

**Charakterisierung von Komplement-  
interagierenden Proteinen von  
*Borrelia recurrentis* und Entwicklung  
spezifischer Immunoassays für die  
Serodiagnostik des epidemischen  
Läuserückfallfiebers**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von

Florian Röttgerding  
aus Troisdorf

Frankfurt am Main, 2023

(D 30)

Vom Fachbereich Biowissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
als Dissertation angenommen.

Dekan

Prof. Dr. S. Klimpel

1. Gutachter

Prof. Dr. V. Müller

2. Gutachter

Prof. Dr. P. Kraiczky

Datum der Disputation:

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	VII
Tabellenverzeichnis .....	X
Abkürzungsverzeichnis.....	XII
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Morphologie von <i>Borrelia</i>.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Charakteristika der Gattung <i>Borrelia</i>.....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Der Erreger des Läuserückfallfiebers – <i>Borrelia recurrentis</i>.....</b>	<b>5</b>
1.3.1 Historie des Läuserückfallfiebers .....	5
1.3.2 Epidemiologie des von <i>B. recurrentis</i> verursachten LRF .....	6
1.3.3 Klinik, Diagnose und Behandlung des LRF .....	9
1.3.4 Zukünftige Perspektiven und Verbreitung des LRF .....	13
<b>1.4 Das Komplementsystem.....</b>	<b>14</b>
1.4.1 Die Aktivierung des klassischen und Lektin-Weges .....	16
1.4.2 Die Aktivierung des alternativen Weges .....	17
1.4.3 Die Aktivierung des terminalen Weges.....	18
1.4.4 Die Regulation der Komplementkaskade .....	18
<b>1.5 Immunevasionsstrategien von <i>B. recurrentis</i>.....</b>	<b>20</b>
<b>1.6 Zielsetzung und Fragestellung .....</b>	<b>26</b>
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>28</b>
<b>2.1 Bakterienstämme.....</b>	<b>28</b>
2.1.1 <i>Borrelia</i> .....	28
2.1.2 <i>Escherichia coli</i> .....	29
<b>2.2 Vektoren und Starteroligonukleotide.....</b>	<b>29</b>
2.2.1 Starteroligonukleotide.....	29
2.2.2 Basisvektoren.....	33

<b>2.3</b>	<b>Antikörper und Proteine .....</b>	<b>33</b>
2.3.1	Antikörper.....	33
2.3.2	Proteine.....	34
<b>2.4</b>	<b>Humanseren und Blutproben .....</b>	<b>35</b>
2.4.1	Humanseren.....	35
2.4.2	Schafserythrozyten für den hämolytischen Assay.....	37
<b>2.5</b>	<b>Verwendete Reagenzienpackungen und Größenstandards .....</b>	<b>37</b>
2.5.1	Reagenzienpackungen.....	37
2.5.2	Größenstandards.....	38
<b>2.6</b>	<b>Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien.....</b>	<b>38</b>
2.6.1	Chemikalien.....	38
2.6.2	Spezielle Substanzen, Puffer und Materialien.....	41
2.6.3	Geräte.....	42
2.6.4	Software.....	44
2.6.5	Allgemeine Puffer und Lösungen.....	45
2.6.6	Kulturmedien.....	46
<b>2.7</b>	<b>Mikrobiologische Methoden.....</b>	<b>47</b>
2.7.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> -Zellen.....	47
2.7.2	Kultivierung von Borrelienzellen.....	47
2.7.3	Antibiotika.....	47
2.7.4	Zellzahlbestimmung von Erythrozyten und Borrelienzellen.....	48
2.7.5	Amplifikation und Reinigung von DNA-Fragmenten nach PCR.....	48
2.7.6	Separation von PCR-Amplifikaten mittels Agarose-Gelelektrophorese.....	50
2.7.7	Hydrolyse von DNA-Fragmenten mittels Restriktionsendonukleasen.....	51
2.7.8	Ligation von hydrolysierten DNA-Fragmenten in einem Vektor.....	51
2.7.9	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> oder <i>B. garinii</i> .....	51
2.7.10	Isolierung von genomischer DNA aus Borrelienzellen.....	52
2.7.11	Isolierung von RNA aus Borrelienzellen.....	52
2.7.12	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA.....	53

---

2.7.13	Reverse Transkription mit anschließender quantitativer PCR (RT-qPCR-Analyse) .....	53
2.7.14	Sequenzierung von Plasmid-DNA.....	54
2.7.15	Transformation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen.....	55
2.7.16	Herstellung kompetenter <i>B. garinii</i> -Zellen und Transformation mittels Elektroporation .....	55
2.7.17	Herstellung von Borrelienlysaten .....	56
2.7.18	Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Schägger.....	56
2.7.19	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli.....	59
2.7.20	Transfer von separierten Proteinen auf Nitrocellulosemembranen (Western Blot).....	60
2.7.21	Färbung von Proteinen im SDS-Polyacrylamid-Gel mit Silbernitrat .....	62
2.7.22	Produktion und Reinigung von rekombinant hergestellten Proteinen aus <i>E. coli</i> -Zellen .....	63
2.7.23	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Micro-BCA .....	67
<b>2.8</b>	<b>Immunologische Methoden .....</b>	<b>67</b>
2.8.1	Western Blot-Analyse.....	67
2.8.2	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	69
2.8.3	Komplementaktivierungs-Assay (WiELISA) für den alternativen Komplementweg.....	71
2.8.4	Hämolytischer Assay zum Nachweis der Inaktivierung des terminalen Komplementweges .....	73
2.8.5	Immunfluoreszenztest zum Nachweis von gegen <i>B. recurrentis</i> gerichtete IgG Antikörper in LRF-Patientenseren .....	74
<b>2.9</b>	<b>Spezielle Methoden.....</b>	<b>75</b>
2.9.1	C9-Polymerisations-Assay .....	75
2.9.2	Serumbakterizidie-Assay .....	76
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>78</b>
<b>3.1</b>	<b>Charakterisierung von Komplement-interagierenden Proteinen von <i>B. recurrentis</i>.....</b>	<b>78</b>

3.1.1 Vergleichende Sequenzanalyse des linearen Plasmids lp165 verschiedenen <i>B. recurrentis</i> -Stämme.....	78
3.1.2 Reinheitsprüfung von affinitätschromatographisch gereinigten Hexahistidin- fusionierten Chi-Proteinen.....	81
3.1.3 Nachweis der Komplement-inhibierenden Eigenschaften der fünf Chi-Proteine von <i>B. recurrentis</i> auf den alternativen und terminalen Komplementweg.....	82
<b>3.2 Identifikation und Untersuchung der Komplement-interagierenden Domäne in ChiB .....</b>	<b>87</b>
3.2.1 Generierung verschiedener ChiB-Varianten von <i>B. recurrentis</i> .....	87
3.2.2 Untersuchung der Komplement-inhibierenden Eigenschaften verschiedener ChiB-Varianten auf den alternativen Komplementweg .....	90
3.2.3 Untersuchung der Komplement-inhibierenden Eigenschaften der verschiedenen ChiB-Varianten auf den terminalen Komplementweg .....	93
<b>3.3 Untersuchung der durch verschiedene ChiB-Proteine vermittelten Serumresistenz.....</b>	<b>95</b>
3.3.1 Nachweis der durch Chi-Proteine vermittelten Serumresistenz im Serumprotektionstest .....	95
3.3.2 Generierung und Charakterisierung von Borrelientransformanten .....	96
3.3.3 Generierung und Charakterisierung von Borrelientransformanten, die verschiedene Kombinationen von Chi-Proteinen produzieren.....	101
<b>3.4 Nachweis von <i>chi</i>-orthologen Genen und deren Expression in <i>B. recurrentis</i> PAbJ und zwei <i>B. duttonii</i>-Stämmen.....</b>	<b>104</b>
<b>3.5 Die Entwicklung und Validierung serologischer Testverfahren zum diagnostischen Nachweis von Läuserückfallfieber .....</b>	<b>107</b>
3.5.1 Nachweis der IgG Antikörperreaktivität bei Läuserückfallfieber-Patientenseren mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie .....	107
3.5.2 Nachweis der IgG- und IgM-Antikörperreaktivität der Läuserückfallfieber-Patientenseren durch eine Western Blot-Analyse.....	108
3.5.3 Identifizierung geeigneter Antigene für die serologische Diagnostik von Läuserückfallfieber .....	111

---

3.5.4	Entwicklung und Evaluation eines Lineblot-Immunoassays für die serologische Diagnostik von Läuse Rückfallfieber .....	114
3.5.5	Entwicklung und Evaluation eines ELISA-basierten Immunoassays zum serologischen Nachweis von Läuse Rückfallfieber .....	118
3.5.6	<i>In silico</i> -Analyse zur Detektion immunogener Regionen in CihC.....	121
3.5.7	Reinheitskontrolle der im Lineblot und ELISA verwendeten Antigene .....	123
3.5.8	Immunreaktivitätskontrolle der im Lineblot und ELISA verwendeten Antigene.....	124
3.5.9	Verwendung des N-terminalen Fragmentes des CihC-Proteins zur Optimierung des Lineblot-Immunoassays.....	125
3.5.10	Optimierung des ELISA durch Verwendung des N-terminalen CihC-Fragmentes.....	127
3.5.11	Zusammenfassung der Ergebnisse der Evaluation und der Optimierung der verschiedenen Lineblot-Immunoassays und ELISA .....	130
3.5.12	Zusammenfassung der verwendeten Seren für die Entwicklung, Optimierung und Evaluierung des Lineblot-Immunoassays und des ELISA.	131
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>132</b>
<b>4.1</b>	<b><i>B. recurrentis</i>, der Erreger des Läuse Rückfallfiebers und Mechanismen der Immunevasion .....</b>	<b>132</b>
<b>4.2</b>	<b>Charakterisierung der Oberflächenproteine ChiA, ChiB, ChiC, ChiD und ChiE von <i>B. recurrentis</i>.....</b>	<b>134</b>
4.2.1	Charakteristika des Chi-Genclusters von <i>B. recurrentis</i> .....	134
4.2.2	Reinheitsgrad der verwendeten Proteine .....	136
4.2.3	Komplement-inhibitorische Eigenschaften von Cih-homologen Proteinen...	136
<b>4.3</b>	<b>Auswirkung von Struktur-basierten Mutationen der generierten ChiB-Varianten auf die Komplement-inhibitorische Wirkung und Komplementinteraktion .....</b>	<b>139</b>
<b>4.4</b>	<b>Chi-Proteine determinieren die Komplementresistenz von <i>B. recurrentis</i> und <i>B. garinii</i> .....</b>	<b>140</b>
<b>4.5</b>	<b>Das Chi-Gencluster in <i>B. recurrentis</i> und <i>B. duttonii</i>.....</b>	<b>143</b>

<b>4.6 Entwicklung eines serologisch basierten Testsystems zum diagnostischen Nachweis des Läuserückfallfiebers.....</b>	<b>144</b>
4.6.1 Untersuchung der Immunreaktivität der LRF-Patientenseren auf verschiedene Antigene von <i>B. recurrentis</i> .....	145
4.6.2 Evaluierung eines Lineblots und ELISA auf Grundlage der Antigene CihC und GlpQ .....	147
4.6.3 Optimierung des ELISA und Lineblots durch die Identifizierung immunogener Regionen mittels <i>in silico</i> Analyse .....	148
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>153</b>
<b>6 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>155</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>171</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>173</b>



# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Morphologie einer Spirochäte mit graphischer Darstellung der verankerten Flagelle.....	1
Abbildung 2: Phylodendrogramm zur Differenzierung von Rückfallfieber-Borrelien .....	4
Abbildung 3: Darstellung der in den Kopf- und Körperlaus übertragbaren Erregern und Lebenszyklus der Körperlaus .....	7
Abbildung 4: Verbreitungsgebiet von <i>B. recurrentis</i> in Zusammenhang mit den Hauptmigrationsrouten und dem Wiederauftauchen von Rückfallfieber in Europa.....	9
Abbildung 5: Symptome von mit LRF infizierten Patienten aus Äthiopien.....	10
Abbildung 6: Mikroskopischer Nachweis von <i>B. recurrentis</i> in Blutausstrichen .....	12
Abbildung 7: Aktivierung des Komplementsystems und die drei Aktivierungswege.....	15
Abbildung 8: Regulatoren des Komplementsystems .....	20
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Komplement-regulierenden Proteine von Rückfallfieber-Borrelien und den identifizierten Liganden .....	21
Abbildung 10: Entstehung von Borrelien-Serotypen durch Antigenvarianten und selektiven Druck der adaptiven Immunabwehr .....	23
Abbildung 11: Antigenvariation von Lyme-Borrelien und Rückfallfieber-Borrelien .....	25
Abbildung 12: Sequenzvergleich des linearen lp165-Plasmids verschiedener <i>B. recurrentis</i> -Stämme und <i>B. duttonii</i> Ly inklusive einer Clustal Omega-Analyse .....	80
Abbildung 13: Reinheitsprüfung isolierter Borrelienproteine.....	82
Abbildung 14: Nachweis des inhibierenden Potentials der fünf Chi-Proteine von <i>B. recurrentis</i> auf den alternativen Komplementweg.....	83
Abbildung 15: Nachweis des inhibierenden Potentials der fünf Chi-Proteine von <i>B. recurrentis</i> auf den terminalen Komplementweg.....	85
Abbildung 16: Konzentrationsabhängige Bindung von C5 an ChiB, ChiD und ChiE von <i>B. recurrentis</i> .....	86
Abbildung 17: Dreidimensionale Struktur und Ladungsverteilung des ChiB-Proteins von <i>B. recurrentis</i> . .....	87
Abbildung 18: Dreidimensionale Struktur des ChiB-Proteins von <i>B. recurrentis</i> und der mutierten Aminosäuren sowie die schematische Darstellung der generierten ChiB-Varianten.....	88
Abbildung 19: Reinheitskontrolle der affinitätschromatographische gereinigten ChiB-Varianten.....	89
Abbildung 20: Untersuchung zur inhibierenden Eigenschaft verschiedener ChiB-Varianten auf den alternativen Komplementweg .....	91
Abbildung 21: Nachweis der Bindung der Komplementkomponenten C3b und C5 an verschiedenen ChiB-Varianten .....	92

---

Abbildung 22: Nachweis der inhibitorischen Kapazität der verschiedenen ChiB-Varianten auf die C9-Polymerisation.....	94
Abbildung 23: Untersuchung des protektiven Potential gereinigter Chi-Proteine von <i>B. recurrentis</i> gegenüber der bakteriolytischen Wirkung von NHS im Serumprotektionstest .....	96
Abbildung 24: Genexpressions-Analyse verschiedener Chi-kodierender Gene von <i>B. recurrentis</i> in <i>B. garinii</i> Transformanten. ....	98
Abbildung 25: Nachweis der Serumresistenz der verschiedenen Borrelientransformanten ..	100
Abbildung 26: Nachweis der Expression verschiedener Chi-kodierender Gene in Transformanten von <i>B. garinii</i> G1.....	102
Abbildung 27: Nachweis der Serumresistenz verschiedener Borrelientransformanten.....	103
Abbildung 28: Nachweis der Chi-kodierenden Gene in <i>B. recurrentis</i> PAbJ und deren Expression in vitro. ....	104
Abbildung 29: Nachweis der chi-orthologen Gene in <i>B. duttonii</i> LAI und V sowie deren Expression in vitro .....	105
Abbildung 30: Nachweis von CihC, HcpA und ChiB in Zellysaten von <i>B. recurrentis</i> A17 mittels Western Blot-Analyse .....	106
Abbildung 31: Nachweis der IgG-Antikörperreaktivität von LRF-Patientenseren im Immunfluoreszenztest.....	108
Abbildung 32: Nachweis der IgM-Antikörperreaktivität bei verschiedenen LRF-Patientenseren .....	109
Abbildung 33: Nachweis der IgG-Antikörperreaktivität bei verschiedenen LRF-Patientenseren .....	110
Abbildung 34: Identifizierung von geeigneten Antigenen für die serologische Diagnostik von LRF mit Hilfe eines Lineblot-Immunoassays.....	112
Abbildung 35: Nachweis von spezifischen anti-CihC Antikörper in LRF-Patientenseren....	113
Abbildung 36: Entwicklung und Evaluierung eines IgM-Lineblot-Immunoassays.....	115
Abbildung 37: Entwicklung und Evaluierung eines IgG-Lineblot-Immunoassays .....	116
Abbildung 38: Vergleichende Analyse ausgewählter Lineblot-Immunoassays zur Erstellung einer Farbkodierungsskala (Heatmap) für die Beurteilung der Signalintensitäten der erhaltenen Antigen/Antikörper-Reaktionen.....	117
Abbildung 39: Entwicklung und Evaluierung eines IgM-ELISA .....	119
Abbildung 40: Entwicklung und Evaluierung eines IgG-ELISA.....	121
Abbildung 41: Identifizierung immunogener Regionen im CihC-Protein durch in-silico-Analyse .....	122
Abbildung 42: Reinheitskontrolle isolierter Proteine mittels SDS-PAGE.....	123
Abbildung 43: Immunreaktivitätskontrolle der generierten CihC-Fragmente .....	124
Abbildung 44: Optimierung und Evaluierung des IgG-Lineblot-Immunoassay bei Verwendung von CihC-N und GlpQ .....	126

---

Abbildung 45: Beurteilung der Signalintensitäten der Antigen/Antikörper-Reaktion ausgewählter IgG-Line blot-Immunoassays zur Erstellung einer Farbkodierungsskala (Heatmap) mit CihC-N und GlpQ .....	127
Abbildung 46: Optimierung und Evaluierung des IgM-ELISA unter Verwendung von CihC-N und GlpQ .....	128
Abbildung 47: Optimierung und Evaluierung des IgG-ELISA durch Verwendung von CihC-N und GlpQ .....	129
Abbildung 48: Zusammenfassende Darstellung der komplementinhibitorischen Eigenschaften der Chi-Proteine .....	138

