



**LATVIJAS  
UNIVERSITĀTE**

BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE

**Jēkabs Fridmanis**

**PROTEĪNU INFEKCIOZO AĢENTU  
PĒTĪJUMI IZMANTOJOT KMR**

PROMOCIJAS DARBA KOPSAVILKUMS

Doktora grāda iegūšanai Bioloģijas nozarē  
Molekulārās bioloģijas apakšnozarē

Rīga, 2023



Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Organiskās sintēzes institūtā laika posmā no 2019. gada līdz 2023. gadam.

## Latvijas Organiskās sintēzes institūts

Pētījumu finansēja ERAF grants (līgums nr. 1.1.1.1/18/A/004) un doktorantu stipendijas no Latvijas Organiskās sintēzes institūta.

Darbs satur ievadu, teorētisko pamatojumu, materiālus un metodes, rezultātus un diskusiju, secinājumus, aizstāvamās tēzes, oriģinālo publikāciju sarakstu, pētījuma aprobāciju un izmantotās literatūras sarakstu.

Darba forma: publikāciju kopa Bioloģijas nozarē, Molekulārās bioloģijas apakšnozarē.

Darba zinātniskais vadītājs: OSI vad. pētnieks, Dr. **Kristaps Jaudzems**

Darba recenzenti:

- 1) **Teodors Pantelejevs**, PhD, pētnieks Latvijas Organiskās sintēzes institūtā
- 2) **Gints Kalniņš**, Dr. biol., pētnieks Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā
- 3) **Jan Stanek**, Dr. chem., zinātniskais līdzstrādnieks Varšavas Universitātē

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2023. gada \_\_\_\_ . \_\_\_\_\_  
plkst. \_\_\_\_\_ Latvijas Universitātes Bioloģijas nozares promocijas padomes  
atklātajā sēdē.

Ar promocijas darbu un tā kopsavilkumu var iepazīties Latvijas Universitātes  
Bibliotēkā Rīgā, Kalpaka bulvārī 4.

LU Bioloģijas zinātņu nozares promocijas padomes priekšsēdētājs

\_\_\_\_\_/Prof., Dr. biol. Nils Rostoks/

Sekretāre

\_\_\_\_\_/Dr. biol. Daina Edze/

ISBN \_\_\_\_\_

© Latvijas Universitāte, 2023

© Jēkabs Fridmanis, 2023

# KOPSAVILKUMS

Katru gadu miljoniem cilvēku zaudē dzīvību no infekciozo aģentu izraisītām slimībām. Dažas no tām kā COVID-19 ir radušās tikai pēdējo gadu laikā, turpretī citas kā Laima slimība, transmisīvās sūkļveida encefalopātijas (TSE) un Ebola pastāv jau ilgu laiku un pret tām vēl joprojām nav izdevies izveidot ārstniecības līdzekļus. Svarīga loma šo slimību izraisīto infekciozo aģentu izdzīvošanā un izplatībā ir proteīniem, kas mijiedarbojas ar to saimniekorganisma iekšējo vidi. Lai gan pēdējo gadu laikā strukturālās bioloģijas jomā ir novērots liels progress un ātrums, ar kādu spējam noteikt proteīnu struktūras, ir ievērojami uzlabojies, mūsu izpratne par šo proteīnu struktūrām un funkcijām joprojām ir ierobežota.

Šī promocijas darba mērķis ir izpētīt proteīnus, kas regulē infekcijas aģentu mijiedarbību ar saimniekorganisma iekšējo vidi. Lai sasniegtu šo mērķi, tika pētīti trīs proteīni no diviem atšķirīgiem infekciozajiem aģentiem, izmantojot kodolu magnētisko rezonansi (KMR). Divi no tiem ir Laimas slimību izraisošās baktērijas *Borrelia burgdorferi* ārējās virsmas lipoproteīni (AVP), BBP28 un BBA03 un viens ir prionu proteīns (PrP), kura nepareiza salocīšanās fibrillās zīdītājos izraisa TSE.

Mūsu pētījumi liecina, ka abi *B. burgdorferi* proteīni ir strukturāli homologi – BBA03 sastāv no nestrukturēta peptīda, kam seko septiņu  $\alpha$ -spirāļu saišķis, bet BBP28, salīdzinot ar BBA03, nav trešās  $\alpha$ -spirāles, un pēdējā  $\alpha$ -spirāle ir aizvietota ar nestrukturētu cilpu, kas pie strukturētās proteīna daļas saistīta ar disulfīda saiti. Abu struktūru dziļāka izpēte parāda, ka BBA03 struktūrā ir hidrofoba pora, savukārt BBP28, kad tas tiek reducēts, uz virsmas atklājas hidrofobas aminoskābes. Ņemot vērā, ka abiem proteīniem ir novērojama līdzība ar palmitīnskābi saistošu proteīnu BTA121, abi varētu pildīt lipīdu saistīšanas funkciju, kam ir ievērojama nozīme *B. burgdorferi* izdzīvošanai saimniekorganismā.

Pētījuma rezultāti, kurā tika pētīts saīsināts peles priona proteīna variants no 89. līdz 230. aminoskābei (MoPrP(89-230)), norāda, ka atkarībā no *in vitro* fibrillizācijas apstākļos esošā jonu spēka veidotajām prionu fibrillām var atšķirties to struktūras. Iegūtie rezultāti liecina, ka fibrillām, kas veidotas apstākļos ar ievērojami atšķirīgu jonu spēku no fizioloģiskā diapazona, ir mazāka fizioloģiskā nozīme.

Atslēgvārdi: infekcijas aģents, Laimas slimība, transmisīvā sūkļveida encefalopātijas, *Borrelia burgdorferi*, prions.

# SATURS

Kopsavilkums.....	2
Saturs.....	3
Darbā izmantotie saīsinājumi .....	4
Ievads .....	5
1. Teorētiskais pamatojums .....	6
1.1. Laimas slimība.....	6
1.2. <i>Borrelia burgdorferi</i> .....	6
1.3. Transmisīvā sūkļveida encefalopātija.....	8
1.4. Priona proteīns.....	8
2. Materiāli un metodes .....	11
2.1. Plazmīdu veidošana .....	11
2.2. Proteīnu ekspresija.....	11
2.3. Proteīnu attīrīšana .....	12
2.4. KMR eksperimenti .....	12
2.5. Otrējo ķīmisko nobīžu analīze .....	14
2.6. Trešējās struktūras analīze .....	14
2.7. Ķīmisko nobīžu salīdzināšana .....	14
3. Rezultāti un diskusija.....	16
3.1. <i>Borrelia burgdorferi</i> BBP28 un BBA03 .....	16
3.2. <i>Mus musculus</i> MoPrP(89-230) .....	23
4. Secinājumi .....	28
5. Aizstāvāmās tēzes.....	29
6. Publikācijas.....	30
7. Pētījuma aprobācija .....	31
8. Pateicības .....	32
9. Literatūras saraksts .....	33

# DARBĀ IZMANTOTIE SAĪSINĀJUMI

AVP – ārējās virsmas proteīns

*B. burgdorferi* – *Borrelia burgdorferi*

BMC – Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs

cp – cirkulāra plazmīda

DNS – dezoksiribonukleīnskābe

DSS – 4,4-dimetil-4-silapentān-1-sulfonskābe

EDTA – etilēndiamīntetraetiķskābe

GdnHCl – guanidīna hidrohlorīds

ID – identitāte

IPTG – izopropil-β-D-tiogalaktozīds

KMR – kodolu magnētiskā rezonanse

LB – Luria-Bertani barotne

lp – lineāra plazmīda

*M. musculus* – *Mus musculus*

Mlp – multi-lipoproteīns

MoPrP(89-230) – peles priona proteīns no 89. līdz 230. aminoskābei

OD<sub>600</sub> – parauga optiskais blīvums, ko mēra pie viļņa garuma 600 nm

ppm – miljonās daļas (*parts per million*)

PrP – priona proteīns

PrP<sup>C</sup> – iekšsūnas, šķīstošs priona proteīns

PrP<sup>Sc</sup> – infekciozi priona proteīna agregāti

RMSD – vidējā kvadrātiskā novirze (*root mean square deviation*)

ROS – reaktīvā skābekļa formas (*reactive oxygen species*)

SDS-PAGE – nātrija dodecilsulfāta poliakrilamīda gēla elektroforēze

TAE buferis – Tris-acetāta-EDTA buferis

TSE – transmisīvā sūkļveida encefalopātija

*wt* – *wild type*

xg – relatīvais centrālās bēdzes spēks

ΔBBA03 – *B. burgdorferi* ar BBA03 delēciju

# IEVADS

Infekciozie aģenti izmanto tiešu (caur ādu) vai netiešu (caur ēdienu/ūdeni) kontaktu, lai pārvietotos starp saimniekorganismiem, kam tie spēj izraisīt postošas, līdz pat letālas slimības. Daži no literatūrā visplašāk aprakstītajiem infekciozajiem aģentiem ir sēne, *Yersinia pestis*, kas izraisa buboņu mēri (Barbieri et al., 2020), *Plasmodium* viensūnu eikarioti, kas izraisa malāriju (Phillips et al., 2017), *Borrelia burgdorferi* baktērija, kas izraisa Laimas slimību (Bohe et al., 2021) un prionu proteīnu agregāti (PrP<sup>Sc</sup>), kuri izraisa TSE (Zhu and Aguzzi, 2021).

Svarīga loma infekciozo aģentu dzīves ciklā un izplatībā ir proteīniem, it sevišķi tiem, kas mijiedarbojas ar saimniekorganismu iekšējo vidi. Piemēram, Laimas slimības baktērijai *B. burgdorferi*, AVP ļauj izdzīvot divās atšķirīgās vidēs, ērcēs un zīdītāja organismā (Kenedy et al., 2012). Priona proteīna izraisītās TSE slimībās, PrP<sup>Sc</sup> mijiedarbība ar saimniekorganismu spēlē lielu lomu patogēnēzē (Imran and Mahmood, 2011). Neskatoties uz plašajiem pētījumiem, kas veikti, lai analizētu *B. burgdorferi* AVP un PrP<sup>Sc</sup>, mūsu zināšanas par to mijiedarbību ar attiecīgajiem saimniekiem un to ietekmi uz slimības progresu joprojām ir nepilnīgas.

Promocijas darba mērķis izpētīt proteīnus, kas regulē infekcijas aģentu mijiedarbību ar saimniekorganisma iekšējo vidi. Mērķa sasniegšanai tika pētīti trīs proteīni no diviem patogēniem un izvirzīti sekojoši uzdevumi:

- 1) Noteikt divu *B. burgdorferi* ārējās virsmas proteīnu, BBP28 un BBA03, struktūras, izmantojot kodolu magnētiskās rezonanses (KMR) spektroskopiju;
- 2) Veikt iegūto struktūru detalizētu analīzi, lai izvirzītu hipotēzes par pētīto proteīnu funkcijām un pārbaudītu šīs hipotēzes;
- 3) Iegūt augstas izšķirtspējas cietvielu KMR spektrus *Mus musculus* priona proteīna fibrillām, kas *in vitro* veidotas atšķirīgos agregācijas apstākļos;
- 4) Analizēt iegūtos datus un noteikt, kā agregācijas apstākļi ietekmē prionu proteīna fibrillu struktūru.

# 1. TEORĒTISKAIS PAMATOJUMS

## 1.1. Laimas slimība

Pirmo reizi Laimas slimība jeb Laimas boreloze tika reģistrēta 1970. gados, kad Laimā, Konetikutā vairākiem cilvēkiem tika diagnosticētas reimatoīdas, artrītam līdzīgas pazīmes (Steere et al., 1977). Mūsdienās Laimas slimība ir viena no izplatītākajām ar ērces vektoru pārnestajām slimībām ziemeļu puslodē. Katru gadu ASV un Eiropā tiek diagnosticēti ap 476 000 un 200 000 jauni slimības gadījumi (Kugeler et al., 2021; Marques et al., 2021).

Pirmajās piecās līdz septiņās dienās pēc ērces koduma, 70% Laimas slimības slimnieku parādās viens no visvieglāk atpazīstamajiem simptomiem, dedzinošs, niezošs ādas iekaisums, ko sauc par *erythema migrans*. Citi agrīnie simptomi ietver drudzi, galvassāpes un nogurumu. Ja agrīnajās stadijās Laimas slimību nesāk ārstēt ar antibiotikām, infekcija var izplatīties pa ķermeni un veicināt smagāku simptomu izveidi kā Bella paralīzi, artrītu, sirdsklauves, nervu sāpes u.c. (Skar and Simonsen, 2022).

## 1.2. *Borrelia burgdorferi*

Šobrīd ir noskaidrots, ka Laimas slimību var izraisīt vairāk kā 20 dažādas *Borrelia* ģints baktērijas, no kurām visbiežāk pētītā ir *B. burgdorferi* (Chaconas et al., 2020). Lai tā spētu izdzīvot zīdītāja organismā, *B. burgdorferi* virsma ir pārklāta ar vairākiem AVP, no kuriem katram ir specifiska funkcija. Daži no tiem, kā CspA saista komplementa sistēmas faktorus un tādējādi veicina *B. burgdorferi* izvairīšanos no komplementa sistēmas izraisītas līzes (Haupt et al., 2007). Citi, kā OspA un OspB veicina tās piesaisti ērcēs (Becker et al., 2005). Līdz ar *B. burgdorferi* limitēto metabolisko kapacitāti, AVP tai arī nodrošina barības vielu un citu metabolītu uzņemšanu no zīdītāja organisma (Groshong et al., 2017). Viens no metabolītiem, kura izveidei *B. burgdorferi* nav nepieciešamo biosintēzes gēnu, ir lipīdi. Tā kā lipīdu nepiesātinātās formas infekcijas laikā tiek pakļautas oksidācijai no neitrofilu izdalītajām reaktīvā skābekļa formām (ROS) (Brisson et al., 2012), *B. burgdorferi* genomā vajadzētu būt lipīdus saistošiem AVP. Neskatoties uz to, pagaidām neviens lipīdus saistošs AVP *B. burgdorferi* genomā nav identificēts.

