

Paweł Penza<sup>a</sup>, Anna Moniuszko-Malinowska<sup>b</sup>, Piotr Czupryna<sup>b</sup>, Sławomir Pancewicz<sup>b</sup>, Joanna Zajkowska<sup>b</sup>

## **BORRELIA BURGDORFERI – MORPHOLOGICAL STRUCTURE AND MOTILITY AS ADAPTATION FOR TRANSMISSION AND SURVIVAL IN THE HABITAT OF A TICK - VERTEBRATE SETUP**

### **BORRELIA BURGDORFERI - BUDOWA MORFOLOGICZNA I ZDOLNOŚĆ RUCHU JAKO ADAPTACJA DO TRANSMISJI I PRZETRWANIA W ŚRODOWISKU KLESZCZ - KRĘGOWIEC**

<sup>a</sup> - Szpital Powiatowy w Zambrowie Sp. z o.o.,  
Oddział Wewnętrzny

<sup>b</sup> - Uniwersytet Medyczny w Białymstoku;  
Klinika Chorób Zakaźnych i Neuroinfekcji

<sup>a</sup> – District Hospital in Zambrów Sp. z o.o.,  
Internal Medicine Ward

<sup>b</sup> – Medical University of Białystok;  
Department of Infectious Diseases and Neuroinfections

#### ABSTRACT

Lyme borreliosis is a multisystem chronic disease caused by *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.) spirochete transmitted by *Ixodes*. This bacterium has a remarkable ability to survive in tick-vertebrate setup. Its infection causes diagnostic and clinical difficulties. It was distinguished as a separate disease entity over 30 years ago. Observations made by Steere et al. proved to be a milestone since they found correlation between the occurrence of skin and joint lesions with tick bites. Further studies showed that the disease affects not only joints and skin, but also nervous and circulatory systems. Shortly afterwards, an etiological factor was identified – spirochete isolated by *W. Burgdorfer* (from ticks) as well as Steer and Benach (from blood). Research conducted by other authors confirmed that the spirochete named after its discoverer (*Borrelia burgdorferi*) is a common etiological factor for disease entities classified as Lyme borreliosis. The high incidence of Lyme borreliosis among the residents of endemic areas, along with diagnostic and therapeutic difficulties, make it a serious academic, clinical and social problem. The present article elaborates on bacterium structure and selected mechanisms facilitating the colonisation of particular hosts. Knowledge of those processes might be useful in understanding complex pathogenesis of lesions occurring in Lyme disease.

**Key words:** *Borrelia burgdorferi*, morphological structure, motility, tick, vertebrate

#### STRESZCZENIE

Borelioza z Lyme jest wieloukładową, przewlekłą chorobą wywoływaną przez krętki *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.) przenoszoną przez kleszcze rodzaju *Ixodes*. Bakteria ta ma niezwykle zdolności przeżycia w relacji kleszcz – kręgowiec. Zakażenie często stanowi trudności diagnostyczne i kliniczne. Jako odrębna jednostka chorobowa została wyodrębniona ponad 30 lat temu. Kamieniem milowym w jej poznawaniu okazały się obserwacje Steere i wsp., którzy wiązali występowanie zmian skórnych i stawowych z pokłuciem przez kleszcza. Dalsze badania udowodniły, że choroba dotyczy nie tylko stawów i skóry, ale także układu nerwowego i krążenia. Wkrótce potem zidentyfikowano czynnik etiologiczny, którym były krętki wyizolowane przez *W. Burgdorfer* (z kleszczy) i przez Steera i Benacha (z krwi). Badania innych autorów potwierdziły, że krętek nazwany na cześć odkrywcy *Borrelia burgdorferi* jest wspólnym czynnikiem etiologicznym jednostek chorobowych zaliczanych obecnie do boreliozy z Lyme. Wysoka zapadalność na boreliozę z Lyme wśród mieszkańców rejonów endemicznych, trudności diagnostyczne oraz terapeutyczne sprawiają, że stanowi ona poważny problem badawczy, kliniczny oraz społeczny. W artykule przedstawiono budowę bakterii oraz wybrane mechanizmy ułatwiające kolonizację poszczególnych żywicieli. Znajomość tych procesów może być przydatna w zrozumieniu skomplikowanej patogenezy zmian chorobowych występujących w boreliozy z Lyme.

**Słowa kluczowe:** *Borrelia burgdorferi*, budowa morfologiczna, zdolność ruchu, kleszcz, kręgowiec

## INTRODUCTION

Lyme borreliosis as a separate disease entity - the etiological factor of which turned out to be *Borrelia burgdorferi* spirochete - was distinguished over 30 years ago (1). Since that time it has been considered as one of the most significant zoonotic diseases of the northern hemisphere. *B. burgdorferi* is a unique, microaerophilic, Gram (-) bacterium which belongs to a numerous Spirochaete class. It comprises features of both Gram (-) and Gram (+) bacteria. It is characterised by remarkably spiral morphology and presence of periplasmic flagellum (2). It is characterised by a linear DNA and does not exhibit lipopolysaccharide in the outer membrane surrounding the cell. (2). Due to its wide adaptation mechanisms, e.g. changing expression of cell surface protein or a specific motility system ensuring active tissue movement, it functions very well in tick-vertebrate-tick cycle.

