

Charakterystyka genetyczna krętka *Borrelia burgdorferi*

BEATA MIZAK, JOANNA KRÓL

Zakład Chorób Zwierząt Mięsożernych i Futerkowych, Państwowego Instytutu Weterynaryjnego,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Mizak B., Król J.

Genetic characteristics of *Borrelia burgdorferi*

Summary

The paper presents the genome structure of *Borrelia burgdorferi*, mechanisms of its replication and factors regulating gene expression. Antigenic proteins and their potential use for diagnosis and immunoprophylaxis of Lyme disease are also described. This molecular analysis may be useful for understanding the mechanisms which determine the genetic diversity and pathogenic properties of the spirochete.

Keywords: *Borrelia burgdorferi*, genome, gene expression, proteins

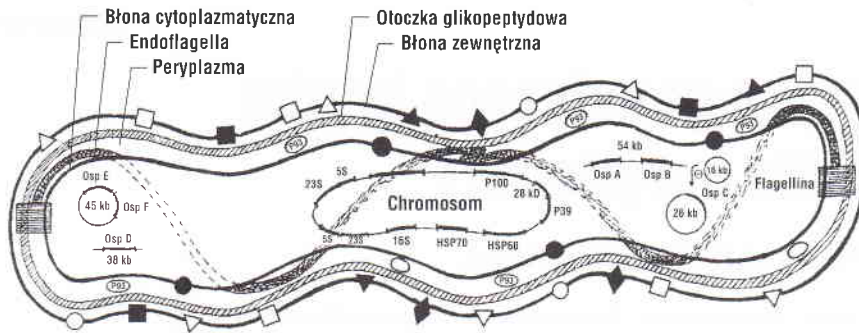
Borrelia burgdorferi, czynnik etiologiczny choroby z Lyme, należy do rodzaju *Borrelia*, rodziny *Spirochaetaceae*. Drobnoustroje mają postać nieregularnych spirali o 3-10 luźnych skrętach. Komórka krętka jest otoczona błoną cytoplazmatyczną, ścianą komórkową oraz błoną zewnętrzną pokrytą warstwą mukoidu. Organem lokomocyjnym jest pęczek 7-11 rzęsek przymocowanych subterminalnie do komórki. *B. burgdorferi* jest drobnoustrojem Gram(-), dobrze barwi się metodą Giemsa, Wrighta i anilinową. Krętki można obserwować w mikroskopie ciemnego pola, najczęściej jednak do ich identyfikacji stosuje się metodę impregnacji srebrem lub test immunofluorescencji. Badania z zastosowaniem technik biologii molekularnej (m.in. hybrydyzacje DNA/DNA, sekwencjonowanie 16S rDNA, rybotypowanie, RFLP, PFGE), prowadzone w ostatnich latach w wielu ośrodkach badawczych, pozwoliły na wyróżnienie w obrębie *B. burgdorferi* genogatunków: *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelli* (3, 7). Ponadto, w Europie opisano genogatunki *B. valaisiana* i *B. lusitaniae* (19, 36), w USA *B. bissettii* i *B. andersonii* (22, 28), natomiast w Japonii zidentyfikowano niepatogenny krętek *B. japonica* (17, 27). Znacznego stopnia zmienność obserwowana wśród krętków *B. burgdorferi* jest przyczyną stwierdzania różnorodnych objawów klinicznych boreliozy.

Badania prowadzone przez Baril i wsp. (4) wykazały, że genom krętka, podobnie jak w przypadku *Streptomyces lividans* (15, 20), zbudowany jest z liniowego chromosomu. Wielkość chromosomu krętka określona na ok. 1000 kbp jest porównywalna z chromosomem *Mycoplasma genitalium* – najmniejszym opisanym dotychczas genomem wolno żyjącego organizmu (13, 29). Oprócz chromosomu, genom krętka stanowi przynajmniej 17 liniowych i kolistych plazmidów (ryc. 1). Liczba plazmidów w komórce zmienia

się w zależności od gatunku, a nawet szczepu krętka. Ponadto znany jest fakt utraty plazmidów w trakcie namnażania *B. burgdorferi in vitro* (6, 32). Mała wielkość genomu krętka, podobnie jak w przypadku *Mycoplasma genitalium*, wiąże się z brakiem niektórych szlaków biosyntezy. U *B. burgdorferi* nie stwierdzono obecności genów szlaku syntezy aminokwasów, kwasów tłuszczowych, kofaktorów enzymów oraz nukleotydów, co wyjaśnia wysokie wymagania żywieniowe krętka (12).

