

Meri Rouhiainen

Konservoituneiden lysiinien merkitys *Borrelia garinii* DbpA- ja DbpB-adheesioproteiineissa

Syventävien opintojen kirjallinen työ

Syyslukukausi 2019

Meri Rouhiainen

Konservoituneiden lysiinien merkitys *Borrelia garinii* DbpA- ja DbpB-adheesioproteiineissa

Biolääketieteen laitos

Syyslukukausi 2019

Vastuhenkilö: Jukka Hytönen

TURUN YLIOPISTO

Lääketieteellinen tiedekunta

ROUHIAINEN MERI: Konservoituneiden lysiinien merkitys *Borrelia garinii* DbpA- ja DbpB-adheesioproteiineissa.

Syventävien opintojen kirjallinen työ, 29 s.

Kliininen mikrobiologia ja immunologia

Maaliskuu 2019

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin Originality Check -järjestelmällä.

---

Tämän syventävien opintojen kirjallisen työn aiheena on Lymen borrelioosi. Lymen borrelioosi on *Borrelia burgdorferi* bakteerin aiheuttama tauti, joka yleensä leviää ihmiseen puutiaisen pureman välityksellä. Lymen borreliosia levittäviä puutiaisia esiintyy laajalti pohjoisella pallonpuoliskolla. Lymen borrelioosi voi aiheuttaa monenlaisia oireita; yleisimmin ihoon, niveliin tai hermostoon. Selviytyäkseen ihmiselimestössä borrelia-bakteerit käyttävät pinnallaan esiintyviä proteiineja tarttuakseen isäntäelimestön soluihin. Tämän tutkimuksen aiheena oli tutkia borrelia-bakteerien pinnalla esiintyviä Dbp-proteiineja. Tutkimuksessa pyrittiin selvittämään Dbp-proteiinien aminohapporakenteen merkitystä borrelia-bakteerien kyvyllä tarttua ihmisoluihin. Borrelia-bakteerien pintaproteiinien ja niiden sitoutumismekanismien tunteminen voi tulevaisuudessa auttaa kehittämään rokotteita, uusia lääkkeitä tai diagnostisia menetelmiä Lymen borreliosin hoitoon.

Tutkimusta varten tuotettiin bakteerikanta, jonka Dbp-proteiinien rakenne erosi normaalista Dbp-proteiineista tutkittavan aminohapposekvenssin osalta. Tämän mutatoitun borrelia-kannan kykyä sitoutua ihmisoluihin tutkittiin sitoutumiskokein. Sitoutumiskokeissa kannan sitoutumiskykyä verrattiin vastaavien normaaleja Dbp-proteiineja pinnallaan omaavien kantojen kykyyn sitoutua samanlaisten solujen pinnalle.

Sitoutumiskokeiden tulokset olivat vaihtelevia. Suuressa osassa Sitoutumiskokeen toistoista mutatoitun kannan bakteerit sitoutuivat heikommin ihmisoluihin kuin normaalia proteiinia pinnallaan ilmentävät kannat. Oli siis nähtävissä suuntaus, että mutaatio heikensi bakteerien sitoutumiskykyä ihmisoluihin. Tämä viittaa, että tutkimuksen aiheena oleva aminohapporakenne olisi tärkeä borrelia-bakteerien sitoutumiskyvyssä ihmisoluihin. Eri toistojen suuren vaihtelun ja negatiivisena kontrollina toimineen kannan liian suuren sitoutumiskyvyn vuoksi tutkimuksen tulokset eivät kuitenkaan ole täysin luotettavia ja aiheesta tarvitaan lisää tutkimusta.

Asiasanat: Lymen borrelioosi, patogeenesi, adheesio

## SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	2
2	KIRJALLISUUSKATSAUS.....	3
	2.1 Lymen borrelioosi.....	3
	2.1.1 Patogeneesi.....	4
	2.1.2 Diagnostiikka ja hoito.....	5
	2.2 <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato.....	8
	2.2.1 Borrelian kiertokulku luonnossa.....	8
	2.2.2 Alalajit ja kannat.....	10
	2.2.3 Rakenne.....	11
	2.3 Borrelian adheesio.....	11
	2.3.1 Disseminaatio.....	11
	2.3.2 Adheesioproteiinit.....	12
	2.4 Dekoriinia sitovat proteiinit.....	13
	2.4.1 Rooli patogeenissä.....	14
	2.4.2 Rakenne.....	15
	2.5 Tutkimuksen tavoitteet.....	16
3	AINEISTO JA MENETELMÄT.....	16
	3.1 Borreliakannat.....	16
	3.2 Plasmidiprofilointi.....	17
	3.3 Napalaskimon endoteelisolut.....	18
	3.4 Western blot -analyysi.....	18
	3.5 Sitoutumiskokeet.....	19
4	TULOKSET.....	20
	4.1 Plasmidiprofilointi.....	20
	4.2 Western blot -analyysi.....	21
	4.3 Sitoutumiskokeet.....	22
5	POHDINTA.....	23
	LÄHTEET.....	26

## 1 JOHDANTO

Lymen borrelioosi on *Borrelia burgdorferi* bakteerin aiheuttama infektiosairaus. Sitä levittävät *Ixodes*-sukuun kuuluvat puutiaiset ja se on merkittävin puutiaisten välittämä infektio Suomessa. Näitä puutiaisia esiintyy laajasti Pohjois-Amerikassa ja Euraasian mantereiden pohjoisosissa. Suomessa borrelioosia levittäviä puutiaisia esiintyy pohjoista Suomea lukuun ottamatta melkein koko maassa (Laaksonen ym. 2017). *Borrelia*-bakteerit pääsevät leviämään ihmiseen puutiaisesta sen purressa ihmistä saadakseen veriaterian. Puutiaisen purressa bakteeripitoista sylkeä pääsee puremakohdan ihoon. Ihosta borreliat pääsevät leviämään muualle elimistöön verisuonia pitkin, kunnes ne tarttuvat verisuonen pinnan soluihin ja tunkeutuvat solukon läpi ympäröivään kudokseen aiheuttaen siellä taudin oireet.

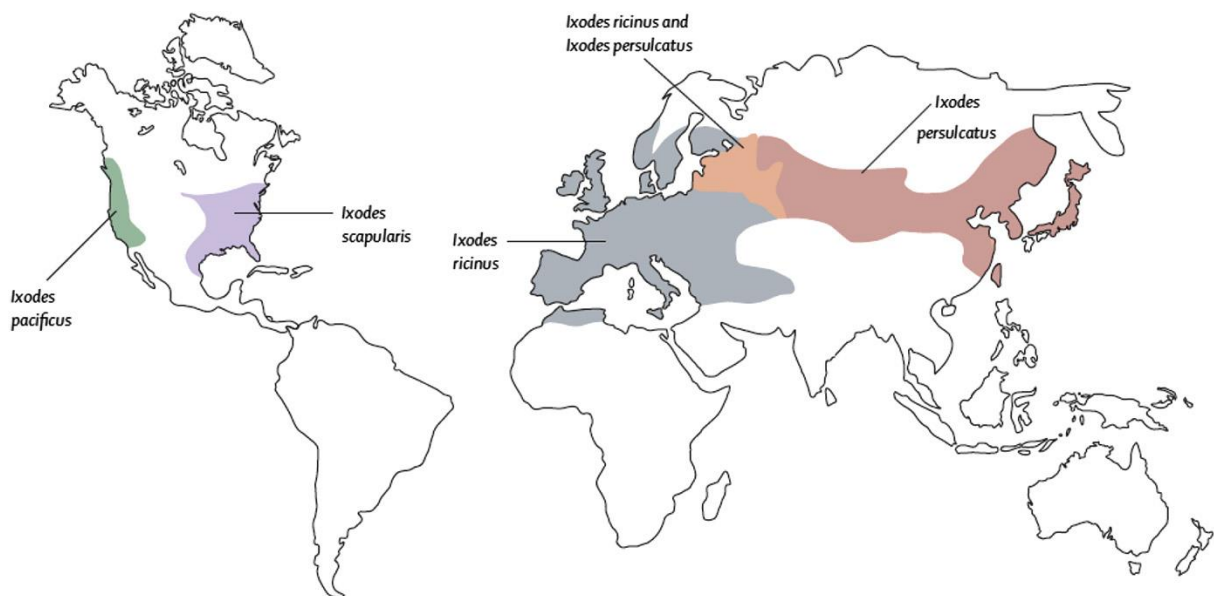
Kaikkien bakteerien pinnalla esiintyy adheesioproteiineja, joilla ne pystyvät tarttumaan ympäristön komponentteihin. *Borrelia*-bakteerit tarvitsevat pinnallaan esiintyviä adheesioproteiineja pystyäkseen aiheuttamaan infektion isännän elimistössä. Niillä *borrelia*-bakteerit tarttuvat muun muassa verisuonten endoteeliin ja näin saavat pysäytettyä vauhtinsa verenkierrossa. Kirjallisuudessa tunnetaan monia *borrelia*-bakteerien adheesioproteiineja ja useiden adheesioproteiinien tehtävä borrelioosin patogeenisissä on selvitetty (Caine ym. 2016). Silti tarkemmat isäntäsolujen komponentteihin sitoutuvat kohdat proteiinien pinnalla ovat selvästi heikommin tunnettuja. Yksi tärkeä adheesioproteiinityyppi *borrelia* leviämislle elimistössä ovat Dbp-proteiinit, joita on kaksi muotoa DbpA ja DbpB. Niiden on todettu vaikuttavan suuresti *borrelia* virulenssiin, eli kykyyn saada aikaan infektio isäntäelimistössä (Shi ym. 2008, Salo ym. 2015). Molempien Dbp-proteiinien rakenne tunnetaan varsin tarkasti. Myös Dbp-proteiinien vuorovaikutus isäntäsolujen komponenttien kanssa tunnetaan.

Silti vielä tarkempi tieto Dbp-proteiinien sitoutumiskohdan rakenteesta on tarpeen. Mitä tarkemmin *borrelia*-bakteerin pintaproteiinit tunnetaan, sitä paremmin tulevaisuudessa voidaan kehittää mahdollisia Lymen borrelioosin hoitoja, rokotteita tai uusia diagnostisia menetelmiä, jotka perustuvat näihin molekyyli-tason vuorovaikutuksiin bakteerin ja isäntäsolujen pintaproteiinien pinnalla. Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää Dbp-proteiineissa esiintyvien tiettyjen proteiinien adheesiolle tärkeiksi arvelujen aminohappojen merkitystä *borrelia*-bakteerien sitoutumiskykyyn isäntäelimistön soluihin. Näiden aminohappojen oletetaan sijaitsevan Dbp-proteiinien sitoutumiskohdassa. Ne osaltaan saavat aikaan tarvittavan sähköisen varauksen sitoutumiskohdan pinnalle, joka mahdollistaa Dbp-proteiinin sitoutumisen vastakappaleeseensa.

## 2 KIRJALLISUUSKATSAUS

### 2.1 Lymen borrelioosi

Lymen borrelioosi, jota voidaan myös kutsua nimellä Lymen tauti, on Suomessa varsin yleinen infektiosairaus (Laaksonen ym. 2017). Borrelioosi on *Ixodes*-sukuun kuuluvien puutiaisten levittämä infektiosairaus (Stanek ym. 2012). Borrelioosin alkuvaiheessa infektion oireina esiintyy punaista ihottumaa. Myöhemmin bakteerien levitessä oireita voi kehittyä moniin eri elimiin. Borrelioosia esiintyy maailmanlaajuisesti varsin laajalla alueella sekä Pohjois-Amerikassa, Aasiassa että Euroopassa. Euroopassa tautitaakka painottuu Keski-Eurooppaan sekä Pohjoismaihin. (Schotthoefler ja Frost 2015.) Suomessa borrelioosia levittäviä puutiaisia esiintyy melkein koko maassa Pohjois-Suomea ja Kainuuta lukuun ottamatta. Suomi kuuluukin puutiaisten pohjoisimpiin elinympäristöihin Euroopassa. Puutiaisten on havaittu laajentaneen elinympäristöään pohjoisemmaksi, luultavasti ilmastonmuutoksen seurauksena. Puutiaisten levittäytymisen seurauksena myös alue, jossa borrelioosin voi saada, kasvaa, sillä tautia aiheuttavia bakteereita on löydetty myös levinneisyysalueen pohjoisosista kerätyistä puutiaisista. (Laaksonen ym. 2017.)