In Lyme borreliosis pathogenesis, out of 19 isolated species, three genospecies known collectively as *B. burgdorferi* sensu lato (s.l.) (3) are of utmost importance: *B. burgdorferi* sensu stricto (s.s.), *B. afzelii*, and *B. garinii*. New bacteria genospecies are still being discovered, which is why the list remains open (4). The occurrence of various species in Europe and the USA is the reason for different clinical symptoms of this disease on both continents.

*Borrelia* ssp. species exhibit a wide diversity in terms of length, diameter, spiral intensity or flagella number. Length oscillates within 10-30  $\mu\text{m}$ , diameter 0.2-0.5  $\mu\text{m}$  (average 0.33  $\mu\text{m}$ ), wave length and amplitude from peak to peak of a flat-striated structure may amount to 2.8  $\mu\text{m}$  and 0.8  $\mu\text{m}$  respectively (5).

**Shape.** *B. burgdorferi* spiral shape is the result of complex interaction between the cell cylinder - the shape of which is determined by peptidoglycan - and endoflagella. This correspondence was attested by inactivating the synthesis of main protein flagellum fibre (FlaB) through induced point mutation, the result of which is the loss of flagellum synthesis and, in consequence, motility and helical shape. The cells were taking *rod-shape* at that time. However, the inhibition of flagellum rotation caused motility loss, whilst spiral morphology was retained (6). Ultrastructurally, in *B. burgdorferi* cell, the following elements are distinguished: outer membrane, periplasmic space containing flagella, and periplasmic cylinder.

**Outer membrane.** The most common OMPs (*outer membrane proteins*) are OspA (*outer surface protein A*), OspB, OspC, OspD, OspE, OspF, and OspG. Osp-encoding genes are located in plasmids (7). OspA and OspC appeared to be very useful in attempts to find a vaccine (8). Host adaptation entails changes in expression of those proteins. OspA synthesis is dominant

## WSTĘP

Boreliozę z Lyme jako odrębną jednostkę chorobową, której czynnikiem etiologicznym okazał się krętek *Borrelia burgdorferi* wyodrębniono ponad 30 lat temu (1). Od tego czasu jest ona uznawana za jedną z ważniejszych chorób odzwierzęcych północnej półkuli. *B. burgdorferi* jest unikalną, mikroaerofilną, Gram (-) bakterią należąca do licznej gromady Spirochaetes. Łączy ona zarówno cechy bakterii Gram (-) i Gram(+). Charakteryzuje się wyjątkową spiralną morfologią i obecnością peryplazmatycznej wici (2). Posiada liniowe DNA i wykazuje brak lipopolisacharydu w zewnętrznej błonie otaczającej komórkę (2). Ze względu na swoje szerokie mechanizmy adaptacyjne m.in. poprzez zmianę ekspresji białek powierzchniowych, czy specyficzny aparat ruchu zapewniający aktywne przemieszczanie się w tkankach doskonale radzi sobie w transmisji w cyklu kleszcz-kręgowiec-kleszcz.

Z 19 dotychczas wyizolowanych gatunków, w patogenie boreliozy z Lyme istotną rolę odgrywają przede wszystkim trzy genogatunki określane wspólnym terminem *B. burgdorferi* sensu lato (s.l.) (3): *B. burgdorferi* sensu stricto (s.s.), *B. afzelii*, *B. garinii*. Nadal odkrywane są nowe genogatunki bakterii, w związku z tym ich lista pozostaje otwarta (4). Występowanie różnych gatunków krętków w Europie i USA jest przyczyną różnic w klinicznych objawach choroby na obu kontynentach.

Gatunki *Borrelia* ssp. wykazują dużą różnorodność pod względem długości, średnicy, skrętu spirali, czy liczby posiadanych wici. Długość jest w granicach od 10 do 30  $\mu\text{m}$ , średnica od 0,2-0,5  $\mu\text{m}$  (średnio 0,33  $\mu\text{m}$ ), długość fali oraz amplituda od szczytu do szczytu płasko-pofałdowanej struktury jaką reprezentują, może wynosić odpowiednio ok. 2,8  $\mu\text{m}$  i 0,8  $\mu\text{m}$  (5).

**Kształt.** Spiralny kształt *B. burgdorferi* jest wynikiem złożonych interakcji pomiędzy cylindrem komórki, którego kształt determinowany jest przez warstwę peptydoglikanu, a endoflagellami. Zależność tę udowodniono w badaniach inaktywując syntezę głównego włókna białkowego wici (FlaB) poprzez celowaną mutację, rezultatem której była utrata zdolności syntezy wici, a co za tym idzie ruchomości oraz helikalnego kształtu. Komórki przybierały wówczas kształt podłużny (*rod-shape*). Natomiast zahamowanie rotacji wici powodowało utratę poruszania się, przy czym spiralna morfologia była zachowana (6). Ultrastrukturalnie w komórce *B. burgdorferi* wyróżniamy: błonę zewnętrzną, przestrzeń peryplazmatyczną z obecnymi w niej flagellami oraz peryplazmatyczny cylinder.

