

PROTEOMOVÁ ANALÝZA BAKTERIE *BORRELIA AFZELII*

¹Věra NEUBAUEROVÁ, ²Aleš MACELA, ²Lenka HERNYCHOVÁ, ²Juraj LENČO, ²Martin BRYCHTA,

²Jana HAVLASOVÁ, ³Jan KOPECKÝ, ³Jitka PECHOVÁ

¹Ústřední vojenský zdravotní ústav, Praha

²Univerzita obrany, Fakulta vojenského zdravotnictví, Ústav molekulární patologie, Hradec Králové

³Akademie věd ČR, Parazitologický ústav, České Budějovice

Souhrn

Borrelia afzelii je jedním z možných původců lymské boreliózy v České republice. Důležitým zdrojem informací o tomto mikroorganismu je v současnosti proteomová analýza, která svými výsledky umožňuje pochopit vznik a průběh tohoto onemocnění. Proteiny byly identifikovány pomocí dvojrozměrové elektroforézy a hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF). Celkem bylo pro identifikační proces vybráno 34 proteinových spot *Borrelia afzelii* (kmen CB43). Identifikace byla úspěšná u 23 proteinů. Tento počet představoval 11 různých proteinů. Identifikováno bylo několik variant *OspC* proteinu, dále několik proteinů s enzymatickou funkcí, protein zapojený do procesu chemotaxe *CheY* a prekursor membránového proteinu P66.

Klíčová slova: *Borrelia afzelii*; Proteomová analýza; 2-DE; MALDI-TOF MS.

Proteome Analysis of Bacterium *Borrelia Afzelii*

Summary

Borrelia afzelii is one of potential etiological agents of Lyme disease in the Czech Republic. An important source of information about this microorganism is proteome analysis. It allows to understand pathogenesis of Lyme disease. The proteins were identified by 2-dimensional electrophoresis and mass spectrometry (MALDI-TOF). Overall 34 protein spots of *Borrelia afzelii* (strain CB43) were chosen for identification. This process was done successfully in case of 23 proteins. This number was represented by 11 different proteins. We identified some variants of *OspC* protein, several enzymes, protein of chemotaxis *CheY* and Membrane associated protein p66 precursor.

Key words: *Borrelia afzelii*; Proteome analysis; 2-DE; MALDI-TOF MS.

Úvod

Proteomová analýza našla široké uplatnění také v lékařství. V oblasti mikrobiologie je jejím cílem zejména identifikace proteinů spojených s patogenitou a identifikace proteinů zahrnutých v procesu interakce mezi hostitelem a patogenem. Snahou je nalezení a identifikace bakteriálních markerů, které zrychlí a zjednoduší analýzy v klinické praxi. Na základě těchto poznatků mohou být vytvořeny rychlé, relativně jednoduché a přesné metody detekce, identifikace a charakterizace různých onemocnění a jejich původců.

Lymská borelióza (LB) je onemocnění, které je způsobováno bakteriemi rodu *Borrelia* ze skupiny označované jako *Borrelia burgdorferi sensu lato* (6). Souvislost s LB byla prokázána u tří genospecies z této skupiny: *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi sensu stricto* a *Borrelia garinii* (4). Borelie mají vel-

mi komplikovaný životní styl. Patogen je udržovaný v enzootickém cyklu, který kromě patogena zahrnuje vektor a hostitele. Výrazně se tak mění jeho životní podmínky, a musí proto mít schopnost adaptovat se na velice rozdílné podmínky prostředí, jež osidluje. Kolonizace klíštěte je spojována s *OspA* proteinem. Proteiny *DbpA*, *DbpB*, *Bgp*, *P66*, *P47* a pravděpodobně i *ErpT* jsou spojovány s kolonizací hostitele, transmise je spojována s proteinem *OspC* a hostitelská obrana s *Erp* (*OspE/F*) (2, 4, 18). Cílem této práce je rozšířit současné znalosti o *B. afzelii* jako jednom z možných původců LB.

Většina publikovaných prací, které jsou zaměřeny na studium proteomu borelií, se týká *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. Jungblut a spol. ve své práci rozdělili pomocí dvojrozměrové elektroforézy (2-DE) proteiny všech tří genospecies *B. burgdorferi s. l.*, jež jsou spojovány s LB. Do studie tak zahrnuli i *B. afzelii* a detekovali 200 proteinů (14).

Materiál a metody

Celý postup zpracování celobuněčného lyzátu, přípravy vysokorozlišovací dvojrozměrové elektroforézy, počítačového vyhodnocení proteinových map, hmotnostní spektrometrie a identifikace jednotlivých proteinů byl proveden podle dříve publikovaného postupu (16).

