Polsce gwałtowny wzrost zapadalności na choroby odkleszczowe, a szczególnie na boreliozę wywołwaną przez krętki *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*s. l.*). Krążenie *B. burgdorferi s. l.* w środowisku naturalnym zależy od obecności właściwych wektorów oraz nosicieli. W Polsce wektorem przenoszącym *B. burgdorferi s. l.* są kleszcze z rodzaju *Ixodes*. W niektórych rejonach Polski do 50% kleszczy może być zakażonych *B. burgdorferi s. l.* [10, 11, 46].

Zachodzące w Europie zmiany klimatyczne i związane z nimi cieplejsze zimy oraz gorętsze i wilgotniejsze lata są jedną z przyczyn ciągłego poszerzania obszarów zasiedlanych przez kleszcze i zwiększania ich liczebności. Jako inne przyczyny wzrostu zapadalności na boreliozę wymienia się rozwój turystyki na terenach leśnych oraz obserwowany w ostatnich latach wzrost populacji dzikich zwierząt. Rozpatrując złożoność eko-

logicznych i epidemiologicznych uwarunkowań takich chorób jak borelioza, czy kleszczowe zapalenie mózgu, trudno jest jednoznacznie wskazać główną przyczynę ich rozprzestrzeniania. W związku ze wzrastającą liczbą zakażeń krętkami *B. burgdorferi s. l.*, także wśród ludzi, problem powstrzymania dalszej ekspansji tego groźnego patogenu staje się coraz bardziej naglący. Stworzenie skutecznych strategii profilaktyki i terapii boreliozy wymaga jednak lepszego poznania mechanizmów molekularnych procesów zachodzących podczas oddziaływań bakterii, kleszcza i jego gospodarza [5].

2. *Borrelia burgdorferi* – podstawowe informacje

Krętki z rodzaju *Borrelia* to Gram-ujemne bakterie o średnicy 0,3–0,5 μm i długości 20–30 μm. Obecnie znanych jest wiele gatunków należących do tego rodzaju (*B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. bissettii*, *B. spielmanii*, *B. lusitaniae* i *B. valaisiana*). W Europie gatunki *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii* traktowane są jako jeden czynnik chorobotwórczy nazywany *B. burgdorferi sensu lato* (*s. l.*) [16].

Krętki *B. burgdorferi* są przenoszone na ludzi głównie przez kleszcze z rodzaju *Ixodes*. W Europie i Azji są to gatunki: *Ixodes ricinus* oraz *I. persulcatus*, w Ameryce

* Autor korespondencyjny: Pracownia Biologii Molekularnej i Systemowej, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Z. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań; e-mail: Marek.Figlerowicz@ibch.poznan.pl

Północnej: *I. scapularis*, a także *I. pacificus*. W Polsce wektorem przenoszącym *B. burgdorferi s. l.* jest *I. ricinus*. Krętki występują także u innych gatunków kleszczy, pewnych gatunków pcheł, much i komarów [36]. Wydaje się jednak, że te bezkręgowce nie przenoszą ich na ludzi. Największy rezerwuuar bakterii *B. burgdorferi s. l.* stanowią drobne gryzonie, nieco mniejszy duże ssaki oraz ptaki [16, 46, 51]. Ludzie oraz zwierzęta domowe, u których rozwija się borelioza, są dla krętka przypadkowymi gospodarzami. Mimo iż wszystkie trzy stadia rozwojowe kleszczy mogą żywić się krwią człowieka, do zakażeń ludzi najczęściej dochodzi w wyniku kontaktu z nimfami, które są małymi i trudnymi do zauważenia, a przy tym najbardziej agresywnymi formami rozwojowymi kleszczy [10, 11, 46].

B. burgdorferi s. l. najczęściej zasiedla kleszcze w stadium larwy lub nimfy, podczas ich żerowania na zakażonym krętkiem kręgowcu. Bakteria nie przedostaje się z dorosłej samicy kleszcza na składane przez nią jaja. Kolejne generacje roztoczy są więc zakażane *de novo*. Naturalny rezerwuuar *B. burgdorferi* stanowią zwierzęta będące kompetentnymi gospodarzami krętka. Do grupy tej należą drobne ssaki oraz ptaki, u których stosunkowo łatwo dochodzi do niegroźnych acz długotrwałych infekcji [37]. Dorosłe kleszcze nie odgrywają znaczącej roli w krążeniu *B. burgdorferi* w przyrodzie, ponieważ żywią się krwią większych ssaków, które nie są dla bakterii kompetentnym gospodarzem. Niemniej jednak, duże ssaki są ważne dla podtrzymania liczebności kleszczy, ponieważ na ich ciele najczęściej dochodzi do kopulacji kleszczy [37].

Poznany w 1997 roku genom szczepu B31 *B. burgdorferi*, zawiera ponad 1750 genów umiejscowionych na liniowym chromosomie (910 kpz) oraz 21 plazmidach (w sumie ich długość wynosi około 610 kpz) – 12 liniowych (lp – *linear plasmid*) i 9 kolistych (cp – *circular plasmid*). Aż 40% informacji genetycznej zakodowana jest w DNA pozachromosomalnym [19]. Badania z użyciem mikromacierzy sugerują, że geny umiejscowione w plazmidach, w większym stopniu niż geny chromosomalne, są zaangażowane w odpowiedź na zmieniające się warunki zewnętrzne [6]. Genom *B. burgdorferi* koduje około 130 lipoprotein – najwięcej spośród znanych genomów bakteryjnych. Większość z nich stanowią białka powierzchniowe, które biorą udział w różnorodnych oddziaływaniach pomiędzy bakterią a gospodarzem oraz pomiędzy bakterią i wektorem. Duża różnorodność plazmidów, w zależności od szczepu i lokalizacji geograficznej stanowi podstawę klasyfikacji bakterii. Znaczna część zawartych w plazmidach genów koduje białka nieposiadające homologów u innych organizmów. Prawdopodobnie białka te decydują o wirulencji patogenu. Utrata większości plazmidów nie wywiera wpływu na propagację bakterii w hodowli, jednak uniemożliwia infekowanie zwierząt laboratoryjnych. Znaczny

polimorfizm pozagenomowego DNA sprawia, iż łatwo dochodzi do zmian antygenów bakterii, co w dużym stopniu utrudnia diagnostykę i profilaktykę boreliozy.

