

**Biologická fakulta Jihočeské univerzity
v Českých Budějovicích**



**Spirochéty Lymeské boreliózy:
kultivace *in vitro*, molekulární identifikace druhového
složení izolátů a pokus o průkaz vázat sacharidy.**

Bakalářská diplomová práce

Lenka Bučinská

2007

Vedoucí práce: Nataliia Rudenko, PhD.

Marina Golovchenko, MSc.

Fakultní garant: Prof. RNDr. Libor Grubhoffer, CSc.

Bakalářská diplomová práce

Bučinská L., 2007: Spirochéty Lymeské boreliózy: kultivace *in vitro*, molekulární identifikace druhového složení izolátů a pokus o průkaz vázat sacharidy. [Lyme borreliosis spirochaetes: *in vitro* cultivation, molecular identification of species compound in isolates and an attempt to prove the carbohydrate binding ability]. Bc. Thesis, in Czech. 45 p., Faculty of Biological Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

Several isolates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato obtained from *Ixodes ricinus* ticks in the area of České Budějovice were successfully cultivated *in vitro*. Polymerase chain reaction was used for species determination using species-specific primers for *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii* and *B. valaisiana*. We demonstrated protein profiles of these isolates using protein separation with SDS-PAGE and the ability of *Borrelia* spp. to bind the carbohydrates probes was analyzed using the Western blotting method.

Bakalářská diplomová práce byla financována z grantů SGA2007/006 from the Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia; grant výzkumného centra LC 06009 a výzkumné záměry PAU BC AV ČR Z60220518 a BF JU 6007665801.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě, Biologickou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, 4.5.2007

.....

Lenka Bučinská

Ráda bych poděkovala svým školitelkám, Nataše Rudenko, Marině Golovchenko a Marušce Vancové za cenné rady, pomoc a podporu při zpracovávání této práce. Také bych chtěla poděkovat profesorovi Liborovi Grubhofferovi za příležitost pracovat v Laboratoři molekulární biologie vektorů a patogenů. Děkuji také Janě Horáčkové, Tereze Matějovské a ostatním členům laboratoře za příjemnou a přátelskou atmosféru v laboratoři.

Mým rodičům děkuji za lásku a podporu během studia.

Obsah

1. ÚVOD.....	6
1.1. Charakteristické rysy rodu <i>Borrelia</i>	6
1.2. Infekční cyklus.....	8
1.3 Vnější povrchové proteiny – Osp (‘Outer surface protein‘).....	9
1.4 Další membránové proteiny.....	10
1.5 Glykoproteiny a další glykokonjugáty v LB spirochétách.....	10
1.6 Lektiny.....	11
1.6.a) Lektiny spirochét LB.....	12
1.6.b) Nástroje ke zkoumání lektinů.....	12
2. CÍLE PRÁCE	13
3. MATERIÁL A METODY.....	14
3.1. Materiál.....	14
3.1.1. Spirochéty <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato.....	14
3.1.2. Použité primery.....	14
3.1.3. Použité chemikálie a kity.....	14
3.1.4. Používaná zařízení.....	16
3.2. Metody.....	16
3.2.1. Kultivace spirochét lymeské boreliózy (LB).....	16
3.2.2. Odběr spirochét LB.....	16
3.2.3. Izolace genomové DNA <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato.....	17
3.2.4. PCR (‘Polymerase Chain Reaction‘).....	17
3.2.5. Elektroforéza.....	18
3.2.6. Purifikace PCR produktu.....	19
3.2.7. Klonování PCR produktu.....	19
3.2.8. Transformace ‘One Shot [®] TOP10 <i>E.coli</i> Komplement Cells‘.....	19
3.2.9. Izolace plazmidové DNA.....	20
3.2.10. Sekvenování.....	20
3.2.11. Izolace a měření koncentrace proteinů.....	21
3.2.11.a) TPI (‘Total protein isolation‘).....	21
3.2.11.b) Izolace proteinů s jejich uvolněním pomocí sonikace.....	21
3.2.11.c) Měření koncentrace podle metody Bradfordové.....	21
3.2.12. Dialýza proteinů.....	22

3.2.13. Elektroforetická analýza proteinů pomocí SDS-PAGE.....	22
3.2.13.a) Příprava gelu.....	22
3.2.13.b) Příprava vzorků.....	22
3.2.13.c) Barvení gelu.....	22
3.2.14. Nativní elektroforéza v polyakrylamidovém gelu ('Blue Native PAGE').....	23
3.2.14.a) Příprava gelu.....	23
3.2.14.b) Příprava vzorků.....	23
3.2.14.c) Barvení gelu.....	23
3.2.15. Nativní gradientová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu ('Pore limit gradient PAGE').....	24
3.2.15.a) Příprava gelu.....	24
3.2.15.b) Příprava vzorků.....	24
3.2.15.c) Barvení gelu.....	24
3.2.16. Přenos proteinů metodou 'Western blotting'.....	24
3.2.16.a) Přenos proteinů na membránu.....	25
3.2.16.b) Značení pomocí sacharidových sond.....	25
4. VÝSLEDKY.....	27
4.1. PCR.....	27
4.2. Kontrola zaklonovaného PCR produktu.....	29
4.3. Sekvenování produktu PCR.....	30
4.4. Analýza proteinů SDS-PAGE.....	30
4.5. Separace proteinů nativní elektroforézou 'Blue Native-PAGE' a nativní gradientovou PAGE.....	33
4.6. Značení pomocí sacharidových sond.....	34
5. DISKUSE.....	38
6. ZÁVĚR.....	40
7. POUŽITÁ LITERATURA.....	41

1. ÚVOD

Lymeská borelióza (LB) je závažné onemocnění se značným epidemiologickým dopadem pro člověka, některá užitková zvířata a skot převážně v oblastech mírného pásma v Evropě, USA a Asii (Burgdorfer 2001). Způsobují ji spirochéty z druhového komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Lymeská borelióza má hlášené desítky tisíc případů za rok v Severní Americe i v centrální Evropě, což z ní činí pravděpodobně nejčastější klíšťaty přenášené bakteriální onemocnění na světě.

1.1 Charakteristické rysy rodu *Borrelia*

Spirochéty rodu *Borrelia* patří spolu se spirochétami rodů *Treponema* a *Leptospira* do kmene *Spirochaetes*. Fylogeneticky se spirochéty značně odlišují od ostatních bakteriálních kmenů. Spirochéty jsou dlouhé, tenké a šroubovitě vinuté bakterie s bičíkem probíhajícím podélně mezi peptidoglykanovou vrstvou a vnější membránou.

Spirochéty rodu *Borrelia* jsou aktivně pohyblivé gram-negativní spirálovité bakterie, dlouhé 10 až 30 μm a velmi tenké 0.2 až 0.25 μm . Závity spirochéty jsou od sebe vzdáleny 2.2 μm a jejich počet je mezi 4 až 15 závitů. Počet bičků se liší, patogenní borélie jich mohou mít až 20 (Bartůněk *et al.* 1996). Bičíky vystupují na obou koncích buňky z bazálních disků, které jsou umístěny v cytoplazmatické membráně a obtáčí tělo bakterie mezi peptidoglykanovou vrstvou a vnější membránou. Borélie se pohybuje rotací podél osy nebo smršťováním a natahováním.

Spirochéty *in vitro* rostou v microaerofilních podmínkách a vyžadují vysoce obohacené komplexní médium s N-acetylglukosaminem, aminokyselinami, vitaminy a nukleotidy, albuminem z hovězího séra a králičím sérem. Bývá označováno jako médium Barbour-Stoenner-Kelly (BSK). Borélie rostou při optimální teplotě 33-34°C s generační dobou 7-20 hodin (Bednář *et al.* 1996).

Spirochéty z rodu *Borrelia* jsou jedinými z celého kmene, které obsahují linerální chromozóm. Podobně jako treponémy, také borélie postrádají lipopolysacharidy (LPS) ve vnější membráně. Ty jsou u nich nahrazeny lipooligosacharidy (LOS).

Buněčná stěna spirochét se skládá z vnitřní peptidoglykanové vrstvy, střední vrstvy lipooligosacharidové a vnější vrstvy lipoproteinové. Stěna je oddělena periplazmatickým prostorem od cytoplazmatické membrány. Velká flexibilita membrán buněčné stěny umožňuje vysunutí bičků v proximálním i distálním směru, tvorbu cyst a vylučování membránových vezikulů.

Borrelia burgdorferi byla původně taxonomicky popsána jako samostatný druh. Ukázalo se však, že se skládá z celé řady odlišných druhů a genomových skupin ('genospecies'). U spirochét LB se proto používá název *Borrelia burgdorferi* sensu lato k označení celého druhového komplexu včetně všech izolátů/kmenů druhově blíže neurčených.

Doposud bylo popsáno 13 druhů/'genospecies'. Odlišují se rozdílnou genomovou sekvencí a různým antigenním profilem, odlišným zastoupením strukturálních složek a jejich různou funkční aktivitou. Dále se tyto druhy liší svým geografickým rozšířením a jsou také spojeny s různými vektory a hostiteli. Těmito druhy jsou: *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. bissettii*, *B. japonica*, *B. turdi*, *B. tanukii*, *B. andersonii*, *B. sinica*, *B. spielmani* a *B. californiensis* (Postic *et al.* 2007; Bergström *et al.* 2002; Postic *et al.* 1994).

V Evropě se nejčastěji vyskytuje *B. garinii* a *B. afzelii*, dále se zde objevuje i *B. valaisiana* (Rijpkema *et al.* 1996), naopak druhy *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. lusitaniae* a *B. bissettii* patří k poněkud vzácnějším (Hanincová *et al.* 2003). V Asii jsou nejčastěji zastoupeny *B. afzelii* a *B. garinii*, ale vyskytuje se zde také *B. sinica* (Masuzawa 2004), *B. japonica*, *B. tanukii*, a *B. turdi* jsou výskytem omezené pouze na Japonsko (Fukunaga *et al.* 1996). V Severní Americe se vyskytuje zejména *B. burgdorferi* sensu stricto, která byla donedávna spojována s výskytem na západním pobřeží USA (Kalifornie). Předpokládá se, že se odtud rozšířila také na východní pobřeží a dále do Evropy (Postic *et al.* 2007). V USA byly popsány další dva potenciální původci onemocnění *B. andersonii* a *B. bissettii* (Postic *et al.* 1998).

Celkem čtyři druhy z komplexu *B. burgdorferi* sensu lato-*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii* a *B. spielmani* jsou zodpovědné za onemocnění LB v různých částech světa. Ovšem také další dva blízké příbuzné druhy *B. valaisiana* a *B. lusitaniae* byly identifikovány v patologických nálezech erythema migrans pacientů (Rijpkema *et al.* 1997; Postic *et al.* 2007).

Symptomy LB korespondují s geografickým rozšířením jednotlivých druhů původců onemocnění. Například v USA jsou častější symptomy artritidy, toto onemocnění je spojováno s nákazou spirochétami *B. burgdorferi* sensu stricto. V Evropě převažují neurologické potíže způsobené spirochétou druhu *B. garinii* a kožní formy onemocnění vyvolané spirochétou *B. afzelii* (Demaerschalcck *et al.* 1995, Baranton *et al.* 1992, Wang *et al.* 1999).

1.2. Infekční cyklus

LB je považována za zoonózu, protože její původce *B. burgdorferi* sensu lato cirkuluje v přirozeném infekčním cyklu mezi klíšťaty rodu *Ixodes* a druhově pestrými obratlovci jako klíštěcími hostiteli. Člověk vstupuje do tohoto cyklu více méně nedopatřením, neboť není obvyklým hostitelem klíšťat.

Spirochéty *B. burgdorferi* sensu lato jsou přenášeny všemi vývojovými stádii klíšťat rodu *Ixodes*, larva, nymfa a dospělec. Všechna tato stadia sají na hostiteli jen jednou a po metamorfóze přecházejí do následující etapy vývoje. Klíště rodu *Ixodes* saje 3-7 dní.

Hostiteli klíšťat rodu *Ixodes* jsou zejména drobní obratlovci, ptáci, hlodavci a vysoká zvěř. Bylo potvrzeno, že jednotlivé druhy borélií jsou spojovány s určitými hostiteli. Za rezervoár LB spirochét v přírodě jsou považováni drobní savci. Například z myši a hrabošů bývá nejčastěji izolovaná *B. afzelii* (Humair *et al.* 1999). Hraboši v Asii také přenášejí *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. japonica* a někteří také různé varianty *B. garinii* (Humair *et al.* 1999; Kurtenbach, *et al.* 1995). Američtí křečci a další drobní hlodavci jsou známými rezervoáry pro *B. bissettii* (Maupin *et al.* 1994). Dalším rezervoárem LB spirochét mohou být ptáci. Příkladem mohou být někteří mořští ptáci, ale také pěvci, kteří přenášejí *B. garinii* (Olsen *et al.* 1995). Různé ptačí druhy byly identifikovány také jako hostitelé pro *B. valaisiana* a *B. burgdorferi* sensu stricto (Anderson 1986).

Známými přenašeči spirochét z rodu *Ixodes* jsou zejména *I. ricinus*, *I. persulcatus* v Evropě a Asii a *I. scapularis*, *I. pacificus* v USA. Byla však potvrzena přítomnost borélií i u jiných druhů klíšťat jako jsou *Haemaphysalis concinna* a nebo *Dermacentor silvarum*. Není však známo, že by tyto druhy byly schopny přenášet borélie na dalšího hostitele (Sun a Xu 2003). Studie prokazuje, že pouze u druhu *I. ricinus* přežívají borélie během přeměny do dalšího stadia klíštěte zatímco u druhů *H. concinna* a *D. silvarum* tomu tak není.