**Kuva 1:** Borrelioosia levittävien puutiaisten levinneisyys maailmassa. Borrelioosin esiintymisalue vastaa pitkälti puutiaisten levinneisyysaluetta. (Kuvan lähde: Schotthoefler ja Frost 2015.)

Suomessa borrelioositartuntoja tavataan useita tuhansia vuodessa. (Nyman ja Wahlberg 2018.) Borrelioosin myöhäisvaiheen muotoa raportoidaan terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen tartuntatautirekisteriin vuosittain noin 2 000 tapausta. Tartuntatautirekisterin tilastotietokannassa on nähtävillä diagnosoitujen borrelioositartuntojen kasvu jo useamman vuoden ajalta, joten borrelioosin kansanterveydellinen merkitys sairautena kasvaa jatkuvasti. (Tartuntatautirekisterin tilastotietokanta - THL kuutio- ja tiivistekäyttöliittymä)

### 2.1.1 Patogeneesi

Lymen borrelioosia aiheuttaa *Borrelia burgdorferi* sensu lato -sukuun kuuluvat bakteerit (viitataan tästä eteenpäin termillä borrelia). Borreliat leviävät elimistöön *Ixodes*-sukuun kuuluvien puutiaisten puremien välityksellä, sillä puutiaiset erittävät puremaan ruokaillessaan bakteeripitoista sylkeä. Euroopassa *I. ricinus* toimii pääasiallisena borrelioosin tautivektorina, kun Aasiassa puolestaan tautia levittää *I. persulcatus*. (Stanek ym. 2012.) Suomessa esiintyy sekä *I. ricinus* että *I. persulcatus* puutiaisia (Laaksonen ym. 2017), johtuen siitä, että Suomi sijaitsee molempien puutiaislajien levinneisyysalueiden reunalla.

Borrelia-bakteerit sijaitsevat puutiaisten keskisuolessa, jossa niiden määrä lisääntyy huomattavasti veriaterian aikana. Samalla bakteerit alkavat muun muassa tuottaa pinnalleen proteiinia nimeltä outer surface protein C (OspC), jonka avulla bakteerit pääsevät tunkeutumaan puutiaisen sylkirauhasiin. Veriaterian aikana puutiainen ruiskuttaa puremakohtaan sylkeään, jonka mukana bakteerit pääsevät ihoon. (Stanek ym. 2012, Borchers ym. 2015.) Myös puutiaisen haavaan erittämä sylki edistää infektiota syntymistä, sillä se vaikuttaa muun muassa isännän verenhiyytymiseen, fibrinolyysiin ja immuunivasteeseen (Steere ym. 2016). Koska borrelioiden täytyy lisääntyä veriaterian aikana ja sen jälkeen tunkeutua puutiaisen sylkirauhasiin ennen kuin ne voivat päästä nisäkkään ihoon, borrelioiden leviäminen puutiaisen puremasta ihmiselimistöön kestää noin 12-72 tuntia (Nyman ja Wahlberg 2018).

Ihosta bakteerit saattavat levitä verisuonten välityksellä muuhun elimistöön. Borrelian levitessä useat elimistön puolustusmekanismit aktivoituvat, mikä johtaa sekä synnynnäisen että hankitun puolustusjärjestelmän reagoimiseen infektiota vastaan. Borrelia ei itse tuota elimistölle haitallisia toksiineja, vaan Lymen borrelioosin oireet johtuvat isäntäelimistön omasta tulehdusreaktiosta. Borrelia-bakteerit hakeutuvat elimistössä levitessään erityisesti hermostoon, niveliin ja ihoon aiheuttaen oireita kyseisissä elimissä. Joskus borrelioosi voi aiheuttaa oireita myös sydämessä tai silmässä. (Steere ym. 2016.)

Riskin bakteerien hematogeeniselle leviämislle on huomattu riippuvan taudin aiheuttaneen kannan geneettisestä taustasta. Tästä esimerkkinä muun muassa OspC-proteiini, jota borrelia tarvitsee tunkeutuakseen puutiaisen sylkirauhasiin. Sen erilaiset geneettiset tyypit vaikuttavat siihen, pääseekö infektiio leviämään vai jääkö se paikalliseksi infektioksi ihoon. (Wormser ym. 2009.) Myös elimistön tulehdusreaktion voimakkuus näyttää riippuvan infektion aiheuttavasta kannasta, sillä *B. burgdorferi* sensu stricto-lajin on havaittu aktivoivan elimistön puolustusjärjestelmää voimakkaammin kuin *B. afzelii*- tai *B. garinii*-lajin. (Strle ym. 2010.)

Kehon puolustusjärjestelmien aktivoitumisesta huolimatta kaikkia borrelia-bakteereita ei aina saada tuhottua elimistöstä ja infektiio voi kroonistua ilman hoitoa. Niiden selviytymistä elimistössä auttaa esimerkiksi borrelioiden kyky sitoutua soluväliaineen eri komponentteihin ja näin piiloutua immuunijärjestelmän soluilta. (Cabello ym. 2007.) Borreliat kykenevät myös estämään tiettyjen tulehdusta aiheuttavien proteiinien tuottamista pinnalleen ja voivat muuttaa muun muassa erään pinnallaan olevan lipoproteiinin nimeltään variable major protein-like sequence expressed eli VlsE antigeenisia ominaisuuksia. Näin borrelioiden pintaproteiinit sekä niiden pinta muuttuvat elimistön puolustusjärjestelmän mekanismeille vaikeammin tunnistettavaksi ja niiden on mahdollista välttää elimistön puolustusjärjestelmän huomio. (Stanek ym. 2012.)

### 2.1.2 Diagnostiikka ja hoito

Lymen borreliosisin diagnostiikassa korostuu potilaan esitietojen merkitys. Jos tiedetään, että potilas on oleskellut alueella, jossa on paljon puutiaisia, ja varsinkin jos hänellä on tuore puutiaisen purema, on hyvä ottaa huomioon borreliosisin mahdollisuus sopivien kliinisten oireiden ilmetessä.

Lymen borreliosisin varhaista paikallista muotoa edustaa erythema migrans -ihottuma (EM). Sen koko, muoto ja väriytyvät voivat vaihdella ja joskus EM voi myös esiintyä moniläiskäisenä, jolloin se luokitellaan jo borreliosisin levinneeksi muodoksi. Yli 5 cm:n kokoinen ihottuma puutiaisen pureman ympärillä vielä viikko pureman jälkeen diagnosoidaan Lymen borreliosisin aiheuttamaksi, eikä laboratoriotutkimusta tarvita. Harvinaisempi ihossa esiintyvä oire on lymfositoma, joka voi kehittyä joko puutiaisen pureman kohdalle tai sen läheisyyteen. (Oksi ym. 2010.) Se on yleisempi lapsipotilailla kuin aikuisilla. Diagnostiikka varten tutkitaan veren seerumista vasta-aineet, joita useimmiten on löydettävissä. Tarvittaessa, esimerkiksi negatiivisen vasta-ainelöydöksen tapauksessa, kudoksesta voidaan tehdä histologinen tai PCR-tutkimus. (Stanek ym. 2012.)



Levinneen borrelioosin diagnostiikassa käytetään muun muassa serologisia tutkimuksia. Serologisissa tutkimuksissa analysoidaan pääasiassa IgG-luokan vasta-aineita, sillä IgM-luokan vasta-aineisiin liittyy paljon epäspesifisyyttä. (Nyman ja Wahlberg 2018.) Lymen neuroborrelioosi on levinneen borrelioosin yleisin ilmenemistapa. Se voi ilmetä jo erythema migrans vaiheessa, mutta kehittyy yleensä kuuden kuukauden kuluessa puremasta. Neuroborrelioosi ilmenee yleensä perifeerisenä kasvohermohalvauksena, aivokalvotulehduksena tai meningoradikuliittina. Myös enkefaliittia, myeliittia tai aivojen suonten vaskuliittia voi ilmetä, mutta ne ovat harvinaisia. Lapsilla ilmenee lähinnä perifeeristä kasvohermohalvausta ja aivokalvotulehdusta (Stanek ym. 2012). Myöhäiseksi neuroborrelioosi luokitellaan oireiden kestettyä yli puoli vuotta ilman hoitoa. Myöhäisen neuroborrelioosin tapauksessa on jo olemassa pysyvien vaurioiden mahdollisuus. (Nyman ja Wahlberg 2018.)

Neuroborrelioosin perifeeristen oireiden tapauksessa tutkitaan aivoselkäydinneste ja sen vasta-aineet. Tosin negatiivinen tulos ei sulje pois neuroborrelioosia, sillä aina aivoselkäydinnesteessä ei havaita muutoksia. Keskushermoston borrelioosin tapauksessa serologiset ja aivoselkäydinnesteen tutkimukset ovat välttämättömät. Aivoselkäydinnesteen lymfocytaarinen pleosytoosi on myös diagnostinen löydös. (Stanek ym. 2012.) Intratekaaliset vasta-aineet sen sijaan nousevat joidenkin päivien viiveellä ja sen lisäksi ne jäävät koholle usein varsin pitkäksi aikaa borrelioosin hoidon jälkeen, joten toistuvia infektioita on vaikea havaita vasta-ainetutkimusten perusteella (Nyman ja Wahlberg, 2018). CXCL13 on kemokiini, jonka pitoisuus aivo-selkäydinnesteessä nousee aiemmin kuin lymfosyyttien määrä ja vasta-ainepitoisuudet. Sen pitoisuus laskee myös pian borrelioosin hoidon jälkeen. Tämän vuoksi CXCL13 on hyödyllinen markkeri akuutin neuroborrelioosin diagnostiikassa. (Hytönen ym. 2014.)

Nivelborrelioosi kehittyy useimmiten muutaman viikon tai kuukauden kuluttua puutiaisen pureman jälkeen. Nivelborrelioosipotilailla on usein lieviä yleisoireita, kuten lämmönnousua ja imusolmukemuutoksia, sekä nivelen ja sen ympäristön kipuja. Nivelborrelioosi esiintyy yleensä vain yhdessä isossa nivelessä, joka on turvonnut ja lämmin. Oireet jatkuvat helposti pitkään aina välillä helpottaen ja sitten taas voimistuen. Muutaman vuoden oireilun kuluttua nivelborrelioosi voi kuitenkin parantua itsellään. (Nyman ja Wahlberg 2018.) Nivelborrelioosi kroonistuu muutamalla prosentilla sairastuneista (Oksi ym. 2010, Nyman ja Wahlberg, 2018). Nivelborrelioosissa seerumin vasta-aineet ovat koholla. Lisäksi voidaan tehdä erotusdiagnostisia tutkimuksia muun muassa kuvantamalla. (Stanek ym. 2012, Nyman ja Wahlberg, 2018)

Levinneen vaiheen borrelioosin ihomuotona esiintyy acrodermatitis chronica atrophicansia (ACA). ACA kehittyy usein kuukausien tai jopa vuosien päästä puutiaisen puremasta. Sitä esiintyy sinipunaisina leesionina ja fibroottisina kyhmyinä yleensä raajojen ojentajalihasten puolisolalla alueella. Tulehdusalue on alun perin turvonnut mutta ajan myötä atrofioituu. Tulehdusalue voi olla kivulias ja ACA:n kanssa voi ilmetä myös paikallisia hermo- ja niveloireita. Diagnostiikassa seerumin vasta-aineet ovat koholla. Tarvittaessa voidaan tehdä histologinen tutkimus tai PCR ihobiopsiasta. (Stanek ym. 2012, Nyman ja Wahlberg, 2018)

Lymen borrelioosi voi aiheuttaa myös tulehduksellisia oireita silmään tai rytmii- ja johtumishäiriöitä sekä myo- tai perikardiittia sydämeen, mutta nämä borrelioosin muodot ovat harvinaisia Suomessa. Niiden diagnosointiin käytetään serologista tutkimusta. (Stanek ym. 2012.)