Fraser i wsp. (12) w 1997 r. opublikowali sekwencję liniowego chromosomu i 11 plazmidów szczepu B31 *B. burgdorferi sensu stricto*. Wielkość chromosomu krętka określono na 910.725 pz. Zawartość G+C wynosi 28,6%. W obrębie chromosomu zlokalizowano 853 sekwencje kodujące (ORF – open reading frames), z których tylko dla 59% udało się określić funkcję biologiczną. 12% ORF wykazuje homologię do genów o nieznanym znaczeniu obecnych u innych organizmów, natomiast 29% to nowe, nieznane wcześniej geny (tab. 1). Średnią wielkość genu zlokalizowanego na chromosomie określono na 992 pz, natomiast masa cząsteczkowa kodowanych białek waha się od 3369 do 254 242 Da.

Ze względu na liniową budowę chromosomu duże zainteresowanie wzbudza mechanizm jego replikacji. Większość bakterii takich, jak *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* czy *Bacillus subtilis* posiada specyficzne regiony inicjacji replikacji (ori), w skład których wchodzi sekwencje przynajmniej czterech 9 nukleotydowych powtórzeń, tzw. DnaA boxes. Proces replikacji zapoczątkowuje białko DnaA, kodowane przez gen *dnaA*, które przyłącza się do DnaA box. Kolejnym etapem jest przyłączenie do kompleksu DNA-DnaA białek DnaB oraz DnaC. Proces replikacji przebiega dwukierunkowo. Ilość miejsc inicjacji replikacji bakterii



Ryc. 1. Struktura genetyczna i antygenowa *B. burgdorferi sensu stricto*. Na rysunku zaznaczono białka HSP60, HSP70 i 12kD oraz prawdopodobną lokalizację białka P93. Symbolami oznaczono antygeny krętka: OspA – ▽; OspB – □; OspC – ○; OspD – ▲; OspE – ■; OspF – ◆; O; P39 – ● (wg Fernandez 1997)

Tab. 1. Analiza genomu krętka *B. burgdorferi* (12)

Chromosom	Plazmidy
910 725 pz (28,6% G+C)	cp9 9.386 pz (23,6% G+C)
	cp26 26.497pz (26,3% G+C)
	lp17 16.828pz (23,1% G+C)
	lp25 24.182pz (23,3% G+C)
	lp28-1 26.926pz (32,3% G+C)
	lp28-2 29.771pz (31,5% G+C)
	lp28-3 28.605pz (25,1% G+C)
	lp28-4 27.329pz (24,4% G+C)
	lp36 36.834pz (26,8% G+C)
	lp38 38.853pz (26,1% G+C)
	lp54 53.590pz (28,1% G+C)
Sekwencje kodujące – 93% geny RNA 0,7%	Sekwencje kodujące – 71%
Sekwencje międzygenowe – 6,3%	Sekwencje międzygenowe – 29%
853 sekwencje kodujące:	430 sekwencje kodujące:
– 500 (59%) – znana funkcja	– 70 (16%) – znana funkcja
– 104 (12%) – hipotetyczne białka	– 110 (26%) – hipotetyczne białka
– 249 (29%) – nieznaną funkcją	– 250 (58%) – nieznaną funkcją

jest zmienna i waha się od jednego u *E. coli* do czterech u *B. subtilis*. Grupy DnaA boxes w *E. coli*, *Pseudomonas putida* i *Bacillus subtilis* zlokalizowane są w pobliżu genu *gidA*. U *P. putida* i *B. subtilis* występuje drugie *ori*, położone pomiędzy genami *dnaA* i *rpmH*. *B. subtilis* posiada jeszcze dwa dodatkowe miejsca inicjacji replikacji, zlokalizowane między genami *dnaA* i *dnaN* oraz pomiędzy genami *gyrA* i *rrnO*. Gen *dnaA* znajduje się w konserwatywnym regionie DNA, wśród genów położonych w kolejności *gidB-gidA-50K-60K-rnpA-rpmH-dnaA-dnaN-gyrB* (2, 34).