**Błona zewnętrzna.** Najczęściej głównymi białkami zewnętrznej powierzchni (OMPs - *outer membrane proteins*) są OspA (*outer surface protein A*), OspB i OspC, OspD, OspE, OspF, OspG. Geny kodujące Osp zlokalizowane są w plazmidach (7). OspA i OspC okazały się bardzo przydatne w próbach opracowania szczepionki (8). Adaptacja do środowiska żywiciela niesie ze sobą pewne

when *B. burgdorferi* stays in the colon of an unfed tick. It interacts with a tick receptor for OspA (TROSPA), which enables a successful tick colonisation. A similar function is attributed to OspB (9). Nonetheless, when a tick starts sucking blood, a phenomenon of the so-called reduced OspA expression takes place, which results in around 90 times increased OspC expression. At that time, *B. burgdorferi* prepares to infect another host by passing from the colon of a tick to its salivary glands. Having inhabited another host, the OspA to OspC transformation becomes complete. An important factor throughout this transformation is ambient temperature (10).

OspE, OspE/F-dependant proteins, the so-called (Erps), *complement regulator acquiring surface proteins* (CRASPs), should also be mentioned as significant *B. burgdorferi* gene encoding proteins, the expression of which is increasing correspondingly to the rising temperature; they play a crucial role in host colonisation through numerous receptive and unreceptive activities. They bind with regulatory genes of a complement system, such as H factor and H-derivative factor 1. Thanks to that, the inhibition of a complement cascade takes place – and so does the inhibition of bacterium cell lysis (11). Furthermore, *B. burgdorferi* manifests capacity to adhere to integrins, proteoglycans, and glycoproteins. The process of binding of p 66 protein's outer membrane and protein glycosaminoglycan (Bgp) respectively with integrins and heparin sulfate (present in endothelium cells and plaques) might have a significant meaning in the spread of blood-derivative spirochetes (12). However, inhabiting extracellular matrix of intended tissues rich in collagen results probably from the presence of *decorin binding proteins* (Dbps) A and B which interact with collagen fibres and *fibronectin binding proteins* (Fbp) - BBK32 and RevA/B (13, 14).

**Periplasmic flagella.** Periplasmic flagella determine proper motility and characteristic spiral shape of a spirochete. *B. burgdorferi* disposes of 7-10 flagella, located in the space between the outer membrane and cylinder cell. Flagella span to just one end (sub-terminally and bipolarly) and come together with the cell centre. They are built mainly from one protein fibre - FlaB, and a smaller protein fibre - FlaA. Flagella protein components (p41 kDa) manifest antigen properties, amino-acid homology in relation to other spirochetes, and are considered as not species-specific. Unlike other bacteria, they are not as covered as *Treponema* spirochetes. Within flagellum, one may distinguish 4 parts: fibre (filament), junction (hook), rod (ring), as well as basal plaque. Rotation of flagella clusters at both ends of a cell is coordinated in such a way that each band rotates adversely to the centre of a cell. Inhibition of flagella rotation does not cause changes in the shape of a cell (6).

zmiany w zakresie ekspresji tych białek. Synteza OspA dominuje wówczas gdy *B. burgdorferi* przebywa w jelicie nienapitego kleszcza. Ulega ono interakcji z kleszczowym receptorem dla OspA (TROSPA- the tick receptor for OspA) umożliwiając tym samym udaną kolonizację kleszcza. Podobną funkcję przypisuje się również OspB (9). Natomiast gdy kleszcz rozpoczyna picie krwi, zachodzi tzw. zjawisko zmniejszonej ekspresji OspA na rzecz około 90-krotnie wzmożonej ekspresji OspC. W tym czasie *B. burgdorferi* wędruje z jelita kleszcza do jego gruczołów ślinowych przygotowując się do zakażenia nowego żywiciela. Kiedy bakteria zasiedla nowego gospodarza, transformacja OspA do OspC jest zakończona. Ważnym czynnikiem w tej przemianie jest temperatura otoczenia (10).

Wśród istotnych białek *B. burgdorferi*, których ekspresja kodujących je genów wzrasta wraz ze wzrostem temperatury i odgrywających zasadniczą rolę w kolonizacji gospodarza poprzez liczne oddziaływania receptorowe, jak i niereceptorowe, należy wymienić także OspE, OspE/F-zależne – tzw. (Erps), CRASPs – *complement regulator acquiring surface proteins* (białka wiążące inhibitory dopełniacza). Łączą się one z białkami regulatorowymi dopełniacza, takimi jak czynnik H i czynnik H-podobny 1. Dzięki temu dochodzi do zablokowania aktywacji kaskady dopełniacza, a co za tym idzie zahamowania lizy komórki bakterii (11). Ponadto *B. burgdorferi* wykazuje zdolność przylegania do integryn, proteoglikanów, glikoprotein. Wiązanie się białka p 66 zewnętrznej powierzchni i białkowego glikozaminoglikanu (Bgp) odpowiednio z integrynami i siarczanem heparyny, które występują na komórkach śródbłonna i płytkach, ma być może istotne znaczenie w krwiopochodnym rozszewieniu krętka (12). Natomiast zasiedlanie pozakomórkowej macierzy docelowych tkanek bogatych w kolagen wynika najprawdopodobniej z obecności białek wiążących dekorynę (Dbps – *decorin binding proteins*) A i B, które wchodzi w interakcje z włóknami kolagenu oraz białek wiążących fibronektynę (Fbp – *fibronectin binding proteins*) BBK32 i RevA/B (13, 14).