Borrelioosin diagnostiikassa on tärkeä pitää mielessä oireiden mahdolliset muut erotusdiagnostiset vaihtoehdot. Erythema migrans-ihottuman erotusdiagnostiikassa on otettava huomioon mahdolliset hyönteisten pistot ja puremat, muut ihoinfektiot, allergiset tai toksiset ihoreaktiot sekä erythema annulare. Neuroborrelioosin kanssa samanlaisia oireita aiheuttavat monet muut keskushermoston infektiot ja perifeerisen hermoston oireita aiheuttavat muutkin perifeeriset hermovauriot. Erotusdiagnostiset vaihtoehdot ACA:ssa ovat monet, sillä se muistuttaa useita varsin yleisiä sairauksia, esimerkiksi nivelreumaa. Nivelborrelioosin tapauksessa monet muut tilat voivat aiheuttaa niveltulehdusta, muun muassa virukset ja muut bakteerit, nivelpsoriaasi tai trauma.

Lymen borrelioosi on tärkeä hoitaa asianmukaisesti, sillä se reagoi hyvin mikrobilääkehoitoon. Ilman asianmukaista hoitoa infektio voi kroonistua, mutta itse infektio saadaan tällaisessakin tapauksessa hoidettua antibiooteilla. Turhia antibioottikuureja on kuitenkin syytä välttää, ja pelkkä puutiaisenpurema ei olekaan syy määrätä mikrobilääkkeitä. Paikallinen tautimuoto hoidetaan yleensä kahden viikon oraalilla amoksisilliini- tai doksisykliini-kuurilla. Tarvittaessa hoitoa voidaan jatkaa viikolla. Taudin levinneeseen muotoon suositellaan oraalista amoksisilliini- tai doksisykliini-hoitoa kolmeksi viikoksi. Neuroborrelioosin tapauksessa hoitoa voidaan tarvittaessa jatkaa neljään viikkoon saakka. Myöhäisen neuroborrelioosin hoitona käytetään keftriaksonia suoneen annosteltuna kolmen viikon ajan. (Nyman ja Wahlberg 2018.)

## 2.2 *Borrelia burgdorferi sensu lato*

Borreliat ovat gramnegatiivisia spirokeettabakteereita. Ne luokitellaan useimmiten anaerobisiksi bakteereiksi, mutta ne kasvavat myös mikroaerobisessa ympäristössä (Hardy ym. 1963, De Martino ym. 2006). *Borrelia*-lajit voivat aiheuttaa useita eri tauteja, ja yleisin borrelioiden aiheuttama tauti ihmisellä on Lymen borreliosisi. Borreliosisia aiheuttavat alalajit, jotka kuuluvat *B. burgdorferi sensu lato* -sukuun. Jotkin borreliat, kuten *B. miyamotoi*, voivat puolestaan aiheuttaa toisintokuumetta. (Radolf ym. 2012, Nyman ja Wahlberg 2018.) Borrelioiden leviämiseen tärkeässä osassa ovat niiden isännät eli puutiaiset ja nisäkkäät. Niiden kiertokulku luonnossa on tämän syyn takia vahvasti kytköksissä puutiaisten elämänsykliin.

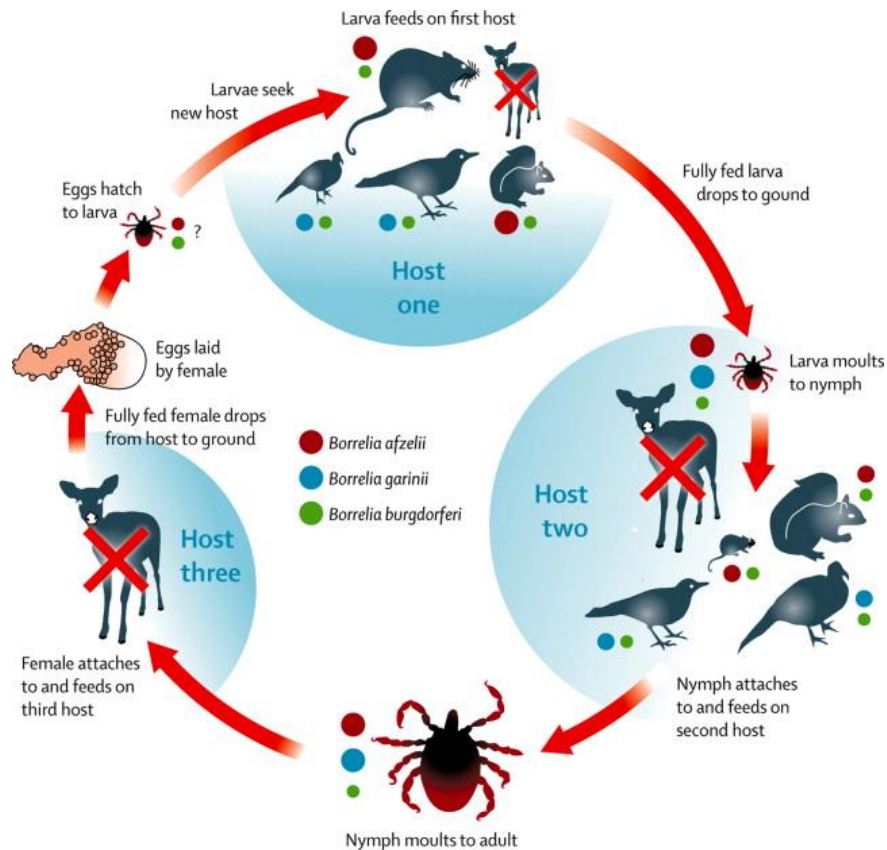
### 2.2.1 *Borrelian kiertokulku luonnossa*

Borreliosisi on zoonosi, eli tauti, joka voi levitä eläinten ja ihmisten välillä. *Borrelia*-bakteerien tapauksessa niillä voi olla hyvin erilaisia isäntiä puutiaisista aina nisäkkäisiin saakka, ja borreliat bakteereilla onkin varsin monimutkainen kiertokulku luonnossa. Borrelian geenien ilmentäminen muuttuu sen isännän mukaan. Puutiaisessa borreliat ilmentävät osittain eri geenejä kuin nisäkkäissä. (Steere ym. 2016.) Tämän takia borrelian on mahdollista levittäytyä ja lisääntyä niin erilaisissa isännissä (kuva 2).

Bakteereiden väli-isäntinä toimivien puutiaisten elämänsykli koostuu neljästä vaiheesta. Puutiaiset syövät sekä levittävät borreliosisia vain kerran jokaisessa vaiheessa. Puutiaiset kiinnittyvät isäntäeläimeen muutamiksi päiviksi ja putoavat sitten maahan. Maaperässä puutiaiset hakeutuvat kosteaan paikkaan, jossa ne kuukausien aikana kehittyvät uudeksi kehitysvaiheeksi. Munista kuoriutuneet toukat ja niistä kehittyneet nymfit, jotka ovat puutiaisen kehitysvaiheista toukan ja sukukypsän puutiaisen välillä, kiinnittyvät mieluiten jyrsijöihin ja lintuihin. Aikuiset puutiaiset suosivat isäntinä usein kookkaampia nisäkkäitä kuten peuroja, hirviä tai ihmisiä. Mahdollinen borreliosisitartunta esimerkiksi ihmiseen pääsee tapahtumaan puutiaisen ollessa kiinnittyneenä isäntäänsä. (Stanek ym. 2012.)

Puutiaisten kehitysvaiheista nymfit ja aikuiset voivat levittää borreliat bakteereita. Toukat eivät voi levittää borreliosisia, sillä niiden pitää ensin saada borreliosisitartunta veriaterian mukana. Borrelioiden ei ole havaittu leviävän aikuisesta naaraspuutiaisesta muniin transovariaalisesti. (Radolf ym. 2012.) Puutiaisista borreliosisin saaneet jyrsijät ja linnut voivat levittää borreliat bakteereita eteenpäin niihin tartunnan jälkeen kiinnittyneisiin puutiaisiin. Peurat ylläpitävät useilla alueilla puutiaiskantoja, sillä niihin voi kiinnittyä

samanaikaisesti useita puutiaisia. Tämän vuoksi borrelioositartunnan riski yleisesti ottaen on suurempi alueilla, joilla esiintyy paljon peuroja. Ne eivät kuitenkaan itse levitä borrelia-bakteereita uusiin puutiaisiin, sillä borreliat eivät pysty selviämään peuran elimistössä pitkiä aikoja. (kuva 2). (Stanek ym. 2012, Kilpatrick ym. 2017)



**Kuva 2:** Puutiaisen elämänsykli. Borrelian elämänsykli seuraa vahvasti puutiaisten elämänsykliä. Rasti isäntäeläimen päällä tarkoittaa, että eläin ei yleensä levitä borrelioosia eteenpäin niissä ruokaileviin puutiaisiin. (Kuvan lähde: Stanek ym. 2012.)

Puutiaisten elinkierrossa on selvä sykli vuodenaikojen mukaan. Tämä vaikuttaa myös borrelioositartuntojen syklimäiseen esiintyvyyteen. Useimmat puutiaislajit aktivoituvat alkukevästä ja pysyvät aktiivisina aina syksyyn saakka. (Stanek ym. 2012.) Puutiaisten määrä on siis suurimmillaan juuri samaan aikaan, kun ihmiset kulkevat luonnossa aktiivisimmin. Borrelioositartuntoja havaitaan eniten loppukevästä aina syksyyn saakka. Taudin levinnyttä muotoa diagnosoidaan vielä loppuvuodesta paljon, koska infektioiden leviäminen kestää muutaman kuukauden ennen oireiden kehittymistä.

### 2.2.2 Alalajit ja kannat

Borrelioosia aiheuttavia borrelia-alalajeja on useita ja yhteisesti niistä käytetään nimitystä *B. burgdorferi* sensu lato. Näistä alalajeista borrelioosia aiheuttavat erityisesti *B. afzelii* ja *B. garinii* Euroopassa ja Aasiassa sekä *B. burgdorferi* sensu stricto Yhdysvalloissa. (Radolf ym. 2012.) Näiden alalajien lisäksi useita muita alalajeja on löydetty. Näihin lukeutuvat muun muassa *B. bavariensis*, *B. spielmanii* ja *B. valaisiana*. Useimpien näistä alalajeista uskotaan myös olevan patogeenisiä. (Borchers ym. 2015.)

Borrelian perimä vaihtelee varsin paljon eri alalajien ja kantojen välillä. Tästä johtuvat eri alalajien aiheuttaman borreliosin erilaiset taudinkuvat. Borrelian genomi koostuu yhdestä lineaarisesta kromosomista, joka on varsin konservoitunut eri alalajien välillä. Sen sijaan borrelian useat eri plasmidit, jotka myös sisältävät huomattavan määrän geneettistä tietoa, voivat vaihdella huomattavasti sekä eri alalajien että jopa saman alalajin kantojen välillä. (Steere ym. 2016.)