Zdravá larva klíštěte se většinou nakazí spirochétami sáním na infikovaném obratlovci nebo je také možný transovariární přenos spirochét. Tento přenos LB spirochét je vzácný a s největší pravděpodobností by nestačil udržet patogenního původce nákazy v populaci přenašeče (Schoeler a Lane 1993). Borélie setrvávají přes svlékání do dalšího stadia klíštěte ve střevě a neinfikují další tkáň nebo orgány klíštěte (Rosa *et al.* 2005). Pouze malé množství spirochét je v tuto dobu dočasně přítomno v slinných žlázách a ty možná nejsou infekční. K účinnému přenosu spirochét LB z nakaženého klíštěte dochází přibližně po 48 hodinách po přichycení klíštěte na povrch hostitele. Saje-li již infikovaná nymfa krev, vlivem změn podmínek prostředí dochází ke zmnožení spirochét ve střevě. Některé borélie opouštějí střevo

a migrují do slinných žláz, odkud jsou přenášeny slinami do hostitele. Neinfikovaný hostitel se nejpravděpodobněji setká s boréliemi, pokud na něm saje infikovaná nymfa. Výskyt infekce je nejvyšší u nymf, jsou tedy zřejmě nejdůležitějším vektorovým stádiem infikujícím člověka ve střední Evropě a vzhledem k jejich nepatrné velikosti mohou být snadno přehlédnutelné (Hubálek *et al.* 1991).

1.3 Vnější povrchové proteiny – Osp ('Outer surface protein')

Genom spirochéty *Borrelie burgdorferi* kóduje velký počet lipoproteinů. Většina z nich je lokalizována ve vnější membráně a pravděpodobně hraje důležitou roli v přenosu spirochét. Mezi snad nejvíce prostudované lipoproteiny spirochét *B. burgdorferi* patří zejména dva: vnější povrchový protein A (OspA) a vnější povrchový protein C (OspC).

OspC vystupuje jako dimér velkého α -helikálního proteinu s potenciálním vázebným místem pro malý ligand. Jeho molekulová hmotnost je 21-25 kDa. Terciární struktura OspA (31 kDa) je vytvořena zejména z β -listů a je velmi odlišná od OspC snad s jedinou výjimkou a tou je přítomnost vázebných míst pro malý ligand (Rosa *et al.* 2005).

Geny kódující OspA a OspB se nacházejí na lineárním plazmidu lp54 a gen pro OspC je umístěn na kruhovém plazmidu cp26. OspC je vysoce variabilní v každém druhu spirochét LB a může být použit k odlišení mezi jednotlivými skupinami příbuzných klonů (Schwan *et al.* 1995; Pal *et al.* 2000, Grimm *et al.* 2004).

Dalšími povrchovými antigeny *B. burgdorferi* jsou lipoproteiny OspD (28 kDa, lineární plazmid lp38), OspE (19 kDa, na kruhovém plazmidu cp32), OspF (26 kDa na lineárním plazmidu lp36) a protein p27 (na lineárním plazmidu lp54).

Antigen OspA je hojný na povrchu spirochéty *B. burgdorferi* ve střevě nenasátého klíštěte. Jakmile klíště začne sát krev hostitele, dochází ke snížení syntézy OspA a naopak k nástupu syntézy OspC. Předpokládá se, že toto přepnutí v syntéze povrchových proteinů spirochéty je nezbytné pro migraci ze střeva do slinných žláz klíštěte.

V experimentálním infekčním cyklu bylo prokázáno že, spirochéty s chybějícím genem ospC nebyly schopny kolonizovat hostitele (myš), avšak byly schopny kolonizovat střevo uměle nakažené larvy. Spirochéty zde přetrvaly přes svlékání larvy a migrovaly do slinných žláz během sání nymfy (Grimm *et al.* 2004; Rosa *et al.* 2005). Laboratorní myši, na kterých sály takto nakažené nymfy, nemohly být infikovány. Tyto výsledky jsou důkazem, že přepnutí exprese OspA a OspC je spojeno s přípravou spirochéty na přenos do savčího hostitele. Další studie ukázala, že spirochéty postrádající gen pro OspC infikovaly klíště,

ale nebyly schopny kolonizovat slinné žlázy klíštěte. Proto přepnutí OspA na OspC je spíše nezbytné k migraci spirochéty do slinných žláz. Je velmi pravděpodobné, že OspC zastává roli adhesinu ve slinných žlázách. (Pal *et al.* 2004; Rosa *et al.* 2005).

Inaktivace OspA (vypnutím genu) nenaruší schopnost spirochéty infikovat myš nebo způsobit onemocnění (Yang *et al.* 2004). To prokazuje i zjištění, že spirochéty v savčím hostiteli netvoří OspA. Avšak mutant s absencí OspA není schopen účinně kolonizovat klíště, což potvrzuje jeho roli jako adhesinu ve střevě klíštěte (Pal *et al.* 2000).

Spirochéty LB procházejí značnými změnami ve složení svých vnějších membránových proteinů (antigenů) v průběhu celého infekčního cyklu. Důvodem jsou změny okolních podmínek spirochét jako je teplota, pH, živiny a buněčná hustota, měnící se během sání krve na hostiteli. Ukázalo se, že tyto změny provedené *in vitro* ovlivňují přepis genů kódujících proteiny Osp a pravděpodobně hrají roli ve spouštění či vypínání syntézy povrchových proteinů spirochéty během sání klíšťat.

1.4 Další membránové proteiny

Další strukturální proteiny se stále zkoumají, je to například Erp (příbuzný OspEF), který je také syntetizován během počáteční fáze savčí infekce. OspE a VlsE jsou vnější membránové proteiny, které obsahují velmi sekvenčně proměnlivou oblast umožňující boréliím uniknout imunitnímu systému hostitele (McDowell *et al.* 2001).

Povrchové proteiny spirochéty *B. burgdorferi* umožňují kolonizovat savčí buňky adhezí spirochét k mimobuněčné tkáni (Hagman *et al.* 1998). Tyto povrchové lipoproteiny nalezené na povrchu borélie jsou například proteiny vázající decorin (DbpA a DbpB) o velikosti 20-22 kDa. Decorin je glykosaminoglykan asociovaný s kolagenem, který se nachází v různých tkáních včetně kůže a kloubů. Na povrchu borélií byl lokalizován další protein BBK32 (47 kDa), který je schopen specificky vázat fibronectin.

Vnější membránový protein P66 je považován za potencionální receptor pro hostitelský integrin alfa(IIb)beta(3), který je nezbytný pro připojení spirochéty k hostitelské buňce (Defoe a Coburn 2001).

1.5 Glykoproteiny a další glykokonjugáty v LB spirochétách

Bakteriální lipopolysacharidy a peptidoglykany byly až donedávna považovány za jediné bakteriální glykokonjugáty. Strukturální analýzy glykolipidů na povrchu *B. burgdorferi* identifikovaly dva unikátní glykolipidy: BbGl-II(α -galaktosyl-diacyl-glycerolipid)

a BbGL-I(cholesterol 6-O-acyl- β -D-galactopyranosid) (Ben-Menachem *et al.* 2003). Ukázalo se, že glykolipidy spirochét *B. burgdorferi* jsou vysoce antigenní a jsou proto považovány za slibné kandidáty diagnostických antigenů či vakcín (Hossain *et al.* 2001).

Nepřímými metodami bylo zjištěno, že vnější povrchové proteiny/lipoproteiny OspA a OspB několika izolátů LB spirochét a protein bičíku FlaA jsou glykosylovány (Sambri *et al.* 1993; Ge *et al.* 1998). Avšak poslední výzkumy ukázaly, že tomu tak nemusí být (Štěrba *et al.* zasláno do tisku). Zkoumáním *B. burgdorferi* na přítomnost glykoproteinů nebyly nalezeny žádné přímé důkazy o glykosylaci hlavních membránových proteinů OspA a OspB ani jiných strukturálních bičíkových proteinů FlaB a FlaA. Bylo zjištěno, že glykoproteiny přítomné na povrchu *B. burgdorferi* pocházejí z kultivačního média (Vancová *et al.* 2005).

1. 6 Lektiny

Lektiny jsou neenzymatické proteiny, které vratně a s vysokou specifitou váží monosacharidy a oligosacharidy (Sharon a Lis 1995). Vyskytují se široce v přírodě a jsou pravděpodobně přítomny u všech eukaryotických, u mnoha bakteriálních druhů a také některých virů. Lektiny jsou rozpustné nebo vázané v mnohých membránách (Goldstein 1980).

Lektiny některých patogenních organismů slouží jako prostředek pro připojení k hostitelské buňce, což je bezpodmínečně nutné k zahájení infekce. Pokud zablokujeme vazebná místa vhodnými sacharidy, které váží tyto lektiny, mohli bychom zabránit infekci (Sharon a Liz 1995).

Některé z lektinů jsou často považovány za funkční analogy imunoglobulinů v organismech postrádajících specifickou imunitu (Vasta a Marchalonis 1984).

Lektin-sacharidové interakce hrají roli při přenosu spirochét klíšťaty. Jejich význam je v imunitní odpovědi klíšťat proti patogenům a spočívá v regulaci jejich vazebných (hemaglutinačních) aktivit po nasátí krve nebo po proniknutí patogenu do hemolymfy. Lektiny spirochét, mohou rozpoznávat sacharidové části receptorů buněk klíštěte a tím napomáhat v navázání patogenu na tkáň, kde se snadněji vyhne antimikrobiálním nástrojům přenašeče (Grubhoffer *et al.* 2005).

S nárůstem důkazů o existenci protein-sacharidové interakce mezi tkáněmi klíštěte a spirochéty jsou dalším cílem snahy objasnit biologickou roli a význam lektinů ve vztahu klíště-patogen a nakonec navrhnout potenciální blokovací strategie proti přenosu nemoci.

1.6.a) Lektiny spirochét LB

První nálezy hemaglutinační aktivity u borélií byly prokázány u lyzátů *B. burgdorferi* a *B. recurrentis* (Grubhoffer *et al.* 1992, 1993; Rudenko *et al.* 1999). Dále byla také sledována schopnost borélie vázat různé glykosaminoglykany (GAG), které jsou přítomné na povrchu savčích buněk, např. heparin, heparansulfát, dermasulfát a chondroitinsulfát. Byl nalezen protein o molekulové hmotnosti 26 kDa vázající glykosaminoglykany, který byl pojmenován *Borrelia* GAG-vázající protein (Bgp). Tento protein také funguje jako účinný inhibitor aglutinace červených krvinek (Parveen a Leong 2000). Kromě Bgp proteinu byly zjištěny další dva GAG-vázající proteiny. Jsou to decorin vázající proteiny DbpA a DbpB (viz kapitola Další membránové proteiny) z povrchu LB spirochét (Parveen *et al.* 2003).

Na základě hemaglutinační aktivity lyzátu buněk *B. burgdorferi* B31 byl postupně identifikován celý 825 bp dlouhý gen kódující lektin. Analýzou tohoto genu byla odhalena existence dvou možných forem proteinů LEC1/2 (Rudenko *et al.* 2001). Zkoumáním sekvencí aminokyselin byla odhalena přítomnost domén typických pro lektiny ze semena fazole druhu *Phaseolus vulgaris* PHA-E a PHA-L. Lektin borélie byl označen jako LECB31 (Rudenko *et al.* 1999) a jeho sekvence byla zaregistrována v Gen Bank pod číslem AF028001 NCBI (giI3138928). Celá sekvence kódující obě formy LEC molekuly je nyní kompletní (LEC1/2, krátká/dlouhá forma). Také byl získán rekombinantní protein LECB31 (Rudenko *et al.* rukopis v přípravě).

1.6.b) Nástroje ke zkoumání lektinů

K identifikaci a určení četnosti výskytu lektinů v buňkách jsou využívány dvě metody. První je použití protilátek proti lektinům, která je výhodnější pro identifikaci konkrétního lektinu. Druhou možností je využití sacharidových sond (carbohydrate probes), které dovolují odhalit skupinu lektinů se stejnými nebo podobnými sacharid-vázajícími vlastnostmi, ale také detekovat volná vazebná místa pro sacharid. Sacharidové sondy mohou být použity k identifikování nových lektinů se známou a nebo předpokládanou sacharidovou specificitou, dokonce pokud je jejich sekvence neznámá. Takovéto sondy zahrnují nosič, značku a sacharid, díky kterému sonda specificky reaguje se sacharidy-rozpoznávající doménou lektinu.

2. CÍL PRÁCE

1. Pořídít literární studii k tématu povrchových antigenních struktur spirochét druhového komplexu *Borrelia burgdorferi*.
2. Optimalizovat podmínky pro kultivaci borélií v médiu při mikroaerofilních podmínkách.
3. Pomocí molekulárních metod PCR s druhově specifickými primery stanovit zastoupení jednotlivých druhů *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii* a *B. valaisiana* v kulturách borélií.
4. Izolovat proteiny z kultur borélií a následně je rozdělit pomocí elektroforézy v akrylamidovém gelu.
5. Pomocí afinitních technik se značenými sacharidovými sondami prokázat u borélií vazebné aktivity pro sacharidové ligandy.

3. MATERIÁL A METODY

3.1 Materiál

3.1.1 Spirochéty *Borrelia burgdorferi* sensu lato

Borrelia burgdorferi, kmen B31 (ss) byl získán od Dr. J. F. Anderson (Connecticut Agricultural Experiment Station, New Haven, CN). *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* byly získány od Dr. Ian Livey, BAXTER Vaccine AG, Orth/Donau, Rakousko.

Další izoláty borélií používané v této práci pocházely ze sběru klíšťat na lokalitách v okolí Českých Budějovic.