Salīdzinot ar citām baktērijām, *B. burgdorferi* ir savdabīgs genoms, kas sastāv no 950 kb lielas, lineāras hromosomas un vairākām variablām lineārām (lp) un cirkulārām plazmīdām (cp) (Brisson et al.,



2012). No plazmīdām, liela uzmanība zinātnieku aprindās ir pievērsta cp32. Tās *B. burgdorferi* genomā atšķirībā no sugas var būt dažādā skaitā un dažas spēj izveidot  $\lambda$ -fāgam līdzīgas  $\phi$ BB-1 bakteriofāgu daļiņas (Eggers et al., 2001; Brisson et al., 2012). Uz cp32 plazmīdām ir trīs variabli reģioni. Viens kodē ParA un BpaB proteīnus, kas ļauj vairākām cp32 plazmīdām atrasties vienā *B. burgdorferi* baktērijā (Stevenson and Brissette, 2022). Pārējie divi reģioni kodē virsmas lipoproteīnus no Mlp (multi-lipoproteīnu) un OspE analogu, erp saimēm. Kamēr Erp proteīniem ir zināmas vairākas funkcijas, kas palīdz *B. burgdorferi* izdzīvot zīdītājos (Alitalo et al., 2002; Brissette et al., 2009; Lin et al., 2015, 2020), Mlp saimes proteīnu funkcijas vēl nav zināmas.

Pēc to molmasas, sekvenču homoloģijas un antivielu reakcijas, Mlp proteīnus var iedalīt divās grupās – I tipa un II tipa Mlp proteīnos (Porcella et al., 2000). *In vitro* eksperimentos noskaidrots, ka to ekspresija palielinās 37 °C salīdzinot ar 25 °C, pie pH 7 salīdzinot ar pH 8 un paaugstinātā šūnu blīvumā (Yang et al., 2003). Pētījumā, kurā, izmantojot šķelšanu ar proteāzi K (PK), tika pētīta lipoproteīnu atrašanās uz *B. burgdorferi* dubultās membrānas, tika noskaidrots, ka, lai gan Mlp saimes locekļi galvenokārt atrodas uz baktērijas virsmas, neliels daudzums tiek vai nu paslēpts no PK šķelšanas, vai arī atrodas periplazmā (Dowdell et al., 2017). Mlp proteīnu funkcionālos pētījumos ir noskaidrots, ka *B. garinii* Mlp I tipa proteīns saista smadzeņu mirovaskulārā endotēlija šūnas (Tkáčová et al., 2020). Meklējot jaunus vakcīnu kandidātus, Xu un kolēģi pārbaudīja 90 dažādu *B. burgdorferi* lipoproteīnu spēju saistīt antivielas vēlās Laimas slimības pacientu asins serumos. Šajā pētījumā tikai viens Mlp saimes II tipa proteīns, BBP28, saistīja antivielas visos 13 pārbaudītajos serumos un tikai 28 proteīni, kuru skaitā ir visi seši tipa II Mlp proteīni, veidoja imūno atbildi vismaz septiņos asins serumos. Jāpiebilst, ka visu Mlp veidotās antivielu atbildes tika konstatētas ar relatīvi vāju intensitāti (Xu et al., 2008).

*B. burgdorferi* attīstībā, tās genomā ir norisinājušās vairākas nozīmīgas izmaiņas. Viena no tām ir lp54 plazmīdas izveide, cp32 plazmīdai integrējoties lp54 prekursorā. Līdz ar rekombināciju, lp54 plazmīdā ir arī atrodams Mlp II tipa homologs proteīns, BBA03 (Casjens et al., 2002). Lai gan šobrīd nav zināma precīza BBA03 funkcija, no BBA03 delēcijas mutantu ( $\Delta$ BBA03) pētījumiem zināms, ka salīdzinot to ar *wild type* (*wt*) celmu,  $\Delta$ BBA03 veido difūzākas, par divām dienām ilgāk augošanas kolonijas. Inficējot peles ar ērcēm, kas satur *wt* un  $\Delta$ BBA03, *wt* ir novērojama konkurētspējas priekšrocība, kas neuzrādās izmantojot šļirces injekciju. PK testos BBA03 netiek sašķelts un tas

veicina vāju aizsardzību pret infekciju imunizācijas testos (Bestor et al., 2012).

### 1.3. Transmisīvā sūkļveida encefalopātija

Agrīnajos pētījumos tika pieņemts, ka līdz ar TSE pārnese starp indivīdiem un ilgo inkubācijas periodu no infekcijas līdz simptomu iestāšanās brīdim, prionu proteīna izraisītās slimības infekcijas aģents ir "lēni vīrusi" (Prusiner, 1998). Mūsdienās, plaši pieņemta ir tikai-prionu hipotēze, kurā uzskata, ka vienīgais TSE cēlonis ir iekššūnas šķīstošā priona proteīna (PrP<sup>C</sup>) nepareiza salocīšanās fibrilārās agregātos (PrP<sup>Sc</sup>) (Pastore and Zagari, 2007). Atkarībā no ārējās vides apstākļiem, aminoskābju sekvenču mainības un pēc-translācijas modifikācijām PrP<sup>C</sup> var veidot dažādus PrP<sup>Sc</sup> celmus, kuru uzkrāšanās saimniekorganismā veicina atšķirīgu TSE izpausmi (Solforosi et al., 2013). Šie celmi viens no otra atšķiras ar inkubācijas periodu, PrP<sup>Sc</sup> bioķīmisko profilu (elektroforētiskās mobilitātes un glikoformu attiecības) un sadalījumu dažādos smadzeņu reģionos. Lai gan visām TSE slimībām ir atšķirīgi simptomi, šīm slimībām kopīgs ir tas, ka letāls iznākums ir nenovēršams (Pastore and Zagari, 2007; Imran and Mahmood, 2011). Viena no plašāk sabiedrībā pazīstamajām TSE ir liellopu sūkļveida encefalopātija, kuras izplatība Lielbritānijā starp 1985. un 2015. gadu caur PrP<sup>Sc</sup> inficētu barību veicināja 185 000 liellopu nāvi (Casalone and Hope, 2018). Cilvēkos izplatītākā TSE ir Kreicfelda-Jakoba slimība, kuru var izraisīt ģenētiskās mutācijas priona proteīna *PRNP* gēnā, PrP<sup>Sc</sup> pārnese medicīnisku procedūru laikā, liellopu ar sūkļveida encefalopātiju izmantošana barībā un spontāna slimības izpausme bez zināma iemesla (Head and Ironside, 2012). Citu vērā ņemamu TSE skaitā ir Kuru, kas agrāk bija plaši izplatīta Fore cilts ietvaros, Papua - Jaungvinejā (Whitfield et al., 2008), un dominanti iedzīmtā Gerstmana-Štrauslera-Šeinkera slimība (Collins et al., 2001).

### 1.4. Priona proteīns

PrP<sup>C</sup> ir augsti konservatīvs, vairākos audu tipos ekspresēts glikoproteīns, kam lielākā ekspresija novērota centrālās un perifērās nervu sistēmas neironos (Stahl, 1987; Bendheim et al., 1992). Ir pierādīts, ka tas ir saistīts ar vairākām fizioloģiskām funkcijām, kā neuroģenēzi, neirālo homeostāzi, šūnu signālu pārnesei, šūnu adhēziju un tam ir aizsargājoša loma pret stresu (Legname, 2017). Salīdzinot ar PrP<sup>C</sup>, kam ir  $\alpha$ -spirālēm bagāta struktūra, tā infekciozā formai, PrP<sup>Sc</sup> ir  $\beta$ -plāksnēm

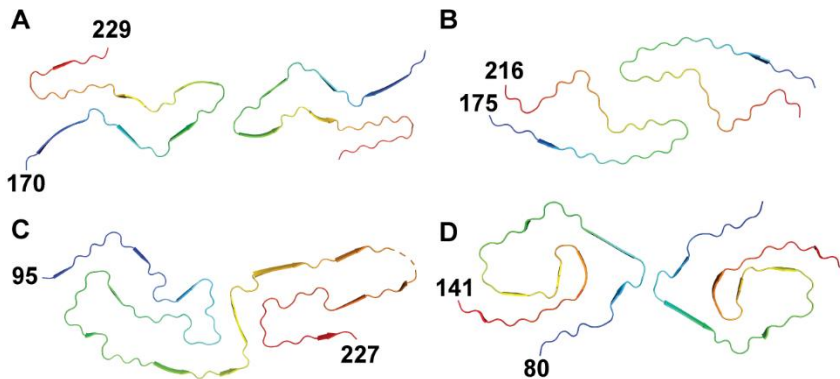
bagāta, lielākoties fibrillāra forma kam ir zema šķīdība deterģentos un augsta izturība pret proteolīzi. PrP<sup>Sc</sup> fibrillāro agregātu saskare ar PrP<sup>C</sup> veicina tā turpmāku pārveidi infekciozu PrP<sup>Sc</sup> agregātu stāvoklī, kas attiecīgi var turpināt iesākto ķēdes reakciju saskarē ar jaunām PrP<sup>C</sup> molekulām (Pan et al., 1993).

TSE pārnesi starp īpatņiem nereti ietekmē parādība, ko sauc par starp sugu barjeru. Tās rezultātā, sugām ar atšķirīgām fizioloģiskām īpašībām, dažādām PrP sekvencēm un dažādiem iespējamajiem PrP<sup>Sc</sup> celmiem ir vājāka slimības pārnese, kā starp vienas sugas īpatņiem (Peden et al., 2021). Pētījumi liecina, ka šīs barjeras izpausmi izteikti ietekmē cilpa PrP<sup>C</sup> proteīnā starp tā otro  $\beta$ -virtni un otro  $\alpha$ -spirāli, jeb starp 170. un 174. aminoskābes atlikumu. Tās ietvaros ir novērojamas vairākas aminoskābes, kas atšķiras salīdzinot dažādu sugu PrP proteīnus un tādējādi, kā pierādīts ar šķīdumu KMR, izmaina cilpas konformāciju (Baral et al., 2019; Šulskis et al., 2023). Tikai dažu aminoskābju atlikumu izmaiņas šajā reģionā, kas palielina cilpas stingrību peles PrP<sup>C</sup> proteīnā, palielina tā noturību pret anormālu salocīšanos saskarē ar PrP<sup>Sc</sup> saturošām smadzeņu suspensijām (Sigurdson et al., 2010).

Pēdējos gados ir publicēti vairāki *in vitro* pētījumi, kuros pētīta PrP<sup>Sc</sup> fibrillu veidošanos. Lai gan šajos pētījumos nav izdevies pilnībā atkārtot PrP<sup>Sc</sup> izveidi, kā tā norisinās *in vivo* apstākļos, dažos ir iegūti infekciozi prionu agregāti, kamēr citos izdevies iegūt pietiekami homogēnus paraugus to struktūras un kinētikas analīzēm (Ryou and Mays, 2008). Lai inducētu stabilā PrP<sup>C</sup> šķīstošā proteīna fibrillizāciju, tas tiek ievietots vidē, kas izjauc tā struktūrā esošās kovalentās saites. Šie aģenti ietver augstu temperatūru, zemu vides pH, denaturējošos aģentus, ribonukleīnskābes, saīsinātu prionu variantus u.c. (Cobb et al., 2008; Choi et al., 2016; Chamachi and Chakrabarty, 2017; Kovachev et al., 2019; Ziaunys et al., 2021, 2022; Pauly et al., 2022). Dažādos literatūrā atrodamos eksperimentos *in vitro* fibrillizācija tiek veikta atšķirīgos maisīšanas ātrumos, kam bieži, proteīna homogenitātes uzlabošanai, seko proteīnu cikliskā fibrillizācijas amplifikācija. Tajā, lai palielinātu fibrillu galu skaitu, izveidotais paraugs tiek apstrādātas ar ultraskaņu un atkārtoti pārsēts viendabīgāka parauga iegūšanai (Saborio et al., 2001). Minētie *in vitro* fibrillizācijas eksperimenti arī bieži atšķiras ar izmantotā PrP<sup>C</sup> garumu. Dažos izmanto vai nu pilna garuma PrP<sup>C</sup> proteīnu bez signālsekvences, vai tā saīsinātu variantu, kas ietver aminoskābes no PrP<sup>Sc</sup> fibrillārā kodola (no 89. līdz 230. aminoskābei). Neatkarīgi no izmantotās sekvences, *in vitro* veidoto fibrillu kodols ir ievērojami īsāks kā dabīgajam PrP<sup>Sc</sup> variantam (no aptuveni 160. – 170. līdz 220. – 225.

aminoskābei) (Cobb et al., 2007, 2008; Lu et al., 2007). Daži pētījumi liecina, ka pat prionu fibrillizāciju veicot identiskos apstākļos, *in vitro* PrP<sup>C</sup> spēj salocīties vairākās atšķirīgās fibrillārās konformācijās (Ziaunys et al., 2020; Sun et al., 2022).

Pēdējos gados, līdz ar straujo krio-elektronmikroskopijas attīstību, ir ievērojami attīstījušies fibrillāro proteīnu strukturālie pētījumi. Līdz 2020. gadam bija izveidots tikai viens priona fibrillu modelis, kas balstīts uz *in vitro* veidotu fibrillu elektronu paramagnētiskās rezonances datiem (Cobb et al., 2007). Kopš tā laika ir publicētas astoņu dažādu priona proteīnu fibrillu krio-elektron mikroskopijas struktūras. No tām, piecas ir *in vitro* veidotām fibrillām (Glynn et al., 2020; Wang et al., 2020, 2021; Chen et al., 2022; Li et al., 2022), bet trīs no smadzenēm izdalītiem paraugiem (Hallinan et al., 2022; Hoyt et al., 2022; Manka et al., 2022) (1. attēls).



**1. attēls.** Krio-elektronmikroskopiski noteiktu prionu proteīnu fibrillu struktūru šķērss griezumus. Katrs protofilaments fibrillā attēlots izmantojot varavīksnes krāsu shēmu. (A), *in vitro* 2 M GdnHCl, 20 mM tris-HCl, pH 7,4 buferī veidotas *wt* cilvēka priona proteīna fibrillas no 23. līdz 230. aminoskābei (Wang et al., 2020). (B), *in vitro* 2 M GdnHCl, 20 mM tris-HCl, pH 7,4 buferī veidotas cilvēka priona proteīna fibrillas no 23. līdz 230. aminoskābei ar E194K mutāciju (Wang et al., 2021). (C), *Mesocricetus auratus* no smadzenēm izdalīts aRML PrP<sup>Sc</sup> celms (Hoyt et al., 2022). (D), *Homo sapiens* no smadzenēm izdalīts Gerstmana-Štrauslera-Šeinkera slimības PrP<sup>Sc</sup> celms (Hallinan et al., 2022).