*B. burgdorferi* sensu stricton on havaittu saavan elimistössä aikaan suuremman immuunivasteen sekä enemmän oireita ja todennäköisemmän hematogeenisen leviämisen kuin *B. garinii* tai *B. afzelii*. Voimakkaampi elimistön reaktio johtuu siitä, että *B. burgdorferi* sensu stricto stimuloi elimistön makrofageja tuottamaan enemmän sytokiineja ja kemokiineja. *B. garinii* puolestaan aiheuttaa nopeamman taudin leviämisen kuin *B. afzelii*. (Strle ym. 2010) Borrelian eri alalajit hakeutuvat myös tyypillisesti eri elimiin. *B. afzelii* jää usein paikalliseksi ihoon ja voi aiheuttaa lymfositooman. *B. burgdorferi* sensu stricto aiheuttaa useimmiten nivelborrelioosia ja sydänoireita. *B. garinii* puolestaan hakeutuu helposti hermostoon ja aiheuttaa neuroborreliosin. (Steere ym. 2016, Radolf ym. 2012.)

Borrelia-alalajit voidaan jakaa vielä niiden sisäisiin kantoihin. Kliinisessä työssä borrelia-kannoilla ja niiden eroilla ei ole juurikaan merkitystä, mutta tieteellisessä tutkimuksessa käytetään useita laboratorioissa kasvatettuja kantoja, sillä niiden ominaisuudet ja geneettinen koodi tunnetaan tarkemmin kuin luonnon villityyppikantojen. Osa kannoista on vuosien saatossa menettänyt infektiivisyytensä, sillä bakteereja laboratorio-olosuhteissa pitkään kasvatettaessa plasmidit helposti katoavat niiden genomista. Osa kannoista puolestaan muistuttaa vielä melko paljon luonnon villityypin kantoja ja ne voivat aiheuttaa infektion luonnossa esiintyvien kantojen tavoin.

### 2.2.3 *Rakenne*

Borreliaat ovat gramnegatiivisia bakteereita, eli niitä verhoaa sekä sisempi varsinainen solukalvo että ulkoseinä, joka koostuu fosfo- ja glykolipidien muodostamasta kaksoiskalvosta. (Steere ym. 2016) Sisä- ja ulkokalvojen välissä on gramnegatiivisille bakteereille tyypillinen peptidoglykaanin muodostama ohut kerros. Borreliaiden periplasmisessa tilassa sisä- ja ulkokalvon välissä on borreliaolle tärkeitä flagella-proteiineja. Flagellan pää on kiinnittynään solun pätyyn ja pyörii solun ympäri periplasmisessa tilassa. Näin flagella vastaa borreliaolle tyypillisestä korkkiruuvimaisesta liikkeestä. (Charon ym. 2012.)

Borreliaiden ulkokalvolla sijaitsee pintaproteiineja. Nämä proteiinit voivat esimerkiksi välittää bakteereille viestejä tai auttaa bakteeria sitoutumaan ympäristönsä komponentteihin. Osa näistä pintaproteiineista voi muuttaa rakennettaan ympäristön olosuhteiden mukaan. Tämä pintaproteiinien muuntelu auttaa borreliaita sekä sopeutumaan uuteen isäntään että välttelemään isäntäelimistön puolustusmekanismeja. (Steere ym. 2016.)

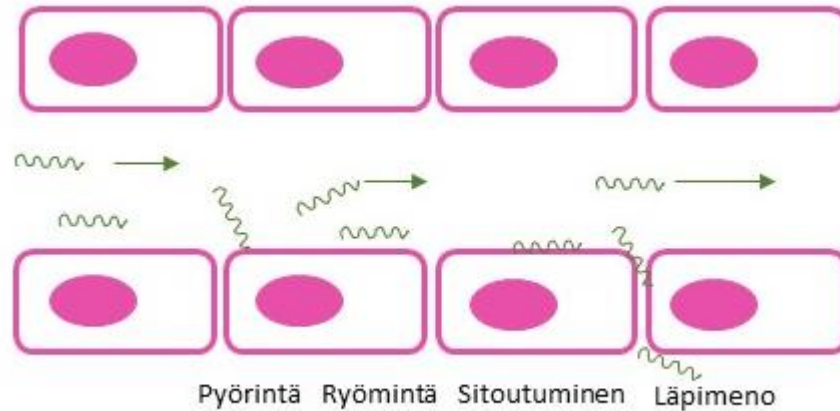
## 2.3 **Borrelia** adheesio

Kyetäkseen selviytymään borreliaiden tarvitsee pystyä kiinnittymään isäntäeliöidensä soluihin eri puolilla elimistöä. Ne voivat sitoutua myös solujen ulkopuolella olevan soluväliaineen komponentteihin. Borreliaiden kyvyn sitoutua useisiin soluväliaineen komponentteihin on havaittu muun muassa auttavan niitä piiloutumaan elimistön puolustusjärjestelmältä. Soluväliaineen komponentit peittävät borreliaat, joilloin elimistön puolustuksen tunnistusmekanismit eivät tavoita borreliaita, ja toisaalta ne vähentävät borreliaiden pinta-antigeenien ilmentymistä. (Cabello ym. 2007.) Samalla borreliaiden adheesio on myös välttämätöntä, jotta bakteerit pääsevät tunkeutumaan verenkierrosta kudoksiin.

### 2.3.1 *Disseminaatio*

Borreliaiden uskotaan leviävän elimistössä pääasiassa verenkierron mukana niin kutsutun hematogeenisen disseminaation avulla. Borrelia liikkuu eteenpäin spiraalimaisen liikkeen avulla ja se pystyy etenemään sekä nestemäisessä faasissa että soluväliaineessa. Levitessään verenkierrossa borreliaat tarttuvat aika ajoin verisuonia verhoavan endoteelisolukon pintaan. Useimmat borreliaat tarttuvat endoteeliin vain hetkellisesti ja jatkavat sitten matkaa

verenkierron mukana. (Charon ym. 2012.) Osa borrelioista jää kuitenkin pysyvästi paikoilleen verisuonen pinnalle. Verisuonen pinnalta bakteerit tunkeutuvat endoteelisolujen läpi soluväliaineeseen, jossa ne puolestaan voivat aiheuttaa tulehduksen. Kuvassa 3 on esitetty borrelioille tyypillinen tapa siirtyä verisuonista kudoksiin.



**Kuva 3:** Borrelioiden hematogeeninen disseminaatio. Verisuonissa kiertävät borreliat tarttuvat verisuonten pintaan ensin väliaikaisesti, jolloin ne pyörivät verisuonen pinnalla. Uusien sidosten muodostuessa adheesioproteiinien ja niiden vastinkappaleiden välille borrelioiden liike muuttuu tasaisemmaksi ja niiden liike muuttuu ryömiväksi. Kun tarpeeksi vahvoja sidoksia on syntynyt borrelioiden ja verisuonen pinnan välille ja borreliat ovat sitoutuneet soluun pintaan, borrelioiden liike pysähtyy. Seuraavaksi borreliat hyödyntävät spiraalimaista liikettään ja adheesioproteiinejaan työntyessään verisuonen pinnan solujen välistä syvemmälle kudokseen.

### 2.3.2 Adheesioproteiinit

Erilaisille soluille on yhteistä, että niiden pinnalla esiintyy pintaproteiineja. Näillä pintaproteiineilla voi olla useita eri tehtäviä. Ne voivat välittää solujen välistä viestintää tai aistia solun ympäristön fysiologista tilaa sekä kiinnittää solun ympäristöönsä. Myös borrelialla on monia pintaproteiineja. Ne auttavat borrelioita selviytymään veressä, vaikuttavat komplementtijärjestelmän tekijöihin ja välittävät borrelioiden sitoutumista verisuonten pintaan sekä niiden disseminaatiota kudokseen. (Steere ym. 2016.)

Borrelioiden pintaproteiinien geenien ilmentyminen vaihtelee huomattavasti ympäristön olosuhteiden mukaan (Steere ym. 2016). Borreliat siis ilmentävät pinnallaan osittain eri proteiineja puutiaisissa ja nisäkkäissä. Tämä mahdollistaa borrelioiden selviytymisen niinkin

erilaisissa isännissä kuin puutiaiset ja nisäkkäät ovat. Yksi tärkeä pintaproteiinien ilmentymisen säätelymekanismi borrelialla on RpoN-RpoS-signaalintijärjestelmä, joka on vastuussa useiden virulenssille tärkeiden tekijöiden kuten borrelian puutiaisissa olon aikana ilmentyvän OspA:n (Outer surface protein A) ja nisäkkäässä olemisen aikana ilmentyvän OspC:n (Outer surface protein C) ilmentymisen säätelystä. RpoN-RpoS-signaalintijärjestelmän on havaittu olevan välttämätön borrelioiden infektoidessa hiiren. (Caine ym. 2016.)

Osa borrelioiden pintaproteiineista ovat tärkeitä tekijöitä borrelioiden virulenssia varten eli niitä tarvitaan, jotta borreliat voivat infektoida esimerkiksi nisäkkään. Nämä pintaproteiinit voivat sitoutua useisiin soluväliaineen komponentteihin kuten fibronektiiniin ja glykosaminoglykaaneihin (GAG). Yksi tärkeä luokka borrelian virulenssitekijöissä ovat sen adheesioproteiinit. Borrelian pintaproteiineista vähintäänkin 19 välittää adheesiota. (Caine ym. 2016.) Koska borrelia on solunulkoisen bakteeri, on vuorovaikutus solunulkoisten komponenttien kanssa sille erittäin tärkeää. Adheesioproteiinit ovat avainasemassa, kun borreliat sitoutuvat muun muassa verisuonten endoteelisolukkuon ja tunkeutuvat soluväliaineeseen. Borrelioiden kyky liikkua soluväliaineessa ja sen jälkeen tarttua soluväliaineen komponentteihin mahdollistaa niiden disseminaation ja hengissä pysymisen soluväliaineessa. (Liang ym. 2004.) Useita borrelioiden pintaproteiineja on tutkittu *in vitro* kokeissa, joista saadaan suuntaa antavaa näyttöä niiden merkityksestä (Caine ym. 2016).

## 2.4 Dekoriinia sitovat proteiinit

Aiemmissä tutkimuksissa borrelioiden on huomattu hakeutuvan usein kudoksiin, jotka sisältävät paljon kollageenia. Sittemmin borrelioiden on havaittu sitoutuvan kuitenkin kollageenisäikeiden sijaan sen kanssa esiintyvään dekoriiniin. (Guo ym. 1995.) Dekoriini on proteoglykaani, jota esiintyy usein soluväliaineessa kollageenisäikeisiin sitoutuneena (Scott ja Orford 1981). Sitä esiintyy monissa kudoksissa ja sitä on huomattavia määriä ihossa, verisuonten sileälihassoluissa ja jänteissä (Jarvelainen ym. 1991). Dekoriini on siis soluväliaineen komponentti, johon sitoutuminen auttaa bakteeria selviytymään kudoksessa. Borrelioiden dekoriiniin sitoutuvia proteiineja, joita kutsutaan Dbp-proteiineiksi (Decorin binding proteins), on olemassa kaksi melko paljon toisiaan muistuttavaa muotoa; DbpA ja DbpB. Ne sitoutuvat dekoriinin ja sen GAG-sivuketjuihin kuten dermataanisulfaattiin (Fischer ym. 2003).



DbpA:n ja DbpB:n on havaittu sitoutuvan dekoriinin lisäksi myös toiseen proteoglykaaniin nimeltä biglykaani. Erityisesti verisuonten endoteelisolut ilmentävät biglykaania. Dekoriinia verisuonten endoteeli ei sen sijaan näytä ilmentävän. Dbp-proteiinien kyky sitoutua biglykaaniin voi siis osaltaan selittää sen, miten borreliat alun perin kykenevät sitoutumaan verisuonten pintaan ennen kuin ne pääsevät sidekudokseen, jossa esiintyy dekoriinia. (Salo ym. 2016.)