Pro analýzu byla použita 12. pasáž kmene CB43 *B. afzelii*, který byl kultivován z *Ixodes ricinus* (L., 1758) – samice (25). Všechny kultivace probíhaly v Barbour-Stoenner-Kelly-H médiu a byly prováděny v laboratoři Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích. Pro identifikaci jednotlivých proteinů byla použita hmotnostní spektra získaná pomocí MALDI-TOF hmotnostního spektrometru (Voyager-DETM STR, Perseptive Biosystems).

Proteiny byly identifikovány s využitím programů ProteinProspector a ProFound. V obou případech byla použita NCBIInr databáze.

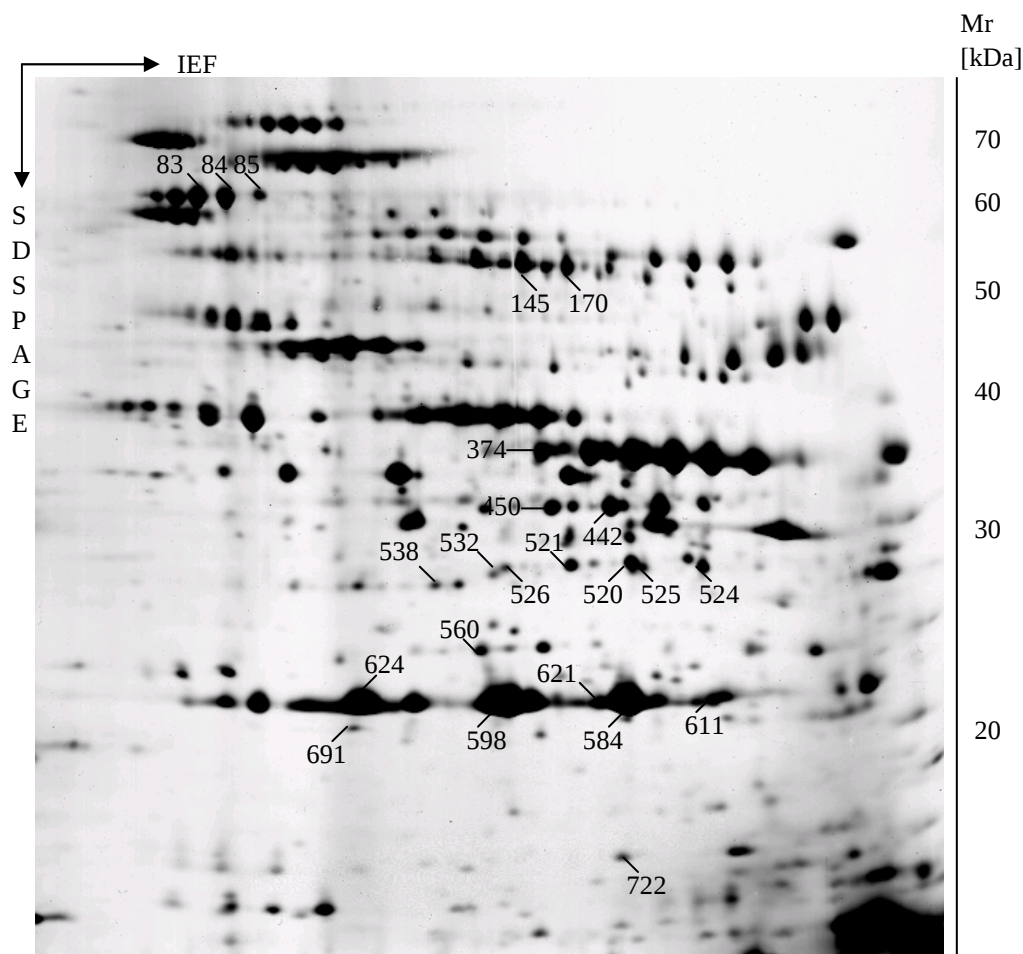
Výsledky a diskuse

Na základě počítačového zpracování a vyhodnocení všech proteinových map byla vytvořena referenční mapa *B. afzelii*. Identifikační postup byl proveden u 34 vybraných proteinových spot a z tohoto počtu bylo 23 spot úspěšně identifikováno. Většina z nich však byla nalezena v několika variantách. Tato skupina tak představuje 11 různých proteinů (tab. 1, obr. 1).