## 2. MATERIĀLI UN METODEDES

### 2.1. Plazmīdu veidošana

*B. burgdorferi* AVP N-terminālās nestrukturētās aminoskābes no plazmīdām tika izņemtas izmantojot Phusion augstas precizitātes DNS polimerāzi (Thermo Fisher Scientific) un sekojošos praimerus: 5'-ataataccatgggcctaaatctaagaagaacta-3', 5'-taataatactcgagctattaggaccattgc -3' priekš BBP28 un 5'-ataccatgggtacaccttagaaaaattagt-3', 5'- agcctcgagctatatagtgtctttaaatttat-3' priekš BBA03, kuros pasvītrotas ir NcoI un XhoI restrikcijas sekvences. Iegūtie produkti, kas kodē tikai proteīnu strukturētās daļas aminoskābes tika šķelti izmantojot NcoI un XhoI restrikcijas enzīmus un attīrīti, izmantojot 1% agarozes gēla elektroforēzi standarta TAE buferī (20 mM etiķskābe, 1mM EDTA, 40 mM Tris, pH 8). Sašķeltie fragmenti tika izgaismoti gelā ar etidija bromīda un ultravioletās gaismas kombināciju un izolēti no gēla izmantojot GenJET Gel ekstrahēšanas komplektu (Thermo Fisher Scientific) pēc ražotāja norādījumiem. Izolētie fragmenti tika ligēti pETm-11 vektorā, kas iegūts no Kalvja Branguļa, Latvijas Biomedicīnas Pētījumu un Studiju centrā (BMC). Iegūtā vektora sastāvā ir seši His atlikumi proteīna N-terminālā galā. Ligācija tika veikta izmantojot T4 DNS ligāzi (Thermo Fisher Scientific) pēc ražotāja norādījumiem, mainot tikai reakcijas laiku uz 16 h, un temperatūru uz 4 °C. Iegūtās plazmīdas tika izmantotas, lai transformētu ķīmiski kompetentas *Escherichia coli* XL-1-blue šūnas, kas tika uzsētas uz Luria-Bertani (LB) agara barotnēm ar kanamicīnu (10 g/l NaCl, 10 g/l triptons, 5 g/l rauga ekstrakts, 50 µg/ml kanamicīns) un inkubētas 16 h, 37 °C. Atsevišķas, izvēlētas kolonijas ar sterilu bakteriālo cilpiņu tika pārnestas uz mēģenēm ar šķidro LB barotni (10 g/l NaCl, 10 g/l triptons, 5 g/l rauga ekstrakts, 50 µg/ml kanamicīns) un inkubētas 16 h, 37 °C pie 200 apgriezieniem min. Plazmīdas tika izolētas no šķidrā barotnē audzētajām šūnām, izmantojot *GenJET* plazmīdu ekstrahēšanas komplektu pēc ražotāju norādījumiem. Visbeidzot, mutāciju esamība plazmīdās tika pārbaudīta BMC ar Sangera sekvencēšanas metodi izmantojot BigDye Terminator v3.1 cikliskās sekvencēšanas komplektu (Thermo Fisher Scientific) pēc ražotāja norādījumiem.

### 2.2. Proteīnu ekspresija

Plazmīdas, kas satur *B. burgdorferi* AVP, tika transformētas izmantojot *heat shock* metodi BL21(DE)3 *Escherichia coli* šūnās (New

England Biolabs, ASV) un uzsētas uz LB agara platēm ar atbilstošu antibiotiku. Pēc 12 – 16 h inkubācijas 37 °C, viena kolonija tika inkulēta 5 ml nakts kultūras, kas nākamajā rītā tika atšķaidīta 1:1000 proporcijā priekš proteīnu ekspresijas testiem. Tajos ekspresija tika inducēta starp OD<sub>600</sub> 0,6 un 0,9, izmantojot dažādas IPTG koncentrācijas (0,05, 0,1, 0,2, 0,5 vai 1 mM), dažādās temperatūrās (25, 30 vai 37 °C) un ekspresija tika veikta atšķirīgos laika periodos (4, 6 vai 16 h). Iegūtie optimālie ekspresijas apstākļi tika atkārtoti liela apjoma ekspresijā LB vai M9 barotnē priekš <sup>15</sup>N vai <sup>15</sup>N un <sup>13</sup>C iezīmēšanas (3 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 12,8 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,5 g/l NaCl, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM tiamīns, mikroelementi, 1 g/l <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl, and 2 g/l <sup>13</sup>C-glikoze vai 4 g/l <sup>12</sup>C-glikoze). Šūnas tika sedimentētas tās centrifugējot pie 7000 līdz 10 000 xg 10 min un uzglabātas -20 °C.

### 2.3. Proteīnu attīrīšana

Sedimentētās *Escherichia coli* šūnas, kas satur *B. burgdorferi* AVP tika izšķīdinātas un sonificētas buferī A (20 mM nātrija fosfāts, pH 7,5, 300 mM NaCl, 15 mM imidazols) attiecībā 1:10 g/ml. Paraugu šķīstošās frakcijas tika atdalītas tās centrifugējot 30 min pie 25 000 xg, 4 °C un filtrējot caur filtriem ar 0,22 μm poru izmēru. Iegūtie šķīdumi tika uznesti uz 5 ml HisTrap kolonām (GE Healthcare), no kurām piesaistītie proteīni tika eluēti, izmantojot 30 ml bufera B (20 mM nātrija fosfāts, pH 7,5, 300 mM NaCl, 300 – 500 mM imidazols) gradientu. Frakcijas, kas saturēja vajadzīgo AVP, tika koncentrētas līdz 1 ml, izmantojot 10 kDa ultra-centrifugēšanas filtrus (Merck). Lai noņemtu N-terminālo iezīmi no AVP, šķīdumam tika pievienota 25 μg/ml tabakas etch vīrusa proteāze un paraugi tika inkubēti pa nakti 4 °C. No rīta iegūtais paraugs tika izlaists cauri HisTrap kolonai un iekoncentrēts līdz 550 μl KMR buferī (20 mM nātrija fosfāts, pH 6,8, 50 mM NaCl). Abu proteīnu attīrīšanas soļi tika uzraudzīti, izmantojot SDS-PAGE ar 4–12% Bis-Tris poliakrilamīda gēlu (ThermoFisher Scientific), iekrāsojot to ar *PageBlue*<sup>TM</sup> krāsvielu (ThermoFisher Scientific).

### 2.4. KMR eksperimenti

#### 1) BBP28 un BBA03 šķīduma KMR eksperimenti

Šķīdumu KMR eksperimenti tika veikti 298 °K izmantojot Varian Unity Inova 600 MHz spektrometru, kas aprīkots ar HCN z-gradienta kriozondi vai Bruker Avance III HD 800 MHz spektrometru, kas aprīkots ar TXI z-gradienta istabas temperatūras zondi. Pamatķēdes

attiecināšanai tika uzņemti 3D HNCA, 3D HNCO, 3D CBCA(CO)HN, 3D HN(CA)CO un 3D HN(CO)CA spektri. 3D [<sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H]-NOESY-<sup>15</sup>N-HSQC, 3D [<sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H]-NOESY-<sup>13</sup>C(alifātisks)-HSQC, 3D [<sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H]-NOESY-<sup>13</sup>C(aromātisks)-HSQC spektri tika uzņemti ar 80 ms relaksācijas laiku. Ķīmiskās nobīdes tika attiecinātas iekšēji no ūdens veidotā signāla pie 4,77 ppm pret DSS.

Aminoskābju atlikumiem specifiskie proteīna pamatķēdes amīda <sup>15</sup>N KMR R<sub>1</sub> un R<sub>2</sub> relaksācijas laiki tika aprēķināti no signālu intensitātēm <sup>15</sup>N-T<sub>1</sub> un <sup>15</sup>N-T<sub>2</sub> (gNT1T2) relaksācijas spektros, izmantojot divu parametru eksponenciālās atbilstības modeli programmā *relax 4.0.3* (d'Auvergne and Gooley, 2008a, 2008b; Bieri et al., 2011). Lai iegūtu sabrukšanas (*decay*) līknes, tika izmantotas T<sub>1</sub> (10 līdz 2000 ms) un T<sub>2</sub> (10 līdz 250 ms) laika novirzes vērtības. Olbaltumvielu rotācijas korelācijas laiks (τ<sub>c</sub>) tika aprēķināts, izmantojot sekojošo vienādojumu:

$$\tau_c \approx \frac{1}{4\pi\nu_N} \sqrt{6\frac{T_1}{T_2} - 7} \quad (\text{Kay et al., 1989}) \quad (1)$$

kur ν<sub>N</sub> ir <sup>15</sup>N rezonanses frekvence (Hz), T<sub>1</sub> ir spina-režģa un T<sub>2</sub> ir spina-spina relaksācijas vērtības. Dati tika tālāk analizēti, veicot *model-free* analīzi Relax 4.0.3 programmā (d'Auvergne and Gooley, 2008a, 2008b; Bieri et al., 2011).

## 2) Šķīduma KMR eksperimenti selektīvās MoPrP(89-230) neiezīmēšanas efektivitātes pārbaudei

Šķīdumu KMR eksperimenti tika veikti pie 298 °K temperatūras, izmantojot Varian Unity Inova 600 MHz spektrometru, kas aprīkots ar HCN z-gradienta kriozondi. Katram selektīvi neiezīmētajam un vienam pilnībā iezīmētam paraugam <sup>15</sup>N-HSQC spektrs tika uzņemts 1 mM koncentrācijā, 200 mM NaCl, 20 mM nātrija fosfāta buferī pie pH 6,8. Spektu attiecinājums tika pielāgots no BMRB:16071 datu kopas, izmantojot 3D HNCA spektru. Selektīvās neiezīmēšanas efektivitāte tika pārbaudīta programmā CARA (Keller, 2004) izmērot uzņemto <sup>15</sup>N-HSQC spektru signālu intensitātes un izdalot katra individuālā signāla intensitāti selektīvi neiezīmēto paraugu spektros ar tā paša signāla intensitāti pilnībā iezīmētam proteīnam. Visaptverošam skatījumam, datu apstrādē tika aprēķināta vidējā neiezīmēšanas efektivitāte katram aminoskābes veidam.

## 3) MoPrP(89-230) fibrillu cietvielu KMR spektri

Visi cietvielu KMR spektri tika uzņemti, izmantojot Bruker Avance III HD 800 MHz spektrometru, kas aprīkots ar 3,2 mm H/C/N E-

free maģiskā griešanas leņķa zondi (Bruker, Billerica, MA, ASV). Visiem projekta paraugiem tika uzņemti 1D  $^{13}\text{C}$  CP,  $^{15}\text{N}$  CP,  $^{13}\text{C}$  INEPT, 2D NCA, NCO, DARR, RFDR un C(HH)C, 3D NCACX, NCOCX, CANCO un CONCA spektri. 2D DARR, RFDR un C(HH)C spektru iegūšanas laikā maģiskā leņķa griešanas frekvence bija 17 kHz, savukārt citiem spektriem tā bija 12,5 kHz. Temperatūras tika iestatīta uz 273 °K. Spektri tika apstrādāti ar Bruker Topspin 3.57 programmu un analizēti programmā CARA (Keller, 2004).

## 2.5. Otrējo ķīmisko nobīžu analīze

Otrējo ķīmisko nobīžu analīze tika veikta visiem promocijas darbā aprakstītajiem proteīniem. Tās laikā no katras proteīnā esošās aminoskābes  $C_\alpha$  un  $C_\beta$  ķīmiskās nobīdes tika atņemtas to aminoskābēm sagaidāmās otrējās ķīmiskās nobīdes. Iegūtās vērtības tika ievietotas formulā:

$$\Delta\delta_i = \frac{(\Delta C_\alpha - \Delta C_\beta) + (\Delta C_{\alpha+1} - \Delta C_{\beta+1}) + (\Delta C_{\alpha-1} - \Delta C_{\beta-1})}{3} \quad (2)$$

Ja iegūtā  $\Delta\delta$  vērtība aminoskābei ir lielāka par 1, tiek pieņemts, ka tā ir  $\alpha$ -spirāles konformācijā, bet, ja mazāka par 1,  $\beta$ -loksne. Ja iegūtā vērtība ir starp 1 un -1, aminoskābes atlikums nav strukturētā proteīna reģionā (Metzler et al., 1993).

## 2.6. Trešējās struktūras analīze

*B. burgdorferi* AVP Kodolu Overhauzera efekta noteiktās augšējās distances robežas starp atomiem tika automātiski iegūtas no UNIO ATNOS/CANDID 2.0.2 (Herrmann et al., 2002a, 2002b; Serrano et al., 2012). Tās struktūras aprēķinam tika izmantotas kopā ar KMR struktūras aprēķina algoritmu CYANA 2.1 (Güntert et al., 1997). Aprēķina gaitā tika izmantoti septiņi UNIO ATNOS/CANDID cikli. Tie sākās ar 100 nejaušiem konformeriem, kas tika pakļauti simulācijai ar 10 000 torsijas leņķa molekulārās dinamikas soļiem. No tiem 25 konformēriem ar viszemākajām CYANA mērķa funkcijas vērtībām tika samazināta enerģija ūdens vidē izmantojot programmu CNS (Brunger, 2007).

## 2.7. Ķīmisko nobīžu salīdzināšana

Atšķirīgu proteīna konformāciju ķīmisko nobīžu salīdzināšana ļauj grafiski attēlot atšķirības to ķīmiskajās nobīdēs. BBP28 gadījumā atlikumu ķīmiskās nobīdes tika salīdzinātas proteīna oksidētajai un



reducētajai formai. Analīzes veikšanai, ūdeņraža un slāpekļa nobīdes tika ievietotas sekojošajā formulā:

$$\Delta\delta_i = \sqrt{(0.1 * \Delta N)^2 + \Delta H_N^2} \text{ (Williamson, 2013)} \quad (3)$$

Iegūtās vērtības, kas ir lielākas par vidējās vērtības un vienas standartnovirzes summu, tiek uzskatītas par nozīmīgām.

Priona proteīnam analīze tika veikta, lai salīdzinātu atšķirīgās vidēs veidoto fibrillu paraugus. Standartnovirze tika aprēķināta no visiem atomiem, kas attiecināti abās salīdzinātajās struktūrās attiecīgajai aminoskābei izmantojot formulu:

$$\Delta\delta_i = \frac{\sqrt{\Delta C_\alpha^2 + \Delta C_\beta^2 + \Delta C_\gamma^2 \dots}}{x} \quad (4)$$

kur x ir atomu skaits, kas tika attiecināts abās salīdzinātajās struktūras attiecīgajai aminoskābei.