DbpB:n on havaittu olevan geneettisesti hyvin konservoitunut eri borrelia-kantojen kesken. Sen sijaan DbpA:n rakenteen on huomattu vaihtelevan melko paljon riippuen borrelia-kannasta ja DbpA:n geneettinen koodi on samalainen vain 58 % eri kantojen välillä. (Roberts ym. 1998.) Nämä geneettiset vaihtelut DbpA:ssa vaikuttavat eri kantojen DbpA:n affiniteettiin dekoriinia kohtaan. Tutkimuksissa on havaittu, että *B. gariniin* DbpA ja sitä kautta myös *B. garinii*-bakteerit sitoutuvat voimakkaimmin dekoriiniin. Myös *B. burgdorferi* sensu stricto sitoutuu dekoriiniin huomattavalla affiniteetilla. (Benoit ym. 2011, Salo ym. 2011.) *B. afzeliin* DbpA:n affiniteetti dekoriiniin on puolestaan havaittu olevan varsin olematon (Salo ym. 2011). Toisessa tutkimuksessa taas *B. afzeliin* DbpA sitoutui dekoriiniin melko hyvin, mutta dermataanisulfaattiin se sitoutui varsin heikosti (Benoit ym. 2011). Dermatäänisulfaatti vaikuttaa siis olevan DbpA:n sitoutumiskohta dekoriiniin. *B. afzeliilla* saattaa siis olla eri sitoutumiskohta dekoriiniin kuin muilla alalajeilla, joka voi vaikuttaa sen adheesion voimakkuuteen. Erot DbpA:n rakenteessa kantojen välillä selittävät ainakin osittain, miksi borrelian eri kannat hakeutuvat eri kudoksiin (Lin ym. 2014).

#### 2.4.1 Rooli patogeneesissä

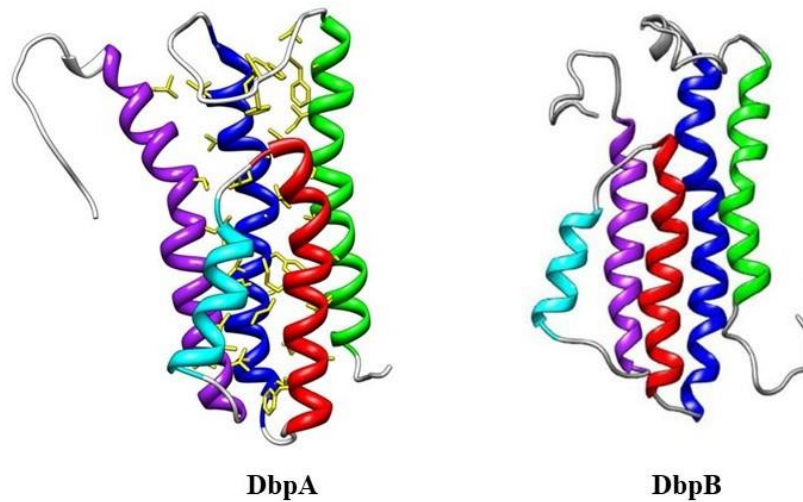
Hiirikokeissa on havaittu, että suurimmat borrelia-pitoisuudet hiirillä löytyivät paljon dekoriinia sisältävistä kudoksista kuten ihosta ja nivelistä. Kun mitattiin borrelia-pitoisuuksia kudoksista hiiriltä, jotka eivät ilmennä dekoriinia, nämä kudokset eivät enää sisältäneet suurempia bakteeripitoisuuksia kuin kudokset, jotka yleensä eivät sisällä paljoa dekoriinia. (Liang ym. 2004.) Lisäksi borrelia-kannat, joilta puuttui joko DbpA:n, DbpB:n tai molempien tuotanto saavat isännässä aikaan selvästi heikomman infektion kuin molempia Dbp-proteiineja tuottavat kannat (Shi ym. 2008). Dbp-proteiinien puutoksen on myös havaittu estävän borreliaa aiheuttamasta nivelborrelioosia hiirille ja lyhentävän nivelinfektion kestoa (Salo ym. 2015). Dbp-proteiinit näyttävät siis auttavan bakteereita selviytymään elimistössä ja näin edistävän infektion jatkumista sen levinneessä vaiheessa. Tämän syyn takia borrelioiden on vaikea saada aikaan levinnyttä infektiota ilman Dbp-proteiineja.

#### 2.4.2 Rakenne

Liukoinen DbpA koostuu viidestä helikaalisesta osasta, joita yhdistävät vähemmän järjestäytyneet alueet (kuva 4). Proteiinia pitää koossa vahva hydrofobisten emästen muodostama sisäosa. Lisäksi DbpA:ssa on joustavammin liikkuvat C- ja N-terminaaliset hännät ja helikaalisia osia yhdistävät välisosat, joista C-terminaalisen pään ja helikaalisia osia 1 ja 2 yhdistävän ketjun uskotaan osallistuvan DbpA:n vuorovaikutukseen GAG-ketjujen kanssa (Wang 2012, Morgan ym. 2015). DbpA:n pinnan kokonaisvaraus on heikosti hapan. Sen pinnalla on kuitenkin emäksisten aminohappojen muodostama alue, johon kuuluu muun muassa C-terminaalinen häntä sekä monia aminohappoja, joiden tiedetään olevan tärkeitä DbpA:n kyvyssä sitoutua GAG-ketjuihin. Monet näistä tärkeistä aminohapoista ovat lysiinejä. (Wang 2012.) Vaikka DbpA:n rakenne vaihtelee borrelia-lajien välillä melko paljon, GAG-ketjuja sitova osa on säilynyt useissa lajeissa varsin samanlaisena ja vain pieniä eroja voidaan havaita eri lajien DbpA-proteiinin GAG-ketjuja sitovan kohdan genomeissa (Morgan ja Wang 2015).

DbpB:n rakenteen määräävästä DNA-sekvenssistä 40 % on yhtäläinen DbpA:n DNA-sekvenssin kanssa. Vaikka DbpA:n sekvenssi saattaa olla varsin erilainen eri borrelia-lajien välillä, DbpB:n sekvenssi on sen sijaan hyvin samanlainen riippumatta borrelia-lajista (Roberts ym. 1998). DbpB:n rakenne vastaa melko hyvin DbpA:n rakennetta. Sekin koostuu viidestä helikaalisesta osasta, joita sitovat yhteen joustavimmat ketjut (kuva 4). Kuitenkin DbpB:n helikaaliset osat 1 ja 5 ovat lyhyemmät ja C-terminaalisen hännän ei-järjestäytynyt osa on pidempi. C-terminaalinen häntä sisältää monia proteiinin GAG-ketjuihin sitoutumiseen tärkeitä emäksisiä aminohappoja. Vaikka DbpB sitoo GAG-ketjuja suurin piirtein yhtä voimakkaasti kuin DbpA, sen sitoutumiskohdat eivät ole DbpA:n kanssa yhteneviä. DbpB:n GAG-ketjuihin sitoutumisessa tärkein kohta on sen lysiinirikas C-terminaalinen häntä. (Feng ja Wang 2015.)

Sekä DbpA:n että DbpB:n kohdalla on havaittu, että proteiinien dekoriiniin sitoutuva osa sisältää paljon lysiinejä. Tämän takia voidaan olettaa, että lysiinit ovat tärkeitä Dbp-proteiinien kyvyssä sitoutua dekoriiniin. Lysiinien 82, 163 ja 170 esimerkiksi tiedetään olevan ratkaisevassa roolissa DbpA:n kyvyssä sitoa dekoriinia (Brown ym. 1999). On havaittu, että borreliat, joilla on mutaatio kyseisissä DbpA:n lysiineissä, eivät pysty aiheuttamaan infektiota hiirissä (Fortune ym. 2014).



**Kuva 4:** DbpA:n ja DbpB:n rakenne. Molemmat proteiinit koostuvat viidestä helikaalisesta osasta, joita yhdistävät joustavammat ketjut. (Kuva mukaillen lähteistä Feng ja Wang 2015 sekä Feng 2012)

## 2.5 Tutkimuksen tavoitteet

Tässä työssä tutkimuksen kohteena oli muutama Dbp-proteiinien adheesiossa merkitykselliseksi oletettu lysiini; lysiinit 78, 80 ja 82 DbpA:ssa ja 79 DbpB:ssä. Näiden lysiinien merkitystä borrelian kyvyllä sitoutua verisuonen endoteeliin tutkittiin työn menetelmäosiossa esitetyin metodein niin sanotun lysiinimutanttikannan avulla. Lysiinimutanttikannan Dbp-proteiineissa kyseiset lysiinit on korvattu kemiallisesti eri tavalla käyttäytyvällä aminohapolla eli alaniinilla, jolloin sitoutuminen ei ole mahdollista muutetun aminohappojärjestyksen kohdalla.

## 3 AINEISTO JA MENETELMÄT

### 3.1 Borrelia-kannat

Eri borrelia-kantoja voidaan käyttää tutkimuksessa hyödyksi kasvattamalla niitä kasvatusliuoksessa ja tutkimalla kasvatettujen bakteerien ominaisuuksia. Borrelia-bakteerit ovat varsin vaativia kasvatusolosuhteidensa suhteen. Tämän vuoksi borrelia-bakteereita kasvatetaan erikseen niiden kasvatukseen kehitetyssä Barbour-Stoenner-Kelly-II-kasvatusliuoksessa (BSK-II-kasvatusliuoksessa) (Barbour 1984). Ne eivät myös kestä liian korkeita lämpötiloja, sillä jo 39 °C:ssa niiden kasvu alkaa hidastua. Borrelioita tuleekin

kasvattaa +30–37 °C:ssa. Bakteerikasvatukseen lisätään antibiootteja, joita kasvatettavat bakteerit kestävät, mutta jotka tappavat mahdolliset muut mikrobit kasvatuksessa. Näin kasvatuksessa saadaan aikaan positiivinen selektio borrelia-bakteereita kohtaan.

Tutkimuksessa käytettiin negatiivisena kontrollina B313+pBSV2-kantaa (viitataan tästä eteenpäin nimellä B313), joka sisältää geeninkuljetusvektorin muttei *dbpA* tai *dbpB*-geenejä. B313-kanta, joka on saatu Thomas Kamradtilta (Deutsches Rheuma- Forschungszentrum, Berliini, Saksa), on *B. burgdorferi* sensu stricto-alalajista peräisin oleva kanta, jonka genomi sisältää varsin vähän plasmideja. Tämän vuoksi sen pinnalta puuttuu useita adheesioproteiineja (Sadziene ym. 1992, Sadziene ym. 1993). Positiivisena kontrollina käytettiin *B. garinii* SKB40-kantaa (Bg40), joka on potilasnäytteestä eristetty villityypin kanta. Sen pinnalla on kaikki borrelian pinnalta normaalisti löytyvät pintaproteiinit. B313+pBSV2/Bg40DbpAB-kanta (B313/DbpABwt) sisältää *B. gariniilta* peräisin olevan normaalin DbpA:ta ja DbpB:tä koodaavan vektorin. B313+pME22/Bg40 DbpAB/DbpA K78/80/82A DbpB K79A -kanta (lysiinimutantti) puolestaan sisältää DbpA- ja DbpB-proteiinien mutatoituneita muotoja.

Bakteerikantoja kasvatettiin BSKII-kasvatusliuoksessa +33 °C:ssa. B313, B313/DbpABwt- ja lysiinimutanttikantojen kasvatusliuokseen lisättiin kanamysiiniä (c=200µg/ml) ja Bg40-kanta kasvatettiin ilman antibiootteja.