W materiale genetycznym *B. burgdorferi* nie zidentyfikowano genów kodujących jakiegokolwiek znane toksyny, czy też czynniki potrzebne do ich sekrecji. Uważa się zatem, że uszkodzenia tkanek związane z rozwojem boreliozy są efektem reakcji zapalnej wywołanej przez organizm gospodarza [50].

B. burgdorferi jest obligatoryjnym pasożytem. W związku z tym jej ewolucja, oraz cykl życiowy są ściśle powiązane z ewolucją i sposobem funkcjonowania wektora (bezkęgowca) oraz żywiciela (kręgowca). Przebywanie *B. burgdorferi* w skrajnie różnych warunkach występujących w organizmach gospodarza oraz wektora wymaga odpowiedniego przystosowania poprzez zmianę profilu ekspresji genów (32). Transkrypcja wielu genów, kodujących białka niezbędne podczas migracji bakterii pomiędzy wektorem i gospodarzem oraz podczas infekcji kręgowców, regulowana jest przez alternatywne czynniki transkrypcyjne Rrp2, RpoN i RpoS. Powstawanie czynnika RpoS kontrolowane jest przez czynniki RpoN (znany również jako σ^{54} oraz NtrA) wiążący się do polimerazy RNA [43]. Transkrypcja *rpoS* wymaga przyłączenia kompleksu białkowego w rejonie znajdującym się przed promotorem *rpoS*. W skład tego kompleksu, oprócz RpoN, wchodzi ufosforylowane białko Rrp2 (*Response regulatory protein 2*) oraz czynniki BosR (*Borrelia oxidative stress regulator*; znany również jako Fur) [22, 35]. Ekspresja *rpoS* jest regulowana potranskrypcyjnie przez krótkie RNA DsrA [28], chaperon RNA – Hfq [27] oraz wiążące RNA białko CsrA [23]. Ekspresję wielu genów niezbędnych do kolonizacji wektora uruchamia system złożony z kinazy histydynowej Hk1 (*Histidine kinase 1*) oraz białka Rrp1. Hk1 i Rrp1 kontrolują produkcję cząsteczki sygnałnej cyklicznego di-GMP. Nukleotyd ten uczestniczy w modulacji ekspresji genów, których produkty ułatwiają adaptację bakterii do warunków panujących w przewodzie pokarmowym żerującego kleszcza. W przeciwieństwie do ścieżki Rrp2/RpoN/RpoS uruchamianej tylko przez bakterie znajdujące się w ssącej krew nimfie kleszcza, ścieżka zależna od Hk1 i Rrp1 funkcjonuje zarówno w jelicie żerującej larwy jak i nimfy [7].

Ścieżka Rrp2/RpoN/RpoS jest w pełni aktywna także w początkowym stadium infekcji gospodarza przez *B. burgdorferi*. Uruchamia ona ekspresję genów umożliwiających przetrwanie bakterii w nowym środowisku oraz tłumi ekspresję genów, które były potrzebne do przeżycia *B. burgdorferi* w kleszczu. Krętki rozprzestrzeniają się w organizmie gospodarza, który w ten sposób staje się swoistym rezerwuarem bakterii. *B. burgdorferi* może następnie infekować larwy, nimfy i formy dorosłe kleszcza. Larwa może zostać zainfekowana już podczas jej pierwszego żerowania. W momencie, gdy pasożyt

jest już syty, ścieżka Rrp2/RpoN/RpoS przestaje być aktywna, a uruchamiana jest ekspresja genów fazy kleszczowej (m.in. *OspA*, którego transkrypcja jest blokowana przez RpoS) [43]. Jednocześnie, aktywowana jest ścieżka Hk1/Rrp1, która jest niezbędna do kolonizacji jelita larwy [7]. Po przeobrażeniu się larwy w nimfę, krętki narażone są na długotrwały głód. W tym okresie ścieżki Rrp2/RpoN/RpoS oraz Hk1/Rrp1 są nieaktywne. Ponownie uruchomiona jest ekspresja genów fazy kleszczowej. Rozpoczęcie żerowania przez nimfę kolejny raz aktywuje ścieżkę Rrp2/RpoN/RpoS, co pociąga za sobą transkrypcję genów niezbędnych do zainfekowania kręgowca i jednocześnie stopniowe tłumienie genów fazy kleszczowej [37, 43]. Oprócz tego, dwuskładnikowy układ Hk1/Rrp1 uruchamia transkrypcję genów, których produkty pozwalają krętkowi uniknąć antybakteryjnej odpowiedzi ze strony kleszcza [24].

3. Kleszcz jako pasożyt

Kleszcze należą do gromady pajęczaków, podgromady roztoczy i są pasożytami zewnętrznymi głównie kręgowców. W Europie najczęściej spotykane są kleszcze z gatunku *Ixodes ricinus* (kleszcz pospolity). Występują one na terenie lasów liściastych oraz mieszanych. Pomiędzy okresami żerowania kleszcze narażone są na wysychanie i dlatego przemieszczają się do warstwy podściółki. Liczebność populacji *I. ricinus* ulega znaczącemu obniżeniu, kiedy okres ich aktywności zbiega się z okresem niskiej zawartości wody w atmosferze [35].