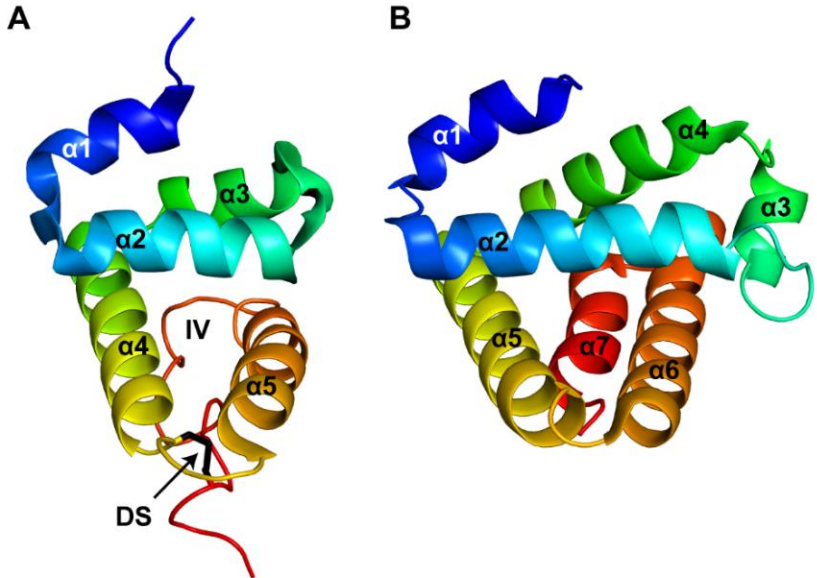
### 3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

Publikāciju kopas rezultātu un diskusijas sekcija ir sadalīta divās daļās. Pirmajā aprakstīti abu pētīto *B. burgdorferi* ārējās virsmas proteīnu, BBA03 un BBP28, pētījumi. Otrajā aprakstīti pētījumi, kuros *in vitro* dažādos apstākļos veidotas prionu proteīnu fibrillas.

#### 3.1. *Borrelia burgdorferi* BBP28 un BBA03

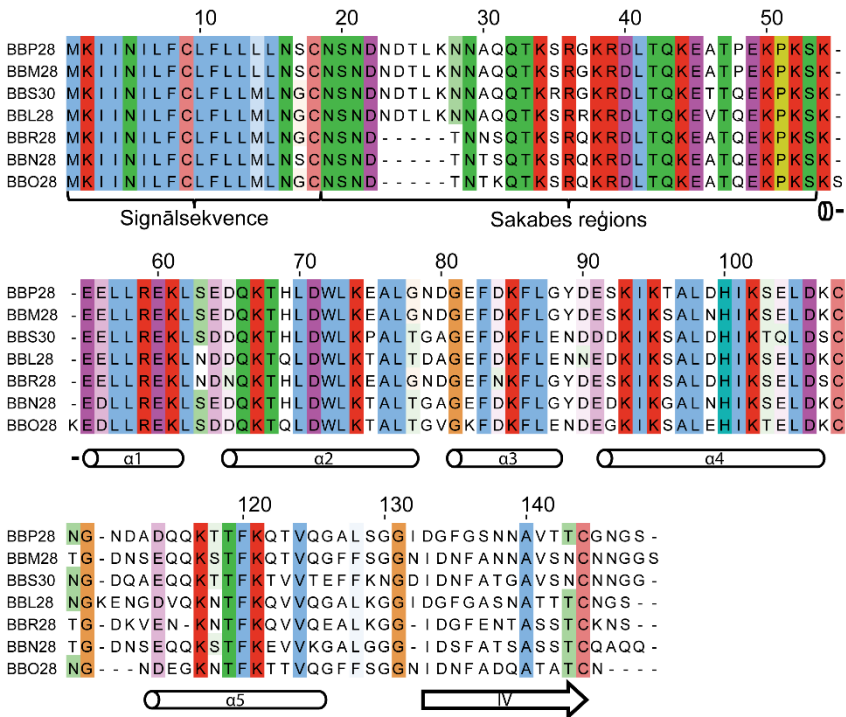
Attīstības gaitā baktērija *B. burgdorferi* ir pielāgojusies dzīvei divās dažādās vidēs, ērces vektorā un zīdītājos. Lai izprastu mehānismu, kā tā izdzīvo šajās vidēs un izvairās no zīdītāju imūnās atbildes, vairāki pētījumi ir fokusējušies tās AVP, kas veido barjeru starp *B. burgdorferi* membrānu un ārējo vidi. Vēl jo vairāk, šajos pētījumos apskatītie proteīni varētu tikt izmantoti kā mērķi vakcīnām pret Laimas slimību un citu zāļvielu izstrādei (Kenedy et al., 2012). Šajā darbā, divi *B. burgdorferi* AVP, BBA03 un BBP28, kam ir palielināta ekspresija zīdītāju infekcijas laikā, tika pētīti izmantojot KMR.

Primārie uzņemtie KMR dati un to secīgā otrējo ķīmisko nobīžu analīze liecina, ka pirmās 37 BBA03 un 36 BBP28 aminoskābes nav strukturētas. Tās proteīniem veic sakābes funkciju, kas piesaista proteīnu strukturētās daļas pie *B. burgdorferi* virsmas. Tā kā abi nestrukturēti reģioni ievērojami pasliktina KMR datu kvalitāti, tie tika izņemti no AVP kodējošām plazmīdām, izmantojot polimerāzes ķēdes reakciju. Sekojoši, saīsinātiem proteīna variantiem tika uzņemti un analizēti pamatķēdes attiecināšanas un NOESY spektri, no kuriem tika iegūtas divas definētas struktūras ar zemām mērķa funkcijām (7,15 Å<sup>2</sup> BBP28 un 9,75 Å<sup>2</sup> BBA03) un labu Ramachandra statistiku kurā abiem proteīniem 94,5% no torsijas leņķiem novēra optimāla konformācija. Abiem proteīniem spektros tika attiecināti vairāk kā 98% atomu. No KMR datiem iegūtā BBP28 struktūra sastāv no piecu α-spirāļu saišķa, pie kā, caur disulfīda saiti ir piesaistīta C-termināla izstiepta virkne (2. attēls).



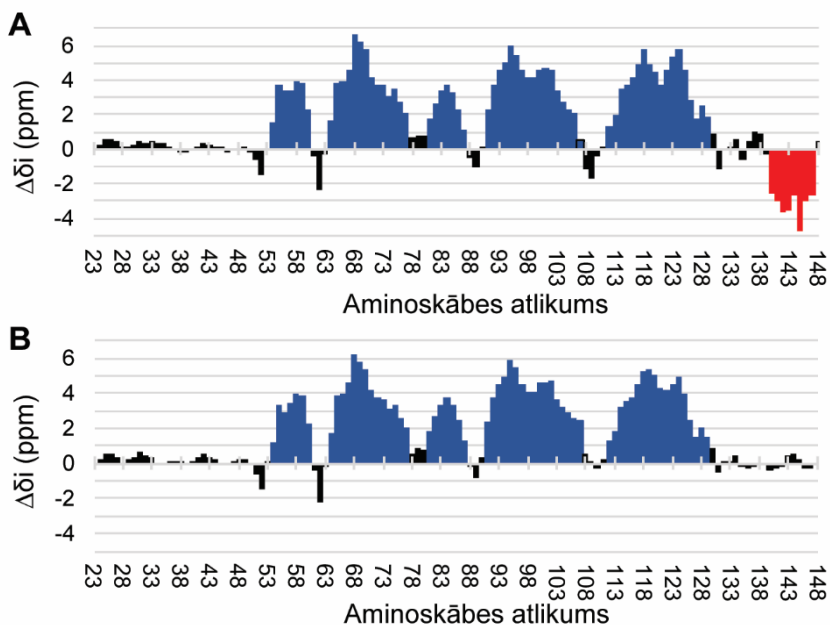
**2. attēls.** BBP28 un BBA03 struktūru attēlojums. **(A)** BBA03 un **(B)** BBP28 proteīnu strukturētās daļas, attēlotas izmantojot varavīksnes krāsu shēmu.  $\alpha$ -spirāles abos proteīnos ir numurētas. BBP28 struktūrā, disulfīda saite (DS) ir melna un C-terminālā izstieptā virkne (IV) ir sarkana.

Salīdzinot BBP28 proteīna sekvenci ar citiem Mlp saimes II tipa proteīniem no *B. burgdorferi* redzams, ka tā signālsekvencai (pirmās 17 aminoskābes) un sekojošajiem 36 nestrukturētajiem aminoskābju atlikumiem ir ievērojama līdzība (3. attēls). Šis novērojums saskan ar iepriekšējiem pētījumiem, kuros pierādīts, ka sakabes reģionam un signālpeptīdam ir liela nozīme lipoproteīna lokalizācijā *B. burgdorferi* membrānā (Chen and Zuckert, 2011). Aminoskābju atlikumu līdzība atlikušajā strukturētajā proteīna daļā norāda, ka visu saimes proteīnu trešējās struktūras ir vienādas. Izteiktas sekvences atšķirības novērojamas tikai izstieptajai virknei, kurā tikai trīs aminoskābju atlikumi, A140, T143 un C144 kurš veido disulfīda saiti, ir augsti konservēti. Tas liecina, ka lielākajai daļai no C-terminālajām aminoskābēm nav jāpaliek nemainīgām, lai proteīns saglabātu savu funkciju.



**3. attēls.** Sekvenču salīdzinājums mlp saimes II tipa proteīniem, veidots izmantojot Jalview (Waterhouse et al., 2009). Zem salīdzinājuma attēlota BBP28 otrējā struktūra, kur  $\alpha$ -spirāles ir numurētas un apzīmētas ar cilindriem un izstieptā virkne (IV) ir attēlota ar bultu.

Veicot otrējo ķīmisko nobīžu analīzi reducētam un oksidētam BBP28 proteīnam tika noskaidrots, ka tā C-terminālā izstieptā virkne reducētā formā ir atsaistījusies no proteīna neizmainot  $\alpha$ -spirāļu struktūru (4. attēls). Rezultātā, hidrofobās aminoskābes, kas normālos apstākļos atrodas proteīna centrālajā daļā, visdrīzāk nonāk uz tā virsmas.



**4. attēls.** Otrējo ķīmisko nobīžu analīze BBP28 (**A**) oksidētajai un (**B**) reducētai formai. Reģioni, kur ķīmiskās nobīdes atbilst  $\alpha$ -spirālei ir zili,  $\beta$ -ķēdei vai izstieptai virknei ir sarkani un reģioni bez regulārām struktūrām ir melni.

Līdzīgi, kā BBP28, tā homologa proteīna BBA03 struktūra sastāv no septiņu  $\alpha$ -spirāļu saišķa (2. attēls). Abu iegūto struktūru salīdzinājums norāda, ka BBP28 proteīnā, salīdzinot ar BBA03, nav trešās  $\alpha$ -spirāles, un pēdējā  $\alpha$ -spirāle ir aizvietota ar nestrukturētu cilpu, kas pie strukturētās proteīna daļas saistīta ar disulfīda saiti. Abu proteīnu salīdzināšana izmantojot Dali serveri (Holm, 2020) norāda, ka struktūru līdzības indekss (*Z-score*) ir 7,4, pārklājot to struktūrās 87 aminoskābes ir novērojama 2,5 Å vidējā kvadrātiskā novirze (*RMSD*) un sekvenciāli tiem ir 21% identitāte (ID). Salīdzinot BBA03 sekvences starp dažādām *Borrelia* sugām novērojama augsta sekvenciālā līdzība (zemākā novērotā identitāte – 68,6%), kas norāda, ka proteīna funkcijas saglabāšanai proteīnam nepieciešams uzturēt nemainīgu sekvenci (dati nav parādīti). Izmantojot CASTp programmu (Tian et al., 2018) tika noskaidrots, ka starp BBA03 spirālēm atrodas hidrofoba T-formas pora.

Homologu meklējumos izmantojot Dali serveri (Holm, 2020), tika noskaidrots, ka abiem pētītajiem *B. burgodferi* AVP strukturāli līdzīgi proteīni ir atrodami Pfam54\_60 proteīnu saimē, kas nosaukta pēc tās proteīnu atrašanās lps4 plazmīdā (1. tabula) (Akopjana and Brangulis,

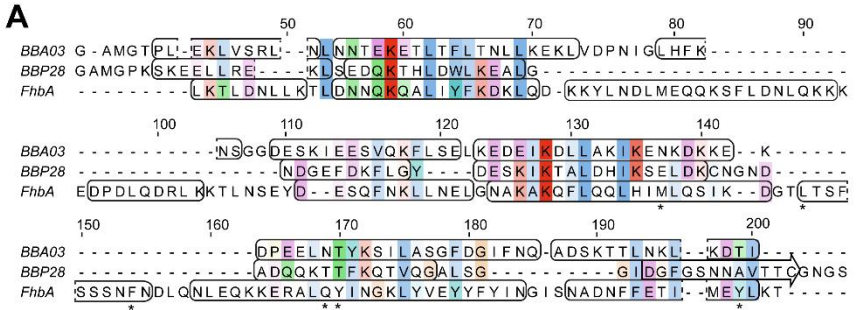
2022). Lai gan starp šiem proteīniem ir novērota ievērojama strukturāla līdzība, to sekvencēm ir zema identitāte (vidēji 18%), kas to starpā veido ievērojamu funkcionālo daudzveidību. Šāda strukturālā līdzība starp funkcionāli atšķirīgiem lipoproteīniem *B. burgdorferi* genomā, iespējams, ir saistīta ar lielu ģenētisko mainību un rekombināciju skaitu tās genomā, kā rezultātā ir izveidojušās vairāku paralogu gēnu saimes. Līdz ar to, šādu proteīnu funkcijas noteikšana, tikai to struktūras salīdzinot ar paralogiem proteīniem, parasti nav iespējama, jo īpaši, ja citās baktērijās sekvencei nav homologu.

**1. tabula.** BBA03 and BBP28 strukturālā līdzība ar citiem proteīniem no *Borrelia* ģints.

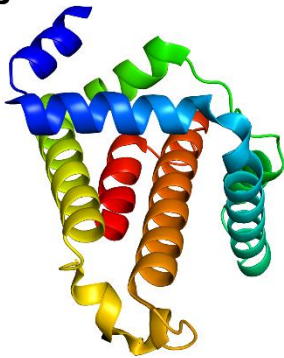
Nosaukums	PDB ID	BBA03			BBP28		
		Z-score	RMSD (Å)	ID (%)	Z-score	RMSD (Å)	ID (%)
FhbA	6ZH1	12,2	2,1	17	7,5	3,0	16
BTA121	5VJ4	7,7	2,3	13	7,7	3,2	14
BGA71*	6FL0	7,0	2,9	12	5,1	3,4	5
BBA69*	6QO1	6,1	3,2	14	4,8	3,4	5
CspA*	5A2U	6,1	3,4	11	3,6	3,3	11
BBE31*	6FZE	5,3	3,1	10	3,5	4,2	9
BBA64*	4ALY	4,5	3,4	18	3,0	3,9	10
BBA73*	4B2F	4,1	3,9	12	3,1	4,2	6

\*Proteīni no *B. burgdorferi* Pfam54\_60 saimes, vai šīs saimes proteīnu homologi no citām *Borrelia* sugām.