DbpA ja DbpB proteiineja koodaavan plasmidin vieti B313-kantaan esitetään Salon ym. artikkelissa (2011). Mutatoituja Dbp-proteiineja koodaava plasmidi vieti puolestaan B313-kantaan elektroporaation avulla. Bakteerit laskettiin ja sentrifugoitiin pelletiksi. Tämän jälkeen seokseen lisättiin proteiineja koodaavan DNA:n sisältävä plasmidi ja bakteereille suoritettiin elektroporaatio. Bakteereita kasvatettiin ensin ilman antibiootteja ja toisesta siirrostuksesta lähtien 96-kuoppalevyllä, jolle lisättiin kanamysiiniä (c=200µg/ml).

### 3.2 Plasmidiprofilointi

Koska bakteereilla on suuri määrä geneettistä informaatiota plasmideissa ja geneettistä muuntelua esiintyy huomattavan paljon juuri plasmidien osalta, on tärkeä voida varmistaa, että bakteerit eivät ole menettäneet mitään geneettistä tietoa ajan myötä. Varsinkin bakteerikannat, joita on pasasoitu kasvatuksessa useita kertoja, alkavat usein menettää plasmideja. Tämän vuoksi bakteerien geneettinen koodi on syytä kartoittaa ja verrata tuloksia referenssitietoihin. Bakteerien genomista voidaan monistaa PCR-menetelmällä (polymerase

chain reaction) plasmidit käyttämällä plasmidispesifisiä alukkeita ja ajaa ne agarosigeelille, josta eripituiset DNA-fragmentit voidaan havainnoida.

Tutkimuksessa käytettyjen borrelia-kantojen geneettinen sisältö tarkistettiin analysoimalla kantojen sisältämät plasmidit multiplex-PCR:llä. Multiplex-PCR suoritettiin protokollalla, jonka Bunikis ym. esittävät artikkelissaan (2011). Reaktioon käytettiin Qiagenin Multiplex PCR kittiä ja artikkelissa kuvattuja primereita (metabion international AG, Steinkirchen, Germany). PCR:n lopputuotteet ajettiin 2,5 % agarosigeelille ja värjättiin Midori greenillä.

### **3.3 Napalaskimon endoteelisolut**

Bakteerien vaikutusta eläinsoluihin voidaan tutkia eristämällä ja kasvattamalla eläinsoluja ja seuraamalla niiden vuorovaikutusta bakteerien kanssa. Eläinsoluja kasvatetaan esimerkiksi nestefaasissa tai kasvatuspullon pohjalla riippuen solutyypin vaatimista olosuhteista. Solut tarvitsevat kasvaakseen kasvatusliuosta, josta ne saavat tarvitsemiaan ravinteita. Lisäksi solukasvatukset ovat erittäin herkkiä kontaminaatioille, joten bakteereja tappavat antibiootit ovat tarpeen. Solut käyttävät vähitellen jakaantuessaan kasvatusliuoksen ravinteet ja täyttävät kasvatuspullon tarjoaman tilan. Sen vuoksi soluja täytyy jakaa säännöllisesti. Jakaessa solut irrotetaan pullon pohjasta ja jaetaan uusiin kasvatuspulloihin, joihin lisätään kasvatusmediumia. Näin solulinjat pysyvät elinvoimaisina. Tosin ihmisestä eristetyt primaarisolulinjat eivät pysty jakautumaan ikuisesti, vaan niiden solulinjan kasvuvauhti laskee ajan myötä ja tämän takia samaa primaarisolulinjaa voidaan käyttää vain rajatun ajan.

Tutkimuksessa käytettiin ihmiskudoksista peräisin olevia napalaskimon endoteelisoluja (HUVEC). HUVEC-solut saatiin valmiiksi eristettynä professori Sirpa Jalkasen laboratorion. HUVEC-soluja kasvatettiin EGM-2 kasvatusliuoksessa (Lonza, Basel, Switzerland), joka sisälsi 100 µg/ml streptomysiiniä ja 100 U/ml penisilliiniä. Soluja kasvatettiin +37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> ja ne siirrostettiin kahdesti viikossa.

### **3.4 Western blot -analyysi**

Western blot -analyysi on tapa selvittää, tuottavatko bakteerikasvatukset tutkittuja proteiineja esimerkiksi pinnalleen tai kasvatusliuokseensa. Bakteerikasvatuksesta otettu näyte ajetaan bis-tris geelille, jolloin erikokoiset proteiinit ajautuvat geelillä eri matkan ja ovat näin erotettavissa toisistaan. Proteiinit siirretään nitroselluloosakalvolle. Kalvon päälle lisätään primaarivasta-aine, joka tarttuu spesifisti tutkittuun proteiiniin. Primaarivasta-aineeseen

sidotaan puolestaan sekundaarivasta-aine, joka voidaan saada kemiallisen reaktion avulla näkymään erityiskameralla kuvattaessa. Näin tuotetussa kuvassa näkyvät vain proteiinit, joihin primaarivasta-aine on sitoutunut. Samalle geelille ajetun referenssinäytteen avulla proteiinien massat voidaan määrittää ja kun tutkitun proteiinin massa tiedetään, tutkittu proteiini voidaan tunnistaa muiden epäspesifisten proteiinien seasta. Näin saadaan tietää, tuottaako bakteerikanta tutkittua proteiinia.

Bakteerikantojen kykyä tuottaa DbpA:ta ja DbpB:tä selvitettiin kyseisellä Western blot -analyysillä. Borrelia-kannoista tuotettiin näytteet, jotka ajettiin 10 % bis-tris geelille (Life Technologies, Carlsbad, California, USA) MES-ajopuskurissa (Life Technologies). Geelin proteiinit siirrettiin elektroforeesin avulla nitroselluloosakalvolle käyttäen NuPAGE transfer puskuria (Life Technologies), joka sisälsi 20 % metanolia. Kalvoa pidettiin yön yli +4 °C fosfaattipuskuroidussa suolaliuoksessa (phosphate-buffered saline, PBS), joka sisälsi 5 % rasvatonta maitojauhetta ja 0,05 % Tweeniä (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA). Primaarivasta-aineina käytettiin anti-DbpA-, anti-DbpB- sekä anti-flagella-vasta-ainetta (p41). Sekundaarivasta-aineena käytettiin goat-anti-rabbit-IgG-HRP:tä (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA). Proteiinien havaitsemista varten kalvot kuvattiin Odyssey Licor -kameralla käyttäen ECL-reagensseja (WesternBright Sirius, Advansta, San Jose, California, USA).

### 3.5 Sitoutumiskokeet

Eri borrelia-kantojen kykyä sitoutua suoraan eläinsoluihin tutkittiin sitoutumiskokeella, jossa borrelioiden annettiin kiinnittyä kuoppalevyllä kasvatettuihin HUVEC-soluihin. Koska borrelia-kantojen Dbp-proteiinit olivat toisistaan poikkeavia, niiden kyky kiinnittyä soluihin saattaa olla erilainen. Soluihin kiinnittyneiden bakteereiden määriä vertaamalla eri kantojen sitoutumiskykyä soluihin voitiin tutkia. Sitoutumiskoe toistettiin neljä kertaa.

Borrelia-kasvatuksista valmistettiin pelletti sentrifugoimalla. Syntynyt bakteeripelletti värjättiin carboxyfluoresein succinimidyl ester -soluvärillä (CFSE-väri, Molecular probes, Eugene, Oregon, USA), jonka pitoisuus oli 10 µM. Borreliat pestiin kahdesti PBS:lla, joka sisälsi 5 % naudan sikiöstä eristettyä seerumia (fetal bovine serum, FBS) värin sitoutumisen lopettamiseksi. Lopulta borreliat laimennettiin PBS:een, jossa oli 0,25 % naudan seerumista eristettyä albumiinia (bovine serum albumin, BSA), ja säilytettiin pimeässä niiden käyttämiseen saakka.

Sitoutumiskoetta varten HUVEC-soluja siirrettiin kasvamaan 96-kuoppalevyille. Solut kiinnitettiin kuoppien pohjalle -20 °C asetonilla ja niiden tumat värjättiin 4',6-diamino-2-fenyyliindolilla (DAPI, Life Technologies), jota oli 1:2000 PBS:ssa. Solujen aktiinifilamentit värjättiin 568 Alexa Fluor Falloidiinilla (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA), joka laimennettiin PBS:een 2,5 %:n pitoisuuteen. Solut säilytettiin pimeässä, kunnes niitä käytettiin sitoutumiskokeessa.

CFSE-värjätyt borreliat lisättiin HUVEC-solujen päälle ja niiden annettiin sitoutua soluihin +37 °C lämpötilassa. Soluihin sitoutumattomat bakteerit pestiin pois, jotta vain solujen pinnassa kiinnittyneenä olevat borreliat nähtiin kuvauksen jälkeen.

Analysointia varten kaivot kuvattiin EVOS FL Auto Imaging System -kameralla (Thermo Fisher Scientific). Jokaisesta kaivosta otettiin 1-4 kuvaa, jotka analysoitiin Image J-ohjelmalla. Kuvista laskettiin solujen määrät niiden tumien perusteella ja kuvissa näkyvien borrelioiden määrät. Eri kantojen kuvissa näkyvien bakteerien määriä verrattiin toisiinsa Kruskal-Wallis testillä ja monivertailut suoritettiin Steel-Dwass metodilla. Analyysit suoritettiin JMP pro 13 -ohjelmalla (SAS Institute, Cary, Pohjois-Carolina, Yhdysvallat).

## **4 TULOKSET**

### **4.1 Plasmidiprofilointi**

Tutkimuksessa käytettyjen borrelia-kantojen geneettinen sisältö tarkastettiin plasmidiprofiloinnilla. Koska kaikki kannat ovat B313-kantoja, joihin osaan on tarkoituksella lisätty plasmideja esimerkiksi DbpAB-proteiinien tuottamiseksi, voitiin tuloksia verrata suoraan ryhmässämme aiemmin saatuihin saman kannan plasmidiprofilointituloksiin. Aikaisempiin tuloksiin verrattuna kaikki kannat sisälsivät juuri ne plasmidit, jotka ne olivat aiemmin sisältäneet (taulukko 1). Kantojen perimässä ei ollut siis tapahtunut muutoksia. Tämä tarkoittaa, että sitoutumiskokeissa nähtävät erot eivät johtuisi ainakaan muutoksista borrelioiden genomissa.

**Taulukko 1:** Borrelia-kantojen plasmidiprofiilit. B313- ja B313/DbpABwt-kannat sisälsivät lineaarisen plasmidin 17 ja sirkulaariset plasmidit 26, 32-4 ja 32-3. Lysiinimutanttikannan kaksi eri kloonia sisälsivät molemmat lineaarisen plasmidin 17 ja sirkulaarisen plasmidin 26. Nämä tulokset vastaavat kannoista aiemmin tehtyjä plasmidiprofilointeja.

Kanta	Plasmidi			
	lp 17	cp 26	cp 32-4	cp 32-3
B313	x	x	x	x
B313/DbpABwt	x	x	x	x
Lysiinimutantti klooni 2	x	x		
Lysiinimutantti klooni 3	x	x		

## 4.2 Western blot -analyysi

Western blot -analyysissä kaikki borrelia-kannat sitoivat p41-vasta-ainetta. Koska kaikissa kannoissa on samanlainen flagella-proteiinia koodaava geeni, voidaan bakteerimääriä, joita käytettiin Western blot -analyysiin, hyvin vertailla p41-vasta-aineen sitoutumisen määrin.