Tabulka 1

Identifikované proteiny *B. afzelii*

Číslo spoty	Název proteinu (podle databáze NCBIInr)	Mw (kDa)/pI teoretické	Mw (kDa)/pI naměřené	Pokrytí sekvence
83	Membrane associated protein p66 precursor	68,2/5,5	60,5/5,2	52%
84	Membrane associated protein p66 precursor	68,2/5,5	60,5/5,3	49%
85	Membrane associated protein p66 precursor	68,2/5,5	61,2/5,4	40%
145	Aminopeptidase I	51,5/5,8	52,2/6,4	47%
170	Aminopeptidase I	51,5/5,8	52,0/6,5	46%
374	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	36,3/7,7	34,1/6,4	63%
442	L-lactate dehydrogenase	34,9/6,4	31,0/6,5	32%
450	L-lactate dehydrogenase	34,9/6,4	31,0/6,5	29%
520	Phosphoglyceromutase	28,4/6,6	28,1/6,6	53%
521	Phosphoglyceromutase	28,4/6,6	28,0/6,5	47%
524	Phosphoglyceromutase	28,4/6,6	27,9/7,0	29%
525	Conserved hypothetical protein	25,6/6,6	27,8/6,7	56%
526	Phosphoglyceromutase	28,4/6,6	27,8/6,3	22%
532	Conserved hypothetical protein	25,6/6,6	27,5/6,3	53%
538	Triosephosphate isomerase	27,8/5,9	27,0/6,2	44%
560	Superoxide dismutase [Fe]	23,5/6,1	23,6/6,3	25%
584	Outer surface protein C	20,5/7,0	21,8/6,5	56%
598	Outer surface protein C	20,5/7,0	21,7/6,3	37%
611	Outer surface protein C	20,5/7,0	21,8/7,1	47%
621	Outer surface protein C	20,5/7,0	21,7/6,5	48%
624	Outer surface protein C	20,5/7,0	21,7/5,9	47%
691	Outer surface protein C	19,4/6,2	20,9/5,7	25%
722	CheY	16,3/7,7	12,6/6,5	45%



Obr. 1: Stříbřená 2-DE referenční mapa *B. afzelii*. Extrahované proteiny byly rozděleny pomocí IEF v rozsahu pH3-10 s následným SDS-PAGE gradientním gelem (9–16%). Číslo spot indikují identifikované proteiny.

Různé studie ukázaly schopnost bakterie měnit své povrchové struktury v různých stádiích svého životního cyklu v savcích a klíšťatech různou expresí genů pro lipoproteiny. Rozdílná genová exprese a variabilní rekombinace mohou přispět k produkci nových molekul povrchu spirochet. Tento jev je pravděpodobně spojen se schopností adaptovat se na hostitele, vyhnout se jeho imunitní odpovědi a umožňuje chronickou infekci (1, 10, 15, 17, 20, 21). Předpokládanými mechanismy perzistence *B. burgdorferi* v hostiteli jsou: potlačení aktivní imunity a únik před imunitou. K úniku dochází jak fázovou a antigenní proměnou, tak i vytvářením fyzických bariér (intracelulární lokalizace, vznik cyst, vyhledávání imunologicky privilegovaných míst). Mezi boreliové proteiny, které jsou do těchto procesů zahrnuty, patří zejména OspA, OspB, OspC, OspE, ErpA, ErpP, vlsE, BapA, dbpA (11).

Identifikovali jsme celkem šest variant proteinu

OspC patřícího do skupiny proteinů vnějšího povrchu. Jde o protein, který je velmi častým objektem studia, a to zejména z důvodu jeho velmi vysoké variability. Bylo zjištěno, že tento protein je variabilní dokonce i uvnitř jedné populace (26, 28, 29). U OspC byl prokázán význam v invazi slinných žláz vektora, což je klíčový krok v přenosu spirochet na hostitele. Spirochety začínají syntetizovat OspC během sání krve klíšťaty, zatímco jsou stále v klíštěcím trávicím traktu. Po přenosu borelií do savčího hostitele je exprese tohoto proteinu opět snížena. OspC tak hraje roli v rozšiřování spirochet v klíštěti a je označován jako virulenní faktor nezbytný pro počáteční stadium infekce savců (13, 19).

Identifikovány byly také i tři varianty prekurzoru proteinu P66. Ten je asociován s vnější membránou spirochet a je částečně povrchově exponován (3, 8). Později bylo popsáno, že u borelií jsou povrchově exponované oblasti tohoto proteinu vysoce

variabilní, a to ve velikosti i sekvenci (9). Bylo zjištěno, že se protein P66 podílí na tvorbě nespecifických difuzních kanálů, tj. má porinovou aktivitu. Protein je pravděpodobně důležitý pro patogenezi LB a fyziologii spirochet (22, 23).