3.1.2. Použité primery

<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto	GI +: 5' AACAAAGACGGCAAGTACGATCTAATT
	GI -: 5' TTACAGTAATTGTTAAAGTTGAAGTGCC
<i>Borrelia garinii</i>	GII +: 5' TGATAAAAACAACGGTCTGGAAC
	GII -: 5' GTAAC TTCAATGTTGTTTTGCCG
<i>Borrelia afzelii</i>	GIII +: 5' TAAAGACAAAACATCAACAGATGAAATG
	GIII -: 5' TTCCAATGTTACTTTATCATTAGCTACTT
<i>Borrelia valaisiana</i>	P8 +: 5' GCAAGTCAAACGGGATGTAGT
	P9 -: 5' GTATTTTATGCATAGACTTTATATG

3.1.3. Použité chemikálie a kity

DNA elektroforéza	50x TAE pufr	200 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA
	Agaróza	1% agarosa (SERVA) pro DNA ELFO v 1xTAE pufru
	5x vzorkový pufr	20% Ficoll, 10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mg/ml Orange G, 500x SYBR Green
Média a pŕdy pro pěstování baktérií	BSK-H complete medium (Sigma)	
	Antibiotika pro <i>Borrelia</i> 100x (Sigma)	
	SOC médium	2% bacto-tryptone, 0.5% bacto-yeast extract, 0.05% NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM glukosa, pH 7.0; sterilní
	LB médium	1% bacto-tryptone, 0.5% bacto-yeast extract, 0.5% NaCl, pH 7.0; sterilní
	LB agar	1.5% bacto-agar v LB médiu
	Antibiotika	Ampicilin (zásobní roztok: 50mg/ml H ₂ O)

SDS- 'Polyacrylamide Gel Electrophoresis' (PAGE)	2x SDS gel- vzorkový pufr	100 mM Tris-HCl (pH 6.8), 200 mM dithiotreitol, 4% SDS, 0.2% bromphenol blue, 20% glycerol
	10x SDS- PAGE Elektroforézový pufr (E pufr)	Na 1 litr: 10 g SDS, 30.3 g Tris, 144.1 g glycin
Nativní elektroforéza 'Blue Native' PAGE	Gelový pufr 3x	75 mM imidazol, 1.5 M kyselina 6-aminohexanová, pH 7.0
	Katodový pufr B	50 mM tricine, 7.5 mM imidazol, 0.02% Coomassie blue G-250, pH 7.0
	Katodový pufr B/10	50 mM tricine, 7.5 mM imidazol, 0.002% Coomassie blue G-250, pH 7.0
	Anodový pufr	25 mM imidazol, pH 7.0
Nativní Gradientová PAGE	Elektroforézový pufr	0.09 M Tris, 0.08 M kyselina boritá, 0.093% EDTA
	AA	28.8 g akrylamid, 1.2 g bis-acrylamid v 100 ml
	Gelový pufr 5x	1.875 M Tris/HCl, pH 8.8
'Western blotting'	Blotovací pufr pro SDS-PAGE	20% methanol, 25 mM Tris-Base, 150 mM glycin
	Blot. pufr pro 'Blue Native' PAGE	50 mM tricine, 7.5 mM imidazol, pH 7.0
	Blot. pufr pro nativní gradientovou PAGE	20% methanol, 25 mM Tris-Base, 150 mM glycin, 1.3 mM SDS
	TBS (0.05 M) s 0.1 mM ionty	100 ml: 0.604 g Tris, 0.876 g NaCl (0.15 M), 0.002 g MgCl ₂ , 0.0019 g MnCl ₂ , 0.0011g CaCl ₂ , pH 7.6 (upravené 1N HCl).
	TBS s ionty/ Tween 20	TBS s ionty + 0.05% Tween 20
	Roztok amidočerně	0.1% Amido Black 10B, 25% methanol, 10% kyselina octová
	Odbarvovací roztok	25% methanol, 10% kyselina octová
Izolace proteinů	IEF pufr	7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 1% dithiotreitol
	10x PBS 0.01M + 0.15 M NaCl	Na 1 litr: 80 g NaCl, 2 g KCl, 26.8 g Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O, 2.4 KH ₂ PO ₄ , pH 7.4 (upravené HCl).

3.1.4. Používaná zařízení:

Třepačka	Heidolf UNIMAX 2010
Centrifugy*	Centrifuge 5415 R Eppendorf
	Centrifuge 5415 D Eppendorf
	Universal 32R Hettich Zentrifugen
Elektroforéza na DNA	HU13 (SCIE-PLAS)
Elektroforéza na PAGE	Hoefler SE 250
Cykler PCR	Mastercycler personal eppendorf
Sonikátor	Bandelin Sonoplus
Spektrofotometr	Spektrofotometr eppendorf BioPhotometer
Pipety	Gilson (1000µl, 20-200µl, 2-20µl, 0.1-2µl)
Blotovací zařízení	Idea Scientific Copany

* Centrifugace vzorků probíhala při pokojové teplotě, není-li uvedeno jinak.

3.2. Metody

3.2.1. Kultivace spirochét lymeské boreliózy (LB)

Borélie byly kultivovány v kompletním BSK-H médiu. Borélie ze zamražených zásobních materiálů byly pasážovány s antibiotiky (směs antibiotik pro *Borrelia*), aby se zamezilo nárůstu nežádoucích kontaminací v kultuře. Jelikož se pracovalo ve sterilním prostředí, další pasáže borélií rostly ve zkumavce bez antibiotik. Kultivace byla prováděna *in vitro* při 33°C za mikroaerofilních podmínek v 50 ml nebo 15 ml zkumavkách. Jako inokulum bylo použito 1 ml živých bakterií do 50 ml média a 0.25-0.5 ml zmražených bakterií do 13 ml média.

Vzorky byly pravidelně kontrolovány v temném poli mikroskopu a pouze nekontaminované kultury byly použity pro další kultivaci bez antibiotik.

3.2.2. Odběr spirochét LB

Kultury byly centrifugovány při teplotě 4°C po dobu 20 minut při 14 480 g. K odmytí zbytků média byl pelet-usazené bakterie promyt v PBS. Směs borélií v PBS byla vortexována a přenesena do čisté 1.5 ml zkumavky Eppendorf a centrifugována 7 minut při 16 100 g. Supernatant byl odstraněn a dekontaminován v roztoku persterilu a pelet byl zamražen při -20°C nebo ihned zpracován.

3.2.3. Izolace genomové DNA *B. burgdorferi* sensu lato

Pro izolaci DNA byl použit čerstvý nebo zamražený pelet borélií, který byl předem propláchnutý v PBS.

Vlastní izolace byla provedena kitem 'DNeasy[®] Tissue Kit (Qiagen) ' pro gram-negativní bakterie. Pelet buněk byl resuspendován v 180 μ l pufru ATL. Bylo přidáno 20 μ l proteinasy K a směs byla vortexována a inkubována při 55°C dokud buňky celkově nezlyzovaly. Během inkubace byly vzorky občas vortexovány. Jakmile lyzát vypadal viskózně, k vzorkům bylo přidáno 200 μ l pufru AL. Směs byla důkladně vortexována a inkubována při 70°C 10 minut. Po skončení inkubace bylo přidáno 200 μ l ethanolu (96-100%) a vzorky byly opět důkladně vortexovány. Celý obsah zkumavky byl přenesen do výrobcem přiložené kolonky 'DNeasy Mini Spin Column' a kolonka byla umístěna do 2 ml sběrné zkumavky. Takto připravené zkumavky byly centrifugovány 1 minutu při 11 440 g. Obsah ve sběrné zkumavce byl odstraněn. Do kolonky bylo přidáno 500 μ l pufru AW1 a zkumavky byly znovu centrifugovány 1 minutu při 11 440 g. Obsah ze sběrné zkumavky byl odstraněn. 500 μ l pufru AW2 bylo přidáno do kolonky a zkumavky byly centrifugovány 3 minuty při 16 100 g. Kolonka byla umístěna do čisté 1.5 ml zkumavky a na kolonku bylo přidáno 200 μ l pufru AE. Zkumavka byla inkubována 1 minutu při pokojové teplotě a centrifugována 1 minutu při 11 440g. Eluovaná DNA ze zkumavky byla znovu přepipetována na membránu a ještě jednou centrifugována 1 minutu při 11 440 g.

Takto izolovaná DNA byla uschována při +4°C nebo ihned zpracována.

3.2.4. PCR ('Polymerase Chain Reaction')

Izolovaná DNA ze vzorků byla zkoumána pomocí druhově specifických primerů pro rod *Borrelia* k určení zastoupení jednotlivých druhů ve vzorcích. Byly použity primery GI, GII, GIII a P8/P9 pro *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii* a *B. valaisianu* v tomto pořadí. Koncentrace DNA vzorků se pohybovala mezi 600-1100 mg/ml. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA borélií, u které již byla prokázána přítomnost daného druhu borélie, nebo plazmid se zaklonovaným PCR produktem. Negativní kontrola obsahovala místo DNA 1 μ l vody.

Příprava reakční směsi: Celkový objem reakce20 μ l

10x PCR pufru.....	2 μ l
25 mM MgCl ₂	2 μ l
1 mM Primer forward	1 μ l
1 mM Primer reverse	1 μ l
10 mM dNTPs	1 μ l
Tag DNA polymeráza(Promega) (0.5U).....	0.5 μ l
DNA <i>Borrelia</i>	0.2-1 μ l dle koncentrace.

Zbývající objem byl doplněn sterilní deionizovanou vodou.

Amplifikační reakce byla prováděna v 0.2 ml tenkostěnné zkumavce, v přístroji Mastercycler (Eppendorf) za následujících podmínek:

1. Denaturace DNA.....95°C.....5 minut
2. 30 cyklů:
 - Denaturace DNA.....95°C....30 sekund
 - Nasedání primerů.....52°C....30 sekund
 - Elongace... ..72°C.....1 minuta
3. Teplota ponechána při 4°C.

První denaturační krok před započítáním cyklů pomáhá cílové DNA lépe se denarovat v dalším kroku. Další krok denaturace zlepšuje kvalitu konečných PCR produktů. Primery nasedají na vlákno DNA při teplotě závisující na jejich teplotě tání. V posledním kroku cyklu dochází k syntéze nové DNA podle templátového řetězce původní DNA. Při dokončení všech cyklů byla teplota ponechána 4°C.

3.2.5. Elektroforéza

Analýza všech vzorků byla prováděna na 1% agarózovém gelu/TAE pufru. K 20 μ l reakce bylo přidáno 4 μ l vzorkového pufru (5x) obsahující barvivo SYBR Green. Jako marker byl použit standard molekulových hmotností GeneRuler™ (MBI Fermentas). Elektroforéza probíhala při napětí 100 V po dobu 20-30 minut na aparatuře HU13 (SCIE-PLAS). Výsledek byl vizualizován pod UV světlem a fotograficky zaznamenán.

3.2.6. Purifikace PCR produktu

Produkt PCR byl vyříznut z gelu a izolován pomocí kitu 'QIAquick[®] Gel Extraction Kit' (Qiagen).

Vyříznutý kousek agarózového gelu byl zvážen ve zkumavce. Do zkumavky byl přidán pufr QG a to v poměru 3x k objemu zváženého kousku agarózy (1 objem gelu 100 mg~100 µl). Zkumavky byly inkubovány při 50°C 10 minut, dokud se gel nerozpustil. Rozpouštění gelu bylo napomáháno vortexováním vzorků během inkubace po 2-3 minutách. Jakmile byl gel kompletně rozpuštěn 1 objem isopropanolu byl přidán a směs byla zamíchána. K navázání DNA byly vzorky naneseny na kolonku QIAquick a kolonka byla umístěna do přiložené 2 ml sběrné zkumavky. Zkumavky byly centrifugovány 1 minutu při 16 100 g. Obsah ze sběrné zkumavky byl odstraněn. Do kolonky bylo přidáno 500 µl pufru QG a zkumavky byly centrifugovány 1 minutu při 16 100 g. Na kolonku bylo dodáno 750 µl pufru PE, a vzorky byly ponechány 2-3 minuty na pokojové teplotě než byly centrifugovány 1 minutu při 16 100 g. Obsah sběrné zkumavky byl opět odstraněn a zkumavky byly centrifugovány 1 minutu při 15 700 g. Kolonka byla umístěna do čisté 1.5 ml zkumavky. DNA byla eluována přidáním 30 µl H₂O do středu membrány. Kolonka byla inkubována při pokojové teplotě 1 minutu a poté byla centrifugována 1 minutu při 16 100 g. Přečištěná DNA byla uschována při -20°C nebo ihned zpracována.

3.2.7. Klonování PCR produktu

Purifikovaný PCR produkt byl zaklonován do vektoru 'pCR[®] 4-TOPO[®] Vector' (Invitrogen). K reakci bylo použito 0.5-4 µl PCR produktu podle koncentrace DNA (0.1 µg/µl), 1 µl salt solution a sterilní H₂O k doplnění na celkový objem 5 µl směsi a 1 µl vektoru. Směs byla inkubována při pokojové teplotě 15-20 minut a následně ponechána na ledu. Tak byla připravena k transformaci kompetentních buněk.

3.2.8. Transformace 'One Shot[®] TOP10 *E.coli* Komplement Cells'

K transformaci byly použity kompetentní buňky 'One Shot[®] TOP10 *E. coli*' (Chemically Competent, Invitrogen).

K pomalu rozmraženým buňkám bylo přidáno 2 µl z klonovací směsi (viz. 3.2.7.), směs byla jemně rozmíchána a ponechána na ledu k inkubaci 30 minut. V dalším kroku byla směs s buňkami vystavena tepelnému šoku 30 sekund při teplotě 42°C, při které se vektor

snadno dostal přes plazmatickou membránu dovnitř buňky *E. coli*. Buňky byly přeneseny zpět na led a při sterilních podmínkách bylo přidáno 250 µl SOC média. Buňky byly kultivovány na třepačce 1 hodinu při 37°C. Po kultivaci byla směs rozetřena na Petriho misky s agarem (LB/agar s ampicilinem-50µg/ml). Abychom získali jednotlivé kolonie buněk, použili jsme různá ředění (50 µl, 250 µl/misku). Misky s buňkami byly inkubovány přes noc při 37°C.

Následující den byly jednotlivé kolonie odebírány z ploten, přeneseny do LB média s ampicilinem (50 µg/ml) a kultivovány za stálého třepání přes noc při 37°C. Narostlé kultury byly centrifugovány při 4 470 g 20 minut při 4°C a z peletu buněk byla izolována plazmidová DNA.