Początek replikacji u *B. burgdorferi* może być zlokalizowany w centralnej części chromosomu, w pobliżu genów kodujących DnaA i rybosomalne RNA (pozycja ok. 458 kpz). Wykazano, że ułożenie genów na chromosomie, w obrębie których można zlokalizować początek replikacji jest odmienne niż u innych

bakterii: *rnpA-rpmH-dnaN-dnaA-gyrB-gyrA* (31). Wskazuje to na rearanżację genów w trakcie ewolucji krętka. W regionie *dnaA* nie wykazano obecności sekwencji DnaA boxes, natomiast istnieją dwie takie sekwencje powyżej genu *rpmH* w odległości ok. 2 kpz od genu *dnaA*. Drugie teoretyczne miejsce inicjacji replikacji chromosomu *B. burgdorferi* może być zlokalizowane w pobliżu genu *gidA* (pozycja ok. 181 kpz). Klonowanie i mapowanie genu *gidA* nie pozwoliło na określenie, czy w jego pobliżu znajduje się *ori* replikacji (26). Wydaje się, że sekwencja nukleotydo-

wa i/lub aranżacja DnaA boxes u *B. burgdorferi* jest nietypowa. Region odpowiedzialny za wiązanie DnaA do DNA u *B. burgdorferi* różni się od konserwatywnych sekwencji DnaA u innych bakterii co sugeruje, że *ori* krętka może być nietypowe, podobnie jak u *Bruchnera aphidicola*, *Caulobacter crescentus*, czy różnych gatunków *Mycobacterium* (2, 31).

U *B. burgdorferi* obserwuje się również niezwykle układ genów kodujących rybosomalne RNA. Większość znanych bakterii posiada geny rRNA zgrupowane w operony. Każdy z operonów, występujących na chromosomie w wielu kopiach, zawiera po jednej kopii genu dla każdego rodzaju rRNA. Zaobserwowano zależność pomiędzy ilością kopii genów kodujących rRNA, a czasem generacji bakterii. Szybko rosnące bakterie, takie jak *E. coli* mają wiele kopii genów, podczas gdy drobnoustroje wolno rosnące, np. przedstawiciele rodziny *Spirochaetaceae* czy *Mycobacteriaceae* posiadają jedną lub dwie kopie. U *B. burgdorferi* występuje pojedyncza kopia genu *rrs*, kodującego 16S rRNA oraz po dwie kopie genów *rrl* (*rrlA* i *rrlB*) i *rrf* (*rrfA* i *rrfB*), kodujących odpowiednio 23S rRNA oraz 5S rRNA. U *B. anserina*, *B. turicata* i *B. hermsii* wykryto tylko po jednej kopii genów *rrl* i *rrf* (16). Geny kodujące rybosomalne RNA zlokalizowane są na fragmencie chromosomu o wielkości ok. 10 kpz. Region kodujący 23S rRNA oraz 5S rRNA jest zlokalizowany w pozycji 435-441 kpz, natomiast gen *rrs* znajduje się w pozycji ok. 445 kpz. Geny kodujące 23S rRNA i 5S rRNA *B. burgdorferi* zaaranżowane są w sekwencję *rrlA-rrfA-rrlB-rrfB* położoną w odległości ok. 2,7 kpz od genu *rrs*. U *B. garinii* i *B. afzelli* odcinek ten jest dłuższy o ok. 2,2 kpz. W obrębie fragmentu DNA o wielkości 2,7 kpz znajdują się geny kodujące tRNA – *alaT* oraz położony w przeciwnej orientacji gen *ileT*. Takie ułożenie genów na chromosomie wskazuje na niezależną od innych genów rRNA transkrypcję genu *rrs*. Sekwencje *rrl-rrf* oddzielone są od siebie fragmentem DNA o wielkości 182 pz, co może sugerować, że transkrypcja każdej z par genów odbywa się niezależnie. Pomiedzy genami *rrl* i *rrf* występuje identyczna sekwencja o wielkości 22 pz, czego nie obserwuje się u innych bakterii (2, 10, 11,

25). Położenie genów kontrolujących biosyntezę rybosomalnych RNA w pobliżu genów biorących udział w replikacji chromosomu (np. *dnaA*) zapewnia im dużą stabilność.