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Auflistung der verwendeten Borrelienisolate. ....	28
Tab. 2:	Auflistung der verwendeten E. coli-Isolate zur Transformation. ....	29
Tab. 3:	Auflistung der verwendeten Starteroligonukleotide. ....	29
Tab. 4:	Auflistung der verwendeten Starteroligonukleotide zur Generierung der Borrelientransformanten. ....	31
Tab. 5:	Auflistung der verwendeten Starteroligonukleotide für die RT-qPCR. ....	32
Tab. 6:	Verwendete primäre Antikörper. ....	33
Tab. 7:	Verwendete sekundäre Antikörper. ....	34
Tab. 8:	Verwendete Restriktionsendonukleasen. ....	34
Tab. 9:	Verwendete gereinigte Proteine. ....	34
Tab. 10:	Verwendete Humanseren. ....	35
Tab. 11:	Verwendete Reagenzienpackungen. ....	37
Tab. 12:	Verwendete Größenstandards. ....	38
Tab. 13:	Verwendete Chemikalien. ....	38
Tab. 14:	Verwendete spezielle Substanzen, Puffer und Materialien. ....	41
Tab. 15:	Verwendete Geräte. ....	42
Tab. 16:	Verwendete Software. ....	44
Tab. 17:	Verwendete Puffer. ....	45
Tab. 18:	Verwendete Kulturmedien. ....	46
Tab. 19:	Verwendete Antibiotika. ....	48
Tab. 20:	Standard-Pipettierschema der Taq DNA-Polymerase. ....	49
Tab. 21:	Reaktionsschema der Taq DNA-Polymerase. ....	49
Tab. 22:	Standard-Pipettierschema der HiFi DNA-Polymerase. ....	49
Tab. 23:	Standard-Pipettierschema der VeriFi DNA-Polymerase. ....	50
Tab. 24:	Reaktionsschema für die HiFi und VeriFi DNA-Polymerase. ....	50
Tab. 25:	Standard-Pipettierschema für die LunaScript RT-PCR. ....	54
Tab. 26:	Reaktionsschema der LunaScript RT. ....	54
Tab. 27:	Standard-Pipettierschema für die Luna Universal qPCR. ....	54
Tab. 28:	Reaktionsschema der Luna-Universal-qPCR. ....	54
Tab. 29:	Zusammensetzung des Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gels. ....	57
Tab. 30:	Zusammensetzung des SDS-Polyacrylamid-Gels nach Laemmli et al. (211). ....	59
Tab. 31:	Identitätsmatrix der Sequenzen verschiedener ORF-Proteine (zur Verfügung gestellt von Dr. Tilman G. Schultze). ....	81

Tab. 32:	Zusammenfassung der für die Lineblot-Immunoassays und ELISA ermittelten Daten. ....	130
Tab. 33:	Zusammenfassung der für die Lineblot-Immunoassays und ELISA getesteten Patientenseren. ....	131

# Abkürzungsverzeichnis

ACA	Acrodermatitis chronica atrophicans	hiNHS	Hitzeinaktiviertes normales Humanserum
AP	Alternativer Komplementweg	His <sub>6</sub>	Hexahistidin
APS	Ammoniumpersulfat	HRP	„Horseradish peroxidase“ (Meerrettichperoxidase)
Aqua dest.	Destilliertes Wasser		
ATP	Adenosintriphosphat	IFT	Immunfluoreszenztest
AUC	„Area under the curve“	Ig	Immunglobulin
		IgG	Immunglobulin G
BCA	Bicinchoninsäure	IgM	Immunglobulin M
BMD	„ <i>Borrelia miyamotoi</i> disease“	IP TG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
(k)bp	(Kilo)Basenpaare		
BS	Blutspendeseren	kDa	Kilodalton
BSA	Bovines Serumalbumin	KI	Konfidenzintervall
BSK-Medium	Barbour-Stoenner-Kelly-Medium	KK	Konjugatkontrolle
		LA	Lyme-Arthritis
C1 – C9	Komplementkomponente C1 bis C9	LB	Lyme-Borreliose
C1-INH	C1-Esterase Inhibitor	LB	„lysogeny broth“
C4BP	„C4b-binding protein“	LBRF	„Louse-borne relapsing fever“
cDNA	„complementary DNA“	Leis	Leishmaniose
CFHR1	„Complement factor H-related	Lept	Leptospirose
Chi	„Complement-targeting and host-interacting protein“	LOD	„Limit of Detection“ (Nachweisgrenze)
CoA	Coenzym A	lp	„linear plasmid“
CP	Klassischer Komplementweg	LP	Lektin-Weg
CRASP	„Complement regulator-acquiring surface protein“	LPS	Lipopolysaccharid
		LRF	Läuserückfallfieber
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol	MAK (TCC)	Membranangriffskomplex
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan	MASP	MBL-assozierte Serinprotease
DNA	Desoxyribonukleinsäure	MASPs	MBL-assozierte Serinproteasen
ELISA	„Enzyme-linked immunosorbent assay“	MBL	Mannose-bindendes Lektin
		NB	Neuroborreliose
FH	Faktor H	NHS	Normales Humanserum
FHL	„Factor H-like protein“	Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
FlaB	Flagellin B protein		
FP	„forward primer“	ORF	„Open reading frame“
$\times g$	Konstante der relativen Erdbeschleunigung ( $g = 9,80655 \text{ m/s}^2$ )	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
GlpQ	Glycerophosphodiester phosphodiesterase	PBS <sup>++</sup>	Phosphat-gepufferte Saline mit $\text{Ca}^{2+}$ und $\text{Mg}^{2+}$
GVB <sup>++</sup>	Gelatine-Veronal Puffer mit $\text{Ca}^{2+}$ und $\text{Mg}^{2+}$	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
		PLK	Probenladekontrolle
HEPES	N-2-Hydroxyethyl- Piperazin-Ethansulfonsäure	PRM	„pattern recognition molecule“
		RF	Rückfallfieber
		RF	Rheumatoide Arthritis

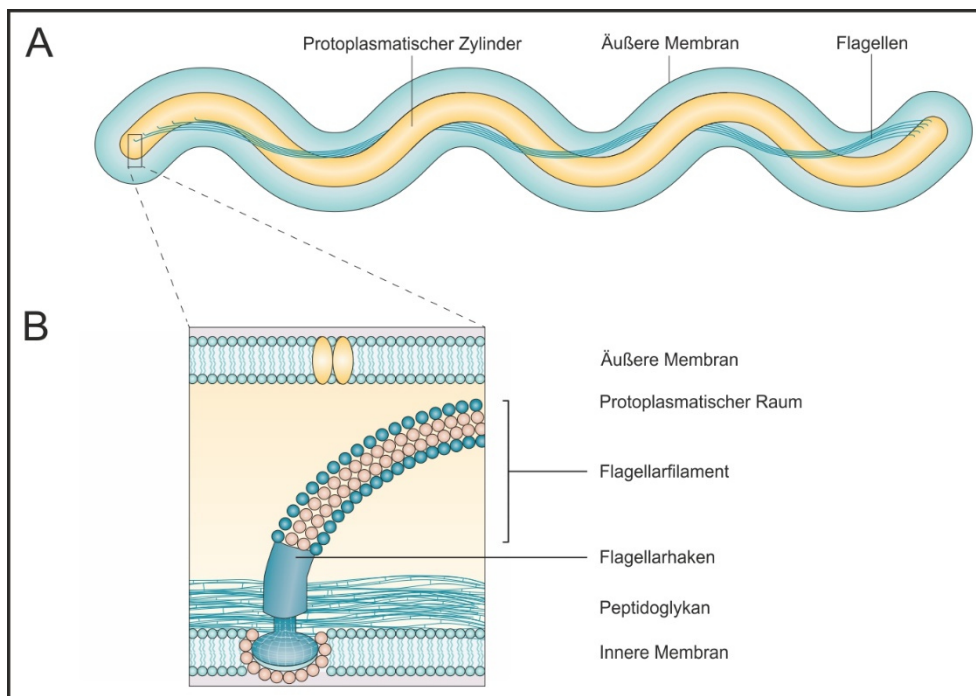
---

RFU	„Relative fluorescence unit“ (Signalstärke)	TH	„Threshold“
ROC	„Receiver operating characteristic“	TMB	3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidin
RP	„reverse primer“	TT	Tris/Tricin
RT	Reverse Transkriptase	Tween 20	Polysorbat 20
RT-qPCR	Quantitative PCR mit reverser Transkription	Upm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat	VLB	Verdacht auf Lyme-Borreliose
Se	Sensitivität	Vlp	„variable large protein“
Sp	Spezifität	Vmp	„variable membrane Protein“
Syph	Syphilis	Vn	Vitronektin
TAE	Tris-Acetat-EDTA	Vsp	„variable small protein“
TB	Tuberkulose	v/v	Volumen pro Volumen
TBRF	„Tick-borne relapsing fever“	w/v	Gewicht pro Volumen
TEMED	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	ZRF	Zeckenrückfallfieber

# 1 Einleitung

## 1.1 Morphologie von *Borrelia*

Borrelien gehören zusammen mit den Treponemen zur Ordnung der Spirochetales und sind durch ihre typische spiralförmig gewundene Morphologie gekennzeichnet. Die Ordnung der Spirochetales ist wiederum aufgeteilt in die Familie der *Spirochaetaceae* und in die Familie der *Borreliaceae*. In letzteren sind schließlich die Erreger der Lyme-Borreliose (LB) und des Rückfallfiebers (RF) untergegliedert. Der morphologische Aufbau der Gram-negativen Borrelien lässt sich wie folgt beschreiben: der protoplasmatische Zylinder besteht aus dem Zytoplasma, einer zytoplasmatischen Membran und einer Peptidoglykanschicht, die von der äußeren Membran umschlossen ist (Abbildung 1) (1). Borrelien, eingeschlossen *Borrelia (B.) recurrentis*, besitzen einen Durchmesser von 0,2 – 0,3  $\mu\text{m}$  und eine Länge von 12 – 22  $\mu\text{m}$ , mit einer Amplitude von 0,8  $\mu\text{m}$  (2). Die im Periplasma lokalisierten Flagellen, von denen *B. recurrentis* je nach Literaturangabe 8-10 (2), 15-20 (3) oder sogar 25-30 (4) besitzt, verleihen den Bakterienzellen ihre charakteristische Fortbewegung in Flüssignährmedium.



**Abbildung 1: Morphologie einer Spirochäte mit graphischer Darstellung der verankerten Flagelle.** (A) Querschnitt einer Spirochäte mit den für diese Bakterien typischen Flagellen (in türkis dargestellt), welche der Zelle die kornenzieherartige Morphologie und Bewegung verleiht. (B) Vergrößerter Ausschnitt der verankerten Flagelle in der inneren Membran sowie der typische Aufbau der Membran mit der äußeren und inneren Membran mit dem periplasmatischen Raum und dem aufliegendem Peptidoglykan. Entnommen aus Fraser, G.M., 2016 (5); modifiziert.



Die Flagellen befinden sich vollständig innerhalb des periplasmatischen Raumes zwischen der inneren und äußeren Zellmembran, welcher einen Durchmesser von 20 – 40 nm besitzt. Die charakteristische spiralförmige Zellmorphologie resultiert aus der Interaktion der Geißeln mit dem elastischen Zellkörper der Spirochäten. In einer flüssigen Umgebung, z.B. im Blutstrom bewirkt schließlich die Rotation der Flagellen eine wellenförmige Bewegung der Zellen. Dies erzeugt wiederum den Schub, der die Zelle vorwärts treibt (5). Ein weiteres Merkmal von Borrelien ist die Zusammensetzung der Membran, welche sich deutlich von anderen Gram-negativen Bakterien unterscheidet. Diese besteht aus 45 – 62 % Protein, 12 – 50 % Lipide und 3 – 4 % Kohlenhydrate (6). Drei Besonderheiten stechen hierbei hervor: Erstens, das Fehlen von Phosphatidylethanolamin und Lipopolysaccharid (LPS) (7) und stattdessen die Präsenz von Glykolipiden (8–10). Zweitens weist die äußere Membran der Borrelien eine relativ geringe Anzahl an transmembran-überspannenden Proteinen auf (11–13). Und drittens enthält die äußere Membran eine ungewöhnlich große Anzahl von Lipoproteinen (14), von denen viele auf der bakteriellen Oberfläche lokalisiert sind. Dort an der Schnittstelle zwischen Wirt und Erreger wirken sie als Adhäsine, Ziele für Antikörper oder Rezeptoren für verschiedene Moleküle. Allerdings im Gegenzug spielen die oberflächenexponierten Lipoproteine eine ebenso wichtige Rolle bei der Abwehr der angeborenen Immunabwehr und der Pathogenität der Spirochäten (15).

Ein weiteres charakteristisches Merkmal der Borrelien ist ihr obligater Parasitismus, bei dem sie in ihrem Lebenszyklus zwischen Arthropoden und Säugetierwirten wechseln. Dementsprechend weisen sie einige Besonderheiten auf, wie zum Beispiel, dass sie im Gegensatz zu anderen Bakterien keine Eisen-abhängigen Enzyme besitzen. Glukose als Energielieferant hingegen wird benötigt und über den glykolytischen Embden-Meyerhof-Stoffwechselweg metabolisiert. Außerdem, da den Borrelien der Citratzyklus fehlt, stellt die Glykolyse hierbei die einzige Quelle der Borrelien für ATP dar. Darüber hinaus besitzen die Borrelien keinen Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex für die Synthese von Acetyl-CoA aus Pyruvat. Stattdessen verwenden sie Acetat, um das wichtige Acetyl-CoA über den AckA-Pta-Weg zu produzieren (16). Hierbei wandelt das AckA das Acetat in Acetylphosphat um, das wiederum von Pta in Acetyl-CoA umgewandelt wird. Das Acetyl-CoA kann schließlich für die Biosynthese von Peptidoglykan oder die Prenylierung von Borrelienproteinen genutzt werden (265). Als weitere Besonderheit haben RF-Borrelien ein zusätzliches Gen, das den Lyme-Borrelien fehlt. Das *glpQ* kodiert für die Glycerophosphodiester-Phosphodiesterase, die die Hydrolyse von deacylierten Phospholipiden zu Glycerin-3-Phosphat ermöglicht. Dadurch

kommt es im Gegensatz zu den Lyme-Borrelien zu der hohen Zelldichte von RF-Borrelien im peripheren Blut von Patienten (16).

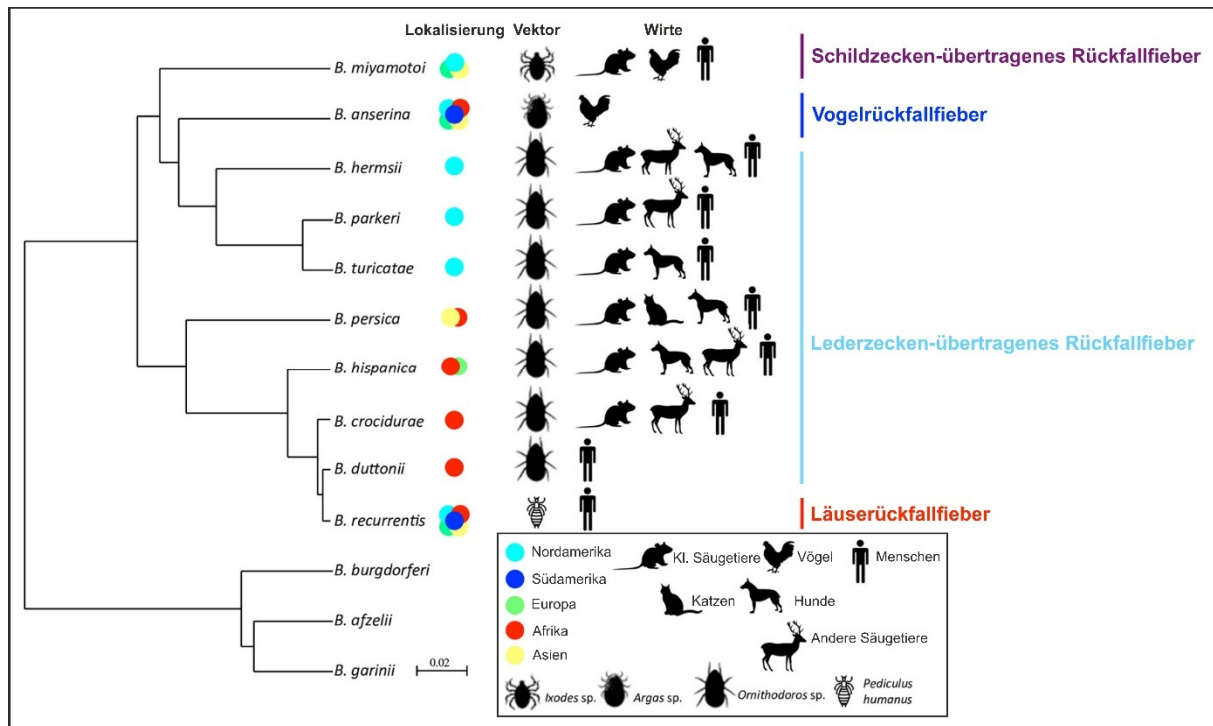
## **1.2 Charakteristika der Gattung *Borrelia***

Borrelien zählen zu der Ordnung der *Spirochaetales* und werden in die Gattung *Borrelia* unterteilt. Ihre Namensgebung erhielten die spiralförmigen Bakterien nach den französischen Mikrobiologen Amédée Borrel von Nicolaas Hendrik Swellengrebel, der die Spirochäten ursprünglich 1907 beschrieb (17). Neben ihrer charakteristischen spiralen Form sind Borrelien vor allem durch ihre mikroaerophile Lebensweise charakterisiert. Die Borrelien werden derzeit in drei Gruppen unterteilt: die Lyme-Borrelien, die RF-Borrelien und die Reptil-assoziierten Borrelien (18). Lyme- und RF-Borrelien werden aufgrund ihrer klinisch hervorgerufenen Infektionskrankheiten sowie ihrer Vektor-adaptierten und biologischen Eigenschaften unterschieden. Phylogenetische Daten haben die Unterscheidung der Spezies bestätigen können. Genom-Analysen lassen außerdem vermuten, dass zwei unabhängige monophyletische Gruppen der Borrelien mit einem gemeinsamen Ursprung existieren (18). Beiden Gruppen gemeinsam ist die obligat parasitische Lebensweise und der charakteristische Wirt- und Vektor-adaptierte Lebenszyklus, der den transstadialen Übertragungsweg (mit Ausnahme des Übertragungsweges von *Borrelia recurrentis*) bedingt (19).