**Wici peryplazmatyczne – flagelle.** Wici peryplazmatyczne warunkują odpowiednią ruchomość oraz charakterystyczny kształt spiralny krętka. *B. burgdorferi* dysponuje pakietem ok. 7-10 wici, znajdujących się w przestrzeni zawartej pomiędzy błoną zewnętrzną a cylindrem komórki. Wici wbudowane są tylko do jednego końca, tzw. sub-terminalnie, dwubiegunowo i pokrywają się z centrum komórki. Zbudowane są one z głównego włókna białkowego (FlaB) oraz mniejszego włókna białkowego (FlaA). Białka składowe wici (p41 kDa) wykazują właściwości antygenowe, nie są one specyficzne gatunkowo, wykazują homologię aminokwasową w stosunku do innych krętków. W odróżnieniu od innych bakterii, wici *B. burgdorferi* nie są osłonięte jak ma to miejsce u krętków *Treponema*. W obrębie flagelli można wyróżnić 4 składowe: włókno (filament), zaczep (hak),

Recent research has offered a new insight on a cell structure. Electron beam tomography has shown that - contrary to previous findings - periplasmic flagella do not create clusters but rather a tight band which is wrapped around the cylinder of a cell. This system appears to be more beneficial, as it allows each flagellum for a direct contact with cell cylinder and promotes their equal impact, together with minimalising the interference between rotating fibres. This affects both cell motility and bacterium flat-striated structure (15).

**Cell cylinder.** Surrounded by a layer of peptidoglycan affecting the shape of a cell, it is the so-called molecular sieve binding heavy metal cations, which stabilises bacterium cell structure and protects against the negative influence of physical, chemical or mechanical factors. It contains muramic acid and ornithine amino acid with two amino groups.

**Genome.** Complete DNA sequence of B31 strain, that is an infectious American *B. burgdorferi* (s.s.) isolate, was one of the first completely explored genome in the history of molecular biology (16). *B. burgdorferi* has a minor, divided genome which contains a small linear chromosome (910 kbp) and over 20 various linear as well as circular plasmids (5-56 kbp). It has been shown that the presence of many of them is absolutely necessary for bacterium survival in the organism of a tick or mammal, which only makes referring to them as chromosomes or “microchromosomes” more justified.

*B. burgdorferi* chromosome consists mainly of protein encoding genes which are responsible for basic bacteria metabolism, the sequence of which is very similar to the currently known strains and genospecies. Plasmids contain massive DNA segments which do not encode proteins, are repetitive, and contain genes damaged during evolution, as well as a high number of genes which undergo expression but encode proteins of unknown function. Only 10% of genes found on plasmids could be identified with their role on the basis of homology sequence analysis. None of these functions coincides with a known virulence mechanism, observed in other bacteria. A high number of plasmid genes (around 15% in total) encodes proteins located in the outer membrane and, thus, have contact with the environment. Plasmids are the main medium of information regarding lifestyle that is a specific bacterium pathogenicity of *Borrelia* species. Genes stored in the region of plasmids condition proper antigenicity (Osp proteins) and spirochete capacity for transmitting infection between hosts and developing infection after inhabiting another host. A key factor affecting lipoprotein expression is ambient temperature. While incubating spirochetes in different temperatures, antigenic variance has been observed. It takes place during the transmission between ectothermic tick and

słup (przewężenie/szyjkę) oraz płytkę podstawną. Rotacje wiązek wici na obu końcach komórki skoordynowane w taki sposób, że każda wstęga obraca się w przeciwnym kierunku z perspektywy centrum komórki. Zahamowanie obrotu wici nie powoduje zmian w kształcie komórki (6).

Ostatnie badania rzuciły nowe światło na strukturę komórki. Przy użyciu elektronowej tomografii komputerowej wykazano, że w przeciwieństwie do wcześniejszych odkryć wici peryplazmatyczne nie tworzą wiązek, lecz ich układ bardziej przypomina obcisłą wstęgę, która owija się wokół cylindra komórki. Układ taki wydaje się być korzystniejszy, gdyż pozwala to każdej z wici na bezpośredni kontakt z cylindrem komórki i oddziaływaniem na niego siły każdej z nich oraz minimalizuje przy tym zakłócenia pomiędzy wirującymi włóknami. Ma to przełożenie zarówno na ruchomość komórki, jak i na strukturę płasko-falistą, jaka reprezentuje bakteria (15).

**Cylinder komórki.** Otoczony przez warstwę peptydoglikanu, który wpływa na kształt komórki, stanowi tzw. sito molekularne wiążąc kationy metali ciężkich, stabilizując strukturę komórki bakteryjnej oraz chroni przed negatywnym wpływem czynników fizycznych, chemicznych i mechanicznych. W jego skład wchodzi kwas muraminowy oraz aminokwas ornityny posiadający dwie grupy aminowe.