Kolejna grupa genów koduje białka odpowiadające za transport różnych substancji przez błony komórkowe. Na chromosomie zidentyfikowano 46 ORF, zaś na plazmidach – dalszych 6 ORF kodujących białka biorące udział w transporcie. Białka te wchodzi w skład 16 różnych systemów transportu dla aminokwasów, cukrów, anionów i kationów. Dystrybucja w obrębie tych czterech klas transporterów u *B. burgdorferi* jest podobna jak w przypadku innych heterotrofów np. *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma genitalium* czy *Helicobacter pylori*. Większość systemów transportu odpowiada za dostarczanie do komórki niezbędnych składników organicznych. Wydaje się, że bakterie nadrabiają braki pewnych szlaków biosyntezy poprzez wytwarzanie systemów transportu aktywnie pobierających brakujące składniki ze środowiska. Tak jest również u *B. burgdorferi*, który nie syntetyzuje żadnego aminokwasu *de novo*. Pomimo tego dotychczas nie zidentyfikowano mechanizmów odpowiedzialnych za pobieranie nukleozydów, nukleotydów, NAD/NADH czy też kwasów tłuszczowych (12).

Ekspresja genów *B. burgdorferi*, podobnie jak u wszystkich organizmów, jest regulowana przez sekwencje promotorowe i regulatorowe, wrażliwe na czynniki środowiska zewnętrznego i zmienia się w zależności np. od organizmu gospodarza, temperatury, zainfekowanego narządu i wielu innych czynników. Jednak regulacja ekspresji jest inna niż u modelowych bakterii. U *B. burgdorferi* zidentyfikowano geny wykazujące duże podobieństwo do genów białek szoku termicznego, takie jak: *groES* (784 kpz), *groEL* (689 kpz), *grpE* (531 kpz), *dnaJ* (528 kpz), *hslU* (304 kpz), *hslV* (305 kpz), *dnaK* (278 kpz) *htpG* (572 kpz) (12). Zaobserwowano również obecność homologów białek szoku cieplnego *Hsp60* i *Hsp70* oraz *Hsp90* (1, 12). Krętek jest wrażliwy na zmiany temperatury, aczkolwiek nie posiada czynnika δ^{32} , który kontroluje ekspresję białek szoku cieplnego w *E. coli* (12). Wydaje się, że genom *B. burgdorferi* koduje trzy czynniki δ : główny czynnik δ^{70} i dwa dodatkowe czynniki δ^N i δ^S . Sekwencję identyczną do zależnych od δ^N promotorów znaleziono powyżej genu *rpoS*, kodującego δ^S . U enterobakterii czynnik δ^S jest zaangażowany w odpowiedź na warunki stresowe. W czasie cyklu życiowego *B. burgdorferi* zmienia środowisko bytowania. Z jelita środkowego kleszczy z rodzaju *Ixodes* krętek przenoszony jest do organizmu ludzi lub zwierząt, u których jest patogenem zewnątrzkomórkowym. Wydaje się, że w związku z koniecznością przystosowania się do różnych warunków bytowania, krętek może wykorzystywać czynnik δ^N do regulacji innego czynnika stresowego, jakim jest δ^S (35).

Pozachromosomalne elementy genomu krętka *B. burgdorferi* stanowią przynajmniej 17 liniowych i ko-

listych plazmidów o wielkości 56 kpz (*lp56*), 54 kpz (*lp54*), cztery plazmidy o wielkości 28 kpz (*lp28-1*, *lp28-2*, *lp28-3*, *lp28-4*), 38 kpz (*lp38*), 36 kpz (*lp36*), 25 kpz (*lp25*), 17 kpz (*lp 17*) oraz plazmidy koliste o wielkości 9 kpz (*cp9*), 26 kpz (*cp26*) i pięć lub sześć plazmidów homologicznych o wielkości 32 kpz (*cp32*) (tab. 1) (12). Fraser i wsp. zsekwencjonowali 11 plazmidów krętka (12). Zlokalizowano na nich 430 ORF, co stanowi 71% DNA plazmidowego. Średnią wielkość genu kodowanego przez DNA plazmidowe określono na 507 pz. Na podstawie homologii do produktów znanych genów określono biologiczną funkcję 70 plazmidowych ORF (16%). Są to między innymi białka membranowe *OspA-F* i enzymy szlaku biosyntezy puryn (24). Nie udało się jednak przypisać funkcji biologicznej 250 (58%) plazmidowym ORF. Należy podkreślić, że ze względu na utratę części plazmidów w czasie hodowli *in vitro* nie określono całkowitej sekwencji DNA genomu *B. burgdorferi*. Znany jest fakt utraty właściwości patogennych krętka spowodowany długotrwałą hodowlą, a tym samym utratą niektórych plazmidów co oznacza, że mogą się na nich znajdować geny decydujące o patogenności bakterii. Zmiana ilości plazmidów może być efektem ich utraty, lateralnej wymiany, rekombinacji, a także tworzenia dimerów (21, 23).