Borrelien verfügen über eine einzigartige Genomstruktur die aus einem einzigen hoch konservierten linearen Chromosom und zahlreichen extrachromosomalen linearen und zirkulären Plasmiden besteht, dessen Anzahl zwischen den Stämmen sehr variabel sein können (20–23). Die Genomgröße von RF-Borrelien umfasst 1-1,5 MBp und ist damit bedeutend kleiner als bei anderen pathogenen Bakterien. Dabei korreliert die geringe Genomgröße mit der degenerierten und sehr spezifischen Lebensweise gut angepasster pathogener Mikroorganismen, die nur eine begrenzte Nische im Vektor und im Wirt besitzen, zu denen auch die RF-Borrelien gehören (24). Aus diesem Grund sind Borrelien ausschließlich auf die durch ihre Wirte und Vektoren bereitgestellten Nährstoffe angewiesen und besitzen ein geringes Repertoire an Virulenz-assoziierten Genen (25, 26).

RF-Borrelien und das von diesen ausgelöste Rückfallfieber lassen sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Vektoren in vier Untergruppen einteilen: das von Lederzecken übertragene Rückfallfieber (Soft-Tick-Borne Relapsing Fever), das von Schildzecken übertragene Rückfallfieber (Hard-Tick-Borne Relapsing Fever oder *Borrelia myiamotoi* Disease (BMD)),

das von Läusen übertragene Rückfallfieber (Louse-Borne Relapsing Fever), und das Vogelrückfallfieber (Avian Relapsing Fever) (Abbildung 2).



**Abbildung 2: Phylodendrogramm zur Differenzierung von Rückfallfieber-Borrelien.** Das Phylodendrogramm wurde durch den paarweisen Vergleich der durchschnittlichen Nukleotididentität (ANI) zwischen zwei Genomsequenzen jeder RF-Borrelienspezies erstellt (Adeolu und Gupta (2014) (26) und Elbir et al. (2014) (23)). Die horizontalen und vertikalen Linien stellen den genetischen Abstand dar, wobei der Maßstab 2 % der Differenz von ANI = 100 % angibt. Entnommen aus Talagrand-Reboul et al., 2018 (28), modifiziert.

Das Vogelrückfallfieber wird durch *B. anserina* hervorgerufen. Diese Borrelienspezies ist ausschließlich für Vögel pathogen (27). Obwohl Schildzecken auch die beiden Borrelienspezies *B. theileri* und *B. lonestari* übertragen, stellt *B. miyamotoi* bisher die einzige human pathogene Borrelienspezies dar (28, 29). Die von Lederzecken übertragenen RF-Borrelien werden in die „Alte Welt Borrelienspezies“ unterteilt, zu denen die Spezies *B. crocidurae*, *B. hispanica* und *B. duttonii* gehören und in die „Neue Welt Borrelienspezies“ mit *B. hermsii*, *B. parkeri* und *B. turicatae* als Vertreter. *B. recurrentis* stellt die einzige Borrelienspezies dar, die von Läusen übertragen wird (Abbildung 2) (30). Es wird angenommen, dass Borrelien zunächst ausschließlich Zecken als Vektoren nutzten und folgend dazu übergingen Lederzecken und zu einem späteren Zeitpunkt auch Läuse zu infizieren (31). Die aus genomischen Daten erstellten phylogenetische Stammbäume deuten darauf hin, dass sich *B. recurrentis*, der alleinige Erreger des Läuserückfallfiebers, entweder aus der Lederzecken übertragenen RF-Borrelienspezies

*B. duttonii* entwickelt hat, oder beide Borrelienspezies mindestens auf einen gemeinsamen Vorfahren zurückzuführen sind (32, 33). Trotz unterschiedlicher Vektoren sind *B. duttonii* und *B. recurrentis* genetisch und genomisch sehr nahe verwandt (32, 34). Allerdings zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen *B. duttonii* und *B. recurrentis* in den durch diese beiden RF-Borrelienspezies verursachten Krankheitsbilder. Das durch *B. duttonii* verursachte Zeckenrückfallfieber (ZRF) tritt vorzugsweise endemisch auf, während das durch *B. recurrentis* hervorgerufene Läuserückfallfieber (LRF) typischerweise durch einen epidemischen Verlauf charakterisiert ist, der zu großen Ausbrüchen und Epidemien führen kann. Im Vergleich zum LRF verläuft eine Infektion mit den durch Zecken-übertragenen RF-Borrelien insgesamt milder mit ein bis zwei Fieberepisoden, die bis zu sieben Tage andauern können. Eine Besonderheit sind allerdings neurologische Komplikationen die im Gegensatz zum LRF beim ZRF in 10 – 40 % der Fälle vorkommen (30).

### 1.3 Der Erreger des Läuserückfallfiebers – *Borrelia recurrentis*

#### 1.3.1 Historie des Läuserückfallfiebers

Die Erstbeschreibung eines Patienten mit rezidivierendem Fieber stammt bereits von Hippocrates, der 430 vor Christus auf der Insel Thasos in der nördlichen Ägäis lebte. Er beschrieb die Erkrankung folgendermaßen: „Die überwiegende Mehrheit (der Erkrankten) hatte den Höhepunkt des Fiebers am sechsten Tag, mit einer Pause von sechs Tagen, gefolgt von einem weiteren Höhepunkt am fünften Tag nach dem Wiederauftreten des Fiebers (35). Da Ikterus ein häufiges Symptom des LRF darstellt wird retrospektiv davon ausgegangen, dass frühere Epidemien, bei denen ein Großteil der Erkrankten einen Ikterus entwickelten, durch *B. recurrentis* verursacht wurden. Dazu gehören zum Beispiel die "Gelbe Pest", die 550 n. Chr. im Rahmen der Justinianischen Pest über Europa hinwegfegte und die Hungersnöte in Irland im 17. und 18. Jahrhundert (36). Bestätigt wurde diese Annahme von John Ruddy, der 1770 in Dublin ein sechs- oder siebentägiges Fieber beschrieb, das in einem kritischen Schweißausbruch endete und bei dem die Patienten bis zu drei oder vier Rückfälle erlitten, sich aber dennoch häufig wieder erholen konnten (37). Kürzliche historische Hinweise für LRF in Europa im 15. Jahrhundert lieferten Ausgrabungen eines Friedhofs in der Nähe der St. Nicolay-Kirche in Oslo. In einem Skelett einer jungen Frau aus der Zeit von etwa 1430 bis 1465 n. Chr. konnten DNA-Spuren von *B. recurrentis* nachgewiesen werden (38). Zusätzlich, mit Hilfe der Paläoserologie, ließ sich das LRF bei sieben Skeletten aus einem Soldatengrab des

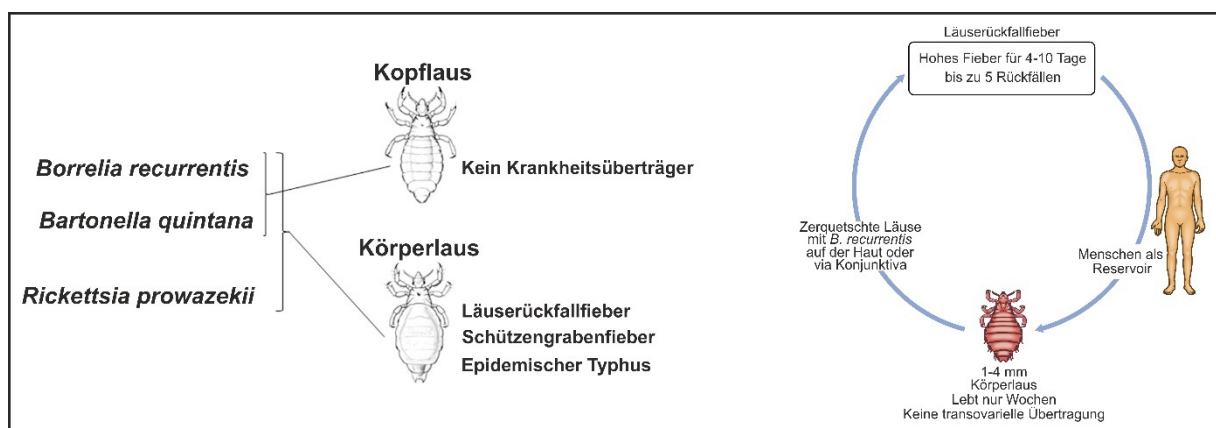
16. Jahrhunderts in Frankreich eruieren (39). Es wird ferner angenommen, dass sich aufgrund eines epidemischen Ausbruchs 1812 ein Drittel der Grande Armée Napoleons infizierte (40). Erst 1843 bezeichnete David Craigie das Rückfallfieber (RF) als eigenständige Entität. Aufgrund seiner Studien während eines Ausbruchs in Edinburgh konnte er das LRF schließlich von Typhus unterscheiden. William Henderson beschrieb wenig später die Unterschiede zwischen beiden Infektionskrankheiten detaillierter (41, 42). Die Ätiologie des RF blieb jedoch weiterhin unklar, bis Otto Obermeier 1866 an der Berliner Charité als Erster Spirochäten im Blut von Patienten mit hohem Fieber entdeckte, die als *Spirochaeta obermeieri* (43, 44) bezeichnet wurden, heute jedoch taxonomisch als *B. recurrentis* klassifiziert sind (45). Die Entdeckung von Obermeier wurde anschließend von Münch und Motschutkoffsky bestätigt, denn sie konnten 1874 bzw. 1876 sowohl in einem Selbstversuch als auch bei gesunden Personen RF hervorrufen, indem sie sich selbst beziehungsweise den Probanden Blut von klinisch erkrankten Patienten injizierten (46). Damit ließ sich der kausale Zusammenhang der Krankheitsentstehung durch die im Blut übertragenen Spirochäten eindeutig erbringen. Schließlich konnte 1907 durch Percival Mackie auch der Übertragungsweg von *B. recurrentis* durch die Körperlaus *Pediculus humanus humanus* aufgeklärt werden (47). Die größten und dramatischsten Epidemien traten allerdings in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts während des ersten Weltkriegs mit schätzungsweise 50 Millionen LRF-Fällen und einer Sterblichkeit von 10 % in Nordafrika, im Nahen Osten und Russland auf, sowie während des zweiten Weltkriegs zwischen 1943-1946 mit ungefähr 10 Millionen LRF-Fällen (48). Alle diese Beispiele lassen erkennen, dass das LRF eines der weltweit bedrohlichsten Infektionskrankheiten darstellte, weswegen Bryceson sie sogar als die „epidemischste aller epidemischen Krankheiten“ bezeichnete (49).

### 1.3.2 Epidemiologie des von *B. recurrentis* verursachten LRF

Im Gegensatz zu den anderen Borrelienspezies wird *B. recurrentis* ausschließlich von einem einzigen Vektor, der Körperlaus *Pediculus humanus humanus* bzw. *corporis* übertragen, wobei der Mensch der einzige Wirt darstellt. Es gilt zu beachten, dass die Taxonomie innerhalb der Gattung *Pediculus* seit Jahrzehnten umstritten und bisher ungeklärt ist. Zwischen Körper- und Kopfläuse existieren keine morphologischen Unterscheidungsmerkmale (50–52). Die Speziesidentifizierung erfolgt daher in Bezug auf der Lokalisation der Läuse auf der menschlichen Körperoberfläche (53). So konnte *B. recurrentis* auch in Kopfläusen nachgewiesen werden (54) und das auch außerhalb des derzeit anerkannten geografischen

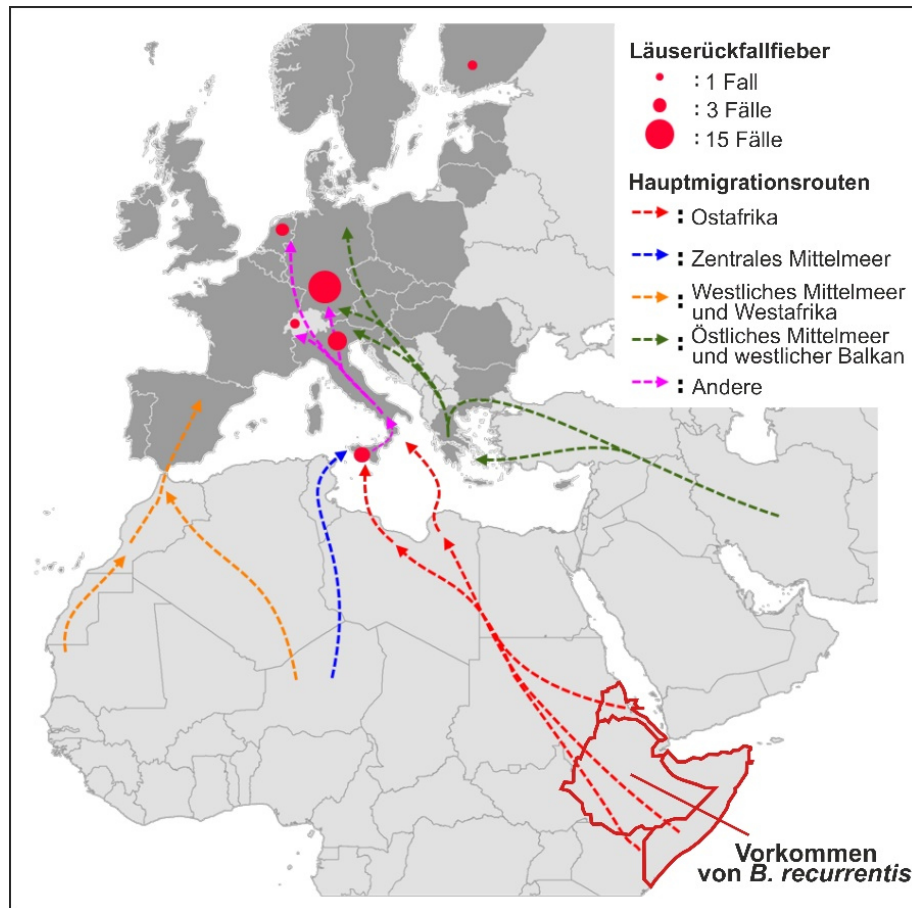
Verbreitungsgebiets des LRF (55), wobei eine Übertragung von *B. recurrentis* durch Kopfläuse bisher nicht bestätigt werden konnte.

Ein Mensch kann von Tausenden von Läusen befallen sein, von denen jede bis zu fünf Blutmahlzeiten während ihrer kurzen Lebenszeit von ca. 21 Tagen zu sich nimmt (56). Zum Beispiel konnten in der Kleidung eines Menschen mehr als 21.500 Läuse entdeckt werden (57). Für die Übertragung von Körperläusen ist ein enger körperlicher Kontakt essentiell, daher sind Menschen mit mangelnder Hygiene, die in überfüllten Räumlichkeiten leben, wie z. B. in Obdachlosenunterkünften, Flüchtlingslagern sowie Gefängnissen, prädestiniert für Übertragungen (58). Läuse stellen obligate hämatophage Ektoparasiten dar und nehmen die Borrelien während der Blutmahlzeit vom infizierten Menschen auf (Abbildung 3) (48). Nach dem Eindringen in den Mitteldarm wandern die Spirochäten in die Hämolymphe, wo diese während der etwa 3-wöchigen Lebensdauer der Laus verbleiben können, aber nicht in die Speicheldrüsen. Der Mensch infiziert sich mit *B. recurrentis*, wenn infizierte Läuse mit den Fingern zerdrückt werden und die Hämolymphe oder auch der Kot der Läuse durch entstandene Mikroläsionen (Kratzen) in direktem Kontakt zu Blut-führenden Gefäßen gelangen. Sehr selten stellen Bluttransfusionen, Nadelstichverletzungen oder Schmierinfektionen mit Erregerhaltigem Blut eine mögliche Ursachen für nosokomiale Infektionen dar (49, 59). Derzeit ist kein weiterer Reservoirwirt bekannt, sodass angenommen wird, dass die Persistenz der Infektionskrankheit zwischen den Epidemien nur durch milde oder asymptomatische menschliche Infektionen erfolgen kann (60).



**Abbildung 3: Darstellung der in den Kopf- und Körperlaus übertragbaren Erregern und Lebenszyklus der Körperlaus.** Links dargestellt sind die in den Läusen persistierenden Erreger und die übertragbaren Infektionskrankheiten. Der Lebenszyklus der Körperlaus ist rechts dargestellt. Entnommen aus Boutellis et al., 2014 (51) und Barbour, A., 2011 (59), modifiziert.