3.2.9. Izolace plazmidové DNA

K izolaci byl použit pelet buněk z transformace (viz 3.2.8.). Plazmidová DNA byla izolována pomocí kitu 'QIAprep[®] Spin Miniprep' (Qiagen).

K resuspendovanému peletu bakterií bylo přidáno 250 µl P1 pufru a směs byla přenesena do nové zkumavky. Dále bylo přidáno 250 µl P2 pufru a zkumavka byla zamíchána jemným otáčením (4-6x). Bylo přidáno 350 µl N3 pufru a směs byla zamíchána jemným otáčením zkumavky (4-6x). Zkumavka byla centrifugována 10 minut při 16 100 g. Supernatant byl přenesen na QIAprep kolonku. Zkumavka s kolonkou byla stočena 30-60 sekund a roztok v sběrné zkumavce byl odstraněn. Kolonka byla vymyta 750 µl PE pufru a centrifugací 30-60 sekund. Obsah sběrné kolonky byl odstraněn a zkumavky byly znovu centrifugovány, aby se zbavily zbytků promývacího pufru. Kolonka QIAprep byla umístěna do čisté 1.5 ml zkumavky. K eluci plazmidové DNA bylo přidáno 50 µl H₂O do středu membrány, zkumavka byla ponechána 1 minutu při pokojové teplotě a centrifugována 1 minutu při 16 100 g.

Izolovaná plazmidová DNA byla uschována při -20°C nebo ihned zpracována.

3.2.10. Sekvenování

K ověření přítomnosti inzertu ve vektoru byla použita metoda PCR se specifickými primery M13-Forw a M13-Rev, s následnou sekvenací vybraných plazmidů s inzertem.

PCR reakce byla provedena dle 3.2.4. se specifickými primery, které nasedají na místa vložení inzertu z obou stran. Teplota nasedání primerů byla 50°C. Produkty PCR reakce byly analyzované na 1% agarózovém gelu/ TAE pufru a vizualizované pod UV světlem.

K sekvenační reakci byly použity plazmidy, u kterých byl prokázán zaklonovaný inzert. Reakce obsahovala 30 ng plazmidové DNA a 3.2 pmol primerů (M13-Forw; M13-Rew). Vzorky byly sekvenovány v servisní laboratoři BF JU a BC AVČR v Českých Budějovicích na sekvenátoru ABI 3130 Perkin Elmer (Applied Biosystems) v sekvenačním kitu 'Big Dye[®] Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit' (Applied Biosystems).

3.2.11. Izolace a měření koncentrace proteinů

Zamražené vzorky borélií byly promyty v PBS a použity k izolaci proteinů metodou TPI ('Total protein isolation') podle Viskari et al. (2003) nebo metodou s jejich uvolněním pomocí sonikace. Obsah proteinů byl měřen podle Bradfordové (1976).

3.2.11.a) TPI ('Total protein isolation')

Pelet buněk byl resuspendován v IEF pufru (objem pufru 10x objemu peletu buněk), sonikován na ledu 6x 15 sekund (200 W, Bandelin Sonoplus) a inkubován při pokojové teplotě 1 hodinu. Vzorky byly centrifugovány 10 minut při 12 000 g pro odstranění nerozbitých buněk. Supernatant byl přenesen do nové zkumavky a proteiny byly vysráženy studeným acetonem (9 objemů počátečního peletu buněk) a vortexovány 2 minuty. Vysrážené proteiny se zformovaly do bílých vloček. K usazení precipitátu se vzorky centrifugovaly při 16 100 g. Supernatant byl odstraněn a pelet byl resuspendován v IEF pufru, jehož objem odpovídal objemu peletu buněk na počátku izolace.

Vzorky byly uschovány při +4°C nebo ihned zpracovány.

3.2.11.b) Izolace proteinů s jejich uvolněním pomocí sonikace

K peletu borélií bylo přidáno 600 µl PBS a celá směs byla sonikována na ledu (2 cykly po 10 sekundách) na sonikátoru (200 W, Bandelin Sonoplus). Poté byly vzorky stočeny 5-10 minut při 16 100 g. Supernatant byl přenesen do nové zkumavky a zamražen na pozdější použití a zbytek peletu byl uschován při -20°C.

3.2.11.c) Měření koncentrace podle metody Bradfordové

Koncentrace proteinu byla změřena metodou podle Bradfordové (Bradfordová, 1976). Vzorky byly k měření připraveny do zkumavky následujícím schématem.

1 µl proteinu + 99 µl H₂O + 1 ml činidla Bradfordové

Směs byla ponechána 2 minuty při pokojové teplotě. Před měřením byly vzorky přelity do kyvety a koncentrace byla změřena na spektrofotometru BioPhotometer (Eppendorf). Jako slepý vzorek byl použit 1 ml činidla Bradfordové.

3.2.12 Dialýza proteinů

Proteiny izolované v IEF pufru byly přes noc dializovány pomocí dialyzační membrány SPECTRA/POR 4 (Sigma) proti PBS 1:1000 za neustálého míchání pufru. Konečná koncentrace dialyzovaného proteinu byla změřena druhý den podle metody Bradfordové.

3.2.13. Elektroforetická analýza proteinů pomocí SDS-PAGE

Izolované proteiny byly rozděleny pomocí SDS-PAGE elektroforézy dle standardních postupů (Laemmli, 1970). Elektroforéza probíhala v E pufru na aparatuře Hoefer SE 250 (Hoefer Scientific Instruments-Amersham Biosciences) při napětí 120-145 V přibližně 2 hodiny. Jako molekulový standard byl použit marker Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (MBI Fermentas).

3.2.13.a) Příprava gelu:

Gel byl připraven dle následujících tabulek.

Rozdělovací gel 12%	Objem	Zaostřovací gel 4%	Objem
Destilovaná deionizovaná voda	4,35 ml	Destilovaná deionizovaná voda	1.272 ml
40% Akrylamid/ Bis-akrylamid	3 ml	40% Akrylamid/ Bis-akrylamid	0.2 ml
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	2.5 ml	0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	0.504 ml
10% SDS	0.1 ml	10% SDS	0.02 ml
TEMED	0.005 ml	TEMED	0.002 ml
10% APS	0.05 ml	10% APS	0.01 ml
celkový objem	10 ml	celkový objem	2 ml

3.2.13.b) Příprava vzorků:

Vzorky byly smíchány s redukujícím vzorkovým pufrům obsahujícím dithiothreitol (DTT) nebo se vzorkovým pufrům bez DTT v poměru 1:1, 10 minut byly povařeny (denaturace teplem), zchlazeny na ledu a stočeny krátce na centrifuze. Hned byly nanášeny na gel.

3.2.13.c) Barvení gelu:

Po dokončení elektroforézy byl gel promyt 3x v 100 ml destilované vody a zahříván v mikrovlnné troubě 1 minutu. Gel byl přenesen do 20 ml Coomassie Brilliant Blue R-250

a byl zahříván v mikrovlnné troubě 30 sekund a nechán v barvičce přes noc. Druhý den byl vyjmut a vypláchnut v destilované vodě. Gel byl fotograficky zaznamenán a zdokumentován.

3.2.14. Nativní elektroforéza v polyakrylamidovém gelu ('Blue Native PAGE')

Proteiny byly rozděleny pomocí metody Blue Native PAGE (Wittig et al. 2005), ve které jsou vzorky v nedenačních a neredukujících podmínkách. Po nanesení vzorků a markeru byla elektroforéza spuštěná 2 hodiny při 100 V, byl používán katodový pufr B v katodovém prostoru a anodový pufr v anodovém prostoru, pufrů se nesmí smíchat. Po 2 hodinách byl pufr B vyměněn za katodový pufr B/10 a foréza pokračovala při 310 V další 2-3 hodiny. Jako marker byly použity směsi lektinů o známé molekulové hmotnosti: Trypsinogen (24 kDa), Pepsin (34 kDa), Albumin E 66 (45 kDa) a Albumin bovine (66 kDa). Celá elektroforéza probíhala v lednici při + 4°C, aby se předešlo denaturaci proteinů teplem.

3.2.14.a) Příprava gelu:

Rozdělovací gel 8%	Objem	Zaostřovací gel 3.5%	Objem
Destilovaná deionizovaná voda	4,694 ml	Destilovaná deionizovaná voda	3.215 ml
30 % Akrylamid/ Bis-akrylamid	2.7 ml	30% Akrylamid/ Bis-akrylamid	0.73 ml
Gel buffer 3x	2.5 ml	Gel buffer 3x	2 ml
TEMED	0.006 ml	TEMED	0.005 ml
10% APS	0.1 ml	10% APS	0.05 ml
celkový objem	10 ml	celkový objem	6 ml

3.2.14.b) Příprava vzorků:

Vzorky byly smíchány s 5% glycerolem a 0.01% Ponceau (Sigma). Koncentrace vzorků byly přibližně 1mg/1ml. Vzorky se po namíchání ihned nanášely na gel z důvodu zamezení denaturaci proteinů teplem.

3.2.14.c) Barvení gelu:

Po dokončení elektroforézy byl gel inkubován 20 minut ve fixačním roztoku (50% methanol, 10% kyselina octová, 100 mM octan amonný) a obarven v Coomassie Brilliant Blue R-250 přes noc. Druhý den byl gel 3x promyt v destilované vodě a fotograficky zaznamenán.

3.2.15. Nativní gradientová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu ('Pore limit gradient PAGE')

Připravené gradientové gely byly umístěny do chlazené elektroforézy Hoefer SE 250 s pufrem pro elektroforézu. Před nanesením vzorků byla elektroforéza spuštěna na 30 minut při 70 V. Po aplikaci vzorků probíhala elektroforéza při 300 V za dostatečného chlazení vodou tak, aby nedošlo k denaturaci proteinů. Jakmile zóna bromfenolové modři doputovala do pufru, byl dosavadní elektroforézový pufr vyměněn za čerstvý pufr a elektroforéza pokračovala na 150 V po dobu 14 hodin. Jako marker byl použit HMW (AP Czech).

3.2.15.a) Příprava gelu (nalévání 4 gradientových gelů 5-17.5%, celkový objem 40 ml)

	Lehký (5%)	Těžký (17.5%)
AA	3.75 ml	10.2 ml
Gel buffer (5x)	4.5 ml	3.5 ml
Glycerol	-	3.5 ml
a.d.	14 ml	-
SDS (10%)	0.225ml	0.175 ml
TEMED	0.005 ml	0.005 ml
APS(10%)	0.09 ml	0.03 ml
celkový objem	22.5 ml	17.5 ml

3.2.15.b) Příprava vzorků:

K vzorkům byl přidán vzorkový pufr obsahující glycerol a bromfenolovou modř v konečné koncentraci 10%.

3.2.15.c) Barvení gelu:

Gel byl obarven pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250 (viz 3.2.13.c) a byl fotograficky zdokumentován.

3.2.16. Přenos proteinů metodou 'Western blotting'

Proteiny rozdělené pomocí SDS-PAGE dle 3.2.13, Blue Native-PAGE dle 3.2.14 a nativní gradientové PAGE dle 3.2.15 byly technikou 'Western blotting' podle Towbina *et al.* (1979) přeneseny na PVDF (polyvinylidenfluorid) membránu (Millipore, 0,45 μ m) a posloužily ke značení sacharidovými sondami.

3.2.16.a) Přenos proteinů na membránu

Blotovací zařízení bylo připraveno následujícím způsobem. Do blotovací aparatury byla položena plastová mřížka, na ní byla umístěna katoda, plastová mřížka a houbička. Aparatura byla naplněna blotovacím pufrům a z vrstev tohoto sendviče byly odstraněny bublinky. Na houbičku bylo dáno 6 filtračních papírů. Byl položen gel a na něj byla přiložena aktivovaná membrána PVDF (aktivace: 30 sek. v methanolu, 2 min. v dest. H₂O). Následovaly filtrační papíry, 2 houbičky, plastová mřížka, anoda a plastová mřížka. Celý sendvič nesmí být stlačitelný víc než 2 mm, jinak by mohlo dojít k shnutí gelu. Vše bylo uloženo tak, aby byly odstraněny bublinky. Přenos proteinů se uskutečnil na blotovacím přístroji (Idea Scientific Copany).

Pro přenos proteinů separovaných v SDS-PAGE byl použit příslušný blotovací pufr a přenos probíhal při konstantním proudu 250 mA po 2 hodiny.

Proteiny rozdělené pomocí separační metody nativní gradientové PAGE byly přenášeny při konstantním proudu 150 mA po dobu 11 hodin. Transferový pufr byl doplněn o 1.3 mM SDS a celý transfer byl uskutečněn při 4°C.

Proteiny přenesené na membránu byly promyty v destilované vodě a vizualizovány pomocí 10% roztoku Ponceau-S, který lze odmyt. Membrána byla použita k značení sacharidovými sondami. Marker byl obarven pomocí roztoku amidočerně (Amido Black 10B).

Přenos rozdělených proteinů metodou 'Blue Native-PAGE' probíhal při konstantním proudu 150 mA po 3 hodiny při 4°C. Byl použit blotovací pufr pro 'Blue Native-PAGE'. Membrána byla promývána v roztoku 25% methanolu a 10% kyseliny octové tak, aby bylo odmyto pozadí, a byla poté opláchnuta ve vodě. K odstranění barvy navázané na proteiny byla membrána inkubována 3 minuty v methanolu.

Membrána s přenesenými proteiny byla uschována při +4°C do dalšího zpracování.

3.2.16.b) Značení pomocí sacharidových sond

Vzorky byly značeny sacharidovými sondami ('carbohydrate probe', Syntesom) pomocí následujícího postupu. Ke značení byly použity membrány s přenesenými a rozdělenými proteiny nebo směs nerozdělených proteinů aplikovaných přímo na PVDF membránu (metoda 'dot blotting').