Geny kodujące główne białka antygenowe *B. burgdorferi* – lipoproteiny powierzchniowe *OspA* i *OspB* zlokalizowane są na plazmidzie liniowym o wielkości 54 kpz (*lp54*) (ryc. 1) (12). Region kodujący *OspA* ma w zależności od szczepu wielkość od 819 do 822 pz. U *B. garinii* i *B. afzelii* zawiera o 6 par zasad więcej niż w przypadku szczepu B31 *B. burgdorferi sensu stricto* (11). Sekwencja wyprowadzająca białko *OspA* na zewnątrz zlokalizowana jest na N-końcu, który jest bardziej konserwatywny niż domena C-terminalna. Największą zmienność obserwuje się w środkowej części lipoproteiny (38). Wielkość genu kodującego lipoproteinę *OspB* określono na 888 pz, natomiast samego białka na 296 aminokwasów. W obrębie sekwencji nukleotydowej i aminokwasowej obserwuje się znaczną zmienność, co uniemożliwia wykorzystanie białka *OspB* do diagnostyki laboratoryjnej boreliozy (33). Gen kodujący lipoproteinę *OspC* zlokalizowano na kolistym plazmidzie *cp26* (12). Białka *OspA*, *OspB* i *OspC* są antygenami immunodominującymi, ale tylko *OspC* indukuje wczesną odpowiedź immunologiczną w zakażonym organizmie. Oprócz tych lipoprotein na powierzchni komórki zidentyfikowano ok. 30 różnych białek, między innymi *OspD* (23), *OspE* (18), *OspF* (18), *EppA* (exported plasmid protein A) (12), a także antygeny P35, P37 (12).

Na podstawie wyników badań genetycznych nad krętkiem *B. burgdorferi* opracowano wiele szczepionek zawierających rekombinowane białka krętka. Do immunizacji wykorzystuje się głównie lipoproteiny powierzchniowe: *OspA*, *OspB*, *OspC* (8, 9, 30, 37), jak również białko HSP70 (heat shock protein 70) (5),

czy DbpA (decorin binding protein A) (14). Wykazano, że najlepsze właściwości immunogenne posiadały szczepionki zawierające białko OspA. Tego typu preparaty są obecnie poddawane badaniom klinicznym dotyczącym możliwości ich zastosowania nie tylko u zwierząt, ale także w medycynie ludzkiej.

Nadal jednak pozostają nie wyjaśnione funkcje niektórych genów krętku *B. burgdorferi*, co stanowi podstawę do prowadzenia dalszych badań umożliwiających bliższe poznanie m. in. mechanizmów determinujących jego właściwości patogenne.