Długość poszczególnych faz cyklu życiowego kleszcza zależy od warunków środowiskowych oraz dostępności żywicieli. Kleszcze żerują na ponad 300 gatunkach kręgowców. We wszystkich stadiach rozwojowych żywią się one krwią gospodarza przez kilka kolejnych dni. Jedynie dorosłe samce żerują bardzo krótko i wypijają niewielką ilość krwi. Larwy piją krew przez 2 do 4 dni, nimfy 4–6 dni, natomiast samice 6–10 dni. Po zakończeniu żerowania postać niedojrzała przekształca się w kolejną formę rozwojową. W pełni dojrzałe samice po żerowaniu składają jaja, a następnie umierają. Z jaj rozwijają się larwy, a z nich powstają nimfy, które następnie przeobrażają się w postać dorosłą. Cały cykl rozwojowy trwa zazwyczaj 2 do 3 lat. W skrajnych przypadkach, kleszcze mogą przetrwać w swoim siedlisku nawet do kilku lat. Aby znaleźć żywiciela, kleszcz wspina się na rośliny i oczekuje na bodźce mechaniczne oraz chemiczne, wytwarzane przez gospodarza, po czym spada na ofiarę [35]. W Europie Środkowej okres aktywności kleszczy rozpoczyna się w marcu i trwa do końca października. Jednak najwyższą aktywność *I. ricinus* wykazuje wczesną wiosną oraz wczesną jesienią [17].

Ze względu na swój pasożytniczy tryb życia kleszcze wykształciły zdolność do pokonywania różnorodnych

barier zabezpieczających organizm gospodarza. W tym celu wytwarzają one szereg białek, które szczególnie obficie występują w ślinie tego roztocza. Zidentyfikowano w niej zarówno liczne czynniki przeciwwązkowe, jak i rozkurczające naczynia krwionośne, substancje przeciwzapalne oraz immunomodulujące [49].

4. Kolonizacja kleszcza przez *B. burgdorferi*

Do kolonizacji kleszcza przez *B. burgdorferi* dojść może podczas jego żerowania na zakażonym kręgowcu. W procesie tym uczestniczą powierzchniowe białka bakterii, między innymi lipoproteina *OspA*, która oddziałuje z receptorem TROSPA (*tick receptor for OspA*) obecnym na powierzchni komórek nabłonka jelita kleszcza, oraz lipoproteina *OspB*, której receptor nie jest znany. Geny *ospA* oraz *ospB* umiejscowione są w pozagenomowym DNA krętka, a ich ekspresję indukują bliżej niezidentyfikowane czynniki uwalniane przez kleszcza, bądź gospodarza podczas ukąszenia. W regulacji ekspresji obu genów uczestniczą alternatywne czynniki transkrypcyjne RpoN/RpoS. Obydwa białka powstają w procesie transkrypcji operonu *ospAB* [1]. Uzyskane metodą rekombinacji DNA białka *OspA* i *OspB* wiążą się specyficznie z tkanką pochodzącą z jelita kleszcza, co potwierdza ich udział w kolonizacji kleszcza przez bakterię. Podczas żerowania kleszcza na myszach, które były wcześniej immunizowane antygenami *OspA*, a następnie zakażone *B. burgdorferi*, nie obserwowano wiązania krętków do nabłonka jelitowego roztocza. Mutanty pozbawione operonu *ospAB* infekują myszy w takim samym stopniu jak typ dziki, nie są jednak w stanie skolonizować kleszcza, ani w nim przetrwać [54]. Wprowadzenie mutacji w genie *ospB* szczepu B31 *B. burgdorferi*, przy zachowaniu funkcjonalnego *ospA*, również ogranicza zdolność infekowania oraz przeżywalność *B. burgdorferi* w kleszczu [30]. Analiza *in vivo* transkryptomu *B. burgdorferi* wykazała, że podczas transferu bakterii z zainfekowanych myszy do żerującego kleszcza następuje wzmożona ekspresja genu *bb0365* kodującego lipoproteinę La7 [20]. Mutanty pozbawione genu *bb0365* zakażają myszy w takim samym stopniu jak typ dziki, jednakże mają znacząco obniżoną przeżywalność w organizmie kleszcza. Nie zaobserwowano wzmożonej ekspresji *bb0365* w żadnej z kolonii bakteryjnych wyizolowanych z różnych tkanek mysich [32]. Ponadto, wykazano, że u pacjentów zakażonych boreliozą immunoglobuliny skierowane przeciwko BB0365 są słabo wykrywalne w testach ELISA [40].

Gdy *B. burgdorferi* znajdzie się w jelicie kleszcza, musi uniknąć strawienia oraz neutralizacji przez system immunologiczny roztocza. Pomimo, iż trawienie u kleszcza zachodzi wewnątrzkomórkowo, a proteazy nie są obecne w świetle jelita, produkty pochodzące

z degradacji hemoglobiny posiadają właściwości przeciwbakteryjne. Ponadto, znaleziono u kleszcza gen kodujący białko defensyno-podobne, który ulega wzmożonej ekspresji po infekcji jelita przez krętki boreliozy. Nie jest jednak znany sposób, w jaki bakteria omija ten rodzaj odpowiedzi immunologicznej [35].

Po nasyceniu się krwią gospodarza niedojrzała forma kleszcza przechodzi przeobrażenie w kolejną formę rozwojową. Jest to proces długotrwały, podczas którego brakuje dostępu do substancji odżywczych. Aby przetrwać ten okres, *Borrelia* uruchamia produkcję odpowiednich białek. Jednym z nich jest białko Dps-podobne (*DNA-binding protein from starved bacteria*), będące ortologiem bakterioferrytyny. Białko to zostało pierwotnie zidentyfikowane w komórkach *Escherichia coli* poddanych długotrwałemu głodzeniu. Stwierdzono, że jego homologi występują u wielu różnych gatunków bakterii. Badania strukturalne wykazały, że białka Dps tworzą dodekamery wykazujące powinowactwo do jonów żelaza oraz DNA. Wiązanie żelaza mogłoby zapobiegać reakcji Fentona, w której powstają reaktywne formy tlenu. U *B. burgdorferi* homolog Dps powstaje jako produkt ekspresji genu chromosomalnego *bb0690*. Wykazano, że białko typu Dps umożliwia *B. burgdorferi* przetrwanie w jelitach kleszcza długotrwałych okresów głodu [26]. W przeciwieństwie do białka pochodzącego z *E. coli*, rekombinowane Dps z *B. burgdorferi* nie wiąże się z DNA, ani nie chroni jego struktury przed uszkodzeniami oksydacyjnymi w testach *in vitro*. Istnieje jednak szereg homologów Dps, które chronią DNA w inny sposób niż białko pochodzące od *E. coli*. *Bacillus brevis* syntetyzuje Dps, w którym nie występuje N-końcowa domena wiążąca DNA, a chromosom bakteryjny jest najprawdopodobniej upakowany pomiędzy tworzące wielowarstwową strukturę dodekamery [41]. Być może *B. burgdorferi* chroni swój materiał genetyczny upakowując go przy pomocy bogatego w cysteiny, C-końcowego odcinka białka Dps [26]. Inne białko ułatwiające *B. burgdorferi* przetrwanie w organizmie kleszcza to lipoproteina powierzchniowa BptA (*Borrelia persistence in tick protein A*). Powstaje ona jako produkt ekspresji genu *bbe16* znajdującego się na plazmidzie *lp25*. Larwy kleszcza zakażone krętkami *B. burgdorferi* z wyciszonym *bptA*, po przeobrażeniu do stadium nimfy, zawierały znacząco mniejszą ilość bakterii w porównaniu z krętkami typu dzikiego. BptA wykazuje wysoką konserwatywność (powyżej 88% podobieństwa oraz ponad 74% identyczności na poziomie aminokwasowym) w obrębie szczepów *B. burgdorferi s. l.* [42].