Postup značení:

1. Promývání v TBS s ionty (2 minuty na třepačce) 3x za sebou;
2. Promytí-blokování endogenních peroxidas 0.3% peroxidem vodíku, čerstvě připraveným, 10 minut;
3. Promývání 3x v TBS s ionty/Tween 20 (2 minuty na třepačce);
4. Blokování v 3% BSA v TBS s ionty/Tween 20, 1.5 hodiny;
5. Inkubace se sacharidovými sondami*, 2 hodiny;
6. Promývání v TBS s ionty/Tween 20 2 minuty na třepačce, 5x;
7. Inkubace se streptavidinem značeným křenovou peroxidasou (Vector) v konečné koncentraci 1 μ g/ml ředěné v 0.3% BSA v TBS s ionty/Tween 20, 1 hodina;
8. Promývání v TBS s ionty/Tween 20 2 minuty na třepačce, 5x;
9. Vyvolání pomocí 3,3'-diaminobenzidin (DAB) 'peroxidase substrate kit' (Vector).

* Byly používány sacharidové sondy α -D-manosa, α -D-galaktosa, β -N-acetylgalaktosamin, β -N-acetylglukosamin a L-fukosa konjugované s biotinem (Syntesom) ředěné v PBS v konečné koncentraci 1 mg/ml. Na značení byla používaná koncentrace sacharidových sond 5 μ g/ml.

4. VÝSLEDKY

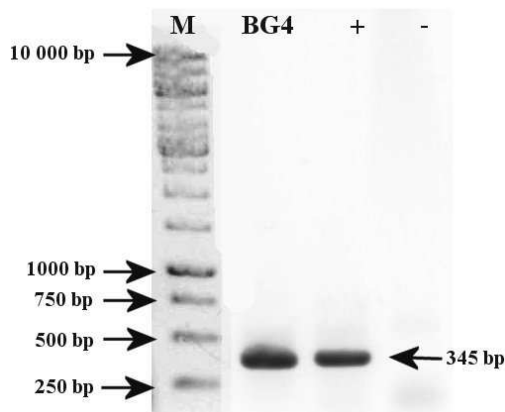
4.1. PCR

Vzorky *Borrelia burgdorferi* sensu lato označené jako CB43, CB53, B31, B5, Br132, Bss, BG4 a BGHUB byly zkoumány na zastoupení jednotlivých druhů. Spirochéty z těchto materiálů byly pasážovány ve vhodných podmínkách v BSK-H médiu. Izolovaná DNA jednotlivých izolátů borélií byla pomocí PCR a druhově specifických primerů porovnávána v 1% agarózovém gelu s pozitivní a negativní kontrolou. Byly používány druhově specifické primery GI pro *B. burgdorferi* sensu stricto, primery GII pro *B. garinii*, primery GIII pro *B. afzelii* a primery P8/P9 pro *B. valaisiana*. Jako pozitivní kontrola sloužila DNA vzorků, u kterých byla prokázána přítomnost daného druhu z druhového komplexu *B. burgdorferi* sensu lato nebo plazmid se zaklonovaným úsekem DNA daného druhu borélie. Jako negativní kontrola byla použita deionizovaná voda. Bylo ověřeno zastoupení jednotlivých druhů ve vzorcích pomocí amplifikace s druhově specifickými primery, které jsme postupně použili na DNA všech vzorků. Kontrola byla provedena porovnáním velikosti PCR produktů s molekulovým standardem. Velikost PCR produktu *B. burgdorferi* sensu stricto je 544 bp, produkt *B. garinii* je velký 345 bp, produkt *B. afzelii* je velký 190 bp a produkt *B. valaisiana* má velikost 549 bp.

Tabulka 1.: Zastoupení jednotlivých druhů u vzorků.

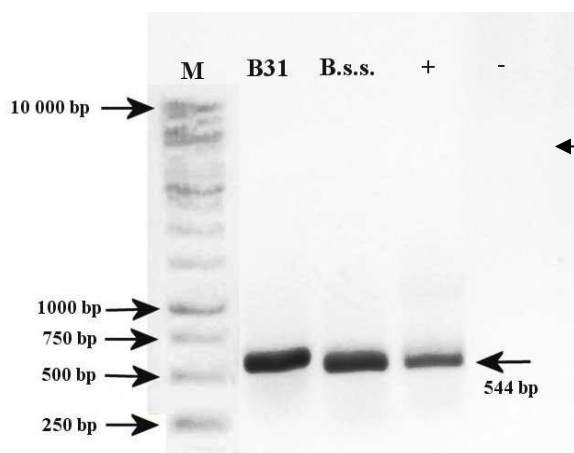
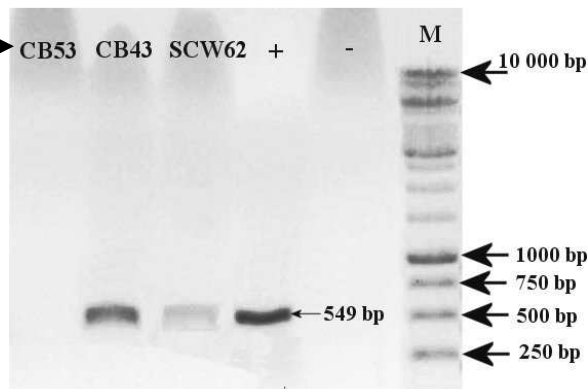
Vzorky Druhy	B31	CB43	CB53	BGHUB	B5	Br132	Bss	BG4
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	●	○	●	●	○	○	●	○
<i>B. afzelii</i>	○	●	○	○	○	○	○	○
<i>B. garinii</i>	○	○	●	●	○	●	●	●
<i>B. valaisiana</i>	○	●	○	●	●	●	●	●

● Pozitivní výsledek ○ Negativní výsledek



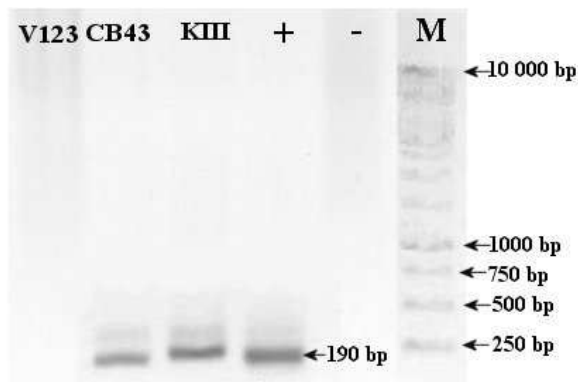
Obr.1.: PCR reakce s primery GII druhově specifickými pro *B. garinii*. M-Marker; + pozitivní kontrola; - negativní kontrola, vzorek **BG4**.

Obr. 2.: PCR reakce s primery P8/9 druhově specifickými pro *B. valaisiana*, M-marker; + pozitivní kontrola; - negativní kontrola, vzorky **CB53, CB43, SCW62**.



Obr. 3.: PCR reakce s primery GI druhově specifickými pro *B. burgdorferi* sensu stricto. + pozitivní kontrola, - negativní kontrola. M-marker, vzorky **B31, Bss**.

Obr. 4.: PCR reakce s primery GIII druhově specifickými pro *B. afzelii*. + pozitivní kontrola, - negativní kontrola. M-marker. Vzorky **V123, CB43, KIII**.



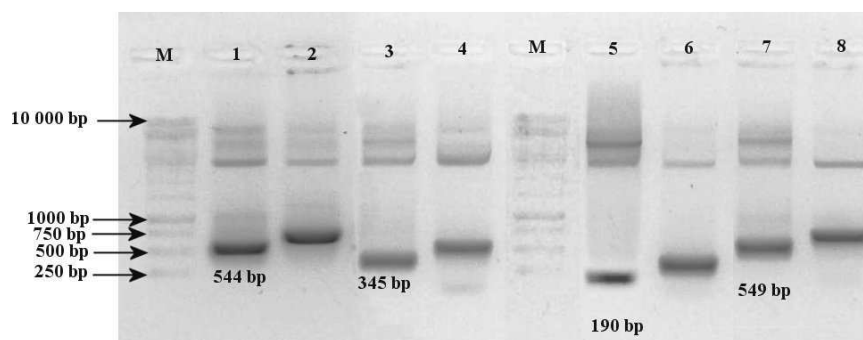
Vzorky izolované DNA z narostlých kultur izolátů borélií, které pocházejí ze sběru klíšťat na lokalitách v okolí Českých Budějovic, byly pomocí PCR a druhově specifických primerů zkoumány na přítomnost jednotlivých druhů *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii* a *B. valaisiana*. Všechny vzorky byly postupně v PCR reakci z primery GI, GII, GIII a P8/9. Díky pozitivní a negativní kontrole bylo možné vyloučit kontaminaci PCR reakční

směsi a my jsme mohli jasně stanovit zastoupení borélií ve vzorcích. Výsledky jsou shrnuty v tabulce tab.1. na straně 27. Zastoupení *B. burgdorferi* sensu stricto ve vzorcích byla 11,1%, avšak v koinfekci s dalšími druhy byla přítomnost 33.3%. *B. afzelii* byla nalezena spolu s *B. garinii* v 11.1% izolátů. *B. garinii* byla přítomna spolu s *B. valaisianou* u 33.3% izolátů. Z 11.1% byla přítomna *B. valaisiana* samostatně ve vzorku.

4.2. Kontrola zaklonovaného PCR produktu

Klonování do vektoru pCR[®] 4-TOPO[®] bylo ověřeno PCR reakcí plazmidové DNA, která byla izolována z buněk One Shot[®] TOP10 *E. coli*. Reakce probíhala s primery pro zaklonované úseky GI, GII a GIII a s vektor specifickými primery M13, které ohraničují vložený inzert. Druhově specifické primery GI, GII a GIII nasedají na úseky typické pro *B. burgdorferi* sensu stricto (GI), *B. garinii* (GII) *B. afzelii* (GIII) a *B. valaisiana* (P9/8), zatímco primer M13 Forw. a Rev. nasedá na speciální sekvence před a po vložený inzert.

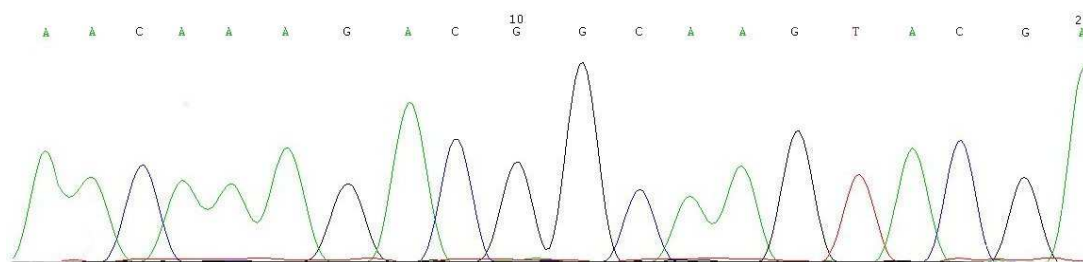
Následující obrázek představuje plazmidovou DNA s předpokládaným zaklonovaným úsekem *B. burgdorferi* s.s. (jamky 1 a 2 na obr. 5.), se zaklonovaným úsekem *B. garinii* (jamky 3 a 4 na obr. 5.), se zaklonovaným úsekem *B. afzelii* (jamky 5 a 6 na obr. 5.), se zaklonovaným úsekem *B. valaisiana* (jamky 7 a 8 na obr. 5.).



Obr. 5.: **1** - Reakce s primery GI, velikost produktu - 544 bp; **2** - Kontrola pomocí M13 primerů; **3** - Reakce s primery GII, velikost - 345 bp; **4** - Kontrola s M13 primery; **5** - Reakce s primery GIII, velikost produktu - 190 bp; **6** - Kontrola s M13 primery; M-markery 250 bp-10 000 bp.

4.3. Sekvenování produktu PCR

Sekvenováním byla provedena kontrola, zda zaklonovaný plazmid spolehlivě obsahuje námi požadovaný úsek DNA. Byly použity vzorky plazmidové DNA, která již byla potvrzena přítomností zaklonovaného inzertu pomocí PCR reakce s druhově specifickými primery v agarozovém gelu (viz obr. 5).



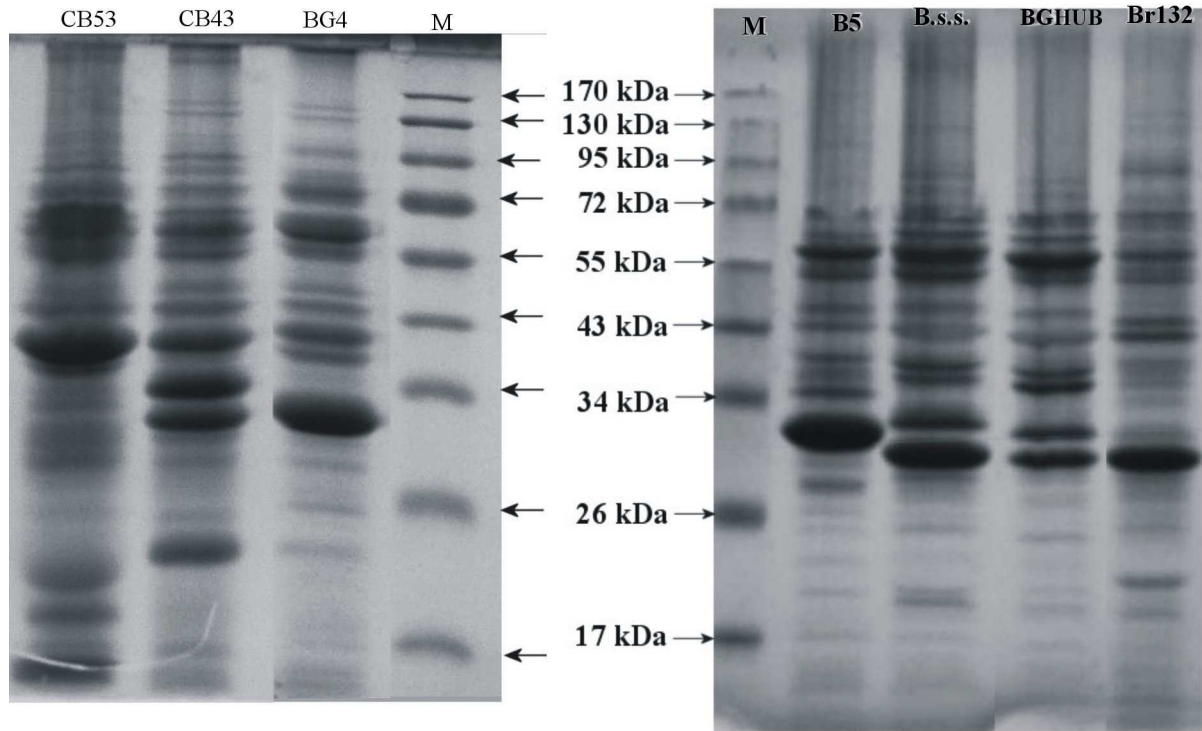
Obr.6.: Chromatogram ze sekvenátoru - úsek typický pro *B. burgdorferi* sensu stricto.