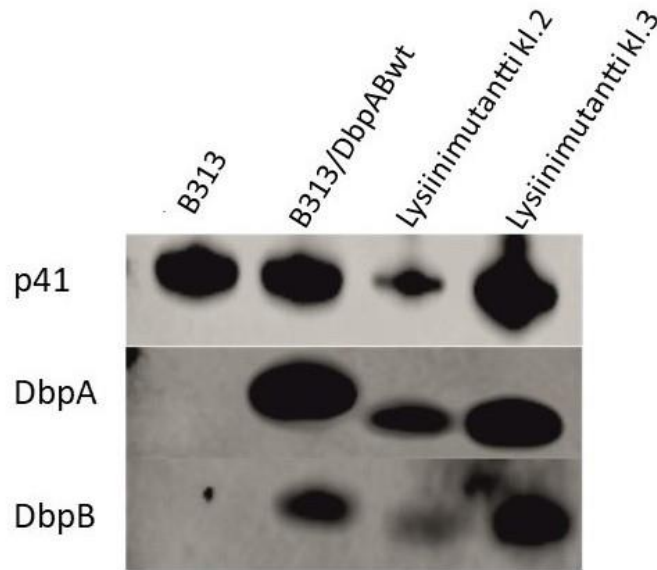
B313-kantaan sitoutui runsaasti p41-vasta-ainetta. Sen sijaan kuvasta 5 näkee, että siihen ei sitoutunut anti-DbpA- eikä anti-DbpB-vasta-aineita. Kanta ei siis ekspressoi DbpA:ta tai DbpB:tä ja sisältää vain geenikuljetusvektorin. Kanta voidaan sen takia käyttää negatiivisena kontrollina, kun tutkitaan Dbp-proteiinien vaikutusta bakteerien kykyyn sitoutua isäntäsolujen pinnalle.

B313/DbpABwt-kanta ilmensi flagella-proteiinia suurin piirtein saman verran kuin B313-kanta, joten bakteereja oli näytteessä myös likimain sama määrä. Villityypin kanta sitoi hyvin runsaasti sekä anti-DbpA- että anti-DbpB-vasta-aineita (kuva 5). Kannan bakteerit tuottavat siis pinnalleen runsaasti molempia proteiineja. Koska villityypin kanta ilmentää DbpA:n ja DbpB:n luonnossa esiintyvää muotoa normaalisti voidaan kanta käyttää tutkimuksissa positiivisena verrokkina mutatoituihin kantoihin verrattuna.

Lysiinimutanttikantoja alun perin tuottaessa saatiin aikaan useita klooneja. Kuten kuvasta 5 näkee, klooni 2 ei kasvanut kunnolla, sillä kaikissa bakteereissa tuotettavaa flagella-proteiinia ei juurikaan ole. Tämän vuoksi päätettiin jatkaa kloonilla numero 3. Molemmat lysiinimutanttikannat ilmensivät kuitenkin western blot -analyysin mukaan DbpA:ta ja DbpB:tä saman verran kuin B313/DbpABwt-kanta. Koska villityypin kannan ja



lysiinimutanttikannan DbpA- ja DbpB-määrät ovat samanlaiset, bakteereissa oleva Dbp-proteiinien mutaatio ei vaikuta borrelioiden kykyyn tuottaa Dbp-proteiineja pinnalleen.

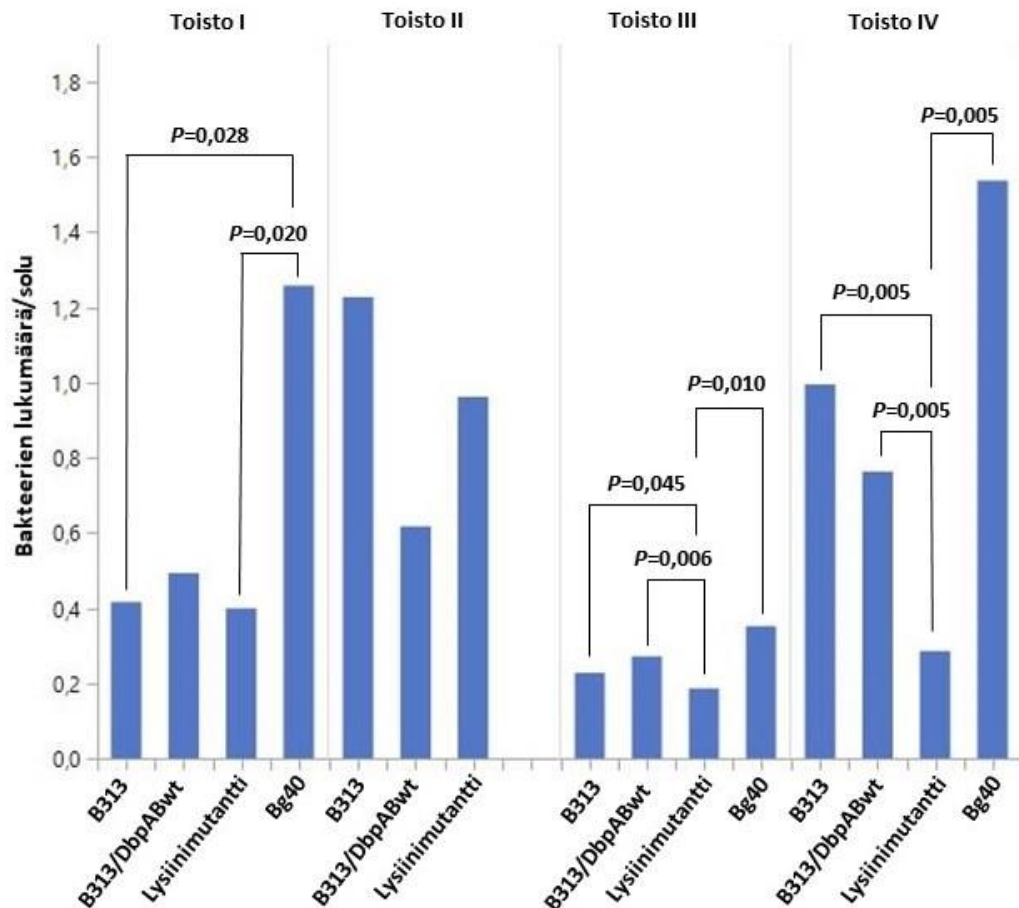


**Kuva 5:** Western blot -analyysi. B313-kanta sitoi western blot -analyysissä pelkästään anti-flagelliinia (p41). Se ei tuota Dbp-proteiineja. B313/DbpABwt-kanta sitoi kaikkia vastaaineita. Lysiinimutanttikantojen molemmat kloonit sitoivat suhteessa yhtä paljon anti-DbpA:ta ja anti-DbpB:tä kuin villityypin kanta. Lysiinimutanttikannoista klooni 3 kasvoi huomattavasti paremmin kuin klooni 2, joka ei sitonut juurikaan anti-flagelliinia.

### 4.3 Sitoutumiskokeet

Sitoutumiskokeiden avulla tutkittiin eri borrelia-kantojen kykyä kiinnittyä HUVEC-solujen pinnalle. Bakteerien määriä eri kantojen kaivoissa verrattiin toisiinsa jokaisessa toistossa erikseen (kuva 6). Lysiinimutanttikanta sitoutui tilastollisesti merkitsevästi vähemmän kuin Bg40-kanta kaikissa toistoissa, joissa Bg40-kantaa käytettiin, eli toistoissa yksi, kolme ja neljä. Toistossa kaksi Bg40-kantaa ei pystytty käyttämään, sillä bakteerit eivät lisääntyneet kasvatuksessa kunnolla. Lisäksi lysiinimutanttikanta sitoutui tilastollisesti merkitsevästi vähemmän kuin B313- ja B313/DbpABwt-kanta toistoissa kolme ja neljä. B313-kanta sitoutui puolestaan soluihin tilastollisesti merkitsevästi vähemmän kuin Bg40-kanta toistossa yksi.

Borrelioiden sitoutumismäärien havaittiin vaihtelevan melko paljon sekä eri kantojen välillä että yksittäisen kannan sisällä eri toistoissa. Tästä syystä tuloksista ei voinut tehdä selkeää johtopäätöstä, mutta havaittavissa oli suuntaus, että lysiinimutanttikanta sitoutui heikosten kaikkien kannoista.



**Kuva 6:** Bakteerikantojen sitoutuminen HUVEC-soluihin. Kokeen ensimmäisessä toistossa lysiinimutantti- ja B313-kannan sitoutuminen erosi tilastollisesti merkitsevästi Bg40-kannan sitoutumisesta. Toisessa toistossa ei saatu tilastollisesti merkitseviä eroja kantojen sitoutumisen välille. Kolmannessa ja neljännessä toistossa lysiinimutanttikannan sitoutuminen erosi kaikkien muiden kantojen sitoutumisesta tilastollisesti merkittävästi. Huomioitaessa kaikki toistot nähtävissä oli suuntaus, jonka mukaan lysiinimutanttikanta sitoutui heikoiten HUVEC-soluihin.

## 5 POHDINTA

Dekoriinia sitovien proteiinien tiedetään olevan tärkeässä roolissa borrelia-bakteerien adheesiossa verisuonten endoteeliin ja näin omalta osaltaan mahdollistavan borrelioiden pääsyn kudoksiin. Dbp-proteiineissa havaittujen monissa kannoissa esiintyneiden lysiini-aminohappojen merkitys adheesiossa on kuitenkin vielä epäselvä. Niiden uskotaan olevan tärkeässä roolissa Dbp-proteiinien sitoutumiskyvylle, sillä ne sijaitsevat siinä Dbp-proteiinin osassa, joka vastaa proteiinin kiinnittymisestä dekoriiniin. Tämän työn tarkoituksena oli

selvittää näiden lysiinien merkitystä borrelioiden adheesiokyvylle. Tätä varten tuotettiin borrelia-kanta, joka ekspressoisi pinnallaan kyseisten lysiinien kannalta muunneltuja Dbp-proteiineja ja kannan borrelioiden kykyä sitoutua ihmisestä peräisin oleviin verisuonen endoteelisoluihin verrattiin normaaleja Dbp-proteiineja tuottavien kantojen sitoutumiseen. Sitoutumiskokeiden tulokset kuitenkin olivat varsin vaihtelevia. Syy vaihteleviin tuloksiin ei luultavasti ole borrelioiden perimän muutoksissa, sillä ennen kokeita varmistettiin niiden geneettinen sisältö, joka oli kaikissa kannoissa entisenlainen. Borrelia-kannat eivät myöskään tuota Dbp-proteiineja eri määriä, sillä Western blot -analyysin mukaan proteiinien tuotanto on samanlaista jokaisessa kannassa.

Yksi suurta vaihtelua tuloksiin tuova toisto oli toisto kaksi. Toistossa kaksi villityypin Bg40-kanta ei lähtenyt kasvamaan, joten toistoon ei saatu ollenkaan positiivista kontrollia. Toiston tulokset olivat lisäksi melkein vastakkaisia muihin toistoihin verrattuna. Sitoutumiskokeissa tärkeintä oli vertailu pelkkää villityypin Dbp-proteiineja tuottavan B313/DbpABwt-kannan ja mutatoituja proteiineja tuottavan lysiinimutanttikannan välillä. Muissa toistoissa lysiinimutanttikanta sitoutui soluihin heikommin kuin B313/DbpABwt-kanta, mutta toistossa kaksi tulos oli päinvastainen. Lysiinimutanttikanta sitoutui soluihin vahvemmin. Mitään tilastollisia merkityksiä ei kuitenkaan esiintynyt toistossa kaksi eri kantojen välillä.