Po wyczerpaniu glukozy w jelicie kleszcza, *B. burgdorferi* musi przestawić się na alternatywne źródła węgla potrzebne do glikolizy i syntezy fosfolipidów. U krętków dochodzi wówczas do wzmożonej ekspresji genów z operonu *glp*, który koduje białka odpowiedzialne za przechwytywanie i wykorzystanie cząsteczek glicerolu

wytwarzanych przez kleszcza w czasie zimy. W aktywacji operonu *glp* uczestniczą czynniki transkrypcyjne Hk1/Rrp1, natomiast wyłączenie *glp* zachodzi pod wpływem czynnika RpoS [37].

Ponowne pobranie pokarmu przez kleszcza diametralnie zmienia panujące w jelicie warunki. Bakterie odczytują tę zmianę jako sygnał, iż pojawiła się możliwość zasiedlenia kolejnego gospodarza. W rezultacie uruchamiają ekspresję odpowiedniej puli genów. Przez pierwsze 36 godzin żerowania krętka pozostają w jelicie dzięki oddziaływaniu OspA-TROSPA. Po 72 godzinach obserwuje się wykładniczy wzrost populacji *B. burgdorferi* oraz jej rozproszenie w obrębie tkanki jelita [33, 47]. Część krętków przechodzi wtedy przez komórki nabłonka do hemocelu, skąd wędruje dalej do gruczołów ślinowych kleszcza. Migracja krętków nie jest dobrze poznanym procesem. Mogą ją wspomagać interakcje pomiędzy białkami powierzchniowymi bakterii i czynnikami produkowanymi przez kleszcza. Postulowane jest między innymi oddziaływanie powierzchniowej lipoproteiny krętka BBE31 z białkiem TRE31 wydzielanym przez nabłonek jelita podczas żerowania kleszcza [55] oraz wiązanie plazminogenu z OspA [12]. Kolejnym bardzo istotnym białkiem pojawiającym się na powierzchni krętka na tym etapie jego cyklu życiowego jest lipoproteina OspC. Gen kodujący OspC stanowi fragment kolistego plazmidu *cp26*, który występuje u większości szczepów *B. burgdorferi* [8]. Za regulację ekspresji tego genu odpowiedzialne są czynniki transkrypcyjne RpoN/S. OspC łączy się z występującym w ślinie kleszcza białkiem Salp15 [2] w rezultacie dochodzi do opłaszczania krętków przez to białko. Rola, jaką pełni OspC w oddziaływaniach bakteria-kleszcz, nie jest do końca jasna. Istnieją przesłanki wskazujące, że OspC jest potrzebne krętkowi do przemieszczenia się z jelita kleszcza do jego gruczołów ślinowych [34]. *Knock-out* genu *ospC* powoduje, że *B. burgdorferi* nie jest w stanie zainfekować ssaka. Efekt ten jest obserwowany zarówno, gdy zakażenie następuje w wyniku ukąszenia przez kleszcza jak i gdy bakteria wprowadzona zostaje za pomocą igły. Na tej podstawie można sądzić, że białko to jest niezbędne do rozwoju infekcji w organizmie gospodarza [21, 48]. Równocześnie wykazano, że mutanty *B. burgdorferi*, z wyłączonym genem *ospC* oraz podwyższoną ekspresją jednego z genów kodujących pozostałe białka powierzchniowe (OspA, OspE, VlsE i DbpA) były w stanie zasiedlić organizm myszy. Okazuje się więc, że inne lipoproteiny powierzchniowe krętka są w stanie przejąć funkcję OspC pod warunkiem, że występują obficie na powierzchni zewnętrznej błony komórkowej bakterii [53]. Lipoproteina BB0323 to kolejne białko występujące w błonie komórkowej *B. burgdorferi*. Wykazano, że jest ono niezbędne dla przetrwania bakterii w wektorze oraz transferu patogenu z kleszcza do organizmu gospodarza. Produkcja bakteryjnego białka BB0323 wzrasta,

gdy zakażony *B. burgdorferi* kleszcz pobiera krew z organizmu gospodarza. Mutanty pozbawione *bb0323* nie są w stanie zainfekować kleszczy, ani myszy. Są one eliminowane w ciągu kilku pierwszych dni infekcji, zarówno u kleszczy, immunokompetentnych myszy, jak i u myszy z zespołem ciężkiego skojarzonego niedoboru odporności. Wykazano również, że zniesienie mutacji *bb0323*, poprzez tzw. komplementację chromosomalną, powoduje w znacznym stopniu odzyskanie wirulencji i przywraca bakteriom zdolność przetrwania w organizmie myszy oraz kleszcza [55].