Piśmiennictwo

- Anzola J., Lutfi B. J., Gorgone G., Dattwyler R. J., Soderberg C., Lahesmaa R., Peltz G.: *Borrelia burgdorferi* HSP70 homolog: characterization of an immunoreactive stress protein. *Inf. Immun.* 1992, 60, 3704-3713.
- Baranton G., Old I. G.: The Spirochaetes: a different way of life. *Bull. Inst. Pasteur* 1995, 93, 63-95.
- Baranton G., Postic D., Saint Girons I., Boerlin P., Piffaretti J. C., Assouss M., Grimont P. A. D.: Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* sp. nov. and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *Int. J. System. Bacteriol.* 1992, 42, 378-383.
- Baril C., Richaud C., Baranton G., Saint Girons I.: Linear chromosome of *Borrelia burgdorferi*. *Res. Microbiol.* 1989, 140, 507-516.
- Bey R. F., Larsson M. E., Lowery D. E., Lee B. W., Knutson K. S., Simonson R. R., King V. L.: Protection of C3H/He mice from experimental *Borrelia burgdorferi* infection by immunization with a 110-kilodalton fusion protein. *Inf. Immun.* 1995, 63, 3213-3217.
- Busch U., Will G., Hizo Teufel C., Wilske B., Preac Mursic V.: Long-term in vitro cultivation of *Borrelia burgdorferi sensu lato sensu lato* strains: influence on plasmid patterns, genome stability and expression of proteins. *Res. Microbiol.* 1997, 148, 109-118.
- Canica M. M., Nato F., du Merle L., Mazie J. C., Baranton G., Postic D.: Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. *Scand. J. Infect. Dis.* 1993, 25, 441-448.
- Chang Y. F., Appel M. J. G., Jacobson R. M., Shin S. J., Harpending P., Straubinger R., Patrican L. A., Mohammed H., Summers B. A.: Recombinant OspA protects dogs against infection and disease caused by *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 1995, 63, 3543-3549.
- Coughlin R. T., Fish D., Mather T. N., Ma J., Pavia C., Bulger P.: Protection of dogs from Lyme disease with a vaccine containing outer surface protein (Osp) A, OspB and the saponin adjuvant QS21. *J. Inf. Dis.* 1995, 171, 1049-1052.
- Davidson B. E., MacDougall J., Saint Girons I.: Physical map of linear chromosome of the bacterium *Borrelia burgdorferi* 212, a causative agent of Lyme disease, and localization of rRNA genes. *J. Bact.* 1992, 174, 3766-3774.
- Fernandez J. G., Fernandez M. R., Murillo F. N., Maroto Vela M. C.: Antigenic and genetic structure of *Borrelia burgdorferi*. *Microbios* 1997, 91, 165-174.
- Fraser C. M., Casjens S., Huang W. M., Sutton G. G., Clayton R., Lathigra R., White O., Ketchum K. A., Dodson R., Hickey E. K., Gwinn M., Dougherty B., Tomb J. F., Fleischmann R. D., Richardson D., Peterson J., Kerlavage A. R., Quackenbush J., Salzberg S., Hanson M., van Vugt R., Palmer N., Adams M. D., Gocayne J., Weidman J., Utterback T., Watthey L., McDonald L., Artiach P., Bowman C., Garland S., Fujii C., Cotton M. D., Horst K., Roberts K., Hatch B., Smith H. O., Venter J. C.: Genomic sequence of a Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 1997, 390, 580-586.
- Fraser C. M., Gocayne J. D., White O., Adams M. D., Clayton R. A., Fleischmann R. D., Bult C. J., Kerlavage A. R., Sutton G., Kelley J. M., Fritchman J. L., Weidman J. F., Small K. V., Sandusky M., Fuhrmann J., Nguyen D., Utterback T. R., Saudek D. M., Phillips C. A., Merrick J. M., Tomb J. F., Dougherty B. A., Bott K. F., Hu P. C., Lucier T. S., Peterson S. N., Smith H. O., Hutchison III C. A., Venter J. C.: The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Nature* 1995, 270, 397-403.
- Hanson M. S., Cassatt D. R., Guo B. P., Patel N. K., McCarthy M. P., Dorrard D. W., Höök M.: Active and passive immunity against *Borrelia burgdorferi* decorin binding protein A (DbpA) protects against infection. *Inf. Immun.* 1998, 66, 2143-2153.
- Hinnenbusch J., Tilly K.: Linear plasmids and chromosomes in bacteria. *Mol. Microbiol.* 1993, 10, 811-820.
- Jenek J.: Biologia molekulara krętków *Borrelia burgdorferi*. *Biotechnologia* 1997, 2, 47-56.
- Kawabata H., Masuzawa T., Yanagihara Y.: Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. *Microbiol. Immunol.* 1993, 37, 843-848.
- Lam T. T., Nguyen T., Montgomery R. R., Kantor F. S., Fikrig E., Flavell R. A.: Outer surface proteins E and F of *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease. *Infect. Immun.* 1994, 62, 290-298.