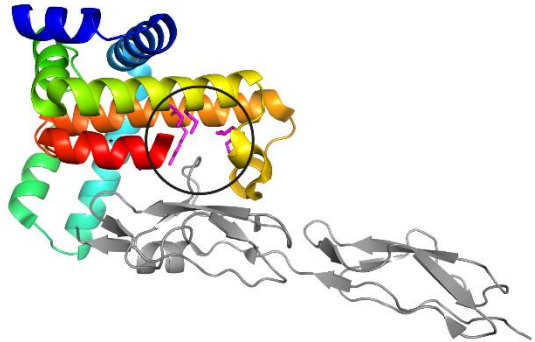
Turpinot līdzīgu proteīnu meklējumus tika noskaidrots, ka tuvākais strukturālais homologs BBA03 un otrs tuvākais homologs BBP28 proteīnam ir recidivējošo drudzi izraisošās baktērijas, *B. hermsii* AVP, FhbA. Tam, salīdzinot ar BBA03 un BBP28, ir tikai septiņas aminoskābes garš sakābes reģions, kam šķietami vajadzētu palielināt tā aizsardzību no imūnās sistēmas atbildes uz *B. burgdorferi* virsmas (Bunikis and Barbour, 1999; Lone and Bankhead, 2020). Funkcionālos pētījumos ir noskaidrots, ka uz FhbA virsmas ir komplementa faktoru H saistošas hidrofobas aminoskābes, kas ļauj *Borrelia* baktērijām izvairīties no komplementa sistēmas izraisītas līzes (Kogan et al., 2022). Neskatoties uz BBA03 un BBP28 līdzību ar FhbA un to, ka arī uz šo abu proteīnu virsmām atrodas hidrofobas aminoskābes, ir svarīgi minēt, ka ne BBP28, ne BBA03 nav atrodams FhbA proteīnam līdzīgs aktīvais centrs (5. attēls).



**B**



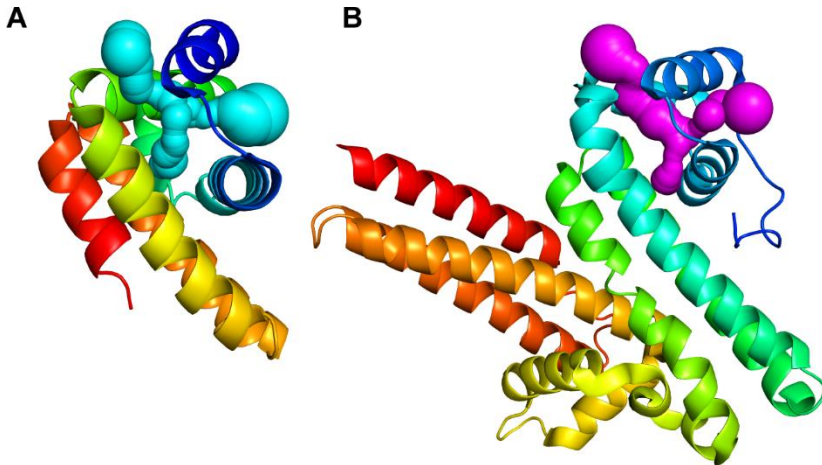
**C**



**5. attēls.** (A) Uz struktūru salīdzinājuma bāzēts BBA03, BBP28 un FhbA sekvenču pārklājums. Tajā  $\alpha$ -spirāles ir apvilktas ar noapaļotiem kvadrātiem un izstieptā virkne norādīta ar bultu. Aminoskābes, kas FhbA aktīvajā centrā saista komplementa faktoru H zem salīdzinājuma norādītas ar zvaigzni. (B) FhbA attēlots izmantojot varavīksnes krāsu shēmu. (C) FhbA, kas saistījies komplementa faktoru H (pelēks). Tajā aktīvā centra hidrofobās aminoskābes, kas saista faktoru H, ir iekrāsotas rozā krāsā un apvilktas ar apli.

Otrais tuvākais homologs BBA03 un tuvākais homologs BBP28 proteīnam ir *B. turicatae* AVP, BTA121. Tā sakabes reģions ir vairāk kā divas reizes garāks, kā tas, kas novērtos BBA03 un BBP28 struktūrās (80 aminoskābes) (Luo et al., 2017). BTA121 funkcionāla analīze norāda, ka *in vitro* eksperimentos tam ir līdzīga afinitāte pret palmitīnskābi, kā zināmajam palmitīnskābi saistošam proteīnam, tabsilīnam-15 (Wilder et al., 2016). Lai gan šī hipotēze netika eksperimentāli pierādīta, Luo un līdzautori uzskata, ka BTA121 taukskābes saista hidrofobajos dobumos un porās, kas atrodams BTA121 struktūrā (Luo et al., 2017). Neskatoties uz to, ka *B. burgdorferi* pieder pie tās pašas ģints kā *B. turicatae* un abas baktērijas dzīvo ērces un zīdītāju organismos, *B. burgdorferi* genomā nav atrodama BTA121 proteīna sekvenca. Salīdzinot BBA03 ar BTA121, tika

noskaidrots, ka homologa T-veida pora kā BBA03 ir atrodama arī BTA121 struktūrā (6. attēls).



**6. attēls.** (A) BBA03 un (B) BTA121 attēloti ar varavīksnes krāsu shēmu. T-formas hidrofobās poras abos proteīnos ir respektīvi gaiši zilā un violetā krāsā.

Viena no pirmajām zīdītāju organisma reakcijām uz *B. burgdorferi* infekciju ir neitrofilu ROS izdalīšanās infekcijas vietā (Boylan et al., 2008). Tā *B. burgdorferi* izraisa kaitīgu efektu kaskādi, kas veicina membrānas nepiesātināto taukskābju oksidāciju. Eksperimentāli ir pierādīts, ka samazināts nepiesātināto taukskābju daudzums *B. burgdorferi* membrānā noved pie tās samazinātas plūstamības, kas nepieciešama efektīvāki virzībai cauri viskozajai saimniekorganisma iekšējai videi (Boylan et al., 2008). Tā kā *B. burgdorferi* genomā nav gēnu, kas ļautu sintezēt savas taukskābes, tām ir nepieciešami proteīni, kas ļautu taukskābes saistīt no ārējās vides. Lai gan iepriekšējie pētījumi liecina, ka *B. burgdorferi* ir spējīga caur tiešu saskari un vezikulām no ārējās vides iegūt holesterīnu (Crowley et al., 2013), līdz šim tās genomā nav identificēti proteīni, kas spētu saistīt hidrofobas molekulas (Brisson et al., 2012). Lai gan neviens no pētītajiem Laimas slimības proteīniem neuzrādīja saistību ar taukskābēm (KMR ķīmisko nobīžu salīdzināšanas eksperimentos, iegūtie dati nenoliedz pārbaudīto proteīnu spēju saistīt citas eksperimentāli nepārbaudītas hidrofobas molekulas. Apskatot iegūto lipoproteīnu struktūras, var novērot, ka abas atbilst tādām, kas varētu nodrošināt *B. burgdorferi* piesātināto taukskābju piesaisti. BBA03 molekulārās dinamikas simulācijās tika noskaidrots, ka tās struktūrā esošā T-veida pora, kurai homologa pora atrodama arī BTA121,



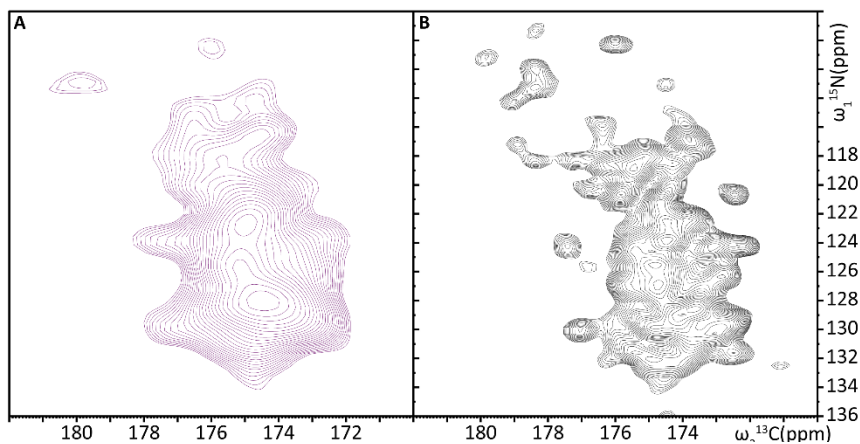
piesaistīta polinepiesātinātas taukskābes ar augstāku efektivitāti, kā piesaistītas. BBP28 proteīna gadījumā, tā C-terminālā cilpa, kas aizsedz hidrofobās aminoskābes uz tā virsmas, ir vāja sekvenču līdzība starp Mlp II tipa saimes pārstāvjiem un tā varētu aizsargāt proteīna konservatīvos reģionus no zīdītāju saimnieka imūnsistēmas un/vai nomākt priekšlaicīgu proteīnu aktivāciju. Ir vilinoši spekulēt, ka disulfīda saites redukcija Mlp II tipa proteīnos varētu notikt kā reakcija uz neitrofilu *ROS* izdalīšanos infekcijas vietā, saskaņojot hidrofobās virsmas atklāšanas laiku ar palielinātu nepieciešamību pēc nepiesātinām taukskābēm. Lai gan lielā daļā gadījumu *B. burgdorferi* tiek uzskatīts par ārpus šūnas infekciozo aģentu, pētījumi liecina, ka tā var arī būt iekšējās patogēns (Ma et al., 1991; Montgomery et al., 1993; Grab et al., 1999; Wu et al., 2011). Tādējādi, disulfīdsaītes redukciju mlp II tipa proteīnos varētu arī veicināt dažādi reducējošie aģenti, kuru intracelulārā koncentrācija palielinās *B. burgdorferi* infekcijas laikā, tai skaitā glutations, homocisteīns, cisteilglicīns un acetilcisteīns (Kerstholt et al., 2018). No šiem reducējošiem aģentiem, glutations, kura iekšējās koncentrācija infekcijas laikā palielinās desmit reizes, saistās pie *B. burgdorferi* lipoproteīna, BBE31. Rezultātā šķiet pašsaprotami, ka tam ir svarīga loma *B. burgdorferi* infekcijā (Brangulis et al., 2020).

### 3.2. *Mus musculus* MoPrP(89-230)

Neskatoties uz to, ka ir veikti vairāki pētījumi, lai izprastu TSE un ar tām asociētos simptomus, viens no lielākajiem šķēršļiem preventīvo līdzekļu izstrādē ir bijis zināšanu trūkums par precīzu šo slimību bioloģisko mehānismu. Šī iemesla dēļ, bieži pētījumos tiek izmantotas no *in vivo* iegūtas vai *in vitro* sagatavotas prionu proteīnu fibrillas, lai iegūtu informāciju par to struktūru, agregācijas kinētiku un īpašībām atkarībā no aminoskābju mainības un citiem fibrilizāciju ietekmējošiem faktoriem (Cobb et al., 2008; Ziaunys et al., 2021, 2022; Pauly et al., 2022). Ņemot vērā prionu fibrillu potenciālu veidot atšķirīgus celmus, šajā izstrādātajā pētījumā centāties noskaidrot, vai fibrillas kas veidotas atšķirīgos vides apstākļos var tikt viena ar otru strukturāli salīdzinātas. Mūsu pētījumā, trīs MoPrP(89-230) paraugi tika fibrilizēti iepriekš literatūrā minētos, atšķirīgos apstākļos (Baskakov et al., 2005; Bocharova et al., 2005; Dutta et al., 2013; Milto et al., 2014; Wang et al., 2017; Sneideris et al., 2020). Respektīvi, G2 paraugs tika veidots 2 M Guanidīna hidrohlorīdā (GdnHCl) ar 50 mM nātrija fosfātu, pH 6,0, G4, 2 M GdnHCl ar 50 mM

nātrija fosfātu, pH 6,0 un U3G1, 3 M urīnvielā, 1 M GdnHCl, 1x fosfāta buferšķīdumā, pH 7,4.

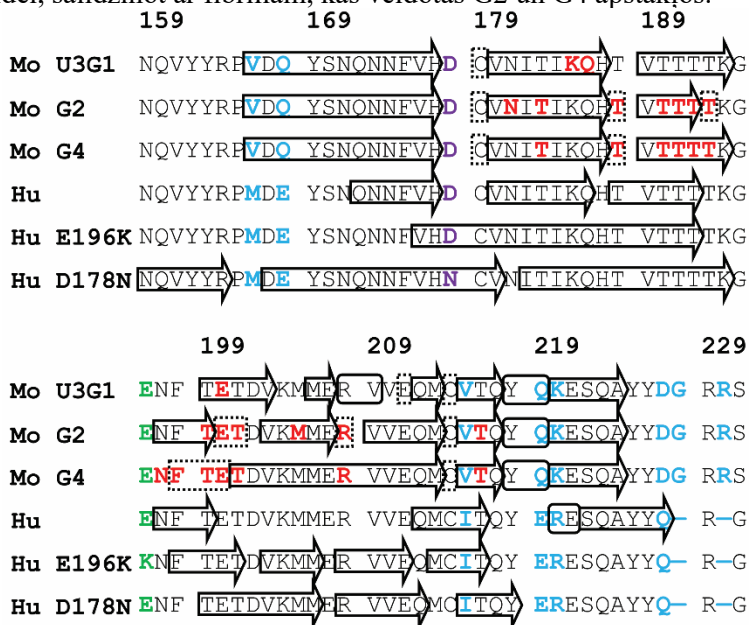
Pirmais sagatavotais paraugs priekš cietvielu KMR analīzes tika veidots U3G1 fibrillizācijas apstākļos. Līdzīgi kā iepriekš novērots kāmjā priona proteīna fibrillām (Tycko et al., 2010), spontāni U3G1 apstākļos veidotam paraugam tika novērota zema KMR spektru izšķirtspēja. Lai uzlabotu iegūtos datus turpmākā darba gaitā, U3G1 apstākļos tika izveidots paraugs, kura sagatavei izmantoti seši cikliskās fibrillizācijas amplifikācijas soļi. Tam KMR spektros lielākoties tika novērota pietiekoši augsta izšķirtspēja otrējo ķīmisko nobīžu analīzes veikšanai (7. attēls). Iegūtajos spektros, vienīgie reģioni, kur tika novērota ievērojama signālu pārklāšanos ir ar Thr un Val veidotiem signāliem. Lai izvairītos no problēmām šo signālu attiecināšanā, tālākā darbā veidotajos U3G1, G2 un G4 paraugos papildus cikliskajai amplifikācijai, tika selektīvi neiezīmēti Thr un Arg aminoskābju atlikumi.



**7. attēls.** U3G1 apstākļos veidotu MoPrP(89-230) proteīna fibrillu NCO spektri (A) spontāni agregātam paraugam un (B) paraugam pēc sešiem fibrillizācijas amplifikācijas soļiem.