Lipoproteina BBA07 stanowi kolejny przykład białka, które ulega zwiększonej produkcji podczas żerowania nimfy oraz odgrywa istotną rolę w przepływie *B. burgdorferi* z kleszcza do ssaka [52]. U krętków hodowanych w temperaturze 37°C i obniżonym pH (pH 6,8), czyli w warunkach podobnych do tych panujących w jelicie odżywiającego się kleszcza, ekspresja *bba07* wzrasta ponad 10-krotnie w porównaniu do kontroli (23°C, pH 7,5). Analizy z użyciem mikromacierzy wykazały, że ekspresja *bba07*, obok 100 innych genów wirulencji (m.in. *ospA*, *ospC*), znajduje się pod kontrolą ścieżki Rrp2/RpoN/RpoS [43]. Stwierdzono, że mutacje *rrp2*, *rpoN* lub *rpoS* powodowały nawet 138-krotny spadek ilości transkryptu *bba07* [4, 6, 19]. Mutanty pozbawione BBA07, pomimo, że są w stanie infekować myszy po inokulacji za pomocą igły oraz przeżywają w kleszczu, nie są zdolne do przedostania się do organizmu ssaka poprzez ugryzienie przez kleszcza. Natomiast po komplementacji mutantów za pomocą kopii genu *bba07*, pochodzącej od typu dzikiego, następuje częściowe odwrócenie tego defektu. Mechanizm działania BBA07 nie został jak dotąd poznany, wiadomo jednak, iż białko to ułatwia przepływ *B. burgdorferi* z wektora do gospodarza [52].

6. Białka kleszcza wykorzystywane przez *B. burgdorferi* podczas zakażenia organizmu gospodarza

W wyniku koewolucji pomiędzy kleszczem a *B. burgdorferi* ukształtował się niezwykle specyficzny system oddziaływań. Z jednej strony umożliwia on efektywną kolonizację wektora przez bakterię, z drugiej ułatwia transfer bakterii z kleszcza do gospodarza. Kleszcze, jako pasożyty, niemal do perfekcji doprowadziły zdolność przełamania systemu obronnego gospodarza, krętki tymczasem nauczyły się jak zdolności te wykorzystywać do własnych celów.

W ślinie kleszczy obficie występują czynniki o działaniu przeciwkrzepowym rozkurczającym naczynia krwionośne, przeciwzapalnym oraz immunomodulującym [49]. Agregacja płytek krwi prowadząca do utworzenia skrzepu stanowi jeden z krytycznych mechanizmów utrzymujących hemostazę naczyń krwionośnych.

Za inicjację procesu krzepnięcia odpowiedzialne są trombocyty. W wyniku ich aktywacji uwalniane są liczne czynniki białkowe i niebiałkowe niezbędne do powstania skrzepu, m.in. ADP, serotonina, kolagen, trombina, czynnik PAF (*platelet-activating factor*) oraz tromboksan A2. W ekstrakcie pochodzącym z gruczołów ślinowych kleszcza zidentyfikowano wiele inhibitorów przeciwdziałających agregacji trombocytów *in vitro*. Należą do nich m.in. apyraza, czyli enzym hydrolizujący ADP i ATP, a także prostacyklina PGI₂ oraz dezintegriny zapobiegające wiązaniu się fibrynogenu z płytkami krwi. Inne antykoagulanty występujące w ślinie kleszcza to inhibitory proteaz typu Kunitza, białka Salp9 i Salp14 pochodzące z *I. scapularis* oraz związki wiążące trombinę i czynnik Xa. Dodatkowo u *Haemaphysalis longicornis*, należącego do rodziny kleszczy twardych, odkryto białko będące silnym inhibitorem procesu angiogenezy [18]. Substancje te z pewnością w sposób pośredni ułatwiają przenoszonym przez kleszcza drobnoustrojom inwazję organizmu kręgowca.

System odpornościowy gospodarza stanowi kolejną barierę, którą muszą pokonać nie tylko kleszcze, lecz i krętki. W odpowiedzi na uszkodzenie skóry oraz obecność antygenów organizm kręgowca produkuje między innymi cytokiny oraz białka należące do układu dopełniacza. Stwierdzono, że kleszcze z rodziny obrzeżkowatych wytwarzają lipokalinę, która jest inhibitorem konwertazy C5, dzięki czemu blokuje zarówno klasyczną, jak i alternatywną drogę aktywacji dopełniacza [31]. Dowiedziono, że ślina *I. scapularis* hamuje działanie neutrofilów oraz dezaktywuje anafilatoksyny [18]. Wykazano, że ekstrakt gruczołów ślinowych kleszcza hamuje wydzielanie przez makrofagi oraz komórki dendrytyczne cytokin wywołujących zapalenie (IL-1, IL-12 i TNF- α) [9, 38]. Podobne działanie śliny kleszcza, czyli blokowanie produkcji IL-2 i TNF- γ obserwowano w przypadku limfocytów [18]. U *I. ricinus* opisano białko Iris (*I. ricinus immunosuppressor*), które także hamuje produkcję cytokin prozapalnych [25]. Jednym z białek kleszczowych blokujących dopełniacz, a wykorzystywanych przez *B. burgdorferi*, jest Salp20. Homologiczne białka IRAC I i IRAC II, hamujące alternatywną ścieżkę ludzkiego dopełniacza odkryte u *I. ricinus* [13, 14]. W testach *in vitro* wykazano, że Salp20 zapobiega lizie wrażliwych na serum szczepów *B. burgdorferi*. Możliwe jest zatem, że białko to chroni bakterię przed dopełniaczem, nie tylko w trakcie jej transferu z gospodarza do wektora, ale także we krwi już pobranej i znajdującej się w jelicie kleszcza [35]. Inne białko *I. ricinus*, Salp15, blokuje produkcję IL-2, przez co uniemożliwia aktywację limfocytów T CD4. Białko to oddziałuje z opisaną wcześniej lipoproteiną powierzchniową *B. burgdorferi* OspC. Dzięki temu oddziaływaniu bakterie mogą bez przeszkód wnikać do organizmu żywiciela, gdyż na ich powierzchni tworzy się ochronny płaszcz z białka