Lisäksi jokaisessa toistossa oli havaittavissa B313-kannan varsin vahva sitoutuminen verrattuna aikaisempiin tutkimuksiin. Aiemmin B313-kannan sitoutumisen on havaittu olevan hyvin vähäistä, mitä voisikin olettaa perustuen siihen, että kannan borrelioiden pinnalla ei ole juuri ollenkaan adheesioproteiineja (Salo ym. 2011, Salo ym. 2016). Verrattuna aikaisemmin havaittuihin B313-kannan sitoutumisaffiniteetteihin oli B313-kannan sitoutuminen sitoutumiskokeissa liian suurta. Tämän vuoksi negatiivista kontrollia ei voida pitää täysin luotettavana ja koko kokeen luotettavuus kärsii. Syy B313-kannan liialliselle sitoutumiselle tuskin on geneettinen, sillä kannan plasmidit kartoitettiin samalla muiden kantojen plasmidiprofiloinnin kanssa. B313-kannan liiallisen sitoutumisen takia koeprotokollaa tulee arvioida uudelleen ja mahdollisesti kehittää, jotta luotettavampia tuloksia saataisiin. Samaa koeprotokollaa on kuitenkin käytetty aiemmin menestyksekkäästi (Salo ym. 2016), joten ongelma saattaa johtua myös jostain muusta tuntemattomasta tekijästä.

Saattaa olla mahdollista, että myös HUVEC-solujen erilaisuus on voinut vaikuttaa sitoutumiskokeiden tuloksiin. HUVEC-solut saadaan eri ihmisluovuttajilta, joten luovuttajahenkilö vaihtelee toistoissa. Toistoissa yksi ja kaksi käytettiin samalta luovuttajalta saatuja HUVEC-soluja ja toistoissa kolme ja neljä puolestaan käytettiin toiselta luovuttajalta saatuja HUVEC-soluja. Nämä eri luovuttajalta saadut HUVEC-solut saattavat erota toisistaan

ja esimerkiksi ekspressoida hiukan erilasin molekyyliä pinnallaan. Nämä erilaiset solujen pintamolekyylit saattavat puolestaan vaikuttaa borrelioiden kykyyn sitoutua solujen pintaan, jolloin eri luovuttajilta saaduilla soluilla saadaan erilaisia tuloksia. Myös solulinjan siirrostamisten määrä, eli kuinka monta kertaa solut on jaettu uuteen kasvatukseen niiden eristyksen jälkeen, saattaa vaikuttaa sitoutumiskokeiden tuloksiin. Toistoissa yksi ja kolme soluja ei ollut vielä siirrostettu kovin montaa kertaa, kun toistoissa kaksi ja neljä solujen siirrostamisten määrä oli puolestaan suurempi. Useammin siirrostettuihin soluihin on ehtinyt kertyä jo enemmän mutaatioita kuin vasta muutaman kerran siirrostettuihin soluihin. Muun muassa kudoksesta eristetyt solulinjat solujen kasvukyky alkaa huonontua vähitellen, mitä useamman kerran solut siirrostetaan. Nämä muutokset HUVEC-soluissa voivat siis myös aiheuttaa vaihteluja sitoutumiskokeiden tuloksiin.

Vaikka sitoutumiskokeissa ei näkynyt selkeää eroa lysiinimutanttikannan ja B313/DbpABwt-kannan välillä, oli kaikki neljä toistoa huomioidessa nähtävissä jonkinlainen suuntaus lysiinimutanttikannan borrelioiden heikommasta sitoutumiskyvystä muihin kantoihin verrattuna. Tämä voisi viitata siihen, että tutkimuksen aiheena olevat konservoituneet lysiinit saattavat hyvinkin olla merkityksellisiä Dbp-proteiinien välittämässä borrelioiden adheesiossa verisuonten endoteelisoluihin. Lisää tutkimusta näiden lysiinien merkityksestä Dbp-proteiineissa tarvitaan ennen kuin lysiinien rooli borrelioiden adheesiossa voidaan vahvistaa, mutta tämä tutkimus antaa selkeitä viitteitä siitä, että aiheen tutkiminen tulevaisuudessa on tarpeen.

## LÄHTEET

- Barbour A. G. Isolation and Cultivation of Lyme Disease Spirochetes. *The Yale journal of biology and medicine*. 1984; 57, ss. 521–525.
- Benoit V. M. ym. Allelic variation of the Lyme disease spirochete adhesin DbpA influences spirochetal binding to decorin, dermatan sulfate, and mammalian cells. *Infection and immunity*. 2011; 79(9), ss. 3501–9.
- Borchers A. T. ym. Lyme disease: A rigorous review of diagnostic criteria and treatment. *Journal of Autoimmunity*. 2015; 57, ss. 82–115.
- Brown E. L. ym. Adherence of *Borrelia burgdorferi*: Identification of critical lysine residues in DbpA required for decorin binding. *J. Biol. Chem.* 1999; 274(37), ss. 26272–26278.
- Bunikis I. ym. Multiplex PCR as a tool for validating plasmid content of *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Microbiological Methods*. 2011; 86(2), ss. 243–247.
- Cabello F. C., Godfrey H. P. ja Newman S. A. Hidden in plain sight: *Borrelia burgdorferi* and the extracellular matrix. *Trends in Microbiology*. 2007; 15(8), ss. 350–354.
- Caine J. A. ym. Multifunctional and Redundant Roles of *Borrelia burgdorferi* Outer Surface Proteins in Tissue Adhesion, Colonization, and Complement Evasion. *Frontiers in Immunology*. 2016; 7(7), s. 442.
- Charon N. W. ym. The unique paradigm of spirochete motility and chemotaxis. *Annu Rev Microbiol.* 2012; 66, ss. 349–370.
- Feng W. ja Wang X. Structure of decorin binding protein B from *Borrelia burgdorferi* and its interactions with glycosaminoglycans. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2015; 18(3), ss. 386–392.
- Fischer J. R. ym. Decorin-binding proteins A and B confer distinct mammalian cell type-specific attachment by *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete. *PNAS*. 2003; 100(12), ss. 7307–7312.
- Fortune D. E. ym. Identification of Lysine Residues in the *Borrelia burgdorferi* DbpA Adhesin Required for Murine Infection. *Infection and Immunity*. 2014; 82(8), ss. 3186–3198.
- Guo B. P. ym. Adherence of *Borrelia burgdorferi* to the Proteoglycan Decorin. *Infection and immunity*. 1995; 63(9), ss. 3467–3472.
- Hardy P. H. ym. Colonial growth of anaerobic spirochetes on solid media. *J. Bacteriol.* 1963;

86, ss. 616–626.

Hytönen J. ym. CXCL13 and neopterin concentrations in cerebrospinal fluid of patients with Lyme neuroborreliosis and other diseases that cause neuroinflammation. *Journal of Neuroinflammation*. 2014;11, ss. 1–11.

Jarvelainen H. T. ym. Differential Expression of Small Chondroitin/Dermatan Sulfate Proteoglycans, PG-I/Biglycan and PG-II/Decorin, by Vascular Smooth Muscle and Endothelial Cells in Culture. *The journal of biological chemistry*. 1991; 266(34), ss. 23274–23261.

Kilpatrick A. M. ym. Lyme disease ecology in a changing world: consensus, uncertainty and critical gaps for improving control. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. 2017; 372(1722), ss. 20160117

Laaksonen M. ym. Crowdsourcing-based nationwide tick collection reveals the distribution of *Ixodes ricinus* and *I. persulcatus* and associated pathogens in Finland. *Emerging Microbes & Infections*. 2017; (6), s. e31.

Liang F. T. ym. Protective niche for *Borrelia burgdorferi* to evade humoral immunity. *American Journal of Pathology*. 2004;165(3), ss. 977–985.

Lin Y.-P. ym. Strain-specific variation of the decorin-binding adhesin DbpA influences the tissue tropism of the Lyme disease spirochete. *PLOS pathogens*. 2014; 10(7), s. e1004238.

De Martino S. J. ym. Enhanced culture of *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* strains on a solid BSK-based medium in anaerobic conditions. *Research in Microbiology*. 2006; 157, ss. 726–729.

Morgan A. ym. Flexible Linker Modulates Glycosaminoglycan Affinity of Decorin Binding Protein A. *Biochemistry*. 2015; 54(32).

Morgan A. M. ja Wang X. Structural mechanisms underlying sequence-dependent variations in GAG affinities of decorin binding protein A, a *Borrelia burgdorferi* adhesin. *The Biochemical journal*. 2015; 467(3), ss. 439–51.

Nyman D. ja Wahlberg P. *Lymen borreliosisi, Terveystietä; Lääkärin tietokannat*. 2018

Oksi J., Seppälä I. J. T. ja Hytönen J. *Borrelia burgdorferi* ja Lymen borreliosisi, *Mikrobiologia. Duodecim*. 2010

Radolf J. D. ym. Of ticks, mice and men: understanding the dual-host lifestyle of Lyme

disease spirochaetes. *Nat Rev Microbiol*. 2012; 10(2), ss. 87–99.

Roberts W. C. ym. Molecular Analysis of Sequence Heterogeneity among Genes Encoding Decorin Binding Proteins A and B of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato. *Infection and immunity*. 1998; 66(11), ss. 5275–5285.

Sadziene A. ym. Antibody-resistant Mutants of *Borrelia burgdorferi*: In Vitro Selection and Characterization. *The journal of experimental medicine*. 1992; 176, ss. 799–809.

Sadziene A. ym. The Cryptic ospC Gene of *Borrelia burgdorferi* B31 Is Located on a Circular Plasmid. *Infection and immunity*. 1993; 61(5), ss. 2192–2195.

Salo J. ym. Decorin binding by DbpA and B of *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii*, and *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. *Journal of Infectious Diseases*. 2011; 204(1), ss. 65–73.

Salo J. ym. Decorin binding proteins of *Borrelia burgdorferi* promote arthritis development and joint specific post-treatment DNA persistence in mice. *PLOS ONE*. 2015; 10(3), ss. 1–17.

Salo J. ym. Flow-Tolerant Adhesion of a Bacterial Pathogen to Human Endothelial Cells Through Interaction With Biglycan. *Journal of Infectious Diseases*. 2016; 213(10), ss. 1623–1631.

Schotthoefer A. M. ja Frost H. M. Ecology and Epidemiology of Lyme Borreliosis. *Clinics in Laboratory Medicine*. 2015; 35(4), ss. 723–743.

Scott J. E. ja Orford C. R. Dermatan sulphate-rich proteoglycan associates with rat tail-tendon collagen at the d band in the gap region. *Biochem. J*. 1981; 197, ss. 213–216.

Shi Y. ym. Both decorin-binding proteins A and B are critical for the overall virulence of *Borrelia burgdorferi*. *Infection and immunity*. 2008; 76(3), ss. 1239–46.

Stanek G. ym. Lyme borreliosis. *The Lancet*. 2012; 379(9814), ss. 461–473.

Steere A. C. ym. Lyme borreliosis. *Nature Reviews Disease Primers*. 2016; 2, s. 16090.

Strle K. ym. *Borrelia burgdorferi* Stimulates Macrophages to Secrete Higher Levels of Cytokines and Chemokines than *Borrelia afzelii* or *Borrelia garinii*. *J Infect Dis*. 2010; 200(12), ss. 1936–1943.

Tartuntatautirekisterin tilastotietokanta - THL kuutio- ja tiivistekäyttöliittymä. Saatavissa: [https://sampo.thl.fi/pivot/prod/fi/ttr/shp/fact\\_shp?row=area-12260&column=time-12059&filter=reportgroup-12465](https://sampo.thl.fi/pivot/prod/fi/ttr/shp/fact_shp?row=area-12260&column=time-12059&filter=reportgroup-12465) (Viitattu: 27. kesäkuuta 2018).

Wang X. Solution Structure of Decorin-Binding Protein A from *Borrelia burgdorferi*. *Biochemistry*. 2012; 51(42).

Wormser G. P. *ym*. *Borrelia burgdorferi* Genotype Predicts the Capacity for Hematogenous Dissemination during Early Lyme Disease. *J Infect Dis*. 2009; 198(9), ss. 1358–1364.