No iegūto paraugu cietvielu KMR spektru analīzes var secināt, ka visos paraugos, gluži kā iepriekš literatūrā aprakstīts, fibrillārais kodols atrodas starp P165 un A224 (8. attēls). Tajos arī novērotas līdzīga garuma  $\beta$ -ķēdes, līdzīgas ķīmiskās nobīdes C179 un C214 atlikumiem, kas liecina par disulfīdsaites veidošanos un ir redzams  $\alpha$ -spirāles motīvs starp Y218 un E219, kas norāda uz pagrieziena motīvu pirms pēdējās  $\beta$ -ķēdes. Tikai vienā paraugā, U3G1, redzams  $\alpha$ -spirāles motīvs starp R208

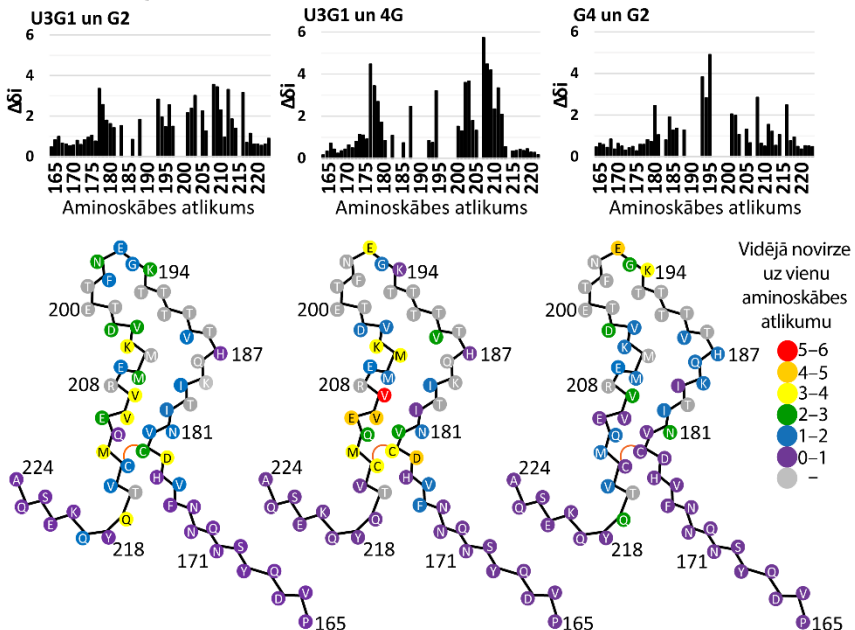
un V209, kas izskaidro ievērojamo atšķirību tā V209 <sup>13</sup>C<sub>α</sub> ķīmiskajai nobīdei, salīdzinot ar fibrillām, kas veidotas G2 un G4 apstākļos.



**8. attēls.** Otrējo struktūru salīdzinājums pētītajām MoPrP(89-230) fibrillām (Mo) ar literatūrā atrodamām strukturāli līdzīgām fibrillām no cilvēka priona proteīna (Hu). Norādītās MoPrP(89-230) struktūras iegūtas no otrējo ķīmisko nobīžu analīzes. Attēlā β-ķēdes ir apvilktas ar bultu, aminoskābju atlikumi ar spirālveida torsijas leņķiem ir apvilkti ar noapaļotiem četrstūriem un aminoskābju atlikumi, kam netika noteikta otrējā struktūra ir apvilkti ar punktotu līniju. Aminoskābju atlikumi, kas nav attiecināti ir sarkanā krāsā, sekvenču atšķirības starp peles priona proteīnu un cilvēka priona proteīnu ir zilā krāsā, E196K mutācija ir zaļā krāsā un D178N mutācija ir violetā krāsā.

Salīdzinot iegūto fibrillu struktūras ar citām, literatūrā atrodamām, visiem paraugiem vislielākā līdzība novērojama ar *wt* cilvēka priona proteīna fibrillām, kas veidotas 2 M GdnHCl klātbūtnē (9. attēls) (Wang et al., 2021). Tomēr, arī šajā salīdzinājumā ievērojamas atšķirības redzamas paraugu fibrillāro kodolu N- un C- terminālo galu garumos. Šīs fibrillu īpatnības var izskaidrot ar atšķirībām cilvēka un peles priona proteīna aminoskābju sekvencēs. Kā aprakstīts darba literatūras sekcijā, priona proteīna fibrillārā kodola N- terminālajā galā, starp P165 un S171, ir novērojamas lielas aminoskābju variācijas starp sugām, kas veicina starpsugu barjeras izveidi. Respektīvi, no iegūtajiem datiem var secināt, ka strukturālās atšķirības šajā reģionā arī varētu būt starp sugu barjeru veicinošs faktors.

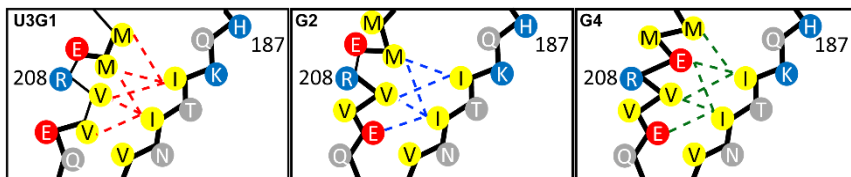
Turpmākā ķīmisko nobīžu salīdzināšanas analizē tika noskaidrots, ka starp paraugiem minimāla atšķirība novērota reģionam pirms H177 un pēc Y218 (8. attēls). Ja G2 un G4 paraugi tiek salīdzināti, lielākās ķīmisko nobīžu atšķirības atrodamas starp K194 un E196, kas sakrīt ar dimerizācijas lokāciju iepriekš minētajā *wt* cilvēka priona proteīna struktūrā (Wang et al., 2021). Tas liecina, ka abiem paraugiem varētu būt atšķirības to saskarsmes vietā starp potenciālajiem protofilamentiem. Salīdzinot G2, G4 ar U3G1 paraugu, vērā ņemamas izmaiņas ir novērojamas visiem centrālajiem aminoskābju atlikumiem. Visizteiksmīgākās atšķirības redzamas starp aminoskābju atlikumiem no E178 līdz Q181 un no K204 līdz M213.



**9. attēls.** Vidējās aminoskābju atlikumu  $^{13}\text{C}$  un  $^{15}\text{N}$  ķīmisko nobīžu atšķirības starp MoPrP(89-230) U3G1, G2 un G4 fibrillām. Augšējā panelī: ķīmisko nobīdes atšķirību histogrammas attiecībā pret atlikumu skaitu. Apakšējā panelī: U3G1 fibrillu strukturālais modelis, kas kodēts ar krāsu shēmu, lai atspoguļotu ķīmiskās nobīdes atšķirības starp U3G1 un G2, U3G1 un G4, G2 un G4 fibrillām.

Ile krustpiķu analīze CHHC un NHHC spektros, kuros iespējams detektēt telpiskos kontaktus starp blakus esošiem aminoskābju atlikumiem, norāda, ka U3G1 paraugā visas Glu ir orientētas uz fibrillas centru. Turpretī, buferos ar paaugstinātu jonu spēku struktūra izmainās un viena Glu G2 paraugā, un divas, G4 paraugā ir vērstas uz āru.

Rezultātā, abās struktūrās tiek novērota pagarināta  $\beta$ -ķēdes struktūra un ir par vienu pagriezienu mazāk, kā U3G1 paraugā. Tā kā izteiksmīgākā atšķirība starp izveidotajiem paraugiem ir tieši denaturējošā aģenta jonu spēks, visdrīzāk šīs atšķirības starp paraugiem veicina negatīvi lādētās aminoskābes fibrillas kodolā, kas tiek balansētas ar GdnHCl izveidotām jonu saitēm (10. attēls). Līdz ar šo novērojumu, ķīmisko nobīžu līdzība paraugiem pirms H177 un pēc Y218 var tikt saistīta ar faktu, ka šajā diapozonā aminoskābju atlikumiem tuvumā nav citu sekundāro struktūru un nav centrālās pozīcijas fibrillārajā kodolā, kur to lādiņi varētu tikt paversti ārējā jonu spēka ietekmē.



**10. attēls.** Novērotie kontakti starp aminoskābju atlikumiem, Ile metil grupas reģions C(HH)C spektrā MoPrP(89-230) fibrillām. Tajos  $\beta$ -ķēdes izceltas ar biezām līnijām.

Šajos un iepriekš literatūras sekcijā aprakstītajos eksperimentos, kur *in vitro* tika veidotas pilna garuma priona proteīna fibrillas, fibrilizācijā izmantotais jonu spēks ir ievērojami lielāks par to, kas novērots fizioloģiskos apstākļos uz neironu virsmas, kur divi visbiežāk sastopamie joni ir  $\text{Na}^+$  un  $\text{K}^+$ , ar respektīvi 135 – 145 un 3 – 30 mM koncentrāciju (Peruzzo et al., 2010; Liu et al., 2020). Ņemot vērā būtiskās atšķirības, kas novērojamas starp *in vitro* veidotajām prionu fibrillu struktūrām un tām, kas iegūtas no pacientiem, ir ticams, ka mūsu eksperimentos pētītajām jonu spēka izmaiņām ir izšķiroša ietekme uz šīm strukturālajām atšķirībām. Šī iemesla dēļ turpmākiem priona proteīna *in vitro* fibrillizācijas pētījumiem vajadzētu fokusēties uz apstākļiem, kuros jonu spēks ir tuvāks fizioloģiski novērotajam.

## 4. SECINĀJUMI

1. Visticamāk, *ROS* un/vai citi reducējošie aģenti infekcijas laikā reducē *B. burgdorferi* BBP28 proteīnā augsti konservēto disulfīda saiti.

2. Lai gan KMR titrēšanas eksperimentos netika pierādīta BBP28 un BBA03 proteīnu saistība ar noteiktiem lipīdiem, abu proteīnu strukturālā līdzība ar *B. turicatae* palmitīnskābi saistošu proteīnu, BTA121, un hidrofobās aminoskābes uz to virsmas liecina, ka tie varētu saistīties ar citām, eksperimentāli nepārbaudītām hidrofobām molekulām.

3. Starpsugu bajeru starp peles un cilvēka priona proteīna fibrillām var izskaidrot ne tikai ar sekvences atšķirībām starp abu sugu īpatņiem, bet arī ar atšķirībām starp to struktūrām, par ko liecina esošās atšķirības to *in vitro* veidotajās fibrillās.

4. MoPrP(89-230) veidoto fibrillu struktūru ietekmē izmantotais denaturējošais aģents, kas ar lādiņa skrīningu stabilizē uz fibrillas kodola iekšpusi vērstošos Glu atlikumus. Šis novērojums ļauj secināt, ka turpmākos eksperimentos būtu ieteicams prionu proteīnu *in vitro* fibrillizāciju veikt apstākļos, kuros novērojams fizioloģiskiem apstākļiem līdzīgs jonu spēks.

5. Ņemot vērā, ka atlikumus pirms H177 un pēc Y218 veido  $\beta$ -ķēdes bez blakus esošām otrējām struktūrām, lādētie atlikumi, kas atrodas šajos reģionos nevar jonu spēka ietekmē tikt virzīti ārpus fibrillārā kodola. Līdz ar to, šo reģionu struktūras ir mazāk jūtīgas pret izmaiņām ārējā jonu spēkā.

## 5. AIZSTĀVĀMĀS TĒZES

1. Visiem mlp tipa II proteīniem mainīgā C-terminālā izstieptā virkne visdrīzāk veic aizsargfunkciju un/vai nomāc priekšlaicīgu proteīna aktivāciju.

2. *B. burgdorferi* AVP, BBP28 un BBA03, struktūras norāda, ka tās varētu veikt lipīdu saistīšanas funkciju, kas ir nepieciešama *B. burgdorferi* izdzīvošanai.

3. Peles priona proteīna fibrillām, kas *in vitro* veidotas apstākļos ar ievērojami atšķirīgo jonu spēku no fizioloģiskā diapozona, ir ievērojami mazāka fizioloģiskā nozīme.

## 6. PUBLIKĀCIJAS

1. Fridmanis, J., Bobrovs, R., Brangulis, K., Tārs, K., and Jaudzems, K. (2020). Structural and Functional Analysis of BBA03, *Borrelia burgdorferi* Competitive Advantage Promoting Outer Surface Lipoprotein. *Pathogens* 9, 826. doi: 10.3390/pathogens9100826.

2. Fridmanis, J., Otikovs, M., Brangulis, K., Tārs, K., and Jaudzems, K. (2021). Solution NMR structure of *Borrelia burgdorferi* outer surface lipoprotein BBP28 , a member of the Mlp protein family. *Proteins* 89, 588–594. doi: 10.1002/prot.26011.

3. Fridmanis, J., Toleikis, Z., Sneideris, T., Ziaunys, M., Bobrovs, R., Smirnovas, V., et al. (2021). Aggregation Condition–Structure Relationship of Mouse Prion Protein Fibrils. *IJMS* 22, 9635. doi: 10.3390/ijms22179635.



## 7. PĒTĪJUMA APROBĀCIJA

1. Fridmanis, J., Aggregation Condition–Structure Relationship of Mouse Prion Protein Fibrils. ADAM 9 konference. Mutiska prezentācija, Rīga, Latvija, 2022.

2. Fridmanis, J., Aggregation Condition–Structure Relationship of Mouse Prion Protein Fibrils. ADAM 8 konference. Stenda referāta prezentācija, Rīga, Latvija, 2019.

3. Fridmanis, J., Structural studies of homologue *Borrelia burgdorferi* outer surface lipoproteins BBP28 and BBA03. FEBS 3+ konference. Stenda referāta prezentācija, Rīga, Latvija, 2019.

## 8. PATEICĪBAS

Promocijas darba pētniecības infrastruktūra tika finansēta no Eiropas Reģionālās attīstības fonda (līguma nr. 1.1.1.1/18/A/004) un Latvijas Organiskās sintēzes institūta doktorantūras stipendijām.

Es vēlētos pateikties manam darba vadītājam, Kristapam Jaudzemam, kā arī visiem pagātnes un tagadnes kolēģiem par atbalstu pētījuma laikā.

Esmu arī pateicīgs BMC darbiniekiem, Kalvim Brangulim un Kasparam Tāram par plazmīdām, kas satur *B. burgdorferi* ārējās virsmas proteīnus un Dāvidam Fridmanim un Inai Baļķei par Sangera sekvencēšanas analīzes veikšanu.