Salp15, który chroni je przed przeciwciałami rozpoznającymi białko OspC. Co więcej, zachodzące oddziaływanie pomiędzy OspC i Salp15 może być korzystne również dla kleszcza. Wykazano bowiem, że *B. burgdorferi* indukuje powstawanie większych ilości białka Salp15, dzięki czemu skuteczniej blokowany jest układ odpornościowy. W konsekwencji kleszcz posiada lepsze warunki do żerowania [39]. Kolejne białko wytwarzane w śliniankach i jelicie kleszcza, Salp25D, jest homologiem peroksyredoksyn i należy do rodziny tio-redoksyno-zależnych peroksydaz [29]. Białka tego typu występują powszechnie u organizmów żywych i odpowiedzialne są za enzymatyczną dezaktywację m.in. nadtlenu wodoru. Wykazano, że Salp25D skutecznie wymiata wolne rodniki tlenowe produkowane przez zaktywowane neutrofile, chroniąc w ten sposób *B. burgdorferi* przed stresem oksydacyjnym [15]. Wyciszenie ekspresji Salp25D w śliniankach kleszcza znacząco redukuje liczbę krętków w roztoczach po tym, jak spożyły one krew myszy zainfekowanych *B. burgdorferi*. Badania myszy immunizowanych Salp25D i zainfekowanych krętkiem wykazały, że immunoglobuliny skierowane przeciwko Salp25D blokują napływ krętków do kleszczy. Ciekawym wydaje się również fakt, iż wyciszenie *salp25D* w śliniankach hamuje przepływ *B. burgdorferi* do kleszcza, podczas gdy wyciszenie tego genu w jelicie nie wywołuje analogicznego efektu. Wynik powyższego doświadczenia sugeruje, że Salp25D odgrywa istotną rolę w miejscu ukąszenia przez kleszcza [29].

Powstrzymanie u gospodarza reakcji wywołującej ból i swędzenie może być jednym z istotnych czynników decydujących o powodzeniu strategii pasożytniczej kleszcza. Jednym z pierwszych mediatorów bólu jest ATP uwalniany z uszkodzonych komórek. Wykazano, że ślina kleszczy zawiera enzymy degradujące ATP. Obok ATP, bradykinina jest kolejnym związkiem pośredniczącym w wywoływaniu poczucia bólu. Dowiedziono, że bradykinina jest degradowana przez występującą w ślinie kleszcza kininazę [18]. Serotonina i histamina uwalniane przez trombocyty i komórki tuczne również indukują powstawanie bólu, a także zwiększają przepuszczalność naczyń krwionośnych. U kleszczy z rodzaju *Dermacentor* wykryto białko SHBP (*serotonine and histamine binding protein*) wiążące obydwa wyżej wymienione związki [44]. Efekt wazodylatacji, czyli rozkurczu mięśni gładkich w ścianie naczyń krwionośnych, umożliwia kleszczowi efektywniejsze ssanie krwi. W ślinie kleszcza znaleziono prostaglandyny PGE₂ i PGF_{2α}, które działają jak substancje wazodylatacyjne [45]. Dodatkowo, związki te podnoszą ciśnienie krwi w kapilarach, co w połączeniu z większą przepuszczalnością naczyń skutkuje intensywniejszym napływem krwi do tkanki w miejscu ugryzienia [18]. Nie odkryto do tej pory czynników bakteryjnych uwikłanych w bezpośrednie oddziaływanie z tą grupą białek kleszcza, jednak

działanie czynników łagodzących ból czy wazodylatacyjnych z pewnością wpływa korzystnie na proces infekcji kręgowca przez *B. burgdorferi*.

6. Podsumowanie

Oddziaływania pomiędzy krętkami *B. burgdorferi*, kleszczami i kręgowcami stanowią niezwykle interesujący i skomplikowany przykład wzajemnego dopasowania pomiędzy pasożytem, wektorem i żywicielem. W ciągu minionych 30 lat nastąpił duży postęp w identyfikacji substancji produkowanych przez gruczoły ślinowe kleszcza, które ułatwiają mu żerowanie. Częsteczkami te współgrają ze sobą w celu ominięcia systemu obronnego kręgowca. Pasożyt reguluje dopływ krwi do miejsca ugryzienia w taki sposób, aby pobrać jak największą ilość pożywienia, a jednocześnie nie uruchomić odpowiedzi układu immunologicznego gospodarza. *B. burgdorferi*, a także inne drobnoustroje chorobotwórcze wykorzystują immunomodulacyjne właściwości śliny kleszcza, aby skuteczniej infekować ssaka. Rosnąca wiedza o tych procesach i czynnikach, które w nich uczestniczą stwarza dużą szansę na stworzenie nowych efektywnych metod ograniczających rozprzestrzenianie się zarówno kleszczy jak i roznoszonych przez nie patogenów [35].

Artykuł powstał w wyniku realizacji grantu MNiSW N N302 041536 oraz Programu MPD „Structural biology of plants and microbes”, finansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego i z budżetu państwa.

Piśmiennictwo

- Alverson J., Bundle S.F., Sohaskey C.D., Lybecker M.C., Samuels D.S.: Transcriptional regulation of the ospAB and ospC promoters from *Borrelia burgdorferi*. *Mol. Microbiol.* **48**, 1665–1677 (2003)
- Anguita J., Fikrig E. i wsp.: Salp15, an *Ixodes scapularis* salivary protein, inhibits CD4⁺ T cell activation. *Immunity*, **16**, 849–859 (2002)
- Blevins J.S., Xu H., He M., Norgard M.V., Reitzer L., Yang X.F.: Rrp2, a σ⁵⁴-dependent transcriptional activator of *Borrelia burgdorferi*, activates rpoS in an enhancer-independent manner. *J. Bacteriol.* **191**, 2902–2905 (2009)
- Boardman B.K., He M., Ouyang Z., Xu H., Pang X., Yang X.F.: Essential role of the response regulator Rrp2 in the infectious cycle of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* **76**, 3844–3853 (2008)
- Brossard M., Wikel S.K.: Tick immunobiology. *Parasitology*, **129**, 161–176 (2004)
- Caimano M.J., Iyer R., Eggers C.H., Gonzalez C., Morton E.A., Gilbert M.A., Schwartz I., Radolf J.D.: Analysis of the RpoS regulon in *Borrelia burgdorferi* in response to mammalian host signals provides insight into RpoS function during the enzootic cycle. *Mol. Microbiol.* **65**, 1193–1217 (2007)
- Caimano M.J., Kenedy M.R., Kairu T., Desrosiers D.C., Harman M., Dunham-Ems S., Akins D.R., Pal U., Radolf J.D.: The hybrid histidine kinase Hk1 is part of a two-component system