Dalším z proteinů, které byly identifikovány, je Che Y. Bakterie se pohybují směrem k prostředí, které je pro ně příznivé a směrem od prostředí, které je pro ně nepříznivé. Tím zvyšují pravděpodobnost svého přežití. Pokud je tento proces odpovědí na chemické látky, je označován jako chemotaxe. Mezi geny pro chemotaxi patří cheR, cheW, cheA, cheY a cheB. Regulace chemotaxe byla intenzivně studována u *E. coli* a *S. enterica* serovar *Typhimurium* a bylo zjištěno, že významnou roli má v regulaci typu pohybu buněk fosforylace CheY (5, 24, 27). Poměrně málo je však známo o chemotaxi spirochet. Genom *B. burgdorferi* obsahuje homology několika genů pro motilitu a chemotaxi (cheA, cheY, cheW, cheB) a neobsahuje cheZ homolog (12).

Identifikováno bylo i několik proteinů s enzymatickou funkcí (aminopeptidáza I, glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza, L-laktát dehydrogenáza, fosfoglyceromutáza, triosefosfát izomeráza, superoxid dismutáza) a dva proteiny byly označeny jako tzv. hypotetické.

Závěr

Pro zkvalitnění diagnostiky a léčby LB je třeba detailněji poznat původce onemocnění LB. Cílem této práce je proto přispět k poznání proteinového složení *Borrelia afzelii* a tím také přispět k poznání enzootického cyklu borelií a nalezení důležitých faktorů virulence.

Přízpůsobení se hostiteli pomocí omezené exprese genů je pravděpodobně nezbytné pro únik před obranou hostitele a umožnění vzniku chronické infekce (15). Většina bakteriálních patogenů exprimuje faktory virulence na buněčném povrchu (příp. poblíž tohoto povrchu) nebo jsou jimi secernovány do extracelulárního okolí, kde mohou přímo ovlivňovat prostředí hostitele. Tyto faktory mohou být zahrnuty v počáteční fázi kolonizace a invaze, získávání živin z prostředí hostitele nebo úniku před obrannými mechanismy hostitele, mohou také přímo působit na tkáň hostitele. Také borelie produkují faktory virulence nezbytné pro přežití bakterie v cizím prostředí. Identifikace a charakterizace povrchových složek zahrnutých v patogenezi onemocnění přispívají k porozumění onemocnění a vedou

k efektivnější diagnostice a léčbě (7). Významným zdrojem nových informací jsou v současnosti postupy používané v proteomice. Znalosti o nově identifikovaných proteinech lze uplatnit v oblasti diagnostiky onemocnění a vývoje vakcín, stejně jako při hledání nových „cílů“ pro účinnou léčbu. Za nejdůležitější je považován cíl identifikovat markery onemocnění.

Literatura

1. ANGUITA, J. – HEDRICK, MN. – FIKRIG, E. Adaptation of *Borrelia burgdorferi* in the tick and the mammalian host. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2003, vol. 27, p. 493–504.
2. AUWAERTER, PG. – AUCOTT, J. – DUMLER, JS. Lyme borreliosis (Lyme disease): molecular and cellular pathobiology and prospects for prevention, diagnosis and treatment (Review). *Expert reviews in molecular medicine*, 2004, DOI: 10.1017/S1462399404007276, p. 1–22.
3. BARBOUR, AG. – TESSIER, SL. – HAYES, SF. Variation in a major surface protein on Lyme disease spirochetes. *Infect. Immun.*, 1984, vol. 4, p. 94–100.
4. BARBOUR, AG. Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. *Yale J. Biol. Med.*, 1984, vol. 57, p. 521–525.
5. BERG, HC. The rotary motor of bacterial flagella. *Annu. Rev. Biochem.*, 2003, vol. 72, p. 19–54.
6. BERGSTROM, S., et al. Molecular and Cellular Biology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. In *Lyme Borreliosis: Biology, Epidemiology and Control*. CAB International, UK, 2002, p. 47–90.
7. BLEDSOE, HA., et al. Isolation and partial characterization of *Borrelia burgdorferi* inner and outer membranes by using isopycnic centrifugation. *J. Bacteriol.*, 1994, vol. 176, p. 7447–7455.
8. BUNIKIS, J. – NOPPA, L. – BERGSTROM, S. Molecular analysis of a 66-kDa protein associated with the outer membrane of Lyme disease *Borrelia*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1995, vol. 131, p. 139–145.
9. BUNIKIS, J., et al. A Surface-Exposed Region of a Novel Outer Membrane Protein (P66) of *Borrelia* spp. Is Variable in Size and Sequence. *J. Bacteriol.*, 1998, vol. 180, p. 1618–1623.
10. CARROLL, JA. – GARON, CF. – SCHWAN, TG. Effects of environmental pH on membrane proteins in *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.*, 1999, vol. 67, p. 3181–3187.
11. EMBERS, ME. – RAMAMOORTHY, R. – PHILIPP, MT. Survival strategies of *Borrelia burgdorferi*, the etiologic agent of Lyme disease (Review). *Microb. Infect.*, 2004, vol. 6, p. 312–318.
12. FRASER, CM., et al. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature*, 1997, vol. 390, p. 580–586.
13. GRIMM, D., et al. Outer-surface protein C of the Lyme disease spirochete: A protein induced in ticks for infection of mammals. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 2004, vol. 101, p. 3142–3147.
14. JUNGBLUT, P. – GRABHER, G. – STÖFFLER, G. Comprehensive detection of Immunorelevant *Borrelia* gamii