Visvairāk esmu pateicīgs manai ģimenei, Dāvidam, Oskaram, Ievai, Sarmītei, Vladimiram, Nikolai, Lizetei, Rojam, Lenardam, Agatei, Dagmārai, Jānim Fridmaņiem, Marijai un Valteram Āboliņiem, Dagnijai Bruzgulei, Baibai Bērziņai un Inai Baļķei par nebeidzamo atbalstu. No viņiem, esmu īpaši pateicīgs Inai Baļķei un Dāvidam Fridmanim par veiksmīgiem padomiem mana mācību perioda laikā.

## 9. LITERATŪRAS SARAKSTS

- Akopjana, I., and Brangulis, K. (2022). Structural Analysis of the Outer Membrane Lipoprotein BBA14 (OrfD) and the Corresponding Paralogous Gene Family 143 (PFam143) from *Borrelia burgdorferi*. *Pathogens* 11, 154. doi: 10.3390/pathogens11020154.
- Alitalo, A., Meri, T., Lankinen, H., Seppälä, I., Lahdenne, P., Hefty, P. S., et al. (2002). Complement Inhibitor Factor H Binding to Lyme Disease Spirochetes Is Mediated by Inducible Expression of Multiple Plasmid-Encoded Outer Surface Protein E Paralogs. *J Immunol* 169, 3847–3853. doi: 10.4049/jimmunol.169.7.3847.
- Baral, P. K., Yin, J., Aguzzi, A., and James, M. N. G. (2019). Transition of the prion protein from a structured cellular form (PrP<sup>C</sup>) to the infectious scrapie agent (PrP<sup>Sc</sup>). *Protein Science* 28, 2055–2063. doi: 10.1002/pro.3735.
- Barbieri, R., Signoli, M., Chev , D., Costedoat, C., Tzortzis, S., Aboudharam, G., et al. (2020). *Yersinia pestis*: the Natural History of Plague. *Clin Microbiol Rev* 34, e00044-19. doi: 10.1128/CMR.00044-19.
- Baskakov, I., Disterer, P., Breydo, L., Shaw, M., Gill, A., James, W., et al. (2005). The presence of valine at residue 129 in human prion protein accelerates amyloid formation. *FEBS Letters* 579, 2589–2596. doi: 10.1016/j.febslet.2005.03.075.
- Becker, M., Bunikis, J., Lade, B. D., Dunn, J. J., Barbour, A. G., and Lawson, C. L. (2005). Structural Investigation of *Borrelia burgdorferi* OspB, a BactericidalFab Target. *Journal of Biological Chemistry* 280, 17363–17370. doi: 10.1074/jbc.M412842200.
- Bendheim, P. E., Brown, H. R., Rudelli, R. D., Scala, L. J., Goller, N. L., Wen, G. Y., et al. (1992). Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein. *Neurology* 42, 149–149. doi: 10.1212/WNL.42.1.149.
- Bestor, A., Rego, R. O. M., Tilly, K., and Rosa, P. A. (2012). Competitive Advantage of *Borrelia burgdorferi* with Outer Surface Protein BBA03 during Tick-Mediated Infection of the Mammalian Host. *Infect Immun* 80, 3501–3511. doi: 10.1128/IAI.00521-12.
- Bieri, M., d’Auvergne, E. J., and Gooley, P. R. (2011). relaxGUI: a new software for fast and simple NMR relaxation data analysis and

- calculation of ps-ns and  $\mu$ s motion of proteins. *J Biomol NMR* 50, 147–155. doi: 10.1007/s10858-011-9509-1.
- Bobe, J. R., Jutras, B. L., Horn, E. J., Embers, M. E., Bailey, A., Moritz, R. L., et al. (2021). Recent Progress in Lyme Disease and Remaining Challenges. *Front. Med.* 8, 666554. doi: 10.3389/fmed.2021.666554.
- Bocharova, O. V., Breydo, L., Parfenov, A. S., Salnikov, V. V., and Baskakov, I. V. (2005). In vitro Conversion of Full-length Mammalian Prion Protein Produces Amyloid Form with Physical Properties of PrPSc. *Journal of Molecular Biology* 346, 645–659. doi: 10.1016/j.jmb.2004.11.068.
- Boylan, J. A., Lawrence, K. A., Downey, J. S., and Gherardini, F. C. (2008). *Borrelia burgdorferi* membranes are the primary targets of reactive oxygen species. *Mol Microbiol* 68, 786–799. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06204.x.
- Brangulis, K., Akopjana, I., Petrovskis, I., Kazaks, A., Zelencova, D., Jekabsons, A., et al. (2020). BBE31 from the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi*, known to play an important role in successful colonization of the mammalian host, shows the ability to bind glutathione. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1864, 129499. doi: 10.1016/j.bbagen.2019.129499.
- Brissette, C. A., Verma, A., Bowman, A., Cooley, A. E., and Stevenson, B. (2009). The *Borrelia burgdorferi* outer-surface protein ErpX binds mammalian laminin. *Microbiology* 155, 863–872. doi: 10.1099/mic.0.024604-0.
- Brisson, D., Drecktrah, D., Eggers, C. H., and Samuels, D. S. (2012). Genetics of *Borrelia burgdorferi*. *Annu. Rev. Genet.* 46, 515–536. doi: 10.1146/annurev-genet-011112-112140.
- Brown, C. R., and Dennis, E. A. (2017). *Borrelia burgdorferi* infection induces lipid mediator production during Lyme arthritis. *Biochimie* 141, 86–90. doi: 10.1016/j.biochi.2017.06.010.
- Brunger, A. T. (2007). Version 1.2 of the Crystallography and NMR system. *Nat Protoc* 2, 2728–2733. doi: 10.1038/nprot.2007.406.
- Bunikis, J., and Barbour, A. G. (1999). Access of Antibody or Trypsin to an Integral Outer Membrane Protein (P66) of *Borrelia burgdorferi* Is Hindered by Osp Lipoproteins. *Infect Immun* 67, 2874–2883. doi: 10.1128/IAI.67.6.2874-2883.1999.
- Casalone, C., and Hope, J. (2018). “Atypical and classic bovine spongiform encephalopathy,” in *Handbook of Clinical*

- Neurology* (Elsevier), 121–134. doi: 10.1016/B978-0-444-63945-5.00007-6.
- Casjens, S., Palmer, N., Van Vugt, R., Mun Huang, W., Stevenson, B., Rosa, P., et al. (2002). A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*: *Borrelia* plasmids. *Molecular Microbiology* 35, 490–516. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.01698.x.
- Chaconas, G., Castellanos, M., and Verhey, T. B. (2020). Changing of the guard: How the Lyme disease spirochete subverts the host immune response. *Journal of Biological Chemistry* 295, 301–313. doi: 10.1074/jbc.REV119.008583.
- Chamachi, N. G., and Chakrabarty, S. (2017). Temperature-Induced Misfolding in Prion Protein: Evidence of Multiple Partially Disordered States Stabilized by Non-Native Hydrogen Bonds. *Biochemistry* 56, 833–844. doi: 10.1021/acs.biochem.6b01042.
- Chen, E. H.-L., Kao, H.-W., Lee, C.-H., Huang, J. Y. C., Wu, K.-P., and Chen, R. P.-Y. (2022). 2.2 Å Cryo-EM Tetra-Protofilament Structure of the Hamster Prion 108–144 Fibril Reveals an Ordered Water Channel in the Center. *J. Am. Chem. Soc.* 144, 13888–13894. doi: 10.1021/jacs.2c05479.
- Chen, S., and Zuckert, W. R. (2011). Probing the *Borrelia burgdorferi* Surface Lipoprotein Secretion Pathway Using a Conditionally Folding Protein Domain. *Journal of Bacteriology* 193, 6724–6732. doi: 10.1128/JB.06042-11.
- Choi, J.-K., Cali, I., Surewicz, K., Kong, Q., Gambetti, P., and Surewicz, W. K. (2016). Amyloid fibrils from the N-terminal prion protein fragment are infectious. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 13851–13856. doi: 10.1073/pnas.1610716113.
- Cobb, N. J., Apetri, A. C., and Surewicz, W. K. (2008). Prion Protein Amyloid Formation under Native-like Conditions Involves Refolding of the C-terminal  $\alpha$ -Helical Domain. *Journal of Biological Chemistry* 283, 34704–34711. doi: 10.1074/jbc.M806701200.
- Cobb, N. J., Sonnichsen, F. D., Mchaurab, H., and Surewicz, W. K. (2007). Molecular architecture of human prion protein amyloid: A parallel, in-register  $\beta$ -structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 18946–18951. doi: 10.1073/pnas.0706522104.

- Collins, S., McLean, C. A., and Masters, C. L. (2001). Gerstmann–Sträussler–Scheinker syndrome, fatal familial insomnia, and prion: a review of these less common human transmissible spongiform encephalopathies. *Journal of Clinical Neuroscience* 8, 387–397. doi: 10.1054/jocn.2001.0919.
- Crowley, J. T., Toledo, A. M., LaRocca, T. J., Coleman, J. L., London, E., and Benach, J. L. (2013). Lipid Exchange between *Borrelia burgdorferi* and Host Cells. *PLoS Pathog* 9, e1003109. doi: 10.1371/journal.ppat.1003109.
- d’Auvergne, E. J., and Gooley, P. R. (2008a). Optimisation of NMR dynamic models I. Minimisation algorithms and their performance within the model-free and Brownian rotational diffusion spaces. *J Biomol NMR* 40, 107–119. doi: 10.1007/s10858-007-9214-2.
- d’Auvergne, E. J., and Gooley, P. R. (2008b). Optimisation of NMR dynamic models II. A new methodology for the dual optimisation of the model-free parameters and the Brownian rotational diffusion tensor. *J Biomol NMR* 40, 121–133. doi: 10.1007/s10858-007-9213-3.
- Dowdell, A. S., Murphy, M. D., Azodi, C., Swanson, S. K., Florens, L., Chen, S., et al. (2017). Comprehensive Spatial Analysis of the *Borrelia burgdorferi* Lipoproteome Reveals a Compartmentalization Bias toward the Bacterial Surface. *J Bacteriol* 199. doi: 10.1128/JB.00658-16.
- Dutta, A., Chen, S., and Surewicz, W. K. (2013). The effect of  $\beta 2$ - $\alpha 2$  loop mutation on amyloidogenic properties of the prion protein. *FEBS Letters* 587, 2918–2923. doi: 10.1016/j.febslet.2013.07.023.
- Eggers, C. H., Kimmel, B. J., Bono, J. L., Elias, A. F., Rosa, P., and Samuels, D. S. (2001). Transduction by  $\phi$ BB-1, a Bacteriophage of *Borrelia burgdorferi*. *J Bacteriol* 183, 4771–4778. doi: 10.1128/JB.183.16.4771-4778.2001.
- Glynn, C., Sawaya, M. R., Ge, P., Gallagher-Jones, M., Short, C. W., Bowman, R., et al. (2020). Cryo-EM structure of a human prion fibril with a hydrophobic, protease-resistant core. *Nat Struct Mol Biol* 27, 417–423. doi: 10.1038/s41594-020-0403-y.
- Grab, D. J., Lanners, H.-N., Martin, L. N., Chesney, J., Cai, C., Adkisson, H. D., et al. (1999). Interaction of *Borrelia burgdorferi* with Peripheral Blood Fibrocytes, Antigen-

- Presenting Cells with the Potential for Connective Tissue Targeting. *Mol Med* 5, 46–54. doi: 10.1007/BF03402138.
- Groshong, A. M., Dey, A., Bezsonova, I., Caimano, M. J., and Radolf, J. D. (2017). Peptide Uptake Is Essential for *Borrelia burgdorferi* Viability and Involves Structural and Regulatory Complexity of its Oligopeptide Transporter. *mBio* 8, e02047-17. doi: 10.1128/mBio.02047-17.
- Güntert, P., Mumenthaler, C., and Wüthrich, K. (1997). Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program Dyana11 Edited by P. E. Wright. *Journal of Molecular Biology* 273, 283–298. doi: 10.1006/jmbi.1997.1284.
- Hallinan, G. I., Ozcan, K. A., Hoq, M. R., Cracco, L., Vago, F. S., Bharath, S. R., et al. (2022). Cryo-EM structures of prion protein filaments from Gerstmann–Sträussler–Scheinker disease. *Acta Neuropathol* 144, 509–520. doi: 10.1007/s00401-022-02461-0.
- Haupt, K., Kraiczky, P., Wallich, R., Brade, V., Skerka, C., and Zipfel, P. F. (2007). Binding of Human Factor H–Related Protein 1 to Serum-Resistant *Borrelia burgdorferi* Is Mediated by Borrelial Complement Regulator–Acquiring Surface Proteins. *J INFECT DIS* 196, 124–133. doi: 10.1086/518509.
- Head, M. W., and Ironside, J. W. (2012). Review: Creutzfeldt–Jakob disease: prion protein type, disease phenotype and agent strain: CJD and prion agent strain. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 38, 296–310. doi: 10.1111/j.1365-2990.2012.01265.x.
- Herrmann, T., Güntert, P., and Wüthrich, K. (2002a). Protein NMR Structure Determination with Automated NOE Assignment Using the New Software CANDID and the Torsion Angle Dynamics Algorithm DYANA. *Journal of Molecular Biology* 319, 209–227. doi: 10.1016/S0022-2836(02)00241-3.
- Herrmann, T., Güntert, P., and Wüthrich, K. (2002b). Protein NMR structure determination with automated NOE-identification in the NOESY spectra using the new software ATNOS. *Journal of Biomolecular NMR* 24, 171–189. doi: 10.1023/A:1021614115432.
- Holm, L. (2020). “Using Dali for Protein Structure Comparison,” in *Structural Bioinformatics Methods in Molecular Biology.*, ed. Z. Gáspári (New York, NY: Springer US), 29–42. doi: 10.1007/978-1-0716-0270-6\_3.