Die verbesserten hygienischen Lebensstandards sowie der globale Einsatz des Insektizids Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT) ab den 1940er Jahren führten zu einem massiven Verschwinden des Vektors, sodass das LRF nur noch sporadisch in den ostafrikanischen Ländern Eritrea, Äthiopien und Südsudan (Horn von Afrika) vorkommt (61, 62). Außerdem ist die Gewinnung fundierter epidemiologischer Informationen eine Herausforderung, zum Teil aufgrund des Dogmas, dass alle fieberhaften Episoden auf Malaria zurückzuführen sind. Tatsächlich zeigt eine Studie aus Togo, dass viele Fälle von RF durch eine falsche Malariadiagnose als "behandlungsresistente Malaria" dargestellt werden (63, 64). Zusätzlich sind LRF-Koinfektionen mit Malaria, wie aus Äthiopien und Tansania gemeldet, ein weiteres Problem und können potentielle RF-Infektionen verschleiern (65). Nichtsdestotrotz beschränkten sich die Berichte über alle aufkommenden Fälle in den letzten Jahrzehnten ausschließlich auf Länder am Horn von Afrika (Abbildung 4) (59, 61). Äthiopien scheint das einzige Land zu sein, indem LRF mit vermutlich 10.000 Fällen pro Jahr endemisch ist und wird dort als siebthäufigster Grund für Krankenhauseinweisung und als fünfhäufigste Todesursache genannt (66). Einzelne Ausbrüche wurden auch in den benachbarten Ländern Eritrea, Sudan und Somalia berichtet (59, 61, 66), wobei die letzten dokumentierten Ausbrüche 1991 in Asella nach dem Äthiopischen Bürgerkrieg (191 Fälle), 1999 in Rumbek im Südsudan (20.000 Fälle) oder 2016 in der Arsi-Zone in Zentraläthiopien (63 Fälle) stattfanden (60, 66–68). Das LRF erlangte im Zuge der Flüchtlingskrise zwischen 2014 und 2016, in der insgesamt 78 Fälle in Europa diagnostiziert werden konnten, eine Renaissance als „New-emerging Disease“. Scheinbar infizierten sich die Flüchtlinge auf ihrer Flucht aus ihren Heimatländern Somalia, Eritrea und Äthiopien in Notunterkünften in Nordafrika (Abbildung 4) (69, 70).



**Abbildung 4: Verbreitungsgebiet von *B. recurrentis* in Zusammenhang mit den Hauptmigrationsrouten und dem Wiederauftauchen von Rückfallfieber in Europa.** Die Länder Äthiopien, Sudan und Eritrea, in denen *B. recurrentis* endemisch ist und frequentiert kleinere bis größere Epidemien auftreten sind rot umrandet. Die Hauptmigrationsrouten während der Flüchtlingskrise 2014 – 2016 sind in rot, blau, orange, grün und pink dargestellt. Die Fälle in Europa aus dem Jahr 2015 sind durch rote Punkte markiert. Entnommen aus ECDC Rapid Risk Assessment, 2015 (70), modifiziert.

### 1.3.3 Klinik, Diagnose und Behandlung des LRF

Die Inkubationszeit des LRF beträgt zwischen 4 und 18 (durchschnittlich 7) Tagen. Die Erkrankung beginnt abrupt mit einer Fiebersymptomatik, welches innerhalb weniger Tage auf über 40 °C ansteigen kann und von Gliederschmerzen begleitet wird. Zu den ersten Symptomen gehören Kopfschmerzen, Schwindel, generelle Schmerzen (vor allem im unteren Rückenbereich, in den Knien und Ellenbogen), Appetitlosigkeit, Übelkeit, Erbrechen und Durchfall. Später treten auch Oberbauchschmerzen, Husten und Epistaxis auf (60). Abgeschlagenheit und Verwirrung sind die Regel. Leberbeschwerden und eine Hepatomegalie sind häufigste Anzeichen bei etwa 50 % bzw. 60 % der Patienten. Zudem entwickeln 7 % bis >70 % der Patienten einen Ikterus. Die Milz ist seltener druckempfindlich und vergrößert (49). Ein petechialer oder ekchymotischer Ausschlag, insbesondere am Rumpf, tritt bei 2 % bis 80 % der Patienten auf (49, 60). Subkonjunktivale Blutungen und Epistaxis werden ebenfalls häufig



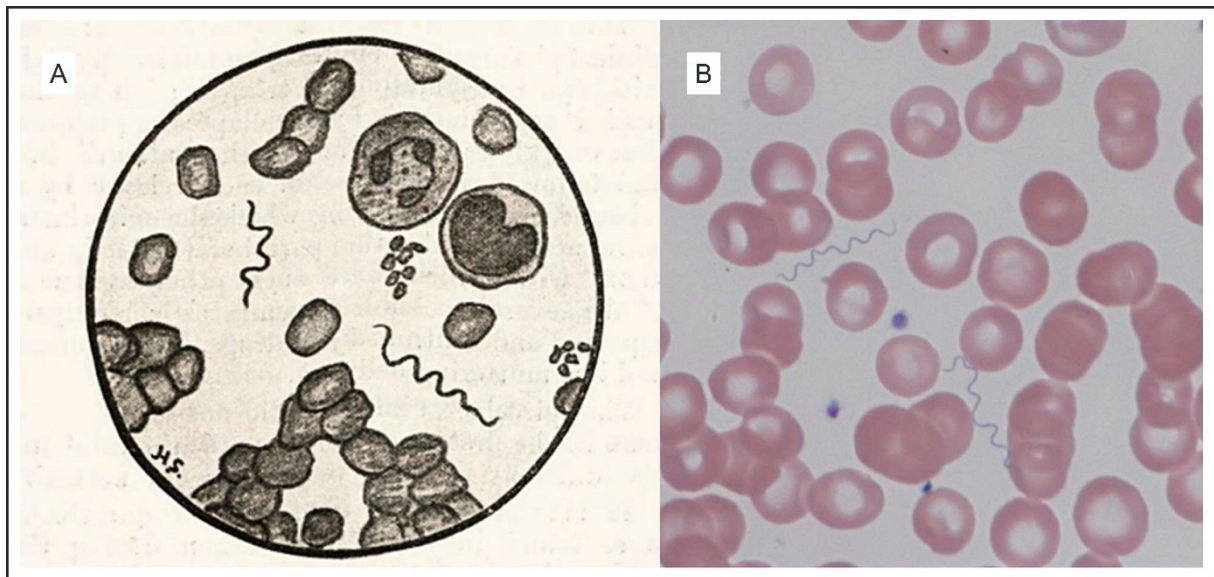
diagnostiziert (25 %), Hämoptysen, gastrointestinale Blutungen und Netzhautblutungen sind allerdings weniger häufig (60). In schweren Fällen kann es zudem zu einer neurologischen Beteiligung, Myokarditis, akutem Atemnotsyndrom, Leberversagen, Milzruptur, disseminierter intravaskulärer Gerinnung und damit zu intrakraniellen, massiven gastrointestinalen, pulmonalen oder peripartalen Blutungen kommen (Abbildung 5) (60). Generell kommen neurologische Symptome allerdings seltener vor als beim ZRF. Eine kongenitale Infektion mit *B. recurrentis* führt bei schwangeren Frauen häufig zu Schwangerschaftsabbrüchen und Fehlgeburten (49). In ihrem Übersichtsartikel stellten Kahlig et al. fest, dass eine Infektion mit *B. recurrentis* mit einer Wahrscheinlichkeit von bis zu 75 % zu negativen Folgen für die Schwangerschaft führen kann. (71). Verschiedene Studien errechneten eine Sterblichkeitsrate von 30 % bis 80 % bei unbehandelten Patienten (49, 72–79), die durch eine adäquate Antibiotikabehandlung auf 2 % bis 5 % gesenkt werden konnte (59). Unbehandelte Fieberanfälle klingen nach 4 bis 10 (durchschnittlich 5) Tagen nach einer Krise ab. Darauf folgt eine afebrile Remission von 5 bis 9 Tagen, gefolgt von bis zu 5 Rückfällen mit abnehmendem Schweregrad, während der es wieder zu Epistaxis, aber nicht zu petechialen Einblutungen kommen kann (60).



**Abbildung 5: Symptome von mit LRF infizierten Patienten aus Äthiopien.** Dargestellt ist (A) eine starke petechiale Einblutung am Rumpf mit einer komplizierenden Infektion mit *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. typhi*). (B) Subkonjunktivale Blutungen mit Anzeichen eines Ikterus, die auf hepatozelluläre Schäden, Thrombozytopenie und Koagulopathie hinweisen. (C) Nachweis von Spirochäten in der Milz (Silberfärbung). (D) Zerebrale Blutung am 6. Krankheitstag. Entnommen aus Warrel D.A. 2019 (60), modifiziert.

Für die Therapie eignen sich verschiedene Antibiotika wie z.B., Tetracyclin, Erythromycin, Chloramphenicol sowie Penicillin als Einzeldosisbehandlung, die sowohl oral oder parenteral appliziert werden können. Allerdings tritt in 80 – 90 % der behandelten Fälle eine Jarisch-Herxheimer-Reaktion auf (59). Diese Komplikation tritt etwa 45 Minuten bis 2 Stunden nach der Verabreichung eines Antibiotikums auf und kennzeichnet sich durch eine Unruhe aus, gefolgt von einer akuten und intensiven Schüttelfrostphase, die 10 bis 30 Minuten andauert. Während dieser Phase steigen Körpertemperatur, Puls und Atemfrequenz steil an, sodass es zu einer Delirium-artigen Symptomatik sowie zu einer potenziell tödlichen Hyperpyrexie kommen kann. Die auf die „Chill“-Phase folgende „Flush“-Phase ist durch eine systemische Vasodilatation mit Blutdruckabfall gekennzeichnet (was zu Hypotonie mit möglichem Kollapsereignis führen kann). Dies wird von starkem Schwitzen und einer langsam sinkenden Körpertemperatur begleitet (49, 80). In den meisten Fällen klingen die Symptome nach wenigen Stunden ab und auch wenn die Jarisch-Herxheimer-Reaktion nur selten tödlich verläuft, erhöht sich dennoch das Risiko für Komplikationen und einen tödlichen Ausgang (Beeinträchtigung der Leber- und Nierenfunktion, akutes Atemnotsyndrom, Herzmuskelschäden, hypotoner Schock, Krampfanfälle, Schlaganfälle sowie Auslösung von Uteruskontraktionen in der Schwangerschaft) (59, 81). Die beginnende Symptomatik des LRF kann sehr leicht mit anderen Fieber-begleitenden Infektionskrankheiten mit ähnlichen Symptomen verwechselt werden, wie das durch *Rickettsia prowazekii* verursachte epidemischen Fleckfieber, Typhus oder Leptospirose sowie Malaria oder auch das durch *Bartonella quintana* verursachte "Schützengrabenfieber". Aus diesem Grund ist eine verlässliche Diagnose des LRF essenziell. Bisher ist der diagnostische Goldstandard die klassische Mikroskopie von Blutaustriechen (dicker Tropfen). In dicken und dünnen Blutaustriechen (gefärbt mit Giemsa-, May-Grünwald-Giemsa-, Wright-, Wright-Giemsa-, Field's- oder Diff-Quick-Färbung) oder direkte Präparate mittels Dunkelfeldmikroskopie sind Spirochäten anhand ihrer typischen Morphologie eindeutig erkennbar (Abbildung 6). Allerdings kann *B. recurrentis* morphologisch nicht von anderen RF-Borrelienspezies mittels Mikroskopie differenziert werden (82, 83). Darüber hinaus besitzt die konventionelle Lichtmikroskopie noch eine entscheidende Limitation in Bezug auf ihre Sensitivität, denn es ist entscheidend, in welcher Phase der Erkrankung das Blut zur Diagnostik entnommen wird. Da während der Fieberphase die höchste Konzentration an Spirochäten im Blut vorliegt, erzielt die Mikroskopie eine Sensitivität von 70 % (84). In der afebrilen Phase zeigt sich allerdings je nach Studie eine Sensitivität von nur noch 5 - 38 % (85, 77). Generell wird für einen positiven Nachweis eine hohe Konzentration von Spirochäten von bis zu  $>10^4$  Bakterien/ml im Blut benötigt (86, 87). Weitere Faktoren, die für die Diagnostik eine

wesentliche Rolle spielen können, sind die mikroskopische Erfahrung des Laborpersonals (88) sowie die verwendeten Fixiermittel und Färbemethoden (89).



**Abbildung 6: Mikroskopischer Nachweis von *B. recurrentis* in Blutausstrichen.** Dargestellt ist eine Zeichnung von *B. recurrentis* in einem dünnen Blutausstrich aus dem Jahr 1909 von einem mit LRF infizierten Patienten aus Jaipur, Indien (A). Mikroskopie (May-Grünwald-Giemsa-Färbung) von *B. recurrentis* in einem dünnen Blutausstrich (1000-fache Vergrößerung) von einem infizierten Patienten von 2015 (B). Entnommen aus Kahlig et al., 2021 (69), modifiziert.

Erst die Einführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Sequenzierungstechniken ermöglichte eine eindeutige Diagnose und Speziesdifferenzierung, wie auch eine Steigerung der Sensitivität. Die Verfügbarkeit einer umfangreichen sowie molekularbiologischen Diagnostik ist jedoch nach wie vor auf wohlhabende Länder mit entsprechend ausgestatteten Laboratorien beschränkt (90, 91). Als alternative Methode für die Diagnostik des LRF wurde daher versucht, serologische Nachweismethoden zu etablieren. Aufgrund der Kreuzreaktion zwischen verschiedenen RF-Borrelienspezies, aber auch mit anderen Spirochäten (z. B., *Treponema pallidum*) zeigte sich jedoch eine zu geringe Spezifität serologischer Tests (92, 89, 84). Erste Testverfahren verwendeten Zellysate von *in vitro* kultivierter Borrelien und wiesen daher eine geringe Spezifität und Sensitivität auf sowie eine hohe Kreuzreaktivität. Weiterführende Studien identifizierten GlpQ als vielversprechendes Antigen für einen serologischen Test. Hierbei ist GlpQ in der Phospholipid-Biosynthese involviert, welches nur bei RF-Borrelien, nicht aber bei Lyme-Borrelien vorkommt (93, 94). Deswegen wurde GlpQ als spezifisches Antigen in serologischen Testverfahren eingesetzt, bei denen Seren von LRF-Patienten, bei welchen eine Infektion mit *B. recurrentis*, *B. turicatae*, *B. parkeri*, *B. coriaceae* oder *B. miyamotoii* nachgewiesen wurde, auf ihre Kreuzreaktivität untersucht (94,

95). Allerdings zeigten diese Tests ebenfalls eine geringe Spezifität und Sensitivität. Aus diesem Grund bleibt nach wie vor die Mikroskopie bis heute das einzige und am weitesten verbreitete Instrument für die Erstdiagnose von RF (60).

#### **1.3.4 Zukünftige Perspektiven und Verbreitung des LRF**

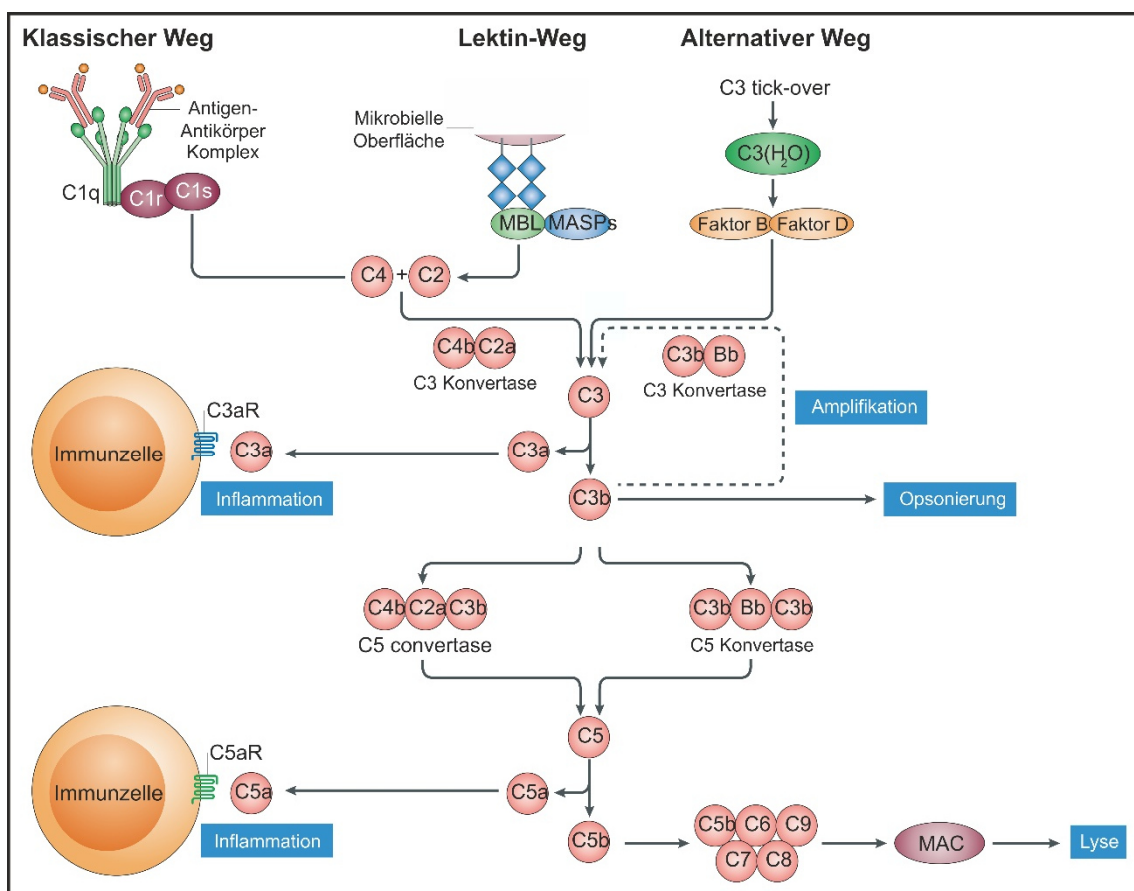
Auch wenn LRF in Europa und der westlichen Welt so gut wie verschwunden ist, bleibt die Gefahr eines erneuten Wiederauftretens jederzeit bestehen. Ein Beweis ist die Flüchtlingskrise von 2014 – 2016, in welcher in neun verschiedenen europäischen Ländern 78 Fälle von LRF nachgewiesen und dokumentiert werden konnten (69). Es wird davon ausgegangen, dass sich die meisten dieser Flüchtlinge auf dem Weg nach Europa infizierten; allerdings lässt sich nicht mit Sicherheit ausschließen, dass sich zumindest einige wenige in Flüchtlingsunterkünften auch in Europa infiziert haben könnten (96). Dieses Szenario könnte sich aufgrund neuer politischen Eskalationen, einer weltweit zunehmend fragileren Sicherheitspolitik sowie der Klimakrise wiederholt ereignen, insbesondere weil LRF eine typisch epidemische Infektionskrankheit darstellt, die mit Kriegen, Hungersnöten, Armut, Überfüllung und mangelnder persönlicher Hygiene einhergeht (57). Nicht nur Flüchtlinge, sondern auch Obdachlose gehören zur potenziell gefährdeten Gruppe. Jüngste Studien zur Prävalenz des Befalls mit Körperläusen unter dieser speziellen Bevölkerungsgruppe in Industrieländern ergaben einen Befall von 4 % in Boston, USA (97), bis zu 16 % in Tokio, Japan (98), und 30 % in San Francisco, USA (99). Weitere Studien in Frankreich zeigten eine Prävalenz von 12-22 % (100, 101) sowie zwischen 18-40 % bei Obdachlosen in Brasilien, Kolumbien und Russland (102–104). Tatsächlich wurden im Jahr 2005 in einer Studie unter Obdachlosen in Marseille IgG Antikörper gegen *B. recurrentis* gefunden, was auf einen früheren kleinen Ausbruch hinweisen könnte (102). Kopfläuse stehen außerdem in Verdacht potentielle Träger von *B. recurrentis* (55) sowie anderen pathogenen Bakterien zu sein, wie z.B. *Bartonella quintana*, *Yersinia pestis*, *Borrelia theileri*, *Coxiella burnetii*, und *Rickettsia aeschlimannii* (55, 105–108, 54, 109). Inwieweit weitere Arthropoden als kompetente Vektoren von *B. recurrentis* infrage kommen könnten, ist bisher nur unzureichend untersucht. In einer Studie mit Bettwanzen ließen sich bis zum 20. Tag nach experimenteller Infektion überlebensfähige Spirochäten im Mittel- und Hinterdarm nachweisen, aber nicht in den Speicheldrüsen. Damit könnte *B. recurrentis* wie auch bei der Körperlaus über den ausgeschiedenen Kot einer Bettlaus übertragen werden (110). Diese Studien lassen erkennen, dass LRF zwar heutzutage zu den vernachlässigten Infektionskrankheiten zählt, aber durchaus ein nicht zu unterschätzendes Potential besitzt, unter bestimmten Umständen sporadische Epidemien zu verursachen.