**Genom.** Kompletna sekwencja DNA szczepu B31, infekcyjnego amerykańskiego izolatu *B. burgdorferi* (s.s.), była jednym z pierwszych w historii biologii molekularnej w pełni poznanych genomem (16). *B. burgdorferi* posiada niewielki, podzielony genom w skład którego wchodzi mały liniowy chromosom (910 kbp) oraz ponad 20 różnych liniowych jak i kolistych plazmidów (5-56 kbp). Wykazano, że obecność wielu z nich jest absolutnie konieczna dla przeżycia bakterii w organizmie kleszcza, bądź ssaka, co daje uzasadnione podstawy do nazywania ich chromosomami, albo „minichromosomami”.

Chromosom *B. burgdorferi* zawiera głównie geny, kodujące białka odpowiedzialne za podstawowy metabolizm bakterii, a jego sekwencja jest bardzo podobna w dotychczas przebadanych różnych szczepach i genogatunkach. Plazmidy zawierają duże odcinki DNA niekodujące białek, powtarzające się, zawierające geny uszkodzone w procesie ewolucji oraz dużą liczbę genów ulegających ekspresji, ale kodujących białka o nieznannej funkcji. Tylko dla 10% genów odnalezionych na plazmidach udało się przypisać ich rolę, na podstawie analizy homologii sekwencji. Żadna z tych funkcji nie pokrywa się ze znanym mechanizmem wirulencji, obserwowanym u innych bakterii. Bardzo duża liczba genów plazmidowych (łącznie około 15%) koduje białka lokalizujące się w błonie zewnętrznej, przez co mające kontakt ze środowiskiem. Plazmidy są głównym nośnikiem informacji związanej z trybem życia, a więc specyficzną patogennością bakterii z rodzaju *Borrelia*. Geny zapisane w obrębie plazmidów warunkują odpowiednią antyge-

endothermic vertebrate. Importantly, some plasmids might be lost whilst bacteria growth, which might result in the incapacity for virulence (17).

**Pleomorphic forms.** Four pleomorphic *B. burgdorferi* forms are distinguished:

1. Spirochete: long (average 20  $\mu\text{m}$ ); corkscrew-shaped
2. Blebs: bleb membrane; diameter  $1.3\pm 0.43 \mu\text{m}$
3. Round bodies (RB): spherical; diameter  $2.8\pm 0.46 \mu\text{m}$
4. Biofilm like (BFL): a colony composed of spirochete, spherical, and bleb forms which contains extracellular polymer substance (EPS) in matrix; comprising at least 10 components (18).

Maintaining spirochetes in a vegetative, spiral form requires presence of nutrients in environment (19). However, their shortage or presence of some antibiotics causes change of spiral form into the so-called spheroplastic L-form, currently called *round bodies* (RBs) which, in optimal conditions, manifest w capacity for transformation back into the spiral form (20). L-form spirochetes are those deprived of murein. Some researchers put forward a hypothesis that the effect of B-lactam antibiotics inhibits peptidoglycan synthesis, which leads to destabilisation of cell structure and its walls rupture which, in turn, promotes the emergence of cysts. Antigenicity of spheroplasts differs from vegetative ones. It has been proved that they do not react against flagellin with antibodies. Motility loss in vegetative forms and transformation into cysts is connected with greater protein synthesis. Generating OspA is twice as intensive during those transformations (19). Spheroplastic L-form is deprived of a cell wall which precludes from eliminating spirochetes with the use of antibiotics influencing its synthesis; moreover, a considerably reduced amount of superficial lipoproteins makes the work of some adaptive antibodies impossible. The emergence of such bacteria forms fosters their survival irrespective of unfavourable conditions (20).

Blebs are much smaller than spheroplasts but also contain the DNA material of a spirochete. Contrarily to L-forms, they are not able to regain their motility as a bacterium. Cell membrane of those forms contain Osp proteins on its surface and they attribute immunogenic properties which are similar to alive spirochetes. They are created in reaction to physiological stress connected with e.g. pH change, ageing, antibiotics or lack of some metabolites. It turns out that their presence does not have profound clinical effect and that they are declining (21). Existence of pleomorphic forms should be taken into account while creating new diagnostic and treatment protocols.

nowość (białka Osp) oraz zdolność krętka do transmisji pomiędzy żywicielami i rozwoju zakażenia po wniknięciu do kolejnego gospodarza. Zasadniczym czynnikiem wpływającym na ekspresję lipoprotein jest temperatura otoczenia. Inkubując krętki w różnych temperaturach, obserwowano zmienności antygenowe, jakie zachodzą podczas transmisji pomiędzy zmiennoocieplnym kleszczem a stałocieplnym kręgowcem. Należy wspomnieć również o możliwości utraty niektórych plazmidów podczas namnażania się bakterii, co w konsekwencji może powodować utratę zdolności wirulencji (17).

**Postacie pleomorficzne.** Wyróżnia się 4 formy pleomorficzne *B. burgdorferi*:

1. Krętka: długi (średnia długość 20  $\mu\text{m}$ ); w kształcie korkociągu
2. Blebs: pęcherzykowa z błoną bleb; średnica  $1.3\pm 0.43 \mu\text{m}$
3. Round bodies (RB): sferyczne; średnica  $2.8\pm 0.46 \mu\text{m}$
4. Biofilm like (BFL): kolonia złożona z form krętkowych, sferycznych oraz blebs, zawierająca pozakomórkową polimeryczną substancję w macierzy (EPS); składa się z przynajmniej 10 komponentów (18).