- Hoyt, F., Standke, H. G., Artikis, E., Schwartz, C. L., Hansen, B., Li, K., et al. (2022). Cryo-EM structure of anchorless RML prion reveals variations in shared motifs between distinct strains. *Nat Commun* 13, 4005. doi: 10.1038/s41467-022-30458-6.
- Imran, M., and Mahmood, S. (2011). An overview of human prion diseases. *Viol J* 8, 559. doi: 10.1186/1743-422X-8-559.
- Kay, L. E., Torchia, D. A., and Bax, A. (1989). Backbone dynamics of proteins as studied by nitrogen-15 inverse detected heteronuclear NMR spectroscopy: application to staphylococcal nuclease. *Biochemistry* 28, 8972–8979. doi: 10.1021/bi00449a003.
- Keller, R. (2004). *The computer aided resonance assignment tutorial*. CANTINA verlag.
- Kenedy, M. R., Lenhart, T. R., and Akins, D. R. (2012). The role of *Borrelia burgdorferi* outer surface proteins. *FEMS Immunol Med Microbiol* 66, 1–19. doi: 10.1111/j.1574-695X.2012.00980.x.
- Kerstholt, M., Vrijmoeth, H., Lachmandas, E., Oosting, M., Lupse, M., Flonta, M., et al. (2018). Role of glutathione metabolism in host defense against *Borrelia burgdorferi* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115. doi: 10.1073/pnas.1720833115.
- Kogan, K., Haapasalo, K., Kotila, T., Moore, R., Lappalainen, P., Goldman, A., et al. (2022). Mechanism of *Borrelia* immune evasion by FhbA-related proteins. *PLoS Pathog* 18, e1010338. doi: 10.1371/journal.ppat.1010338.
- Kovachev, P. S., Gomes, M. P. B., Cordeiro, Y., Ferreira, N. C., Valadão, L. P. F., Ascari, L. M., et al. (2019). RNA modulates aggregation of the recombinant mammalian prion protein by direct interaction. *Sci Rep* 9, 12406. doi: 10.1038/s41598-019-48883-x.
- Kugeler, K. J., Schwartz, A. M., Delorey, M. J., Mead, P. S., and Hinckley, A. F. (2021). Estimating the Frequency of Lyme Disease Diagnoses, United States, 2010–2018. *Emerg. Infect. Dis.* 27, 616–619. doi: 10.3201/eid2702.202731.
- Legname, G. (2017). Elucidating the function of the prion protein. *PLoS Pathog* 13, e1006458. doi: 10.1371/journal.ppat.1006458.
- Li, Q., Jaroniec, C. P., and Surewicz, W. K. (2022). Cryo-EM structure of disease-related prion fibrils provides insights into seeding barriers. *Nat Struct Mol Biol* 29, 962–965. doi: 10.1038/s41594-022-00833-4.



- Lin, Y.-P., Bhowmick, R., Coburn, J., and Leong, J. M. (2015). Host cell heparan sulfate glycosaminoglycans are ligands for OspF-related proteins of the Lyme disease spirochete: GAG binding by *B. burgdorferi* OspF-related proteins. *Cellular Microbiology* 17, 1464–1476. doi: 10.1111/cmi.12448.
- Lin, Y.-P., Frye, A. M., Nowak, T. A., and Kraiczky, P. (2020). New Insights Into CRASP-Mediated Complement Evasion in the Lyme Disease enzootic cycle. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10, 1. doi: 10.3389/fcimb.2020.00001.
- Liu, J., Li, F., Wang, Y., Pan, L., Lin, P., Zhang, B., et al. (2020). A sensitive and specific nanosensor for monitoring extracellular potassium levels in the brain. *Nat. Nanotechnol.* 15, 321–330. doi: 10.1038/s41565-020-0634-4.
- Lone, A. G., and Bankhead, T. (2020). The *Borrelia burgdorferi* VlsE Lipoprotein Prevents Antibody Binding to an Arthritis-Related Surface Antigen. *Cell Reports* 30, 3663-3670.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2020.02.081.
- Lu, X., Wintrode, P. L., and Surewicz, W. K. (2007).  $\beta$ -Sheet core of human prion protein amyloid fibrils as determined by hydrogen/deuterium exchange. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 1510–1515. doi: 10.1073/pnas.0608447104.
- Luo, Z., Kelleher, A. J., Darwiche, R., Hudspeth, E. M., Shittu, O. K., Krishnavajhala, A., et al. (2017). Crystal Structure of *Borrelia turicatae* protein, BTA121, a differentially regulated gene in the tick-mammalian transmission cycle of relapsing fever spirochetes. *Scientific Reports* 7. doi: 10.1038/s41598-017-14959-9.
- Ma, Y., Sturrock, A., and Weis, J. J. (1991). Intracellular localization of *Borrelia burgdorferi* within human endothelial cells. *Infect Immun* 59, 671–678. doi: 10.1128/iai.59.2.671-678.1991.
- Manka, S. W., Zhang, W., Wenborn, A., Betts, J., Joiner, S., Saibil, H. R., et al. (2022). 2.7 Å cryo-EM structure of ex vivo RML prion fibrils. *Nat Commun* 13, 4004. doi: 10.1038/s41467-022-30457-7.
- Marques, A. R., Strle, F., and Wormser, G. P. (2021). Comparison of Lyme Disease in the United States and Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 27, 2017–2024. doi: 10.3201/eid2708.204763.
- Metzler, W. J., Constantine, K. L., Friedrichs, M. S., Bell, A. J., Ernst, E. G., Lavoie, T. B., et al. (1993). Characterization of the three-dimensional solution structure of human profilin: 1H, 13C, and

- 15N NMR assignments and global folding pattern. *Biochemistry* 32, 13818–13829. doi: 10.1021/bi00213a010.
- Milto, K., Michailova, K., and Smirnovas, V. (2014). Elongation of Mouse Prion Protein Amyloid-Like Fibrils: Effect of Temperature and Denaturant Concentration. *PLoS ONE* 9, e94469. doi: 10.1371/journal.pone.0094469.
- Montgomery, R. R., Nathanson, M. H., and Malawista, S. E. (1993). The fate of *Borrelia burgdorferi*, the agent for Lyme disease, in mouse macrophages. Destruction, survival, recovery. *J. Immunol.* 150, 909.
- Pan, K. M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., et al. (1993). Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 10962–10966. doi: 10.1073/pnas.90.23.10962.
- Pastore, A., and Zagari, A. (2007). A Structural Overview of the Vertebrate Prion Proteins. *Prion* 1, 185–197. doi: 10.4161/pri.1.3.5281.
- Pauly, T., Bolakhrif, N., Kaiser, J., Nagel-Steger, L., Gremer, L., Gohlke, H., et al. (2022). Met/Val129 polymorphism of the full-length human prion protein dictates distinct pathways of amyloid formation. *Journal of Biological Chemistry* 298, 102430. doi: 10.1016/j.jbc.2022.102430.
- Peden, A. H., Suleiman, S., and Barria, M. A. (2021). Understanding Intra-Species and Inter-Species Prion Conversion and Zoonotic Potential Using Protein Misfolding Cyclic Amplification. *Front. Aging Neurosci.* 13, 716452. doi: 10.3389/fnagi.2021.716452.
- Peruzzo, M., Milani, G. P., Garzoni, L., Longoni, L., Simonetti, G. D., Bettinelli, A., et al. (2010). Body fluids and salt metabolism - Part II. *Ital J Pediatr* 36, 78. doi: 10.1186/1824-7288-36-78.
- Phillips, M. A., Burrows, J. N., Manyando, C., van Huijsduijnen, R. H., Van Voorhis, W. C., and Wells, T. N. C. (2017). Malaria. *Nat Rev Dis Primers* 3, 17050. doi: 10.1038/nrdp.2017.50.
- Porcella, S. F., Fitzpatrick, C. A., and Bono, J. L. (2000). Expression and Immunological Analysis of the Plasmid-Borne *mlp* Genes of *Borrelia burgdorferi* Strain B31. *Infect Immun* 68, 4992–5001. doi: 10.1128/IAI.68.9.4992-5001.2000.
- Prusiner, S. B. (1998). Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 13363–13383. doi: 10.1073/pnas.95.23.13363.

- Ryou, C., and Mays, C. E. (2008). Prion propagation *in vitro* : are we there yet? *Int. J. Med. Sci.*, 347–353. doi: 10.7150/ijms.5.347.
- Saborio, G. P., Permanne, B., and Soto, C. (2001). Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 411, 810–813. doi: 10.1038/35081095.
- Serrano, P., Pedrini, B., Mohanty, B., Geralt, M., Herrmann, T., and Wüthrich, K. (2012). The J-UNIO protocol for automated protein structure determination by NMR in solution. *J Biomol NMR* 53, 341–354. doi: 10.1007/s10858-012-9645-2.
- Sigurdson, C. J., Nilsson, K. P. R., Hornemann, S., Manco, G., Fernández-Borges, N., Schwarz, P., et al. (2010). A molecular switch controls interspecies prion disease transmission in mice. *J. Clin. Invest.* 120, 2590–2599. doi: 10.1172/JCI42051.
- Skar, G. L., and Simonsen, K. A. (2022). “Lyme Disease,” in *Lyme Disease* (Treasure Island). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK431066/>.
- Sneideris, T., Ziaunys, M., Chu, B. K.-Y., Chen, R. P.-Y., and Smirnovas, V. (2020). Self-Replication of Prion Protein Fragment 89-230 Amyloid Fibrils Accelerated by Prion Protein Fragment 107-143 Aggregates. *IJMS* 21, 7410. doi: 10.3390/ijms21197410.
- Solfrosi, L., Milani, M., Mancini, N., Clementi, M., and Burioni, R. (2013). A closer look at prion strains: Characterization and important implications. *Prion* 7, 99–108. doi: 10.4161/pri.23490.
- Stahl, N. (1987). Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* 51, 229–240. doi: 10.1016/0092-8674(87)90150-4.
- Steere, A. C., Malawista, S. E., Snyderman, D. R., Shope, R. E., Andiman, W. A., Ross, M. R., et al. (1977). An epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three connecticut communities. *Arthritis & Rheumatism* 20, 7–17. doi: 10.1002/art.1780200102.
- Stevenson, B., and Brissette, C. A. (2022). Erp and Rev adhesins of the Lyme disease spirochete’s ubiquitous cp32 prophages assist the bacterium during vertebrate infection. *Microbiology* doi: 10.1101/2022.12.01.518731.
- Šulskis, D., Šneiderienė, G., Žiaunys, M., and Smirnovas, V. (2023). The seeding barrier between human and Syrian hamster prion protein amyloid fibrils is determined by  $\beta$ 2- $\alpha$ 2 loop sequence

- elements. *International Journal of Biological Macromolecules* 238, 124038. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.124038.
- Sun, Y., Jack, K., Ercolani, T., Sangar, D., Hosszu, L., Collinge, J., et al. (2022). Direct Observation of Competing Prion Protein Fibril Populations with Distinct Structures and Kinetics. *Biophysics* doi: 10.1101/2022.08.10.503301.
- Tian, W., Chen, C., Lei, X., Zhao, J., and Liang, J. (2018). CASTp 3.0: computed atlas of surface topography of proteins. *Nucleic Acids Research* 46, W363–W367. doi: 10.1093/nar/gky473.
- Tkáčová, Z., Pulzová, L. B., Mochnáčová, E., Jiménez-Munguía, I., Bhide, K., Mertinková, P., et al. (2020). Identification of the proteins of *Borrelia garinii* interacting with human brain microvascular endothelial cells. *Ticks and Tick-borne Diseases* 11, 101451. doi: 10.1016/j.ttbdis.2020.101451.
- Tycko, R., Savtchenko, R., Ostapchenko, V. G., Makarava, N., and Baskakov, I. V. (2010). The  $\alpha$ -Helical C-Terminal Domain of Full-Length Recombinant PrP Converts to an In-Register Parallel  $\beta$ -Sheet Structure in PrP Fibrils: Evidence from Solid State Nuclear Magnetic Resonance. *Biochemistry* 49, 9488–9497. doi: 10.1021/bi1013134.
- Wang, F., Wang, X., Orrú, C. D., Groveman, B. R., Surewicz, K., Abskharon, R., et al. (2017). Self-propagating, protease-resistant, recombinant prion protein conformers with or without in vivo pathogenicity. *PLoS Pathog* 13, e1006491. doi: 10.1371/journal.ppat.1006491.
- Wang, L.-Q., Zhao, K., Yuan, H.-Y., Li, X.-N., Dang, H.-B., Ma, Y., et al. (2021). Genetic prion disease-related mutation E196K displays a novel amyloid fibril structure revealed by cryo-EM. *Sci. Adv.* 7, eabg9676. doi: 10.1126/sciadv.abg9676.
- Wang, L.-Q., Zhao, K., Yuan, H.-Y., Wang, Q., Guan, Z., Tao, J., et al. (2020). Cryo-EM structure of an amyloid fibril formed by full-length human prion protein. *Nat Struct Mol Biol* 27, 598–602. doi: 10.1038/s41594-020-0441-5.
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M., and Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25, 1189–1191. doi: 10.1093/bioinformatics/btp033.
- Whitfield, J. T., Pako, W. H., Collinge, J., and Alpers, M. P. (2008). Mortuary rites of the South Fore and kuru. *Phil. Trans. R. Soc. B* 363, 3721–3724. doi: 10.1098/rstb.2008.0074.

- Wilder, H. K., Raffel, S. J., Barbour, A. G., Porcella, S. F., Sturdevant, D. E., Vaisvil, B., et al. (2016). Transcriptional Profiling the 150 kb Linear Megaplasmid of *Borrelia turicatae* Suggests a Role in Vector Colonization and Initiating Mammalian Infection. *PLoS One* 11, e0147707. doi: 10.1371/journal.pone.0147707.
- Williamson, M. P. (2013). Using chemical shift perturbation to characterise ligand binding. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 73, 1–16. doi: 10.1016/j.pnmrs.2013.02.001.
- Wu, J., Weening, E. H., Faske, J. B., Höök, M., and Skare, J. T. (2011). Invasion of Eukaryotic Cells by *Borrelia burgdorferi* Requires  $\beta_1$  Integrins and Src Kinase Activity. *Infect Immun* 79, 1338–1348. doi: 10.1128/IAI.01188-10.
- Xu, Y., Bruno, J. F., and Luft, B. J. (2008). Profiling the humoral immune response to *Borrelia burgdorferi* infection with protein microarrays. *Microbial Pathogenesis* 45, 403–407. doi: 10.1016/j.micpath.2008.09.006.
- Yang, X. F., Hübner, A., Popova, T. G., Hagman, K. E., and Norgard, M. V. (2003). Regulation of Expression of the Paralogous Mlp Family in *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 71, 5012–5020. doi: 10.1128/IAI.71.9.5012-5020.2003.
- Zhu, C., and Aguzzi, A. (2021). Prion protein and prion disease at a glance. *Journal of Cell Science* 134, jcs245605. doi: 10.1242/jcs.245605.
- Ziaunys, M., Mikalauskaite, K., Veiveris, D., Sakalauskas, A., and Smirnovas, V. (2022). Superoxide dismutase-1 alters the rate of prion protein aggregation and resulting fibril conformation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 715, 109096. doi: 10.1016/j.abb.2021.109096.
- Ziaunys, M., Sakalauskas, A., Mikalauskaite, K., Snieckute, R., and Smirnovas, V. (2021). Temperature-Dependent Structural Variability of Prion Protein Amyloid Fibrils. *IJMS* 22, 5075. doi: 10.3390/ijms22105075.
- Ziaunys, M., Sneideris, T., and Smirnovas, V. (2020). Formation of distinct prion protein amyloid fibrils under identical experimental conditions. *Sci Rep* 10, 4572. doi: 10.1038/s41598-020-61663-2.