4.4. Analýza proteinů SDS-PAGE

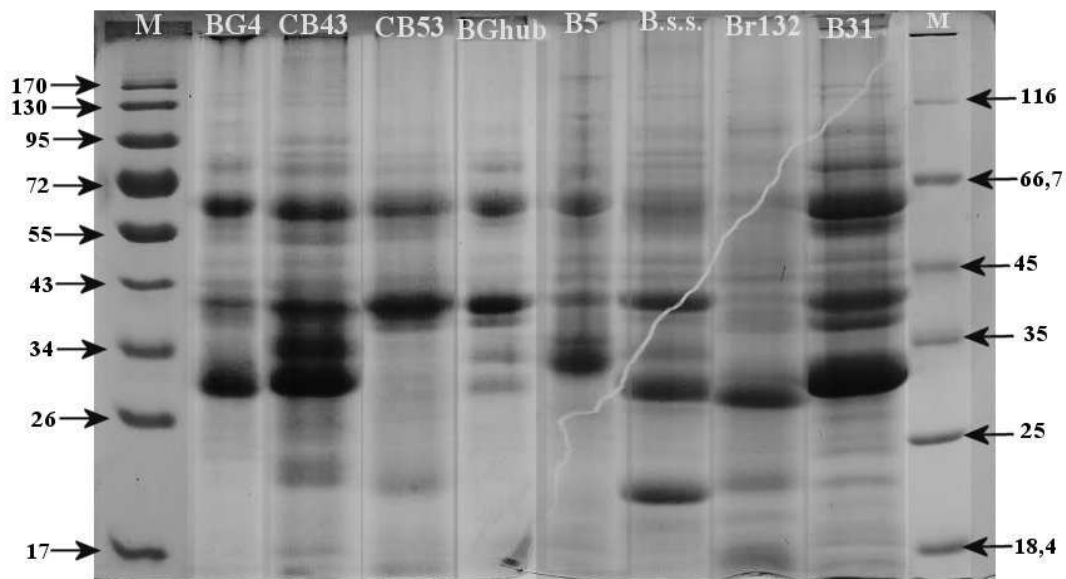
U použitých vzorků borélií označených: BG4, CB43, CB53, B31, B5, Br132, Bss a BGHUB bylo zjištěno rozdílné zastoupení proteinů. Proteiny těchto izolátů borélií byly separovány v 12 % akrylamidovém gelu SDS-PAGE elektroforézou (viz 3.2.13). Gely byly barveny, odbarveny, vyfoceny a porovnány mezi sebou navzájem. Obrázky 7a. a 7b.

Obr. 7.: Elektroforetické porovnání heterogenity proteinového spektra u jednotlivých izolátů. Elektroforetické rozdělení proteinů (SDS-PAGE) v 12% akrylamidovém gelu u vzorků **BG4**, **CB43**, **CB53**, **B31**, **B5**, **Br132**, **Bss** a **BGHUB**. Vzorky izolované pomocí TPI. Porovnání s markery.

Obr.7a:

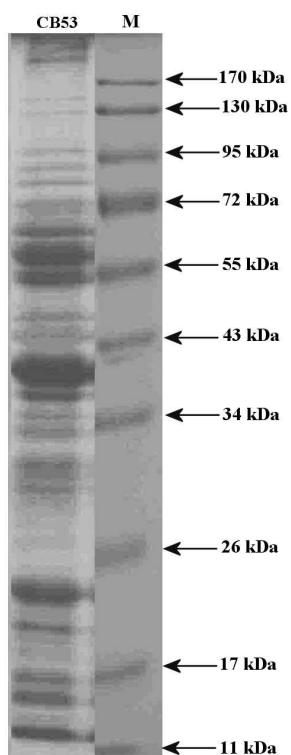


Obr. 7b:

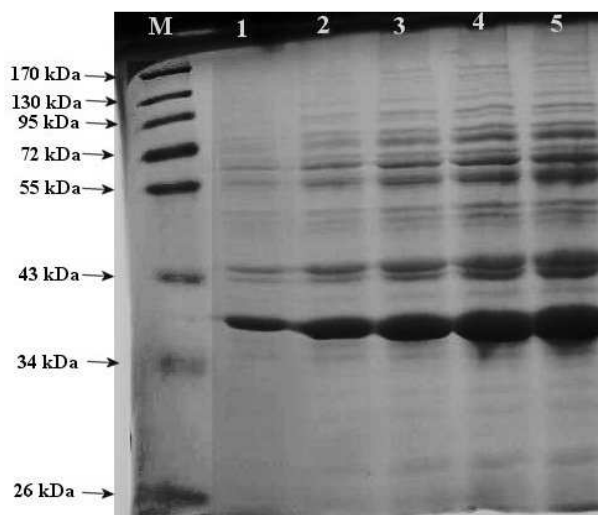


Proteiny byly izolovány z peletu buněk a izolace probíhala podle protokolu TPI nebo pomocí sonikace, při které byly buňky rozbity a centrifugací byly nerozbité zbytky buněk odstraněny.

Z obrázku 7a. a 7b. vidíme, že se jednotlivé vzorky liší zastoupením proteinů. Ve vzorcích je variabilita v zastoupení druhů (viz tabulka 1), ale také velká různorodost v proteinovém profilu. Vzorky, které obsahují stejné složení druhů borélií vykazují podobné složení izolovaných proteinů. Příkladem mohou být proteinové profily BGHUB a Bss, které mají podobné oblasti přibližně od 30 kDa do 70 kDa. Z obrázků je také vidět, že se u většiny vzorků objevuje protein o velikosti kolem 60 kDa, protein o velikosti přibližně 40 kDa, protein o velikosti kolem 30 kDa na obrázku 7 silně exprimovaný u vzorků BG4, CB43, Bss, BG4 a BGHUB a protein o velikosti 20 kDa.



Obr. 8.: Ukázka elektroforetického rozdělení proteinů u vzorku **CB53** (izolovaný pomocí TPI) v 12% akrylamidovém gelu. Porovnání proteinů se standardem molekulových hmotností.



Obr. 9.: Různá ředění proteinů u vzorku **BGHUB** izolovaného pomocí sonikace v PBS. **1** - koncentrace proteinů 0,537 µg/ml, **2** - koncentrace proteinů 1,073 µg/ml, **3** - koncentrace proteinů 2,147 µg/ml, **4** - koncentrace proteinů 3,221 µg/ml, **5** - koncentrace proteinů 4,294 µg/ml.

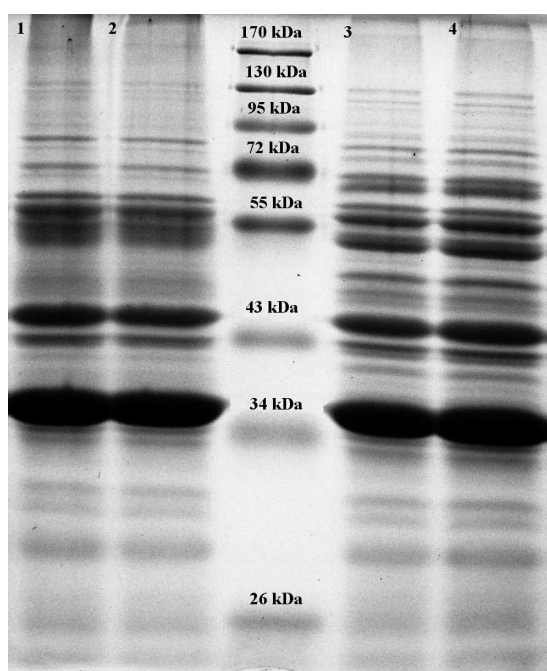
4.5 Separace proteinů nativní elektroforézou 'Blue Native-PAGE' a nativní gradientovou PAGE

Jelikož se sacharidové sondy nevázaly na proteiny, které byly analyzované při 'dot-blotech' v přítomnosti SDS a DTT, přešli jsme na použití nativních elektroforéz k separaci proteinů/lektinů.

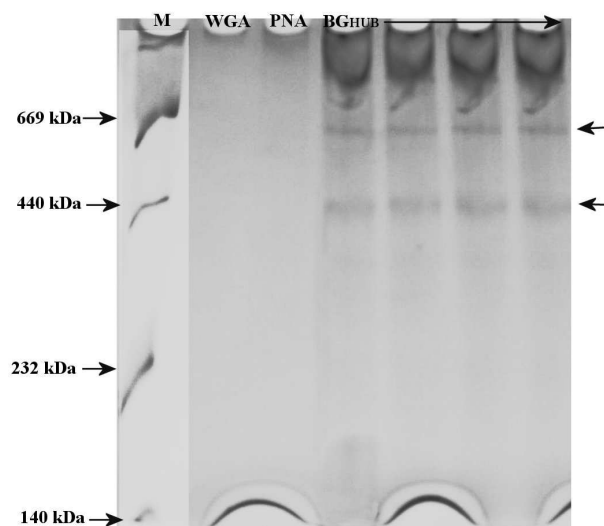
V 8 % akrylamidovém gelu nativní elektroforézou (viz. 3.2.14) a v gradientovém gelu 5-17.5 % gelu nativní gradientovou PAGE byly separovány proteiny a lektiny za podmínek uvedených 3.2.14-3.2.15.

Jako pozitivní kontrola vazby cukerných sond byly použity lektiny rozdělené v akrylamidovém gelu a přenesené na membránu. Byly vybrány lektiny s odpovídající vazebnou aktivitou k používaným sacharidovým sondám. Konečná koncentrace použitých lektinů byla 5 µg/ml.

Vzorky byly k separaci nativní elektroforézou připraveny ve vzorkovém pufru bez redukujícího DTT a bez tepelné denaturace.



Obr. 10.: Porovnání elektroforeticky rozděleného proteinu **BGHUB** (izolace pomocí sonikace) se vzorkovým pufrům **1,2** - bez DTT a **3,4** - s DTT.



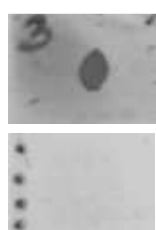
Obr.11.: Elektroforeticky rozdělené proteiny **BGHUB** a lektiny **WGA** a **PNA** rozdělené nativní gradientovou elektroforézou v gradientovém gelu 5-17.5%.

Vzorky z elektroforézy 'Blue Native-PAGE' se nepodařilo separovat v 8% gelu. Tento gel neměl dostatečně velké póry, aby jím nedenaturované proteiny prošly. Při nativní gradientové PAGE byl použit gradientový gel s gradientem 5%-17.5%, díky kterému nedenaturované proteiny postupně procházely gelem a zastavovaly se na rozmezí gradientů, kde už dál nemohly projít (obr. 11).

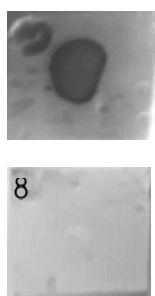
V nativních podmínkách byl používán vzorkový pufr stejného složení, ale bez DTT. Obrázek 8 ukazuje srovnání na rozděleném proteinu BGHUB s DTT a bez DTT. Je vidět, že vzorky rozdělné bez denaturačního činidla DTT mají některé proteiny, které jsou s DTT dobře viditelné, propojené či špatně čitelné.

4.6. Značení pomocí sacharidových sond

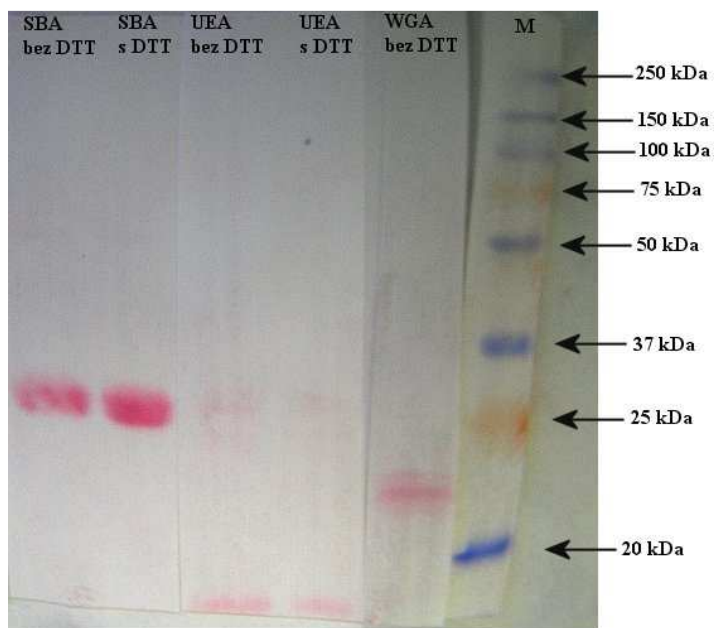
Proteiny rozdělené v akrylamidovém gelu, přenesené technikou 'Western blotting' na PVDF membránu a nerozdělené směsi proteinů aplikované přímo na PVDF membránu technikou 'dot blotting' byly značeny pomocí sacharidových sond, podle postupu viz 3.2.16.b. Kontrola byla provedena stejným postupem, avšak místo cukerných sond byl použit TBS doplněný kovovými ionty. Jako pozitivní kontrola na vazbu sacharidů, byly použity rostlinné lektiny o známých vazebných specifitách pro sacharidy. Lektin 'Concanavalin A' (ConA) s vazebnou specifitou pro α -D-manosu, lektin 'Wheat germ agglutinin' (WGA) s vazebnou specifitou pro N-acetylglukosamin, lektin 'Soybean agglutinin' (SBA) s vazebnou specifitou pro N-acetylgalaktosamin a lektin 'Ulex europaeus agglutinin' (UEA) s vazebnou specifitou pro L-fukosu.