## 1.4 Das Komplementsystem

Bereits 1885 beschrieb Elia Metchnikoff, dass Phagozyten in der Lage sind eingedrungene Bakterien aufzunehmen und zu zerstören, was die Grundlage für die Erforschung der zellulären Immunität bildete (111). Buchner und Kollegen fanden schließlich 1891 einen hitzelablen Faktor im Blut, der Bakterien abtöten konnte und nannten ihn "Alexin" (griechisch für "abwehren") (112, 113). Jules Bordet untermauerte die "humorale Theorie" (Immunität durch antitoxische und bakterientötende Substanzen in Körperflüssigkeiten), indem er nachwies, dass die Abtötung von Bakterien zwei Faktoren voraussetzt: einen hitzelablen lytischen Faktor und einen hitzestabilen Faktor, den er als „Sensibilisator“ bezeichnete (von dem wir heute wissen, dass es sich um Antikörper handelte) (114). Paul Ehrlichs Theorie zur Antikörperbildung prägte schließlich den Namen „Komplement“ als zirkulierende Serumproteine, die die Antikörpergetriggerte Immunantwort „komplementiert“. Denn die Antikörper binden nicht nur an spezifische Antigene, sondern auch an eine hitzelabile antimikrobielle Komponente, dem so genannte "Komplement" (115).

Das humane Komplementsystem besteht aus mehr als 60 Komponenten und aktivierungsfähigen Vorläuferproteinen. Zu diesen gehören die neun zentralen Komponenten der Kaskade (C1 bis C9), generierte Aktivierungsprodukte mit unterschiedlichen biologischen Aktivitäten (z. B. C3a, C3b, C4a, C4b, C5a, C5b), Regulatoren und Inhibitoren (Faktor H, Faktor H-ähnliches Protein 1 (FHL-1), Faktor H-ähnliches Protein 1 bis 5 (CFHR1-5), CR1 (CD35), C4b-bindendes Protein (C4BP), C1q und Vitronectin, Proteasen (z. B. Faktor B, Faktor D, Faktor I) oder Rezeptoren für Effektormoleküle (z. B. C3aR, C5aR, C5L2 und Rezeptor für die Komplementkomponente C1q (C1qR) (116–118). Als Teil der angeborenen Immunität trägt das Komplementsystem wesentlich zur Erkennung, Markierung und Elimination von Krankheitserregern bei (119, 120) und leitet Entzündungsreaktionen ein (121). Außerdem spielt Komplement eine wichtige Rolle für die zelluläre Integrität, die Gewebemöostase und die Modifizierung der adaptiven Immunantwort (121, 122) sowie für die Beseitigung von körpereigenen apoptotischen oder nekrotischen Zellen (123, 124). Die Aktivierung der Komplementkaskaden auf der mikrobiellen Oberfläche erfolgt über drei verschiedene Wege (125). Die Bildung von Antikörper-Antigen-Komplexen initiiert hierbei die Aktivierung des klassischen Weges (CP), während der Mannose-bindende Lektin-Weg (LP) durch die Erkennung von Kohlenhydratkomplexen (Kollektine und Ficoline) auf mikrobiellen Oberflächen aktiviert wird. Die Aktivierung des alternativen Weges (AP) erfolgt durch die Bindung von aktiviertem C3b an mikrobielle Oberflächen (Abbildung 7) (125). Die Komplementaktivierung beruht auf einer sequenziellen Abfolge von Aktivierungsstufen und

lässt sich in vier Hauptschritte unterteilen: Einleitung der Komplementaktivierung, die Bildung der C3-Konvertasen, die Generierung der C5-Konvertasen und die Aktivierung des terminalen Komplementweges, der zur Formation des terminalen Komplementkomplexes (TCC oder MAK) führt und die Lyse der Zelle einleitet. Die einzelnen Aktivierungsstufen werden durch verschiedene Komplementregulatoren und -inhibitoren kontrolliert, um ein „Überschießen“ der Gesamtreaktion zu vermeiden. Diese Regulatoren sind in der Lage zwischen eigenen und fremden Oberflächen, wie z.B. apoptotische und nekrotische Zellen sowie Infektionserreger zu unterscheiden (124, 126–129).



**Abbildung 7: Aktivierung des Komplementsystems und die drei Aktivierungswege.** Dargestellt sind die drei Komplementwege mit den einleitenden Aktivierungsschritten. Links oben dargestellt ist der klassische Weg, welcher hauptsächlich durch die Bindung von C1q an Antikörpern aktiviert wird. Der Lektin-Weg (Mitte oben) wird durch die Bindung von Erkennungsmolekülen wie Mannosebindendes Lektin (MBL), Kolektine oder Ficoline an ihre Liganden, zu denen auch Kohlenhydratstrukturen gehören, aktiviert. Die Aktivierung des alternativen Komplementweges (oben rechts) wird spontan durch die Entstehung von C3b in der Flüssigphase eingeleitet. Nach initialer Aktivierung erfolgt die Spaltung verschiedener Komplementkomponenten, die zur Bildung der C3-Konvertasen führt. Dieser Enzymkomplex spaltet C3 in das Anaphylatoxin C3a und das Opsonin C3b, welches, gebunden an die C3-Konvertasen, die C5-Konvertasen bildet. Die Proteolyse von C5 durch die C5-Konvertase führt zur Bildung von C5b und des potenten proinflammatorischen Anaphylatoxins C5a. Die Bindung von C5b an die Zelloberfläche leitet den terminalen Weg durch die sequenzielle Anlagerung der Komponenten C6 bis C9 ein, sodass der Membranangriffskomplex (MAK) entsteht. Entnommen aus Trouw et al., 2017 (129), modifiziert.

### 1.4.1 Die Aktivierung des klassischen und Lektin-Weges

Der klassische Weg wird als Antikörper-abhängig bezeichnet, da er durch die Bindung der Komplementkomponente C1q an IgM- oder IgG-Antikörper-Antigen-Komplexe initiiert wird. Das vielseitige Mustererkennungsmolekül (Pattern Recognition Molecule = PRM) C1q aktiviert Komplement auch durch eine unspezifische jedoch direkte Interaktion mit Oberflächenstrukturen auf mikrobiellen oder apoptotischen Zellen sowie Pentraxine. Durch die Anlagerung von zwei Molekülen C1r und C1s an gebundenes C1q bildet sich der C1-Komplex (C1qr<sup>2</sup>s<sup>2</sup>), wodurch beide Untereinheiten aktiviert werden (Abbildung 7) (130, 131). C1s spaltet daraufhin C4 in C4a und C4b, welches eine Konformationsänderung erfährt und ein unzugänglicher Thioesterrest freigesetzt wird. Dies führt zur kovalenten Bindung von C4b an die betreffende Zelloberfläche in unmittelbarer Nähe der Aktivierungsstellen (Opsonisierung). Durch die Spaltung von C4b-gebundenem C2 in C2a und C2b vermittelt C1s auch die Bildung der C3-Konvertase des klassischen Weges (C4b2b). Die C3-Konvertase spaltet C3 in C3a und C3b. Während C3a zur Rekrutierung und Aktivierung von Effektorzellen des angeborenen Immunsystems beiträgt sowie außerdem eine antimikrobielle und antimykotische Wirkung besitzt (132), wird C3b in der Nähe des Entstehungsortes an die Zielmembran „verankert“. Das C3b verstärkt die Kaskade durch die Bildung von weiteren Oberflächengebundenen C3-Konvertasen und der Generierung weiterer C3b-Moleküle (133, 134). Diese binden an die C3-Konvertasen, sodass sich schließlich die C5-Konvertase C4bC2bC3b formiert. Dieser Enzymkomplex spaltet C5 in C5a und C5b, von dem letzteres den terminalen Signalweg einleitet (135, 116).

Im funktionell ähnlichen Lektin-Weg fungieren das Mannose-bindende Lektin (MBL) und Ficoline als PRMs, die vorwiegend Kohlenhydratmuster auf der zellulären Oberfläche erkennen. MBL-assoziierten Serinproteasen (MASPs) wirken aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu C1r und C1s als Proteasen, sobald ein Komplex mit MBL gebildet werden kann. Allerdings ist nur MASP-2 in der Lage sowohl C4 als auch C2 zu spalten, wodurch die in ihrer Zusammensetzung identische C3-Konvertase des klassischen Weges entsteht. Die proteolytische Aktivität von MASP-1 zielt nur auf C2, aber nicht auf C4, und besitzt daher nur einen unterstützenden Effekt auf die Aktivierung des Lektin-Weges (136) und die Effizienz der C3-Konvertasebildung (137, 138).

### 1.4.2 Die Aktivierung des alternativen Weges

Während der klassische und Lektin-Weg eine entscheidende Rolle bei der spezifischen Erkennung von Krankheitserregern und der Auslösung der Komplementkaskade spielen, stellt der alternative Weg jedoch mehr als 80 % der terminalen Komplementaktivität nach der Erregererkennung sicher (139). Im Vergleich zum klassischen und Lektin-Weg erfolgt die Aktivierung des alternativen Weges unmittelbar nach Eindringen von Mikroorganismen spontan und unspezifisch und stellt daher ein ständig aktivierbares Überwachungssystem dar (126, 127). Deswegen handelt es sich im Gegensatz zum klassischen Weg und zum Lektin-Weg beim alternativen Weg um drei unterschiedliche, aber teilweise überlappende Prozesse. Zum Ersten beruht der alternative Weg auf einem zentralen Prozess der Komplementaktivierung, auf dem sogenannten „Tick-Over“, welcher das Komplementsystem in Alarmbereitschaft hält und die ständige Identifizierung von Fremdzellen ermöglicht (140, 141). Auf dieser Stufe spielt die Komplementkomponente C3 eine zentrale Rolle (Abbildung 7). Dieses Molekül ist in seiner nativen Form relativ inert und nur ein geringer Anteil wird in der Flüssigphase zu C3H<sub>2</sub>O hydrolysiert, wodurch neue Bindungsstellen freigelegt werden. Dadurch kann Faktor B an C3H<sub>2</sub>O binden, sodass das gebundene Faktor B von Faktor D in die Komponenten B<sub>b</sub> und B<sub>a</sub> gespalten wird. Diese, in der Flüssigphase entstandene C3-Konvertase (C3H<sub>2</sub>OB<sub>b</sub>), bewirkt die Spaltung von C3 in die aktiven Fragmente C3<sub>a</sub> und C3<sub>b</sub>. Durch die Spaltung von C3 wird ein reaktives, kurzlebiges Thioester in C3<sub>b</sub> freigesetzt, sodass sich aktiviertes C3<sub>b</sub> kovalent an Amin- und Kohlenhydratgruppen auf der mikrobiellen Zieloberfläche anlagern kann. Dieser als Opsonisierung bezeichnete Prozess der Markierung wird auf fremden Zellen verstärkt, auf menschlichen Zellen jedoch streng reguliert (Kapitel 1.4.4) (142, 143). Zweitens umfasst der alternative Weg auch einen PRM-basierten Initiierungsmechanismus, der denjenigen des Lektin-Weges und des klassischen Weges ähnelt und an dem Properdin beteiligt ist. Properdin als „positiver Regulator“ erkennt verschiedene Pathogen- oder schadensassoziierte, molekulare Muster (PAMPs bzw. DAMPs) auf fremden und apoptotischen Zellen und stabilisiert die C3-Konvertase des alternativen Weges (C3bB<sub>b</sub>P). Die Bindung von C3<sub>b</sub>-Molekülen initiiert anschließend die Komplementkaskade und potenziert diese indem es gebildetes C3<sub>b</sub> in der Flüssigphase an die bereits markierte Oberfläche anlockt (144) und die *de novo* C3-Konvertaseassemblierung ermöglicht (145). Die Generierung von aktivierten C3<sub>b</sub>-Molekülen durch bereits vorhandene, oberflächengebundenen C3-Konvertasen des klassischen und Lektin-Weges führt zusätzlich zur Aktivierung des alternativen Weges auf der mikrobiellen Zelloberfläche. Die generierten C3<sub>b</sub>-Moleküle werden in der unmittelbaren Umgebung der Aktivierung abgelagert, sodass sich nach Bindung von Faktor B und



anschließender Spaltung des gebundenen Faktor B durch Faktor D die C3-Konvertase des alternativen Weges (C3bBb) ausbildet. Dadurch entsteht eine effiziente Amplifikationsreaktion und eine verstärkte Bildung von C3b-Molekülen, die sich an die C3-Konvertasen anlagern, um die Enzymkomplexe C4b2b3b oder C3bBb3b zu bilden (C5-Konvertasen) (139). Dadurch ändert sich die Substratspezifität von C3 zu C5, wodurch C5 in das Anaphylatoxin C5a und das Fragment C5b gespalten werden. Das C5b lagert sich an der Zelloberfläche an und leitet schließlich den terminalen Weg sowie die Bildung des terminalen Angriffskomplexes ein (146).

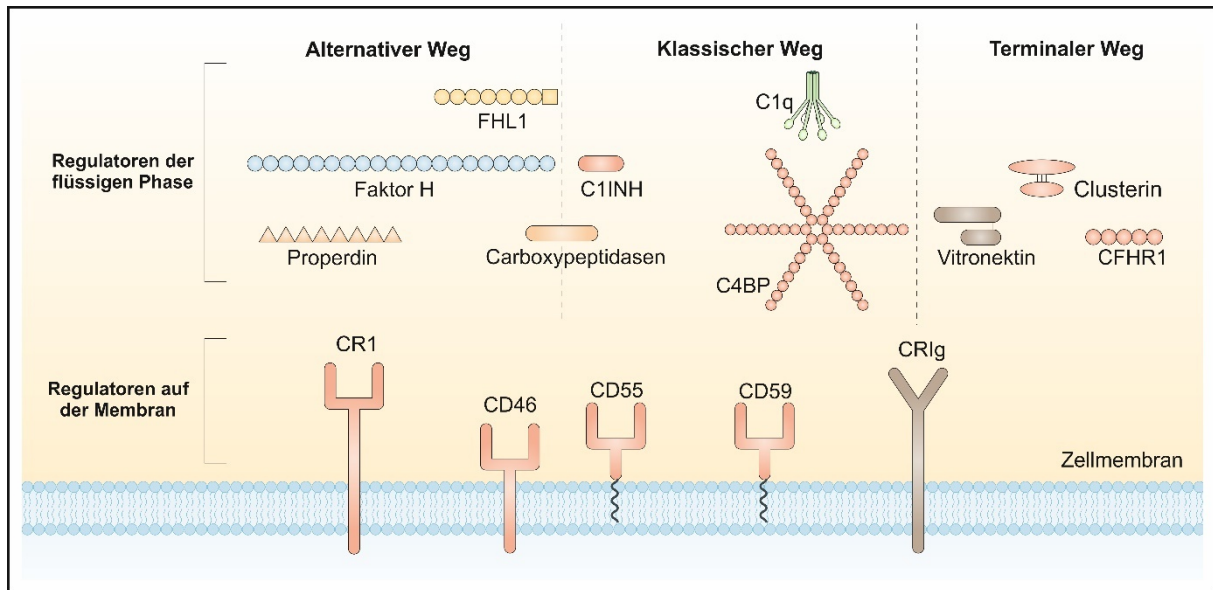
### 1.4.3 Die Aktivierung des terminalen Weges

Die Aktivierung des terminalen Komplementweges führt schlussendlich zur Bildung des Membranangriffskomplexes (MAK) (Abbildung 7), der eine 10 nm große Pore in der Zielmembran darstellt (147). Mit der Spaltung von C5b erfährt dieses Molekül mit Freisetzung einer reaktiven Thioestergruppe eine Konformationsänderung, ähnlich wie C3b (148). Dies führt zur kovalenten Bindung von C5b an die Zellmembran und zur Einleitung des terminalen Komplementweges. Anschließend lagern sich sequenziell die Komplementkomponenten C6 bis C9 als strukturell ähnliche Proteine an C5b an und bilden schlussendlich den MAK. Der entstandene, lipophile C5b-7-Komplex bindet als erstes an die Zellmembran (149) und C8 durchdringt anschließend die Lipiddoppelschicht (150). Durch die Fähigkeit zur Autopolymerisation können nun bis zu 18 C9-Moleküle an den C5b-8-Komplex binden. Dabei reichen jedoch schon zwei C9-Moleküle aus, um eine funktionelle Pore zu bilden (151, 152). Während ein einziger funktioneller MAK bereits ausreicht um einen Erythrozyten zu lysieren, ist die Abtötung von Zellen mit Zellkernen ein "Multi-Hit"-Prozess, der mehrere C5b-9-Komplexe erfordert (153).