- that is essential for survival of *Borrelia burgdorferi* in feeding *Ixodes scapularis* ticks. *Infect. Immun.* **79**, 3117–3130 (2011)
8. Casjens S., Fraser C.M. i wsp.: A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Mol. Microbiol.* **35**, 490–516 (2000)
 9. Cavassani K.A., Aliberti J.C., Dias A.R., Silva J.S., Ferreira B.R.: Tick saliva inhibits differentiation, maturation and function of murine bone-marrow-derived dendritic cells. *Immunology*, **114**, 235–245 (2005)
 10. Chmielewska-Badora J.: Seroepidemiologic study of Lyme boreliosis in the Lublin Region. *Ann. Agric. Environ. Med.* **5**, 183–186 (1998)
 11. Cisak E., Chmielewska-Badora J., Zwoliński J., Wójcik-Fatla A., Polak J., Dutkiewicz J.: Risk of tick-borne bacterial diseases among workers of Roztocze National Park (South-Eastern Poland). *Ann. Agric. Environ. Med.* **12**, 127–132 (2005)
 12. Coleman J.L., Gebbia J.A., Piesman J., Degen J.L., Bugge T.H., Benach J.L.: Plasminogen is required for efficient dissemination of *B. burgdorferi* in ticks and for enhancement of spirochetemia in mice. *Cell*, **89**, 1111–1119 (1997)
 13. Couvreur B., Godfroid E. i wsp.: Variability and action mechanism of a family of anticomplement proteins in *Ixodes ricinus*. *PLoS One*, **3**, e1400 (2008)
 14. Daix V., Vanderplasschen A. i wsp.: *Ixodes* ticks belonging to the *Ixodes ricinus* complex encode a family of anticomplement proteins. *Insect. Mol. Biol.* **16**, 155–166 (2007)
 15. Das S., Banerjee G., DePonte K., Marcantonio N., Kantor F.S., Fikrig E.: Salp25D, an *Ixodes scapularis* antioxidant, is 1 of 14 immunodominant antigens in engorged tick salivary glands. *J. Infect. Dis.* **184**, 1056–1064 (2001)
 16. Derdákóvá M., Lenčáková D.: Association of genetic variability within the *Borrelia burgdorferi sensu lato* with the ecology, epidemiology of Lyme borreliosis in Europe. *Ann. Agric. Environ. Med.* **12**, 165–172 (2005)
 17. Dzierżęcka M., Barszcz K.: Borelioza z Lyme u ludzi oraz zwierząt domowych i dziko żyjących. *Kosmos*, **59**, 91–98 (2010)
 18. Francischetti I.M., Sa-Nunes A., Mans B. J., Santos I.M., Ribeiro J.M.: The role of saliva in tick feeding. *Front. Biosci.* **14**, 2051–2088 (2009)
 19. Fraser C.M., Venter J.C. i wsp.: Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature*, **390**, 580–586 (1997)
 20. Grewe C., Nuske J.H.: Immunolocalization of a 22 kDa protein (IPLA7, P22) of *Borrelia burgdorferi*. *FEMS Microbiol. Lett.* **138**, 215–219 (1996)
 21. 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)
 22. Hyde, J.A., Shaw D.K., Smith R. III, Trzeciakowski J.P., Skare J.T.: The BosR regulatory protein of *Borrelia burgdorferi* interfaces with the RpoS regulatory pathway and modulates both the oxidative stress response and pathogenic properties of the Lyme disease spirochete. *Mol. Microbiol.* **74**, 1344–1355 (2009)
 23. Karna S.L., Sanjuan E., Esteve-Gassent M.D., Miller C.L., Maruskova M., Seshu J.: CsrA modulates levels of lipoproteins and key regulators of gene expression critical for pathogenic mechanisms of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* **79**, 732–744 (2011)
 24. Kostick J.L., Szkotnicki L.T., Rogers E.A., Bocci P., Raffaelli N., Marconi R.T.: The diguanylate cyclase, Rrp1, regulates critical steps in the enzootic cycle of the Lyme disease spirochetes. *Mol. Microbiol.* **81**, 219–231 (2011)
 25. Leboulle G., Crippa M., Decrem Y., Mejri N., Brossard M., Bollen A., Godfroid E.: Characterization of a novel salivary immunosuppressive protein from *Ixodes ricinus* ticks. *J. Biol. Chem.* **277**, 10083–10089 (2002)
 26. Li X., Pal U., Ramamoorthi N., Liu X., Desrosiers D.C., Eggers C.H., Anderson J.F., Radolf J.D., Fikrig E.: The Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi* requires BB0690, a Dps homologue, to persist within ticks. *Mol. Microbiol.* **63**, 694–710 (2007)
 27. Lybecker M.C., Abel C.A., Feig A.L., Samuels D.S.: Identification and function of the RNA chaperone Hfq in the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Mol. Microbiol.* **78**, 622–635 (2010)
 28. Lybecker M.C., Samuels D.S.: Temperature-induced regulation of RpoS by a small RNA in *Borrelia burgdorferi*. *Mol. Microbiol.* **64**, 1075–1089 (2007)
 29. Narasimhan S., Fikrig E. i wsp.: A tick antioxidant facilitates the Lyme disease agent's successful migration from the mammalian host to the arthropod vector. *Cell Host. Microbe*, **2**, 7–18 (2007)
 30. Neelakanta G., Li X., Pal U., Liu X., Beck D. S., DePonte K., Fish D., Kantor F.S., Fikrig E.: Outer surface protein B is critical for *Borrelia burgdorferi* adherence and survival within *Ixodes* ticks. *PLoS Pathog.* **3**, e33 (2007)
 31. Nunn M.A., Sharma A., Paesen G.C., Adamson S., Lissina O., Willis A.C., Nuttall P.A.: Complement inhibitor of C5 activation from the soft tick *Ornithodoros moubata*. *J. Immunol.* **174**, 2084–2091 (2005)
 32. Pal U., Dai J., Li X., Neelakanta G., Luo P., Kumar M., Wang P., Yang X., Anderson J.F., Fikrig E.: A differential role for BB0365 in the persistence of *Borrelia burgdorferi* in mice and ticks. *J. Infect. Dis.* **197**, 148–155 (2008)
 33. Pal U., Fikrig E. i wsp.: TROSPA, an *Ixodes scapularis* receptor for *Borrelia burgdorferi*. *Cell*, **119**, 457–468 (2004)
 34. Pal U., Yang X., Chen M., Bockenstedt L.K., Anderson J.F., Flavell R.A., Norgard M.V., Fikrig E.: OspC facilitates *Borrelia burgdorferi* invasion of *Ixodes scapularis* salivary glands. *J. Clin. Invest.* **113**, 220–230 (2004)
 35. Pal U., Fikrig E. (w) *Borrelia*: Molecular Biology, Host Interactions, and Pathogenesis, red. Samuels D. S., Radolf J. D., Caister Academic, Norfolk, 279–298 (2010)
 36. Piesman J., Schwan T.G. (w) *Borrelia*: Molecular Biology, Host Interactions, and Pathogenesis, red. Samuels D.S., Radolf J.D., Caister Academic, Norfolk, 251–278 (2010)
 37. Radolf J.D., Caimano M.J., Stevenson B., Hu L.T.: Of ticks, mice and men: understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 87–99 (2012)
 38. Ramachandra R.N., Wikel S.K.: Modulation of host-immune responses by ticks (*Acari: Ixodidae*): effect of salivary gland extracts on host macrophages and lymphocyte cytokine production. *J. Med. Entomol.* **29**, 818–826 (1992)
 39. Ramamoorthi N., Fikrig E. i wsp.: The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. *Nature*, **436**, 573–577 (2005)
 40. Rauer S., Wallich R., Neubert U.: Recombinant low-molecular-mass proteins pG and LA7 from *Borrelia burgdorferi* reveal low diagnostic sensitivity in an enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 2039–2040 (2001)
 41. Ren B., Tibbelin G., Kajino T., Asami O., Ladenstein R.: The multi-layered structure of Dps with a novel di-nuclear ferroxidase center. *J. Mol. Biol.* **329**, 467–477 (2003)
 42. Revel A.T., Blevins J.S., Almazán C., Neil L., Kocan K.M., de la Fuente J., Hagman K.E., Norgard M.V.: *bptA* (*bbe16*) is essential for the persistence of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, in its natural tick vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 6972–6977 (2005)
 43. Samuels D.S.: Gene regulation in *Borrelia burgdorferi*. *Annu. Rev. Microbiol.* **65**, 479–499 (2011)
 44. Sangamnatdej S., Paesen G.C., Slovak M., Nuttall P.A.: A high affinity serotonin- and histamine-binding lipocalin from tick saliva. *Insect. Mol. Biol.* **11**, 79–86 (2002)