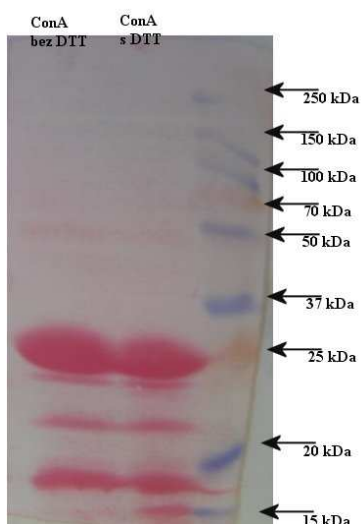
Obr. 12.: Dot-blot: **3**- Nerozdělený protein **B2** (koncentrace 4,61 μ g/ml) aplikovaný na PVDF membránu, inkubovaný s N-acetyl-D-galaktosaminylovou sondou a HRP-streptavidinem.
4- Kontrola neznačená sacharidovou próbou, ale inkubována s TBS s ionty a HRP-streptavidinem.



Obr. 13.: Dot-blot: **3**- Nerozdělený lektin **SBA** (koncentrace 5 μ g/ml) aplikovaný na PVDF membránu, inkubovaný s N-acetyl-D-galaktosaminylovou sondou a HRP-streptavidinem
8- Kontrola neznačená sacharidovou próbou, ale inkubována s TBS s ionty a HRP-streptavidinem.

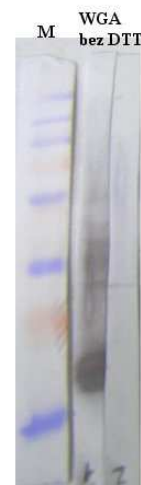


Obr. 14.: Proteiny/lektiny **WGA, UEA, SBA** elektroforeticky rozdělené v akrylamidovém gelu, v přítomnosti DTT nebo bez DTT, přenesené na PVDF membránu a obarvené v Ponceau-S.



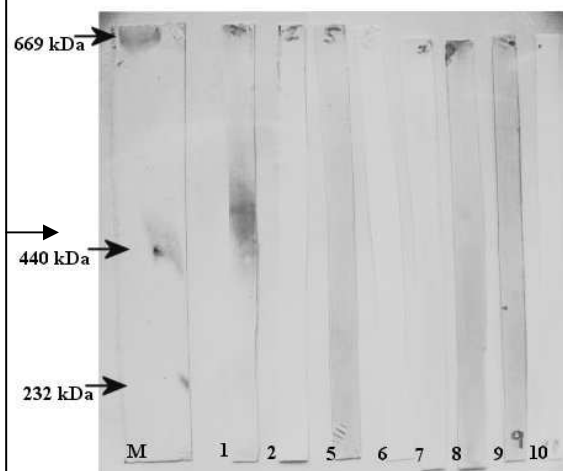
Obr.15.: Lektin **ConA** elektroforeticky rozdělený v akrylamidovém gelu se vzorkovým pufrům s nebo bez DTT. Proteiny byly přeneseny na PVDF membránu a obarveny v Ponceau-S.

Obr. 16.: Proužek membrány s elektroforeticky rozděleným **WGA** se vzorkovým pufrům bez DTT, po inkubaci s N-acetyl-D-glukosaminylovou sondou a HRP-streptavidinem.



Obr.17.: Proteiny a lektiny přenesené nativní gradientovou elektroforézou byly značeny podle následujícího schématu:

- 1** - **WGA** po inkubaci s N-acetyl-D-glukosaminylovou sondou a HRP-streptavidinem;
- 2** - **WGA** - kontrola inkubována pouze s HRP-streptavidinem;
- 5** - **ConA** po inkubaci s α -manosylovou sondou a HRP-streptavidinem;
- 6** - **ConA** -kontrola - značena pouze HRP-streptavidinem;
- 7** - **BGHUB** po inkubaci s N-acetyl-D-glukosaminylovou sondou a HRP-streptavidinem;
- 8** - **BGHUB** - po inkubaci s N-acetyl-D-galaktosaminylovou sondou a HRP-streptavidinem
- 9** - **BGHUB** po inkubaci s α -manosylovou sondou a HRP-streptavidinem;
- 10** - kontrola **BGHUB** inkubovány jen s HRP-streptavidinem.



Pokusy značit elektroforeticky rozdělené proteiny i 'dot-bloty' proteinů, které byly izolovány pomocí protokolu TPI, byly neúspěšné. Nepodařilo se nám značit takto izolované proteiny. Jako srovnávací vzorek kontroly vaznosti sacharidové sondy na proteinový izolát borélie byl použit protein B2, který byl izolován sonikací a následnou centrifugací v PBS. Tento protein vykazoval na 'dot-blotech' reakci pouze u N-acetylgalaktosaminu (obr. 12). U proteinu BGHUB izolovaného již v PBS byla reakce na N-acetylgalaktosamin také silná, ale kontrola značená pouze streptavidinem konjugovaným s HRP byla pozitivní na přítomnost nespecifických vazeb.

Takto připravené proteiny rozdělené pomocí SDS-PAGE ve vzorkovém pufru s denaturačním činidlem DTT nebo bez něj (obr. 10), však byly neúspěšné. Ani v jednom případě nedošlo k navázání sacharidové sondy na proteiny přenesené na membránu.

Jako pozitivní kontroly jsme použili elektroforeticky rozdělené lektiny, které by se měly vázat se sacharidovými sondami a měly by tak potvrdit správnou funkci vaznosti sond. Avšak jakkoliv se sacharidové sondy vázaly na lektiny SBA a WGA na 'dot-blotech', sondy nebyly schopné se navázat na rozdělené proteiny v SDS-PAGE. Pouze s výjimkou WGA,

který navázal N-acetylglukosamin (obr.16). Lektin WGA byl nejprve separován se vzorkovým pufrům v přítomnosti DTT a s tepelnou denaturací v akrylamidovém gelu, ale k vazbě nedošlo. Teprve bez přítomnosti DTT ve vzorkovém pufru došlo k navázání sondy na vazebné místo lektinu. Po přenesení elektroforeticky přenesených proteinů na membránu, byla membrána obarvená v Ponceau-S (obr. 14, 15), abychom se ujistili, že přenos proteinů proběhl v pořádku. Jelikož se sacharidové sondy nevázaly na ostatní konkrétní lektiny s výjimkou vazby N-acetylglukosaminu na WGA, byly změněny podmínky separace proteinů. Proteiny a lektiny byly rozděleny v akrylamidovém gelu nativní elektroforézou 'Blue Native PAGE' a nativní gradientovou elektroforézou 'Pore limit gradient PAGE'. Proteiny BGHUB a lektiny (WGA, ConA) přenesené na membránu z gelu gradientovou elektroforézou byly opět značeny sacharidovými sondami, avšak pozitivní výsledek protein-sacharidové interakce byl zaznamenán opět pouze v případě WGA po inkubaci s N-acetyl-D-glukosaminylovou sondou. (obr. 17).

5. DISKUSE

Cílem práce bylo úspěšně pasážovat borélie z izolátů klíšťat sesbíraných v okolí Českých Budějovic, zjistit druhové složení komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato v těchto izolátech metodou PCR s druhově specifickými primery a demonstrovat rozdílné zastoupení antigenních struktur v izolovaných proteinech. Dalším cílem bylo prokázat schopnost borélií vázat sacharidy.

Spirochéty byly pasážovány v BSK-H mediu po dobu několika měsíců. Ke kultivaci byly zprvu používány antibiotika, abychom vyloučili kontaminaci vzorků. Další pasáže byly kultivovány bez antibiotik a díky vhodným podmínkám spirochéty rostly velmi rychle. Spirochéty byly pravidelně kontrolovány mikroskopicky v temném poli. Kultivace je vhodnou metodou k získání dostatečného materiálu k další identifikaci izolátů (Wittenbrink *et al.* 1996).

Získané izoláty byly zkoumány na druhové zastoupení *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii* a *B. valaisianu*, pomocí PCR s druhově specifickými primery. Optimalizovali jsme PCR cyklus a minimalizovali jsme trvání reakce, aby množství DNA spirochét bylo dostatečné k vizualizaci v agarozovém gelu bez další reamplifikace PCR produktu. Použitím SYBR Greenu se zvýšila citlivost detekce DNA v gelu.

Nejčastěji izolovaným druhem komplexu *B. burgdorferi* sensu lato v Evropě je *B. garinii* (39.1%), třetím nejčastěji izolovaným druhem pak *B. burgdorferi* sensu stricto (15.9%). Procentuální nálezy *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, *B. garinii* i *B. valaisiana* v izolátech podporují i dříve publikované výsledky o výskytu druhů v okolí Českých Budějovic (Štěpánková-Tresová *et al.* 2000, Hubálek a Halouzka 1997).

Proteiny izolované ze vzorků, u kterých bylo prokázáno stejné zastoupení borélií, měly velmi podobný profil proteinů. Nejvíce exprimované byly většinou proteiny o velikosti okolo 60 kDa, 40 kDa, 30 kDa a 20 kDa. Tyto proteiny odpovídají proteinům charakteristickým pro komplex *B. burgdorferi* sensu lato jako jsou: flagelinový protein molekulová velikost 41 kDa, 60 kDa protein a povrchové proteiny OspA (31 kDa), OspB(34 kDa) a OspC o velikosti 21-25 kDa (Wilske *et al.* 1991). Jelikož nemůžeme přesně určit jaké proteiny jsou skutečně zastoupeny v pozorovaném profilu proteinů, nemůžeme ani spekulovat o různorodosti těchto profilů. Různá síla exprese proteinů u jednotlivých izolátů může být také ovlivněna počtem pasáží v kulturách. Variabilní zastoupení proteinů u jednotlivých izolátů obsahující různé druhy spirochét LB nemůže být přikládáno k různým

vlivům ovlivňujícím spirochéty *in vivo*. Tyto vlivy jsou například různé: geografické rozšíření LB spirochét, odlišní hostitelé, ale také odlišné klinické projevy patogenních původců onemocnění LB. Je možné, že z důvodu různých podmínek ve svém okolí by spirochéty reagovaly na toto prostředí a měnily tak expresi různých proteinů, avšak studium této problematiky bylo provedeno *in vitro*, čímž nelze tyto úvahy ani vyvrátit ani potvrdit. Stejně jako vliv zastoupených druhů v izolátech. Jelikož jsme neměli k dispozici čisté kultury jednotlivých druhů, nemohli jsme porovnat rozdíly v proteinových profilech izolátů a jasně říci, zda více druhů v kultuře ovlivňuje tento profil.

Proteinové profily byly určovány pomocí elektroforézy SDS-PAGE, kde jsou vzorky v prostředí obsahujícím detergent sodium dodecyl sulfate (SDS). Tento iontový detergent denaturuje proteiny ve vzorku změnou konformace od nativního stavu proteinů a pevně je váže ke své molekule. Molekuly SDS díky sulfátové skupině udělují proteinům svůj vlastní negativní náboj a vytváří tak uniformní náboj všem proteinům. Zavedením elektrického proudu do elektroforézy začnou všechny proteiny putovat gelem směrem k anodě. SDS-PAGE gel rozděluje proteiny primárně podle velikosti, jelikož náboj je relativně stejný (Laemmli 1970).

Proteiny a lektiny byly také rozdělovány nativní elektroforézou, která nám dovoluje oddělovat proteiny v nativní terciární konformaci a ponechává proteinovým komplexům biologickou aktivitu, což může přispět k lepší detekci protilátkami. 'Blue Native PAGE' má tu výhodu, že jediný detergent přidávaný ke vzorkům slouží k solubilizaci membránových lipidů a není škodlivý pro proteiny. Při této elektroforéze to není SDS, kdo uděluje proteinům záporný náboj, ale Coomassie blue G-250 přidávaný ke vzorkům a pH 7.5 pufru. Proteiny nejsou rozdělovány podle své molekulové hmotnosti, ale podle velikosti pórů v gradientovém gelu nativní elektroforézy. Tudíž nejsou vhodné pro přesné stanovení molekulové velikosti (Wittig et al. 2006). Jelikož proteiny zůstávají v komplexech, jejich velikost se značně liší od té, kterou mají při použití denaturačních činidel (SDS-PAGE). Proto při použití 8% gelu při nativní elektroforéze 'Blue Native PAGE' nedošlo k rozdělení lektinů ani proteinů izolovaných z borélií.

Použitím nativní elektroforézy 'Pore limit gradient PAGE' jsme eliminovali denaturační vliv na proteiny. Na rozdíl od 'Blue Native PAGE' gel gradientové nativní elektroforézy obsahuje SDS. Elektroforéza je spuštěná na půl hodiny ještě před nanesením vzorků a díky tomu SDS putuje gelem před vzorky a rozdělované proteiny se s SDS téměř nesečkají. I zde se proteiny rozdělují jen v závislosti na velikosti pórů gradientového gelu.

K prokázání sacharidových vazebných míst proteinů/lektinů *B. burgdorferi* jsme použili sacharidové sondy. Některé sacharidové sondy ukazovaly pozitivní reakci

na 'dot-blotech'. Protein BGHUB se vázal se sondou obsahující N-acetylglukosamin, lektin WGA se také vázal se sondou obsahující sacharid N-acetylglukosamin a lektin SBA se vázal se sondou obsahující sacharid N-acetylgalaktosamin. Avšak na membrány s elektroforeticky rozdělenými proteiny/lektiny (SDS-PAGE) se kromě N-acetylglukosaminu, který se vázal na elektroforeticky rozdělený lektin WGA, nevázala žádná další sonda. Je tedy možné, že některé sacharidové sondy mohou reagovat s denaturovanými bílkovinami, jindy je nutné použít nativní elektroforézu. Proto jsme proteiny a lektiny rozdělili pomocí nativní elektroforézy a přenesli na membrány, které jsme opět značili sacharidovými sondami. Avšak pozitivní výsledek interakce byl zaznamenán opět pouze v případě kontrolního lektinu WGA.