### 1.4.4 Die Regulation der Komplementkaskade

Die Bedeutung der Komplementregulation wird durch die Anzahl an verschiedenen Regulatoren unterstrichen. Komplementregulatoren wirken differentiell auf allen Aktivierungsstufen und können in drei Gruppen eingeteilt werden: 1. Regulatoren in der Flüssigphase, 2. Regulatoren, die an der Zelloberfläche verschiedener humaner Zellen lokalisiert sind und 3. in der Zellmembran verankerte Komplementrezeptoren für die Effektorproteine C1q, C3a und C5a. Die in der Flüssigphase zirkulierenden Komplementregulatoren kommen vor allem im Plasma bzw. Blut vor, sowie in Körperflüssigkeiten wie z.B. der Synovial- und der Glaskörperflüssigkeit (116). Diese

Regulatoren werden nach ihrer Aktivität gruppiert und umfassen die Regulatoren des alternativen Weges, wie z. B. Faktor H (121) und FHL-1 (154, 155), die die Aktivierung negativ kontrollieren, wie auch das Aktivatorprotein Properdin, welches die Aktivierung positiv beeinflusst (155). Faktor H und FHL-1 wirken hauptsächlich auf die C3-Konvertase des alternativen Weges, indem sie entweder mit Faktor Bb konkurrieren und dieses aus dem C3bBb-Komplex entfernen (Decay-Accelerating-Aktivität; Beschleunigung des Zerfalls der C3-Konvertase) oder als Kofaktor für die Faktor I-vermittelte Inaktivierung von C3b dienen (156). Zu den löslichen Regulatoren des klassischen und des Lektin-Wegs zählen der C1-Inhibitor (C1INH) (157) und das C4b-bindende Protein (C4BP) (158). Der C1-Inhibitor bindet und inaktiviert die beiden Proteasen C1r und C1s, was zur Dissoziation des C1-Komplexes und zur Freisetzung von freiem C1q Molekül führt, sodass ein inaktiver Komplex zwischen dem C1-Inhibitor und C1r oder C1s zurückbleibt (159, 160). C4BP ist in erster Linie ein Kofaktor für C4b und verhält sich zur C3-Konvertase des klassischen- und Lektin-Wegs wie Faktor H zu der C3-Konvertase des alternativen Weges. D.h., dass C4BP in Gegenwart von Faktor I in der Lage ist, C4b in der C3-Konvertase zu inaktivieren, die dadurch ihre Aktivität verliert und in ihre Einzelkomponenten zerfällt. Zu den bekannten, löslichen Inhibitoren des terminalen Weges gehören CFHR1, Clusterin und Vitronectin (161–164). Wenn die in der flüssigen Phase gebildeten und löslichen Komplexe sC5b-7, sC5b-8 und sC5b-9 nicht an eine Membran binden, wird durch eine Interaktion mit Clusterin und Vitronectin die Löslichkeit der Komplexe erhöht und so deren Integration in die Zielmembran verhindert (148, 165, 166). Die Carboxypeptidase N fungiert nicht nur als klassischer Komplementregulator, sondern ist auch in der Lage effizient C3a und C5a zu inaktivieren und ist somit in allen drei Aktivierungswegen involviert (167, 168). Zusätzlich stehen noch weitere, in der Membran humaner Zellen verankerte Komplementregulatoren zur Verfügung, welche die drei Komplementaktivierungswege auf der Aktivierungsstufe von C3 und C4 kontrollieren (116, 169). Zu diesen Regulatoren gehören CD35 (CR1), CD46 (MCP) und CD55 (DAF). CD59 wirkt auf den terminalen Weg, indem es die Integration des C5b-9-Komplexes verhindert (Abbildung 8). Komplementrezeptoren, die spezifisch die Effektorproteine C1q, C3a und C5a binden, fungieren ebenfalls inhibitorisch auf die Komplementaktivierung. Zu dieser Gruppe zählen C3aR, C5aR (CD88), C5L2, C1qR (CD93) und SIGNR1 (CD209) (116, 170).

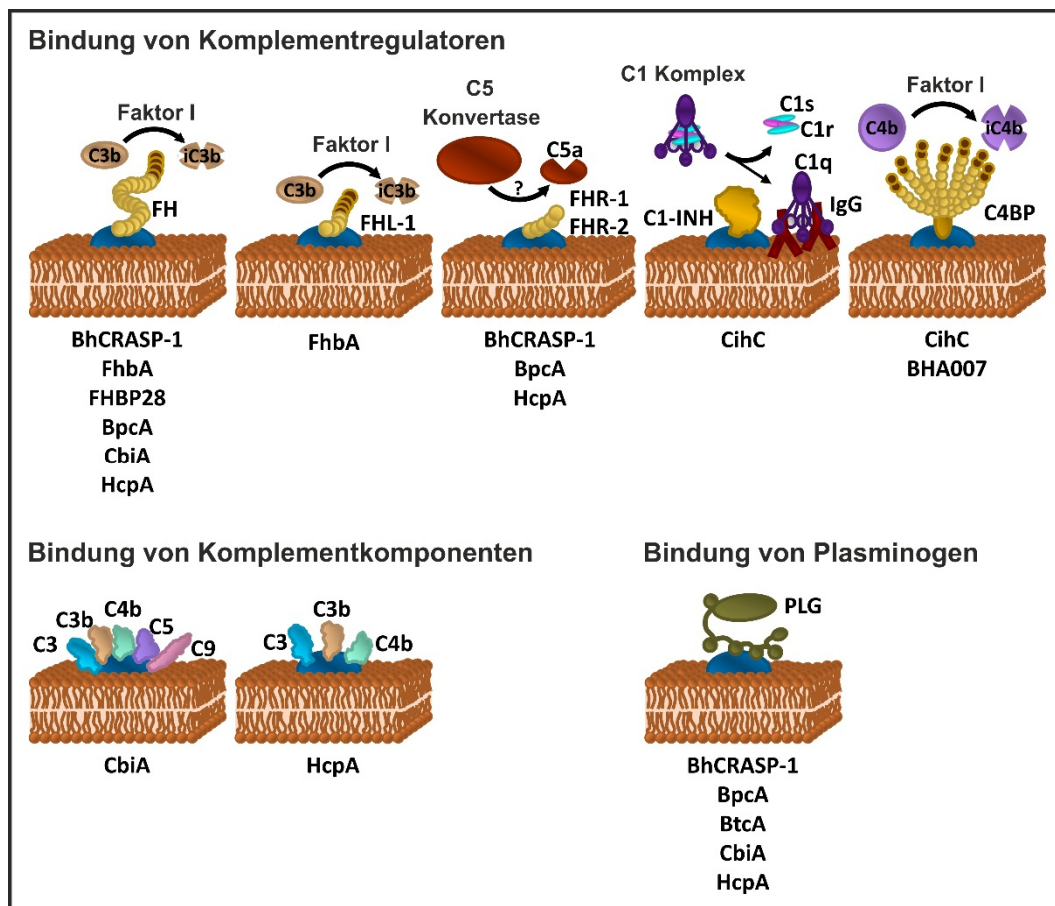


**Abbildung 8: Regulatoren des Komplementsystems.** Zusammenfassung der Regulatoren zur Inhibition des Komplementsystems unterteilt in Regulatoren der flüssigen Phase und in Regulatoren, die auf der Membranoberfläche lokalisiert sind. Zu den Regulatoren des alternativen Weges, die im Plasma und in den Körperflüssigkeiten zirkulieren, gehören Faktor H, das Faktor-H-ähnliche Protein 1 (FHL1) und das Aktivatorprotein Properdin. Carboxypeptidase N hat eine regulierende Wirkung auf den alternativen Weg, den klassischen Weg und den Lektin-Weg. Zu den löslichen Regulatoren des klassischen und des Lektin-Wegs gehören die Komplementregulatoren C1-Inhibitor (C1INH) und das C4b-bindende Protein (C4BP). Zu den löslichen Inhibitoren des terminalen Weges gehören Clusterin, Vitronectin und das Komplementfaktor-H-verwandte Protein 1 (CFHR1). Zu den auf der Membran lokalisierten Regulatoren gehören CR1 (CD35), CD46 (MCP), CD55 (DAF), CD59 (Protectin) und der Komplementrezeptor der Immunglobulin-Superfamilie (CRIg bzw. VSIG4). Die Komplementregulatoren wirken auf unterschiedliche Aktivierungsstufen der Kaskade. So bewirkt C1INH beispielsweise die Dissoziation der C1-Komponenten. CD35, CD55 und C4BP verdrängen eine Komponente der C3-Konvertase im klassischen Weg. CD59 verhindert die Formation des Membranangriffskomplexes. Entnommen aus Zipfel und Skerka, 2009 (164), modifiziert.

## 1.5 Immunevasionsstrategien von *B. recurrentis*

Die Tatsache, dass bereits eine einzige Borrelienzelle Rückfallfieber verursachen kann, verdeutlicht wie erfolgreich *B. recurrentis* die angeborene Immunabwehr unterwandert (171). So konnte gezeigt werden, dass RF-Borrelien in der Lage sind, Komplement-bindende Proteine zu produzieren, um sich vor der Komplement-vermittelten Bakteriolyse zu schützen (Abbildung 9). Diese Proteine wirken inhibitorisch auf verschiedene Aktivierungsstufen (172–179). Eine der häufigsten Strategien der Komplementevasion beruht auf der Bindung von Komplementregulatoren um die Aktivierung zu unterbinden (180–182). Bei RF-Borrelienspezies wurden mindestens sieben Faktor H-interagierende Proteine beschrieben. Dazu gehört BhCRASP-1 (FhbA1) von *B. hermsii* HS1 und FhbA2 (FhbA, FHBP19) von *B. hermsii* YOR, FHBP28 und BpcA von *B. parkeri*, CbiA von *B. miyamotoi* und HcpA von *B. duttonii* und *B. recurrentis* (172, 173, 175, 176, 178, 179). Diesen Proteinen ist gemeinsam, dass sie die Komplement-regulierende Aktivität von gebundenen Faktor H in Gegenwart von

Faktor I nutzen, um somit C3b zu inaktivieren (Kapitel 1.4.4) und den alternativen Weg zu inhibieren (175, 176, 178, 179). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass BhCRASP-1, HcpA, BpcA sowie CbiA Komplementresistenz bewirken können, wenn die Proteine ektopisch in genetisch manipulierten Spirochäten (Gain-of-Function-Stämmen) produziert werden (175, 176, 178, 179). CihC von *B. recurrentis* ist bislang das einzige Protein, das durch die Bindung von C1-Inhibitor und C4BP eine komplementinaktivierende Wirkung auf den klassischen und Lektin-Weg ausübt. Funktionelle Analysen ergaben, dass an die Zelloberfläche von Borrelien gebundenes C4BP seine Komplement-inhibitorische Aktivität für die Faktor I-vermittelte C4b-Inaktivierung beibehält und daher den klassischen und Lektin-Weg terminieren kann (177).



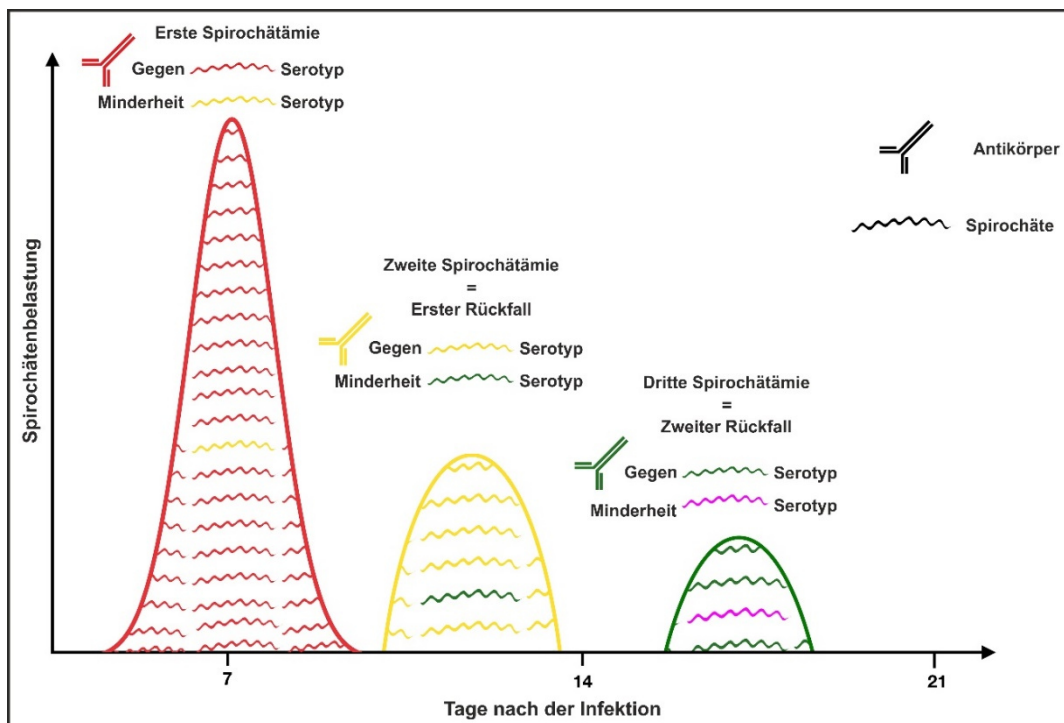
**Abbildung 9: Schematische Darstellung der Komplement-regulierenden Proteine von Rückfallfieber-Borrelien und den identifizierten Liganden.** Das humane Komplementsystem kann durch Interaktion verschiedener, oberflächenständiger Borrelienproteine mit Komplementkomponenten auf unterschiedlichen Ebenen der Aktivierungskaskade inhibiert werden. FH, Faktor H; FHL-1, Faktor H-ähnliches Protein 1; FHR, Faktor H-ähnliches Protein; C4BP, C4b-Bindungsprotein; C1-INH, C1-Esterase-Inhibitor; iC3b, inaktiviertes C3b; iC4b, inaktiviertes C4b; IgG, Immunglobulin G. Entnommen aus Röttgerding und Kraiczy, 2020 (184), modifiziert.

So konnten Meri et al. die Inaktivierung des klassischen Weges durch die Bindung von funktionell aktivem C4BP an die Oberfläche von *B. recurrentis* und *B. duttonii* nachweisen (183). Außerdem führt die Bindung von C1-Inhibitor an CihC zur Unterbrechung der ersten Aktivierungsschritte des klassischen Weges (177). Dies deutet darauf hin, dass CihC von *B. recurrentis* multifunktionale Komplement-inhibierende Eigenschaften aufweist (184). Ein weiterer Mechanismus der Inaktivierung besteht in der Interaktion mit Komponenten der letzten Aktivierungsschritte der Kaskade. Für CbiA und HcpA konnte gezeigt werden, dass die Bindung an die terminale Komplementkomponente C9 die Assemblierung des MAK inhibiert (179).

Verschiedene Komplement-interagierende Proteine unterschiedlicher RF-Borrelienspezies, darunter BhCRASP-1, HcpA und CbiA, weisen außerdem eine Vielzahl von Bindungsaffinitäten an Wirtsproteine der Flüssigphase, wie z.B. Plasminogen auf (175, 176, 178, 185). Plasminogen kann nach Aktivierung zu Plasmin, C3, C3b und C5 degradieren (186). Plasminogen ist auch in der Lage, die durch Faktor I vermittelte Inaktivierung von C3b in Gegenwart von Faktor H zu verstärken (186). Für HcpA und CbiA konnte zudem nachgewiesen werden, dass diese Proteine einzelne Komplementkomponenten, wie C3, C3b, C4 bzw. C4b sowie C5 (CbiA) binden können (179).

Eine zweite bedeutende Strategie der RF-Borrelien, um der Immunantwort zu entkommen, besteht in der Antigenvariation. Bereits 1985 konnte durch Infektionsexperimente mit der RF-Borrelienspezies *B. hermsii* nachgewiesen werden, dass sich individuelle Borrelienzellen einer Gesamtpopulation in ihrem Antigenmuster voneinander unterscheiden lassen (Abbildung 10) (187). Schematisch gesehen entspricht jeder Rückfall dem Aufkommen einer anderen Variante von RF-Borrelien, die ein verändertes "variable major protein" (Vmp) auf ihrer Oberfläche tragen. Diese für die Antigenvariation verantwortlichen, immundominanten Proteine werden als „variable major proteins“ oder „Vmp“ bezeichnet und in zwei verschiedene, polymorphe Proteinfamilien unterteilt: Die „variable small proteins“ oder Vsp mit einer molekularen Masse von ~20 kDa und die „variablen large proteins“ oder Vlp mit einer molekularen Masse von ~36 kDa. Die Vmp werden wiederum in vier weitere Unterfamilien unterteilt:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$  (188–190). Es konnten bei *B. hermsii* 30 bis 40 verschiedene Vmp identifiziert werden, die sich anzahlmäßig gleichmäßig auf Vsp und Vlp verteilen. Da in einer einzigen Borrelienzelle verschiedene Serotypen während des Infektionsprozesses entstehen können, liegt bereits zu einem frühen Zeitpunkt eine heterogene Subpopulation an Varianten vor, die sich in ihren Vlp und Vmp unterscheiden. Frühere Studien haben gezeigt, dass bei einer Infektion von Mäusen 60-70 antigenetisch unterschiedliche Varianten von *B. hermsii* entstehen

können (190). Da die Homologie zwischen den Vlp und Vsp nur ca. 30 % beträgt, werden auch keine Antikörper mit hoher Spezifität generiert. Die geringe Kreuzreaktivität ist der Grund, dass während der fieberfreien Intervalle eine Subpopulation von Borrelien erneut eine Spirochätämie auslösen kann, die der ursprünglichen Antikörperantwort entgangen ist (Abbildung 10). Dieses Szenario kann sich theoretisch mehrmals wiederholen, solange unterschiedliche Varianten der adaptiven Immunabwehr entgehen, wodurch sich die rekurrenden Fieberschübe des RF erklären lassen (191, 192).