Utrzymanie krętków w postaci wegetatywnej, spiralnej wymaga obecności w środowisku substancji odżywczych (19). Natomiast ich deficyt lub obecność niektórych antybiotyków powoduje przejście spiralnej postaci w tzw. sferoplastyczną formę-L, obecnie nazywaną *round bodies* (RBs), która w optymalnych warunkach wykazuje zdolność ponownej transformacji w formę spiralną (20). Formami L krętka określane są bakterie pozbawione mureiny. Niektórzy badacze przedstawiają hipotezę, iż działanie antybiotyków B-laktamowych hamuje syntezę peptydoglikanu, co prowadzi do destabilizacji struktury komórki, przerwania jej ścian, a to z kolei sprzyja tworzeniu cyst. Antygenowość form sferoplastycznych różni się od form wegetatywnych. Wykazano, że nie reagują one z przeciwciałami przeciwko flagellinie. Utrata ruchliwości form wegetatywnych i przejście w cysty związana jest z większą syntezą białka. Wytwarzanie OspA jest dwukrotnie bardziej intensywne w trakcie tych przemian (19). Forma sferoplastyczna L pozbawiona ściany komórkowej uniemożliwia w tej postaci eliminację krętków antybiotykami, działającymi na jej syntezę, a znacznie mniejsza ilość lipoprotein powierzchniowych uniemożliwia skuteczne działanie niektórych swoistych przeciwciał. Pojawienie się takich form bakterii ułatwia jej przetrwanie w niekorzystnych warunkach (20).

Formy pęcherzykowe „blebs” są znacznie mniejsze niż formy sferoplastyczne i również zawierają materiał genetyczny krętka. W przeciwieństwie do form-L nie są zdolne do ponownej transformacji w kierunku ruchliwej postaci bakterii. Błona komórkowa tych form posiada na swojej powierzchni białka Osp z właściwościami immunogennymi bardzo zbliżonymi do żywych krętków. Po-

## VECTOR AND INFECTION

Apart from the ability to enable transmission between hosts, *B. burgdorferi* benefits from the shortage of local immunological barrier by a tick itself. During prying on a host, a tick releases with its saliva substances which ensure its survival. Some of them are anticoagulants, vasodilators and compounds of immunosuppressive effect. One of the examined particles with proved immunomodulatory mechanism is Salp15 (binding with OspC) which indirectly and to a lesser extent inhibits lymphocytes T activation. Other immunomodulators present in tick saliva are PGE2, 36kDa protein, IL-2 binding protein, or a recently isolated sialostatin L (Sialol) which is an inhibitor of cysteine protease. This inhibitor manifests much likeness to katepsin L and partly with katepsin S. Binding katepsin S inside dendritic cells leads to disorderly and difficult at final processing of antigens as well as the emergence of MHC II complexes. Accordingly, it has been shown that Sialol, with the use of microbes, inhibits DC growth, leading to inhibition of antigen-specific lymphocytes T proliferation. Therefore, local immunosuppression arising out of a tick activity itself promotes translocation and makes its way towards the development of *B. burgdorferi* infection (22).

**Specific prevention.** Currently there is a considerable lack of vaccines protecting people against borreliosis. Scientists are still working on concepts concerning the creation of an effective vaccine. They make allowances not only for spirochete's antigens, but also tick proteins which *B. burgdorferi* utilises to clear its way for the emergence of an infection. At present, the following premises are taken into account: 1) immunisation with the use of a few OMPs proteins; 2) immunisation using tick proteins which induce immunological response in a tick bite locus, which disturbs blood sampling and, accordingly, causes a tick to fall off the skin; 3) immunisation with tick proteins which disturbs the immunological reaction of a host (e.g. by affecting coagulation); 4) immunisation of tick proteins which directly and indirectly interact with bacterium cells; 5) immunisation by combining *Borrelia* antigens with tick proteins for a better synergy effect.

It is presumed that thanks to those solutions it will become possible to limit the transmission not only in a tick-human relation, but regarding anthropada in general.

wstają one w odpowiedzi na stres fizjologiczny związany np. ze zmianą pH, starzeniem się, brakiem niektórych metabolitów, czy z obecnością antybiotyków. Okazuje się, że ich obecność nie ma istotnego znaczenia klinicznego i są formą schyłkową (21). Istnienie form pleomorficznych powinno być rozważane podczas tworzenia nowych protokołów diagnostycznych i leczniczych.