Neprokázali jsme přítomnost sacharid vázajících míst u spirochét komplexu *B. burgdorferi* sensu lato pomocí sacharidových sond s následujícími cukrenými zbytky s glykosidickými vazbami uvedené anomerní konfigurace: α -D-manosa, α -D-galaktosa, β -N-acetylgalaktosamin a β -N-acetylglukosamin konjugované s biotinem. Je možné, že izolované proteiny/lektiny ztrácejí svoji původní konformaci a tím i vazebné místo pro sacharidy. Nebo je možné, že sacharidové sondy dodávané firmou Syntesom nejsou vhodné k vazbě na buněčné i izolované lektiny.

6. ZÁVĚR

Vzorky izolátů byly úspěšně pasážovány *in vitro* při standardních podmínkách platných pro *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Izolovaná DNA byla pomocí druhově specifických primerů a PCR prozkoumána na druhové složení *B. burgdorferi* sensu lato v těchto vzorcích. Druhové složení odpovídá již publikovaným studiím o výskytu jednotlivých druhů (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii* a *B. valaisiana*) v klíšťatech pocházejících z lokalit v okolí Českých Budějovic.

Ze získaných izolátů byly izolovány proteiny a pomocí elektroforézy v akrylamidovém gelu byl určen proteinový profil jednotlivých izolátů. Izolované proteiny byly také přeneseny na membránu metodou 'Western blotting' a byly značeny sacharidovými sondami konjugovanými s biotinem k potvrzení vlastnosti borélií vázat sacharidové konjugáty. Nepodařilo se nám prokázat přítomnost sacharidových vazebných míst u spirochét z druhového komplexu *B. burgdorferi* sensu lato.

7. POUŽITÁ LITERATURA

- ANDERSON J. 1986: Involvement of birds in the epidemiology of the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* **51**: 394–396.
- BARANTON G., POSTIC D., SAINT GIRONS I., BOERLIN P., PIFFARETTI J. C., ASSOUS M., GRIMONT P. A. 1992: Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**: 378–383.
- BARTŮŇEK P. a kolektiv 1996: Lymeská borelióza, Avicenum-zdravotnické nakladatelství. pp 128.
- BEDNÁŘ M. a spol.: Lékařská mikrobiologie, Marvil 1997, pp.190-192.
- BEN-MENACHEM G., KUBLER-KIELB J., COXON B., YERGEY A., SCHNEERSON R. 2003: A newly discovered cholesteryl galactoside from *Borrelia burgdorferi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**(13): 7913–7918.
- BERGSTRÖM, S., NOPPA, L., GYLFE, A. AND OSTBERG, Y. 2002: Molecular and cellular biology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. V publikaci: Lyme Borreliosis: Biology, Epidemiology and Control, pp. 47–90. CABI International.
- BRADFORD M. M. 1976: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- BURGDORFER W. 2001: Arthropod-borne spirochetosis: a historical perspective. *Eur. J. Clin. Microbiol. Dis.* **20**: 1–5.
- DEFOE G., COBURN J. 2001: Delineation of *Borrelia burgdorferi* p66 Sequences Required for Integrin $\alpha_{\text{Iib}}\beta_3$ Recognition. *Infect. Immun.* **69**(5): 3455–3459.
- DEMAERSCHALCK I., MESSAOUD A.B., KESEL M. De, HOYOIS B., LOBET Y., HOET P., BIGAIGNON G., BOLLEN A., GODFROID E. 1995: Simultaneous presence of different *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in biological fluids of Lyme disease patients. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 602–608.
- FUKUNAGA M., HAMASE A., OKADA K., NAKAO M. 1996: *Borrelia tanukii* sp. nov. and *Borrelia turdae* sp. nov. found from ixodid ticks in Japan: rapid species identification by 16S rRNA gene-targeted PCR analysis. *Microbiol. Immunol.* **40**: 877–881.

- GE Y., CORUM L., SLAUGHTER C.A., CHARON N.W. 1998: Structure and expression of the FlaA periplasmic flagellar protein of *Borrelia burgdorferi*. J. Bacteriol. **180**: 2418–2425.
- GOLDSTEIN, I. J., HUGHES R. C., MONSIGNY M., OSAWA T., SHARON N. 1980. What should be called a lectin? Nature (London) **285**: 66.
- 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. 2004: Outersurface protein C of the Lyme disease spirochete: a protein induced in ticks for infection of mammals. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **101**: 3142–3147.
- GRUBHOFFER L., GOLOVCHENKO M., VANCOVÁ M., ZACHAROVOVÁ-SLAVÍČKOVÁ K., RUDENKO N. and OLIVER J.H. 2005: Lyme borreliosis: insights into tick- / host-borrelia relations. Folia Parasitol. **52**: 279–294.
- GRUBHOFFER L., KOVAŘ V., RUDENKO N. 2004: Tick lectins: structural and functional properties. Parasitology **129**: S113-S125.
- GRUBHOFFER L., UHLÍŘ J., VOLF P. 1992: Hemagglutination activity of *Borrelia burgdorferi* and *B. recurrentis*. 1st International Conference on Lyme Borreliosis, Prague, Abstract 22.
- GRUBHOFFER L., UHLÍŘ J., VOLF P. 1993: Functional and structural identification of a new lectin activity of *Borrelia recurrentis* spirochetes. Comp. Biochem. Physiol. **105B**: 535–540.
- HAGMAN K. E., LAHDENNE P., POPOVA T.G., PORCELLA S. F., AKINS D. R., RADOLF J. D., NORSGARD M. V. 1998: Decorin-binding protein of *Borrelia burgdorferi* is encoded within a two-gene operon and is protective in the murine model of Lyme Borreliosis. Infect. Immun. **66**(6): 2674–2683.
- HANINCOVÁ K., TARAGELOVÁ V., KOCI J., SCHÄFER S. M., HAILS R., ULLMANN A. J., PIESMAN J., LABUDA M., KURTENBACH K. 2003: Association of *Borrelia garinii* and *B. valaisiana* with Songbirds in Slovakia. Appl. Environ. Microbiol. **69** (5): 2825-2830.
- HOSSAIN H., WELLENSIEK H. J., GEYER R., LOCHNIT G. 2001: Structural analysis of glycolipids from *Borrelia burgdorferi*. Biochimie **83**(7): 683-92.
- HUBÁLEK Z., HALOUZKA J. 1997: Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe, a review Eur. J. Epidemiol. **13**: 951-957.
- HUMAIR P.F. RAIS O., GERN L. 1999: Transmission of *Borrelia afzelii* from *Apodemus* mice

- and *Clethrionomys* voles to *Ixodes ricinus* ticks: differential transmission pattern and overwintering maintenance. *Parasitology* **118**: 33–42.
- KURTENBACH, K., KAMPEN H., DIZIJ A., ARNDT S., SEITZ H. M., SCHAIBLE U. E., SIMON M. M. 1995: Infestation of rodents with larval *Ixodes ricinus* L. (Acari: Ixodidae) is an important factor in the transmission cycle of *Borrelia burgdorferi* s.l. in German woodlands. *J. Med. Entomol.* **32**: 807–817.
- LAEMMLI U.K. 1970: Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- MAUPIN, G.O. GAGE K. L., PIESMAN J., MONTENIERI J., SVIAT S. L., VANDER, ZANDEN L., HAPP C. M. , DOLAN M., JOHNSON B. J. 1994: Discovery of an enzootic cycle of *Borrelia burgdorferi* in *Neotoma mexicana* and *Ixodes spinipalpis* from northern Colorado, an area where Lyme disease is nonendemic. *J. Infect. Dis.* **170**: 636–643.
- MCDOWELL J. V., SUNG S. Y., PRICE G., MARCONI R. T. 2001: Demonstration of the genetic stability and temporal expression of select members of the Lyme disease spirochete OspF protein family during infection in mice. *Infect. Immun.* **69**(8): 4831–4838.
- MASUZAWA T. 2004: Terrestrial distribution of the Lyme borreliosis agent *Borrelia burgdorferi* sensu lato in East Asia. *Jpn. J. Infect. Dis.* **57**(6): 229-35.
- OLSEN B., JAENSON T. G., BERGSTROM S. 1995: Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato-infected ticks on migrating birds. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3082–3087.
- PAL U., DE SILVA A. M., MONTGOMERY R. R., FISH D., ANGUITA J., ANDERSON J. F., LOBET Y., FIKRIG E. 2000: Attachment of *Borrelia burgdorferi* within *Ixodes scapularis* mediated by outer surface protein A. *J. Clin. Invest.* **106**(4): 561–569.
- PAL U., YANG X., CHEN M., BOCKENSTEDT L. K., ANDERSON J. F., FLAVELL R. A., NORGARD M. V., FIKRIG E. 2004: OspC facilitates *Borrelia burgdorferi* invasion of *Ixodes scapularis* salivary glands. *J. Clin. Invest.* **113**(2): 220-30.
- PARVEEN N., CAIMANO M., RADOLF J.D., LEONG J.M. 2003: Adaptation of the Lyme disease spirochaete to the mammalian host environment results in enhanced glycosaminoglycan and host cell binding. *Mol. Microbiol.* **47**: 1433–1444.
- PARVEEN N., LEONG J.M. 2000: Identification of a candidate glycosaminoglycan-binding adhesin

- of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. Mol. Microbiol. **35**: 1220–1234.
- POSTIC D., ASSOUS M. V., GRIMONT P. A., BARANTON G., 1994: Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of *rrf*(5S)-*rrl*(23S) intergenic spacer amplicons. Int. J. Syst. Bacteriol. **44**: 743–752.
- POSTIC D., GARNIER M., BARANTON G. 2007: Multilocus sequence analysis of atypical *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates – Description of *Borrelia californiensis* sp. nov., and genomospecies 1 and 2. Int. J. Med. Microbiol. (v tisku) www.sciencedirect.com doi:10.1016/j.ijmm.2007.01.006.
- POSTIC D., MARTI RAS N., LANE R. S., HENDSON M., BARANTON G. 1998: Expanded Diversity among Californian *Borrelia* Isolates and Description of *Borrelia bissettii* sp. nov. (Formerly *Borrelia* Group DN127). J. Clin. Microbiol. **36**(12): 3497–3504.
- RIJPKEMA S. G., HERBES R. G., VERBEEK-DE KRUIF N., SCHELLEKENS J. F. 1996: Detection of four species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected from roe deer (*Capreolus capreolus*) in The Netherlands. Epidemiol. Infect. **117**(3): 563-6.
- RIJPKEMA S.G., TAZELAAR D.J., MOLKENBOER M.J., NOORDHOEK G.T., PLANTINGA G., SCHOOLS L.M., SCHELLEKENS J.F. 1997: Detection of *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* and group VS116 by PCR in skin biopsies of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans. Clin. Microbiol. Infect. **3**: 109–116.
- RUDENKO N., GOLOVCHENKO M., GRUBHOFFER L. 1999: Lectin-like sequences in genome of *Borrelia burgdorferi*. Folia Parasitol. **46**: 81–90.
- RUDENKO N., GOLOVCHENKO M., GRUBHOFFER L. 2001: Lectin of *Borrelia burgdorferi*, a new factor of spirochetal virulence? Rev. Infect. Dis. (Suppl. **3**): 102–104.
- SAMBRI V., MASSARIA F., ARDIZZONI M., STEFANELLI C., CEVENINI R. 1993: Glycoprotein patterns in *Borrelia* spp. Zentralbl. Bakteriol. **279**: 330–335.
- SHARON N., LIS H. 1995: Lectins--proteins with a sweet tooth: functions in cell recognition. Essays Biochem. **30**: 59-75.
- SCHOELER G. B., LANE R. S. 1993: Efficiency of transovarial transmission of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, in the western blacklegged tick, *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). J. Med. Entomol. **30**: 80–86.

- SCHWAN T.G., PIESMAN J., GOLDE W.T., DOLAN M.N., ROSA P.A. 1995: Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **92**: 2909–2913.
- SUN Y., XU R. 2003: Ability of *Ixodes persulcatus*, *Haemaphysalis concinna* and *Dermacentor silvarum* ticks to acquire and transstadially transmit *Borrelia garinii*. Exp. and Appl. Acarol. **31**: 151–160.
- ŠTĚPÁNKOVÁ-TRESOVÁ G., KOPECKÝ J., KUTHEJLOVÁ M. 2000: Identification of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks from southern Bohemia using monoclonal antibodies. Zentralbl Bakteriologie. **289**(8): 797-806.
- VANCOVÁ M., NEBESÁŘOVÁ J., GRUBHOFFER L. 2005: Lectin-binding characteristics of a Lyme borreliosis spirochete *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. Folia Microbiol. **50**: 229–238.
- VASTA G. R., MARCHALONIS J. J. 1984: Summation: immunobiological significance of invertebrate lectins. Progr. Clin. Biol. Res. **154**: 177–191.
- WANG G., VAN DAM A. P., SCHWARZ I., DANKERT J. 1999: Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. Clin. Microbiol. Rev. **12**(4): 633–653.
- WITTENBRINK M. M., REUTER C., MANZ M. L., KRAUSS H. 1996: Primary culture of *Borrelia burgdorferi* from *Ixodes ricinus* ticks. Zentralbl. Bakteriologie. **285**(1): 20-8.
- WITTIG I., BRAUN H.-P., SCHÄGGER H. 2006: Blue native PAGE. publikováno online, Nature Publishing Group <http://www.nature.com/natureprotocols>. doi:10.1038/nprot.2006.62.
- YANG X. F., PAL U., ALANI S. M., FIKRIG E., NORGDARD M. V. 2004: Essential role for OspA/B in the life cycle of the Lyme disease spirochete. J. Exp. Med., **199**(5): 641-648.