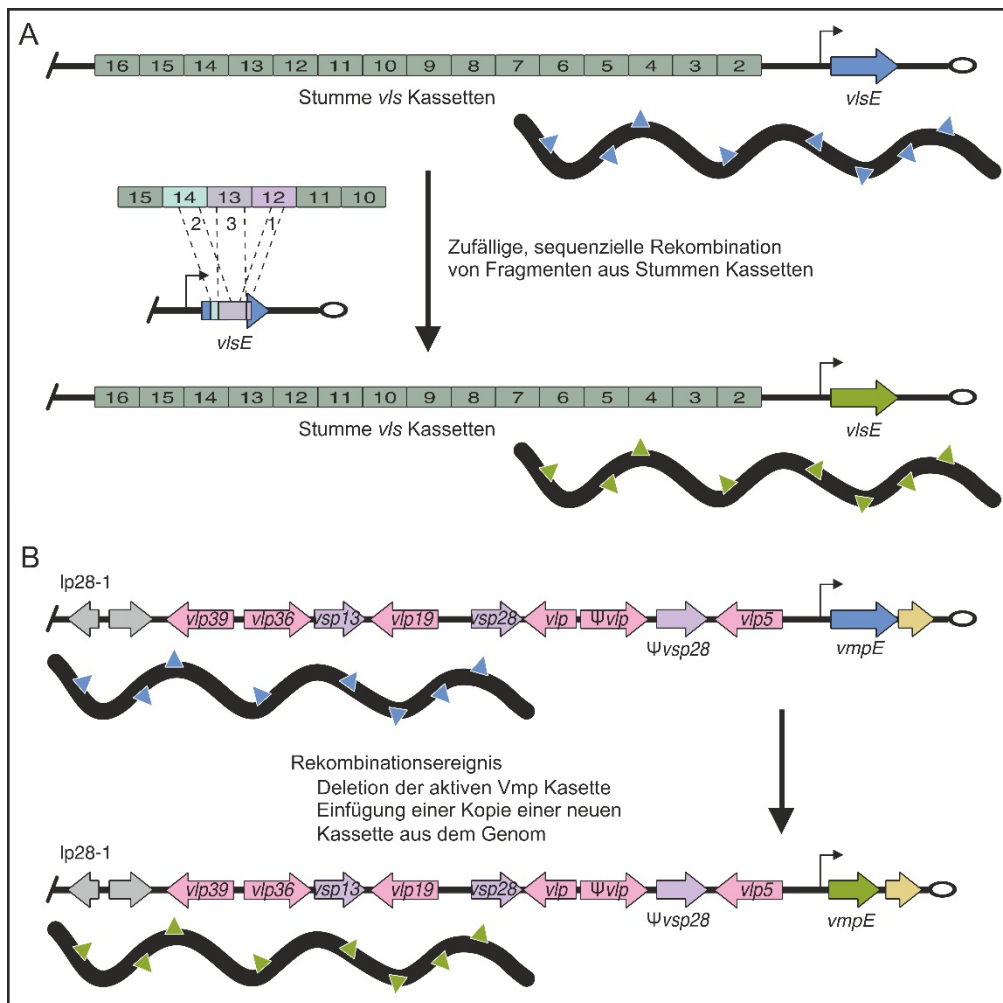


**Abbildung 10: Entstehung von Borrelien-Serotypen durch Antigenvarianten und selektiven Druck der adaptiven Immunabwehr.** Spirochäten mit einem bestimmten Serotyp, die initial dem angeborenen Immunsystem entgehen, erzielen während des ersten Fieberschubes eine hohe Zellkonzentration im Blut. Nach Bildung spezifischer Antikörper gegen den ursprünglichen Serotyp (rot), wird die erste Subpopulation eliminiert. Die überlebenden Borrelien (Serotyp gelb) verursachen die zweite Spirochätämie. Dieser Kreislauf wiederholt sich bis der Wirt stirbt oder die Borrelien durch das Immunsystem eliminiert werden. Entnommen aus Talagrand-Reboul et al., 2018 (28), modifiziert.

Diese Vielfalt an Borrelienvarianten entsteht durch genetische Rekombinationsprozesse der *vmp*-kodierenden Gene. Der molekulare Mechanismus lässt sich durch: 1. eine nicht-reziproke Rekombination von „stillen“ oder „archivierter“ *vmp*-Genen mit einem aktiven transkribierten *vmp*-Gen (Genkonversion), 2. einer intra-molekularen DNA-Umlagerung, und 3. durch eine Veränderung des Expressionsstarts, was wiederum zu einer Veränderung des Transkripts führt, erklären (193, 194). Die *vmp*-kodierenden Gene lassen sich bei allen RF-Borrelien, wie z.B.

*B. turicatae*, *B. crocidurae*, *B. duttonii* (195, 196), *B. miyamotoi* (197, 198) und *B. recurrentis* (32, 199), nachweisen.

Jede einzelne Borrelienzelle produziert jeweils ein Vsp- oder Vlp-Protein. Abhängig davon welches Gen in der aktiven Expressionsstelle nahe dem Ende eines linearen Plasmids lokalisiert ist, wird ein spezifisches Vsp- oder Vmp-Protein produziert. Die weiteren 30 oder 40 *vsp*- und *vlp*-Gene sind auf anderen Plasmiden in Form von „Genkassetten“ verteilt und werden nicht transkribiert. Ein anderes *vsp*- oder *vlp*-Gen kann spontan dasjenige Gen an der Expressionsstelle mit einer Häufigkeit von  $10^{-4}$  bis  $10^{-3}$  pro Zellgeneration durch die oben beschriebenen Mechanismen ersetzen (192, 200). Der häufigste Mechanismus des Genaustausches ist die nicht-reziproke Rekombination zwischen zwei linearen Plasmiden (dargestellt in Abbildung 11A). Die Bereiche für die Rekombination werden von einzelnen Kassetten begrenzt. Diese Kassetten werden wiederum von 5'- und 3'-Enden flankiert, deren Sequenzen zwischen den „stillen“ und den „aktiven“ Genen identisch sind (190). Die Häufigkeit der Rekombination bzw. des Auftretens von neuen Serotypen wird dann zum einen von dem Grad der Sequenzidentität zwischen den 5'-Enden der stillen und aktiven Gene und zum anderen von dem Abstand zwischen dem stillen Gen und dem nächsten Rekombinationsblock in 3'-Richtung bestimmt (201). Der zweite Mechanismus beruht auf einer intra-molekularen Rekombination (Abbildung 11B). Die Grundlage bildet hierbei ein stromabwärts des aktiven Gens nicht transkribiertes, stilles Gen, das in der gleichen Orientierung vorliegt (194). Durch eine Deletion zwischen den kurzen „direct repeats“ an den 5'-Enden der beiden Gene wird das aktive Gen eliminiert und das stromabwärts gelegene Gen rückt an dessen Stelle direkt hinter der Promotorstelle (59).



**Abbildung 11: Antigenvariation von Lyme-Borrelien und Rückfallfieber-Borrelien.** (A) Antigenvariation des *vlsE*-kodierenden Gens bei Lyme-Borrelien. Der Expressionslocus (*vlsE*) (blauer oder grüner Pfeil) befindet sich in der Nähe des Telomers (offenes Oval) des linearen Plasmids (lp) 28-1. Die Lokalisation des Promotors ist durch einen schwarzen Pfeil gekennzeichnet. Die stillen Vlp-Kassetten befinden sich stromaufwärts und in der entgegengesetzten Ausrichtung zum aktiven *vlsE*-Gen. Durch die zufällige Rekombination von stillen Kassettenfragmenten (mit 1, 2 und 3 gekennzeichnet) in die aktive Expressionsstelle entstehen unterschiedliche VlsE-Varianten. (B) Antigenvariation bei RF-Borrelien. Vlp (rosa Pfeile) und Vsp (lila Pfeile) enthaltene Kassetten befinden sich im gesamten Genom auf den linearen Plasmiden lp28-1, lp28-2, lp28-3, lp28-4 und lp32-1. Der Austausch des aktiven *vmpE*-Gens erfolgt durch Deletion (blauer Pfeil) und Insertion einer Kopie einer neuen Kasette (grüner Pfeil über Rekombinationsereignisse). Dies führt zu einer Veränderung des exprimierten Vmp-Proteins auf der Oberfläche des Bakteriums (gekennzeichnet durch blaue bzw. grüne Dreiecke). Entnommen aus Stone und Brissette, 2017 (200), modifiziert.



## 1.6 Zielsetzung und Fragestellung

Die vorliegende Dissertationsarbeit ist in zwei Teile untergliedert. Der erste Teil beinhaltet die Identifizierung und Charakterisierung von Komplement-interagierenden Proteinen von *B. recurrentis* und der zweite Teil die Entwicklung von zwei *in vitro* Immunoassays zum serologischen Nachweis von Rückfallfieber. Teil der in dieser Arbeit dargestellten Daten wurden in Kooperation mit verschiedenen Kooperationspartnern des LOEWE-Zentrums DRUID sowie der NovaTec Immunodiagnostica GmbH erhoben.

Das Komplementsystem als erste Verteidigungslinie des angeborenen Immunsystems ist die initiale Hürde, die ein pathogener Mikroorganismus überwinden muss, um im menschlichen Wirt Infektionen hervorzurufen. Borrelien haben verschiedene Immunescape-Strategien entwickelt und sind in der Lage in verschiedenen Wirten über einen längeren Zeitraum zu überleben (15). RF-Borrelien besitzen Komplement-bindende Proteine, die die Komplementkaskade auf verschiedenen Aktivierungsstufen inhibieren (172–178). In vorangegangenen Arbeiten konnten vier homologe Komplement-inhibierende Proteine, ORF6 (ChiA), ORF7 (ChiB), ORF8 (ChiC) und ORF9 (ChiD) von *B. recurrentis* identifiziert werden (202). Im Rahmen dieser Arbeit sollen diese Proteine zusammen mit einem weiteren ORF-homologen Protein, ORF10 (ChiE), hinsichtlich der Interaktion mit dem humanen Komplementsystem und ihrer Rolle für den Immunescape von *B. recurrentis* im Detail untersucht werden.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit soll mittels vergleichender Sequenzanalysen diverser *B. recurrentis*-Stämme, unter Ausführung von Dr. Tilman G. Schultze (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Universitätsklinikum Frankfurt, Frankfurt am Main), die Verwandtschaft und Homologie der zu untersuchenden ORF-Proteine bioinformatisch analysiert werden. Anschließend sollen die inhibitorischen Eigenschaften der Proteine auf die unterschiedlichen Komplementwege untersucht werden. Die in Kooperation mit Dr. Karin Fritz-Wolf aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jude Przyborski (Institut für Ernährungswissenschaften, Justus-Liebig-Universität Gießen) aufgeklärte Struktur von ORF7 (ChiB) diene als Vorlage, um Aminosäuren zu identifizieren, welche für die Interaktion mit Komplementkomponenten in Frage kommen könnten. Basierend auf diesen Daten sollen gezielt Varianten von ORF7 (ChiB) generiert und diese auf ihre inhibitorischen Eigenschaften gegenüber dem Komplementsystem analysiert werden. Schlussendlich sollen „Gain of function“-Stämme generiert werden, indem Serum-sensible *B. garinii*-Stämme erzeugt werden, die „Shuttle“-Vektoren zur Produktion spezifischer ORF-Proteine enthalten. Diese

Borreliienstämme sollen im Detail hinsichtlich der Genexpression und auf ihre Serumempfindlichkeit bzw. -resistenz überprüft werden. Schlussendlich soll das Vorhandensein und die Expression der ORF-kodierenden Gene in *B. recurrentis* und *B. duttonii* überprüft werden.

Trotz der geringen Sensitivität von 70% stellt die Mikroskopie nach wie vor den „Goldstandard“ dar und ist vor allem in armen Ländern, in denen diese Infektionskrankheit heute noch epidemisch auftritt, wie z.B. Äthiopien, Süd-Sudan und Eritrea, die am weitesten verbreitete und kostengünstigste Methode zur Diagnostik des LRFs (69, 82). Im Rahmen des vom LOEWE Zentrums DRUID unterstützten Projektes soll in diesem Sinne ein verlässliches *in vitro* Diagnostikum basierend auf einem Lineblot-Immunoassay und ELISA entwickelt werden. Dafür sollen die zuvor untersuchten Komplement-inhibitorischen Proteine aufgrund ihrer Exposition auf der Membranoberfläche als potenzielle Antigene untersucht und zusammen mit GlpQ für serologische Testverfahren zur Diagnose von LRF validiert werden. Die Sensitivität und Spezifität der zu entwickelnden Testsysteme soll mit einem umfangreichen Serumpanel von Patienten mit unterschiedlichen Vektor-assoziierten Infektionskrankheiten überprüft, evaluiert und weiter optimiert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Bakterienstämme

#### 2.1.1 *Borrelia*

Die verwendeten Borrelienisolat sind in Tab. 1 dargestellt.

Tab. 1: Auflistung der verwendeten Borrelienisolat.

Isolat	Genospezies	Geographische Herkunft	Biologische Herkunft	Referenz
G1	<i>B. garinii</i>	Deutschland	Liquor	(203)
Ly	<i>B. duttonii</i>	Tansania	Blut	(204)
LAI	<i>B. duttonii</i>	Tansania	Blut	(204)
V	<i>B. duttonii</i>	unbekannt	unbekannt	Prof. Reinhard Wallich (emer.), Institut für Immunologie, Universität Heidelberg
A1	<i>B. recurrentis</i>	Tansania	Blut	(205)
A17	<i>B. recurrentis</i>	Addis Ababa	Blut	(205)
PAbJ	<i>B. recurrentis</i>	München	Blut	Prof. Volker Fingerle, Nationales Referenzzentrum für Borrelien, Oberschleißheim
PMaC	<i>B. recurrentis</i>	München	Blut	Prof. Volker Fingerle, Nationales Referenzzentrum für Borrelien, Oberschleißheim
PUfA	<i>B. recurrentis</i>	München	Blut	Prof. Volker Fingerle, Nationales Referenzzentrum für Borrelien, Oberschleißheim
PAbN	<i>B. recurrentis</i>	München	Blut	Prof. Volker Fingerle, Nationales Referenzzentrum für Borrelien, Oberschleißheim
PBeK	<i>B. recurrentis</i>	München	Blut	Prof. Volker Fingerle, Nationales Referenzzentrum für Borrelien, Oberschleißheim

### 2.1.2 *Escherichia coli*

In Tab. 2 sind die jeweiligen *E. coli*-Isolate aufgezählt, welche zur Transformation verwendet wurden

Tab. 2: Auflistung der verwendeten *E. coli*-Isolate zur Transformation.

Stamm	Genotyp	Referenz
Neb5α	<i>fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	New England Biolabs
BL21(DE3)	<i>fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHI ΔEcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5</i>	New England Biolabs
M15	<i>F-, Φ80ΔlacM15, thi, lac-, mtl-, recA+, KmR</i>	Qiagen

## 2.2 Vektoren und Starteroligonukleotide

### 2.2.1 Starteroligonukleotide

Die Bezeichnung der Starteroligonukleotide und ihre Nukleotidsequenz in Bezug auf ihre Verwendung sind in Tab. 3 aufgeführt.