## WEKTOR A ZAKAŻENIE

Poza zdolnościami ułatwiającymi transmisję między żywicielami *B. burgdorferi* wykorzystuje przełamanie miejscowej immunologicznej bariery przez samego kleszcza. W czasie bytowania na żywicielu, kleszcz uwalnia ze śliną substancje ułatwiające przetrwanie. Należą do nich antykoagulanty, wazodilatory oraz związki o działaniu immunosupresyjnym. Jedną z poznanych cząstek o udowodnionym mechanizmie immunomodulacyjnym jest Salp15 (wiążący się z OspC), która w sposób pośredni i w mniejszym stopniu bezpośredni hamuje aktywację limfocytów T. Z innych immunomodulatorów obecnych w ślinie kleszczy należy wymienić PGE2, białko 36kDa, białko wiążące IL-2, czy ostatnio wyodrębnioną sialostatinę L (Sialol) będącą inhibitorem proteazy cysteinowej. Inhibitor ten wykazuje duże powinowactwo do katepsyny L oraz częściowo katepsyny S. Wiązanie katepsyny S wewnątrz komórek dendrytycznych prowadzi do zaburzenia i trudności w końcowej obróbce przetwarzanych antygenów i powstawania kompleksów z MHC II. Wykazano tym samym, że Sialol hamuje indukowane obecnością drobnoustrojów dojrzewanie DC, prowadząc do zahamowania proliferacji swoistych antygenowo limfocytów T. Zatem lokalna immunosupresja w wyniku działania samego kleszcza sprzyja translokacji i toruje drogę rozwojowi zakażenia *B. burgdorferi* (22).

**Zapobieganie swoiste.** Obecnie brak szczepionek chroniących ludzi przed boreliozą. Nadal trwają prace i pojawiają się nowe koncepcje dotyczące stworzenia skutecznej szczepionki. Naukowcy biorą pod uwagę nie tylko antygeny krętka, ale także proteiny kleszcza, które *B. burgdorferi* wykorzystuje dla torowania infekcji. Wśród nowych założeń bierze się pod uwagę: 1) immunizację za pomocą kilku białek OMPs; 2) immunizację białkami kleszcza indukującymi odpowiedź immunologiczną w miejscu ukąszenia lub i wewnątrz kleszcza, co zaburza pobieranie krwi i powoduje tym samym odpadnięcie kleszcza od powłok skórnych; 3) immunizację z białkami kleszcza, które zaburzają reakcję obronną gospodarza (np. wpływające na układ krzepnięcia); 4) immunizację białkami kleszcza, które w sposób bezpośredni i pośredni ulegają interakcji z komórkami bakterii; 5) immunizację kombinacją antygenów *Borrelia* z białkami kleszcza dla uzyskania efektu synergistycznego.

Zakłada się, że dzięki tym rozwiązaniom stanie się możliwe ograniczenie transmisji zakażenia nie

Former research showed that OspA immunisation induces a long-term immunological response in mice. Spirochetes were eliminated with the use of anti-OspA.

OspA-based vaccine was authorised to be sold in the USA in 1998. It was withdrawn 4 years later due to its low effectiveness in practice. OspC-based vaccine became an alternative object of study. The disadvantage is, however, heterogeneity in the occurrence of OspC proteins within *B. burgdorferi* strains and the emergence of skin lesions after its injection. The role of other OMPs proteins characterised by immunogenic potential, e.g. OspB, DbpA, BBK32 or RevA, have been tested on animal subjects. Attempts at utilising tick proteins as immunogens have been made. In one experiment, mice were vaccinated with a recombinant and remodified tick protein - 64p (64TRP). The synthesis of 64TRP antibodies interacted with epitopes in a tick's intestine in such a way that it caused its damage. However, the vaccination of cattle with the use of Bm86, Bm95 glycoproteins, also located in tick's intestinal epithelium, caused digestive system cells lysis. Other tick proteins, which may serve as potential sources of immunisation are: Salp15, sialostatin, or subolesin - among others (23). Because of its unique properties, the process of finding a vaccine against *B. burgdorferi* is very difficult and poses an enormous challenge.

tylko w relacji kleszcz-człowiek, ale ogólnie między stawonogami. Wcześniejsze badania wykazywały, że immunizacja z OspA indukuje długotrwałą obronną odpowiedź immunologiczną u myszy. Krętki były eliminowane za pomocą przeciwciał anti-OspA.

Szczepionka na bazie OspA została po serii badań zatwierdzona w USA do sprzedaży w 1998 r. Jednak wycofano ją 4 lata później ze względu na niską skuteczność w praktyce. Alternatywą stały się badania nad szczepionką na bazie OspC. Wadą jednak okazała się niejednorodność w występowaniu białek OspC wśród szczepów *B. burgdorferi* oraz pojawianie się po jej zastosowaniu nieprawidłowych odczynów skórnych w miejscu wkłucia. Rolę innych białek OMPs m.in. OspB, DbpA, BBK32, RevA o potencjale immunogennym udowodniono na modelu zwierzęcym. Podjęto próby wykorzystania białek kleszcza jako immunogenów. W jednym z doświadczeń myszy zaszczepiono rekombinowanym i zmodyfikowanym kleszczowym białkiem 64p (64TRP). Synteza wystymulowanych tą drogą przeciwciał anti-64TRP w wyniku ich reakcji z epitopami w jelicie kleszcza powodowała jego uszkodzenie. Natomiast szczepienie bydła przy użyciu Bm86, Bm95 glikoprotein również zlokalizowanych w nabłonku jelitowym kleszcza powodowała lizę komórek układu pokarmowego. Pozostałe białka kleszcza, które mogą służyć jako potencjalne źródło immunizacji to m.in. Salp15, sialostatyna, czy subolesyna (23). Dzięki unikatowym właściwościom *B. burgdorferi* proces tworzenia szczepionki jest bardzo trudny i stanowi duże wyzwanie.