45. Sá-Nunes A., Bafica A., Lucas D.A., Conrads T.P., Veenstra T.D., Andersen J.F., Mather T.N., Ribeiro J.M., Francischetti I.M.: Prostaglandin E2 is a major inhibitor of dendritic cell maturation and function in *Ixodes scapularis* saliva. *J. Immunol.* **179**, 1497–1505 (2007)
46. Śpiewak R.: Zawodowe choroby skóry u rolników indywidualnych. *Post. Dermatol. Alergol.* **21**, 278–285 (2004)
47. Srivastava S.Y., de Silva A.M.: Reciprocal expression of ospA and ospC in single cells of *Borrelia burgdorferi*. *J. Bacteriol.* **190**, 3429–3433 (2008)
48. Tilly K., Bestor A., Jewett M.W., Rosa P.: Rapid clearance of Lyme disease spirochetes lacking OspC from skin. *Infect. Immun.* **75**, 1517–1519 (2007)
49. Valenzuela J.G., Francischetti I.M., Pham V.M., Garfield M.K., Mather T.N., Ribeiro J.M.: Exploring the sialome of the tick *Ixodes scapularis*. *J. Exp. Biol.* **205**, 2843–2864 (2002)
50. Weis J.J., Bockenstedt L.K. (w) *Borrelia: Molecular Biology, Host Interactions, and Pathogenesis*, red. Samuels D.S., Radolf J.D., Caister Academic, Norfolk, 413–441 (2010)
51. Wodecka B., Skotarczak B.: Genetyczna zmienność *Borrelia burgdorferi* s. l. u kleszczy *Ixodes ricinus* zebranych w północno-zachodniej Polsce. *Wiad. Parazytol.* **46**, 475–485 (2000)
52. Xu H., He M., He J.J., Yang X.F.: Role of the surface lipoprotein BBA07 in the enzootic cycle of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* **78**, 2910–2918 (2010)
53. Xu Q., McShan K., Liang F.T.: Essential protective role attributed to the surface lipoproteins of *Borrelia burgdorferi* against innate defences. *Mol. Microbiol.* **69**, 15–29 (2008)
54. 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)
55. Zhang X., Yang X., Kumar M., Pal U.: BB0323 function is essential for *Borrelia burgdorferi* virulence and persistence through tick-rodent transmission cycle. *J. Infect. Dis.* **200**, 1318–1330 (2009)
56. Zhang L., Zhang Y., Adusumilli S., Liu L., Narasimhan S., Dai J., Zhao Y.O., Fikrig E.: Molecular interactions that enable movement of the Lyme disease agent from the tick gut into the hemolymph. *PLoS Pathog.* **7**, e1002079 (2011)