- antigens by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, 1999, vol. 20, p. 3611–3622.
15. LIANG, FT., et al. Borrelia burgdorferi outer surface protein (osp) B expression independent of ospA. *Microb. Pathog.*, 2004, vol. 37, p. 35–40.
16. NEUBAUEROVÁ, V. – MACELA, A. – HERNYCHOVÁ, L., et al. Proteomová analýza mikroorganismu Borrelia garinii. *Voj. zdrav. Listy*, 2008, roč. 77, s. 104–109.
17. OHNISHI, J. – PIESMAN, J. – DE SILVA, AM. Antigenic and genetic heterogeneity of Borrelia burgdorferi populations transmitted by tick. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 2001, vol. 98, p. 670–675.
18. PAL, U. – FIKRIG, E. Adaptation of Borrelia burgdorferi in the vector and vertebrate host (Review). *Microb. Infect.*, 2003, vol. 5, p. 659–666.
19. PAL, U., et al. OspC facilitates Borrelia burgdorferi invasion of Ixodes scapularis salivary glands. *J. Clin. Investig.*, 2004, vol. 113, p. 220–230.
20. SCHWAN, TG., et al. Induction of an outer surface protein on Borelia burgdorferi during tick feeding. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 1995, vol. 92, p. 2909–2913.
21. SCHWAN, TG. Ticks and Borrelia: Model Systems for Investigating Pathogen-Arthropod Interactions (Mini Review). *Infect. Agents Dis.*, 1996, vol. 5, p. 167–181.
22. SKARE, JT., et al. Porin Activity of the Native and Recombinant Outer Membrane Protein Oms28 of Borrelia burgdorferi. *J. Bacteriol.*, 1996, vol. 178, p. 4909–4918.
23. SKARE, JT., et al. The Oms66 (p66) Protein Is a Borrelia burgdorferi Porin. *Infect. Immun.*, 1997, vol. 65, p. 3654–3661.
24. SZURMANT, H. – ORDAL, GW. Diversity in chemotaxis mechanisms among the bacteria and archaea. *Microbiol. Molecular Biology Rev.*, 2004, vol. 68, p. 301–319.
25. ŠTĚPÁNOVÁ-TRESOVÁ, G. – KOPECKÝ, J. – KUTHEJLOVÁ, M. Identification of Borrelia burgdorferi sensu stricto, Borrelia garinii and Borrelia afzelii in Ixodes ricinus ticks from Southern Bohemia using monoclonal antibodies. *Zentralbl. Bakteri.*, 1999, vol. 289, p. 797–806.
26. THEISEN, M., et al. Evolution of the Borrelia burgdorferi outer surface protein OspC. *J. Bacteriol.*, 1995, vol. 177, p. 3036–3044.
27. WADHAMS, GH. – ARMITAGE, JP. Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*, 2004, vol. 5, p. 1024–1037.
28. WANG, IN., et al. Genetic Diversity of ospC in a Local Population of Borrelia burgdorferi sensu stricto. *Genetics*, 1999, vol. 151, p. 15–30.
29. WILSKE, B., et al. Immunological and molecular polymorphism of OspC, an immunodominant major outer surface protein of Borrelia burgdorferi. *Infect. Immun.*, 1993, vol. 61, p. 2182–2191.

Korespondence: Kpt. Ing. Věra Neubauerová, Ph.D.
Ústřední vojenský zdravotní ústav
U Vojenské nemocnice 1200
169 02 Praha 6-Střešovice
e-mail: Vera.Neubauerova@seznam.cz

Do redakce došlo 20. 10. 2008