## REFERENCES

- Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, et al. Lyme disease-a tick-borne spirochetosis? *Science* 1982; 216: 1317-1319.
- Barbour A, Hayes SF. Biology of *Borrelia* species. *Microbiol Rev* 1986; 50: 381-400.
- Wang G, van Dam AP, Schwartz I, et al. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 633-653.
- Stanek G, Reiter M. The expanding Lyme *Borrelia* complex-clinical significance of genomic species? *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 487-493.
- Hayes SF, Burgdorfer W, Barbour AG. Bacteriophage in the *Ixodes dammini* spirochete, etiological agent of Lyme disease. *J Bacteriol* 1983; 154: 1436-1439.
- Motaleb AM, Corum L, Bono LJ, et al. *Borrelia burgdorferi* periplasmic flagella have both skeletal and motility functions. *PNAS* 2000; 97: 10899-10904.
- Hans-Walter P, Bettina W, Weber K. Lyme borreliosis: basic science and clinical aspects. *Lancet* 1994; 343: 1013-1016.
- Steere CA, Sikand KV, Meurice F, et al. Vaccination against Lyme disease with recombinant *Borrelia burgdorferi* Outer-Surface Lipoprotein A with adjuvant. *N Engl J Med* 1998; 339: 209-215.
- Pal U, Li X, Wang T, Montgomery RR, et al. TROSPA, an *Ixodes scapularis* receptor for *Borrelia burgdorferi*. *Cell* 2004; 119: 457-468.
- Tokarz R, Anderton MJ, Katona IL, et al. Combined effects of blood and temperature shift on *Borrelia burgdorferi* gene expression as determined by whole genome DNA array. *Infect Immun* 2004; 72: 5419-5432.
- Kraiczya K, Skerkab C, Kirschfink M, et al. Mechanism of complement resistance of pathogenic *Borrelia burgdorferi* isolates. *Int Immunopharmacol* 2001; 1: 393-401.
- Coburn J, Chege W, Magoun L, et al. Characterization of a candidate *Borrelia burgdorferi*  $\beta$ 3-chain integrin ligand identified using a phage display library. *Mol Microbiol* 1999; 34: 926-940.
- Zambrano CM, Beklemisheva AA, Bryksin VA, et al. *Borrelia burgdorferi* binds to, invades, and colonizes native type I collagen lattices. *Infect Immun* 2004; 72: 3138-3146.

14. Probert SW, Johnson BJB. Identification of a 47 kDa fibronectin-binding protein expressed by *Borrelia burgdorferi* isolate B31. *Mol Microbiol* 1998; 30: 1003-1015.
15. Charon WN, Goldstein FS, Marko M. The flat-ribbon configuration of the periplasmic flagella of *Borrelia burgdorferi* and its relationship to motility and morphology. *J Bacteriol* 2009; 191: 600–607.
16. Fraser C, Casjens S, Huang WM, et al. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 1997; 390: 580-586.
17. Rosa AP, Tilly K, Stewart EP. The burgeoning molecular genetics of the Lyme disease spirochaete. *Nat Rev Microbiol* 2005; 3: 129-143.
18. Meriläinen L, Herranen A, Schwarzbach A, et al. Morphological and biochemical features of *Borrelia burgdorferi* pleomorphic forms. *Microbiology* 2015; 161: 516-27.
19. Alban SP, Johnson WP, Nelson RD. Serum-starvation-induced changes in protein synthesis and morphology of *Borrelia burgdorferi*. *Microbiol* 2000; 146: 119-127.
20. Brorson O, Brorson HS. A rapid method for generating cystic forms of *Borrelia burgdorferi*, and their reversal to mobile spirochetes. *APMIS* 1998; 106: 1131–1141.
21. Zajkowska JM, Hermanowska-Szpakowicz T. Nowe aspekty patogenetyczne boreliozy z Lyme. *Przegl Epidemiol* 2002; 56: 57-67.
22. Hovius JW, de Jong MA, den Dunnen J, et al. Salp15 binding to DC-SIGN inhibits cytokine expression by impairing both nucleosome remodeling and mRNA stabilization. *PLoS Pathog* 2008; 8: 4(2):e31.
23. Schuijt TJ, Hovius JW, van der Poll T. Lyme borreliosis vaccination: the facts, the challenge, the future. *Trends Parasitol* 2011; 27(1): 40-47.

Received: 27.01.2016

Accepted for publication: 23.03.2016

Otrzymano: 27.01.2016 r.

Zaakceptowano do publikacji: 23.03.2016 r.

**Address for correspondence:**

**Adres do korespondencji:**

1. Anna Moniuszko-Malinowska

Medical University of Białystok

Department of Infectious Diseases and Neuroinfections

Żurawia 14, 15-540 Białystok

Phone: 85 740 95 14; fax: 85 740 95 15

E-mail: annamoniuszko@op.pl

2. Paweł Penza

District Hospital in Zambrów Sp. z o.o.,

Internal Medicine Ward

Papieża Jana Pawła II 3, 18-300 Zambrów

Phone: 86 2763613; fax: 86 271 21 32