- Le Fleche A., Postic D., Girardet K., Peter O., Baranton G.: Characterization of *Borrelia lusitanae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1997, 47, 921-925.
- Lin Y. S., Kieser H. M., Hopwood D. A., Chen C. W.: The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. *Mol. Microbiol.* 1993, 10, 923-933.
- Marconi R. T., Casjens S., Munderloh U. G., Samuels D. S.: Analysis of linear plasmid dimers in *Borrelia burgdorferi sensu lato* isolates: implications concerning the potential mechanisms of linear plasmid replication. *J. Bact.* 1996, 178, 3357-3361.
- Marconi R. T., Liveris D., Schwartz I.: Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates. *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33, 2427-2434.
- Marconi R. T., Samuels D. S., Landry R. K., Garon C. F.: Analysis of the distribution and molecular heterogeneity of the ospD gene among the Lyme disease spirochetes: evidence for lateral gene exchange. *J. Bact.* 1994, 176, 4572-4582.
- Margolis N., Hogan D., Tilly K., Rosa P.: Plasmid location of *Borrelia* purine biosynthesis gene homologs. *J. Bact.* 1994, 176, 6427-6432.
- Ojaimi C., Davidson B. E., Saint Girons I., Old I. G.: Conservation of gene arrangement and an unusual organization of rRNA genes in the linear chromosomes of the Lyme disease spirochetes *B. burgdorferi*, *B. garinii* and *B. afzelii*. *Microbiology* 1994, 140, 2931-2940.
- Old I. G., MacDougall J., Saint Girons I., Davidson B. E.: Mapping of genes on the linear chromosome of the bacterium *Borrelia burgdorferi*: possible locations for its origin of replication. *FEMS Microbiol. Lett.* 1992, 99, 245-250.
- Postic D., Belfaiza J., Isogai E., Saint Girons I., Grimont P. A. D., Baranton G.: A new genomic species in *Borrelia burgdorferi sensu lato* isolated from Japanese ticks. *Res. Microbiol.* 1993, 144, 467-473.
- Postic D., Marti Ras N., Lane R. S., Hendson M., Baranton G.: Expanded diversity among Californian *Borrelia* isolates and description of *Borrelia bissettii* sp. nov. (formerly *Borrelia* group DN 127). *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36, 3497-3504.
- Pyle L. E., Corcoran L. N., Cocks B. G., Bergemann A. D., Whitley J. C., Finch L. R.: Pulse-field electrophoresis indicates larger-than-expected sizes for mycoplasma genomes. *Nucl. Acids Res.* 1988, 16, 6015-6025.
- Rice Conlon J. A., Mather T. N., Tanner P., Gallo G., Jacobson R. H.: Efficacy of a nonadjuvanted, outer surface protein A, recombinant vaccine in dogs after challenge by ticks naturally infected with *Borrelia burgdorferi*. *Vet. Therap.* 2000, 1, 96-107.
- Saint Girons I., Old I. G., Davidson B. E.: Molecular biology of the *Borrelia*, bacteria with linear replicons. *Microbiology* 1994, 140, 1803-1816.
- Schwan T. G., Burgdorfer W., Garon C. F.: Changes in infectivity and plasmid profile of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, as a result of in vitro cultivation. *Inf. Immun.* 1988, 56, 1831-1836.
- Shoberg R. J., Jonsson M., Sadziene A., Bergström S., Dence Thomas D.: Identification of a highly cross-reactive outer surface protein B epitope among diverse geographic isolates of *Borrelia* spp. causing Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.* 1994, 32, 489-500.
- Smith D. W., Yee T. W., Baird C., Krishnapillai V.: Pseudomonad replication origins: a paradigm for bacterial origins? *Mol. Microbiol.* 1991, 5, 2581-2587.
- Studholme D. J., Buck M.: Novel roles of δ^N in small genomes. *Microbiology* 2000, 146, 4-5.
- Wang G., Van Dam A. P., Le Fleche A., Postic D., Peter O., Baranton G., De Boer R., Spanjaard L., Dankert J.: Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1997, 47, 926-932.
- Wilske B., Busch U., Fingerle V., Jauris-Heipke S., Preac Mursic V., Rössler D., Will G.: Immunological and molecular variability of OspA and Osp C. Implications for *Borrelia* Vaccine development. *Infection* 1996, 24, 208-212.
- Zumstein G., Fuchs R., Hofmann A., Preac Mursic V., Soutschek E.: Genetic polymorphism of the gene encoding the outer surface protein A (OspA) of *Borrelia burgdorferi*. *Med. Microbiol. Immunol.* 1992, 181, 57-70.