Tab. 3: Auflistung der verwendeten Starteroligonukleotide.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'→3')	Verwendung
GlpQ BRE_242 Bam	GAGGTAAATTAATGGGATCCAAATT AATAATG	Herstellung von His-GlpQ (N-terminal fusioniert)
GlpQ BRE_242 Sal	CATAAATGAGATAGTCGACTTATTAA AATTATG	Herstellung von His-GlpQ (N-terminal fusioniert)
pQE FP 30	TTTGCTTTGTGAGCGGATAAC	Sequenzierung von pQE- Vektoren
pQE RP	GTTCTGAGGTCATTACTGG	Sequenzierung von pQE- Vektoren und Herstellung von His-ChiB_Δ248-267, His-ChiB_Δ1-57
M13 FP	GTAAAACGACGGCCAGT	Sequenzierung und Überprüfung von Transformanten
M13 RP	CAGGAAACAGCTATGAC	Sequenzierung und Überprüfung von Transformanten

Tab. 3: Auflistung der verwendeten Starteroligonukleotide, fortgesetzt.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'→3')	Verwendung
CihC-194 Stop Bam_RP	CTATCTAATTTATCATTGGATCCTTAC TCCGGACTATCTTCTTCTTC	Herstellung von His-CihC-N
CihC_Nde_FP	GGCCTTATAATGGAACATCATATGGAA TATAATG	Herstellung von His-CihC-C
CihC_Bam_RP	GGCTGCAGGTCGGATCCCGACTACTT TACATAC	Herstellung von His-CihC-C
ChiB_H90Y FP	GTTTGGTAAAGTGTACAATGATGCAG CTGCG	Herstellung von His-ChiB_H90Y
ChiB_H90Y RP	CAGCTGCATGATTGTACATTTACCAA ACACG	Herstellung von His-ChiB_H90Y
ChiB_Y160A FP	GATTTTGCTAAAGCTGCTTATATAGA TGCACATGATACCTTAC	Herstellung von His-ChiB_Y160A
ChiB_Y160A RP	GTATCATGTGCATCTATATAAGCAGC TTAGCAAAATCTC	Herstellung von His-ChiB_Y160A
ChiB_Y160A-Y161A v2 FP	GATTTTGCTAAAGCTGCTATAGATGC ACATGATACCTTAC	Herstellung von His-ChiB_Y160A-Y161A
ChiB_Y160A-Y161A v2 RP	GTATCATGTGCATCTATAGCAGCAGC TTAGCAAAATCTC	Herstellung von His-ChiB_Y160A-Y161A
ChiB_R197E FP	GGGAGAAGCTTGAGGCAAGAGAATTG AAGTTAATAAG	Herstellung von His-ChiB_R197E
ChiB_R197E RP	CCACTTATTAAGTCAATTCTCTTGCC TCAAGTTC	Herstellung von His-ChiB_R197E
ChiB_R209E FP	GGTGTAATAGCCGAAGTTGAAAGTGA TTAAATAAC	Herstellung von His-ChiB_R209E
ChiB_R209E RP	CTACTGTTATTTAAATCACTTTCAACT TCGGCTATTAC	Herstellung von His-ChiB_R209E
ChiB_W238A v2 FP	GCAGATAAAAACATATGCGAATCAA AGTCAGCTAC	Herstellung von His-ChiB_W238A
ChiB_W238A v2 RP	GCTGACTTTGATTCCGATATGTTTTTA TCTGCTCCG	Herstellung von His-ChiB_W238A
ChiB_Δ1-57 FP	GAAAAAGAGAAATTGGATCCATTAA AGATGCAACTTCTAG	Herstellung von His-ChiB_Δ1-57
ChiB_Δ87-107 FP	GGTGTAAGTGAAGTCGTGCACAATGA TGCAGCTG	Herstellung von His-ChiB_Δ87-107
ChiB_Δ87-107 RP	CCATCTACTTTATGGTGCACCTTACCA AACAC	Herstellung von His-ChiB_Δ87-107
ChiB_Δ248-267 FP	CAATATGTTTTTATCTGGTCGACGGT GGTAGCATTAC	Herstellung von His-ChiB_Δ248-267
ChiB_Δ256-267 FP	GATTGTGAAGATATGAGGTAAATTA AAAATATTTTGGAT	Herstellung von His-ChiB_Δ256-267
ChiB_Δ256-267 RP	CAAAATATTTTAAATTTAACCTCATAT CTTCAATCTCAG	Herstellung von His-ChiB_Δ256-267

Tab. 3: Auflistung der verwendeten Starteroligonukleotide, fortgesetzt.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'→3')	Verwendung
ChiB_Δ260-267 FP	GTGAAGATAAGTGGTGAAATTTAAAA TATTTTGGATAATATTC	Herstellung von His-ChiB_Δ260-267
ChiB_Δ260-267 RP	CTGAATATTATCCAAAATATTTTAAA TTTACCACCTTATCTTC	Herstellung von His-ChiB_Δ260-267

Weitere Starteroligonukleotide, ihre Nukleotidsequenzen und für welche Generierung von Borrelia transformanten sie verwendet wurden, sind in Tab. 4 aufgeführt.

Tab. 4: Auflistung der verwendeten Starteroligonukleotide zur Generierung der Borrelia transformanten.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'→3')	Verwendung
pChiA-Cterm SacI FP	GGAACAAAAAGAGCTCTGGTTTTGAAAC TCG	Herstellung von G1/pChiB; G1/pChiB-ChiC; G1/pChiB-ChiD; G1/pChiB-ChiE
pChiC-Nterm Sall RP	CCTCTCCTCTTCTTCTGATTGTCGACGTG ACGATGC	Herstellung von G1/pChiB
pChiB-Cterm SacI FP	GATGACTGAGCTCAGATTGTGAAGATAA GTGG	Herstellung von G1/pChiC; G1/pChiC-ChiD; G1/pChiC-ChiE
pChiD-Nterm Sall v2 RP	CAGGCTTTTTTCCGTGTCGACCACAAGC	Herstellung von G1/pChiC; G1/pChiB-ChiC
pChiC-Cterm SacI FP	GAGGATAAGAGCTCAAATTAAAGGAATC TTGG	Herstellung von G1/pChiD; G1/pChiD-ChiE
pChiE-Nterm Sall RP	GTGTCTCTGCATCATAAAGTCGACTTTCT CC	Herstellung von G1/pChiD; G1/pChiB-ChiD; G1/pChiC-ChiD
pChiD-Cterm SacI FP	GAGATCTTGACTAGAGCTCATTAGGAGA TTAATG	Herstellung von G1/pChiE
pORF11-Nterm Sall RP	GATCACAAGCTATTAGTAGTCGACTTATC AACAC	Herstellung von G1/pChiE; G1/pChiB-ChiE; G1/pChiC-ChiE; G1/pChiD-ChiE

Die für die RT-qPCR verwendeten Starteroligonukleotide, ihre Nukleotidsequenz und die Verwendung sind in Tab. 5 dargestellt.

Tab. 5: Auflistung der verwendeten Starteroligonukleotide für die RT-qPCR.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Nukleotidsequenz (5'→3')</b>	<b>Verwendung</b>
CihC FP RT	ATATTACTAGCAGTTTAAGCGGT	Nachweis der Genexpression
CihC RP RT	GGACTATCTTCTTCTTCCACAATAC	Nachweis der Genexpression
HcpA FP RT	TTTCAAGAATCACTTCAAGATAATAAGC	Nachweis der Genexpression
HcpA RP RT	AGTCTTATCATTCCCAAGTTTCCT	Nachweis der Genexpression
ChiA FP RT	GGTACAACGCCTAATTCT	Nachweis der Genexpression
ChiA RP RT	CCAGATCTTCCAATCTTCC	Nachweis der Genexpression
ChiB FP RT	TGCGACTGGCGCTGTTG	Nachweis der Genexpression
ChiB RP RT	CAAAAATCTTGCCTCGTCTAAAGAGAG	Nachweis der Genexpression
ChiC FP RT	ACAAAGTCTAGCGATAGG	Nachweis der Genexpression
ChiC RP RT	GTA ACTAAGTCCCTAGTCTC	Nachweis der Genexpression
ChiD FP RT	CTAATGGATGACAATAGGGC	Nachweis der Genexpression
ChiD RP RT	TAAGTCCACAGTCCCAAT	Nachweis der Genexpression
ChiE FP RT	GGTACGACACTTGGCGAT	Nachweis der Genexpression
ChiE RP RT	CGATTCTAAAATCCCTAATGAATCAGAACC	Nachweis der Genexpression
FlaB FP RT	CTAGTGGGCATAGAATTAATCGTGC	Nachweis der Genexpression
FlaB RP RT	GCTTGGGATAACCCTCTAATTTGA	Nachweis der Genexpression
FlaB <i>B. garinii</i> FP RT	ATCAAACAAATCTGCTTCCCA	Nachweis der Genexpression
FlaB <i>B. garinii</i> RP RT	ATATTTACAGCAATCGCTTCATC	Nachweis der Genexpression
16S FP RT	GCTGTAAACGATGCACACTTGGT	Nachweis der Genexpression
16S RT RT	GGCGGCACACTTAACACGTTAG	Nachweis der Genexpression

### 2.2.2 Basisvektoren

#### Expressionsvektor pQE-30 Xa

Für die Aufreinigung von Proteinen mittels einer N-terminalen His<sub>6</sub>-Sequenz wurde der 3,5 kbp große Vektor pQE-30 Xa von QIAGEN verwendet. Die erzeugte Ampicillin-Resistenz diente als Selektionsmarker.

#### Shuttle-Vektor pKFSS1

Zur Klonierung und anschließenden Transformation von Borrelienprotein-kodierenden Genen in den Serum-sensiblen *B. garinii* Stamm G1 wurde der Shuttle-Vektor pKFSS1 verwendet (264). Hierbei kam die erzeugte Streptomycin-Resistenz als Selektionsmarker zum Einsatz.

## 2.3 Antikörper und Proteine

### 2.3.1 Antikörper

In Tab. 6 werden die verwendeten primären Antikörper aufgeführt.

Tab. 6: Verwendete primäre Antikörper.

Antikörper	Antigen	Eigenschaften	Referenz
anti-His <sub>6</sub>	Hexahistidin	Monoklonal	Klon Br-I/1.1, P Zur Verfügung gestellt von Prof. Reinhard Wallich (emer.), Institut für Immunologie, Universität Heidelberg
anti-His <sub>5</sub>	Pentahistidin	Monoklonal	Qiagen, 34660
anti-His <sub>6</sub>	Hexahistidin	Monoklonal	Novagen, 70796
anti-C3	C3, Spaltprodukte von C3	Polyklonal	Calbiochem, 204869
anti-C5	C5, Spaltprodukte von C5	Polyklonal	Complement Technology, A220
anti-C5b-9	MAK	Monoklonal	Quidel, A239
anti-HcpA	HcpA von <i>B. recurrentis</i>	Monoklonal	Zur Verfügung gestellt von Prof. Reinhard Wallich (emer.), Institut für Immunologie, Universität Heidelberg; (176)



Tab. 6: Verwendete primäre Antikörper, fortgesetzt.

Antikörper	Antigen	Eigenschaften	Referenz
anti-CihC	CihC von <i>B. recurrentis</i>	Monoklonal	Zur Verfügung gestellt von Prof. Reinhard Wallich (emer.), Institut für Immunologie, Universität Heidelberg; (177)
anti-ChiB	ChiB von <i>B. recurrentis</i>	Polyklonal	Eurogentec
anti-ChiE	ChiE von <i>B. recurrentis</i>	Polyklonal	Eurogentec
FITC-markiertes Ziege anti-human IgG	Immunoglobulin G	Polyklonal	Euroimmun AG, AF 102-0160

Fortführend sind die sekundären Antikörper in Tab. 7 dargestellt.

Tab. 7: Verwendete sekundäre Antikörper.

Antikörper	Konjugat	Referenz
anti-Kaninchen IgG	HRP konjugiert	Dako Cytomation, P0448
anti-Maus IgG	HRP konjugiert	Dako Cytomation, P0260
anti-Ziege IgG	HRP konjugiert	Dako Cytomation, P0449

### 2.3.2 Proteine

Tab. 8 zeigt die verwendeten Restriktionsendonukleasen und ihre jeweilige Schnittstelle.

Tab. 8: Verwendete Restriktionsendonukleasen.

Bezeichnung	Schnittstelle	Hersteller	Bestellnummer
BamHI-HF	GGATCC	New England Biolabs	R3136
DpnI	GATC	New England Biolabs	R0176
Sall-HF	GTCGAC	New England Biolabs	R3138
SacI-HF	GAGCTC	New England Biolabs	R3156

Die verbleibenden verwendeten gereinigten Proteine sind in Tab. 9 aufgeführt.

Tab. 9: Verwendete gereinigte Proteine.

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
Komplement C3b	Complement Technology	A114
Komplement C5	Complement Technology	A120
Komplement C7	Complement Technology	A124

Tab. 9: Verwendete gereinigte Proteine, fortgesetzt.

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
Komplement C8	Complement Technology	A125
Komplement C9	Complement Technology	A126
Komplement C5b-6	Complement Technology	A122
Vitronektin	Merck	CC080
Albumin aus Rinderserum (BSA)	Sigma-Aldrich	A7030
T4-DNA Ligase	New England Biolabs	M0202
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Invitrogen	10342053
Verifi DNA-Polymerase	PCR Biosystems	PB10.42-01
Hifi DNA-Polymerase	PCR Biosystems	PB10.41-02
Protease Inhibitor Cocktail	Roche	04 693 124 001
Lysozyme	Sigma-Aldrich	L6876
Proteinase K für die RNA- und genomische DNA-Aufreinigung	Qiagen	19131
RNase-Free DNase Set	Qiagen	79254
RQ1 RNase-Free DNase	Promega	M6101

## 2.4 Humansen und Blutproben

### 2.4.1 Humansen

Für Lineblots und ELISAs wurden die in Tab. 10 aufgeführten Humansen herangezogen.

Tab. 10: Verwendete Humansen.

Patientenseren	Anzahl	Herkunft	Referenz
Blutspendeseren	100	DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg- Hessen, Frankfurt am Main	Prof. Dr. Volhard Kempf
LRF-Patientenseren	12	Nationales Referenzzentrum für Borrelien, Oberschleißheim	Dr. Volker Fingerle (96)
Lyme Borreliose- Patientenseren	57	Universitätsklinikum Frankfurt am Main	(206, 207)
Syphilis- Patientenseren	20	Universitätsklinikum Frankfurt am Main	(206, 207)
Leptospirose- Patientenseren	16	Universitätsklinikum Frankfurt am Main	(206, 207)
Leishmaniose- Patientenseren	11	Universitätsklinikum Frankfurt am Main	(206, 207)

Tab. 10: Verwendete Humanseren, fortgesetzt.

Patientenseren	Anzahl	Herkunft	Referenz
Tuberkulose-Patientenseren	11	Universitätsklinikum Frankfurt am Main	(206, 207)
Seren von Patienten mit rheumatoider Arthritis	10	Universitätsklinikum Frankfurt am Main	(206, 207)
Leishmaniose-Patientenseren	58	Sudan	Prof. Dr. Ulrich Steinhoff, Institut für medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Universität Marburg
Tuberkulose-Patientenseren	5	Sudan	Prof. Dr. Ulrich Steinhoff, Institut für medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Universität Marburg
Malaria-Patientenseren	5	Sudan	Prof. Dr. Ulrich Steinhoff, Institut für medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Universität Marburg

Für Komplement-basierte, immunologische Methoden wurde außerdem humanes Serum von freiwilligen Spendern gewonnen. Dazu wurde den Spendern venöses Blut entnommen (S-Monovette für Serum, Sarstedt), welches nach Koagulation sofort auf Eis gelagert wurde. Die Serumproben wurden für 20 min bei  $2000 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in 0,5 ml oder 1 ml Aliquots bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Um zu garantieren, dass die Versuche nicht durch anti-Borrelien Antikörper beeinflusst werden, wurden die Seren jedes einzelnen Blutspenders mittels ELISA (Enzygnost Borreliosis VlsE/IgG Siemens; Enzygnost Borreliosis IgM, Siemens) und ggfs. eines Immunoblots (recomLine *Borrelia* IgG, Mikrogen; recomLine *Borrelia* IgM, Mikrogen) auf anti-Borrelien Antikörper getestet. Nur Borrelienantikörper-negative Seren wurden zu einem Serumpool zusammengefasst.

Alle Spender wurden vor der Blutentnahme hinreichend über mögliche Risiken aufgeklärt und haben dahingehend eine Einverständniserklärung unterschrieben. Das Studiendesign sowie die Probandeninformationen wurden der Ethikkommission (Geschäftsnummer 160/10) des Klinikums der Goethe-Universität vorgelegt und geprüft. Die Durchführung der Studie wurde daraufhin für unbedenklich erklärt.

### 2.4.2 Schafserythrozyten für den hämolytischen Assay

Schafserythrozyten wurden freundlicherweise von Prof. Michael Kirschfink (emer.), Institut für Immunologie, Universität Heidelberg, fertig präpariert in einer Alsever'schen Lösung, zur Verfügung gestellt.

## 2.5 Verwendete Reagenzienpackungen und Größenstandards

### 2.5.1 Reagenzienpackungen

Die kommerziell erhältlichen und verwendeten Reagenzienpackungen sind in Tab. 11 abgebildet.

Tab. 11: Verwendete Reagenzienpackungen.

Bezeichnung	Verwendungszweck	Hersteller	Bestellnummer
Monarch Plasmid Miniprep Kit	Isolierung von Plasmid-DNA	New England Biolabs	T1010
QIAamp DNA Mini Kit	Isolierung von genomischer DNA	Qiagen	51306
PureYield Plasmid Midiprep System	Isolierung von Plasmid-DNA aus großen Kulturansätzen	Promega	A2495
MinElute Reaction Cleanup Kit	Reinigung von Restriktionsansätzen	Qiagen	28206
QIAquick PCR purification Kit	Reinigung von PCR-Ansätzen	Qiagen	28106
Pierce BCA Protein Assay Kit	Bestimmung der Proteinkonzentration gereinigter Proteine	Thermo Scientific	23227
Reversible Protein Detection Kit for Membranes and Polyacrylamide Gels	Western Blot-Analyse	Sigma-Aldrich	RPOB-1KT
RNeasy Mini Kit	Isolierung von RNA aus Borrelienzellen	Qiagen	74104
RNAprotect Bacteria Reagent	Isolierung von RNA aus Borrelienzellen	Qiagen	76506
LunaScript RT SuperMix Kit	Reverse Transkriptase PCR	New England Biolabs	E3010
Luna Universal qPCR Master Mix	Quantitative PCR	New England Biolabs	M3003

Tab. 11: Verwendete Reagenzienpackungen, fortgesetzt.

Bezeichnung	Verwendungszweck	Hersteller	Bestellnummer
Monarch RNA Cleanup Kit	Reinigung von RNA-Proben	New England Biolabs	T2030
Chagas IgG/IgM LineBlot	Lineblot und ELISA	Novatec Immundiagnostica GmbH	TRYG2570

## 2.5.2 Größenstandards

In Tab. 12 sind die Größenstandards verzeichnet, die für die Agarosegel-Elektrophorese bzw. die Polyacrylamidgel-Elektrophorese zum Einsatz kamen.

Tab. 12: Verwendete Größenstandards.

Bezeichnung	Verwendungszweck	Hersteller	Bestellnummer
100 bp DNA Ladder	Größenstandards für die Agarosegele	New England Biolabs	N3231
1 kb DNA Ladder	Größenstandards für die Agarosegele	New England Biolabs	N3232
Precision Plus Protein Dual Color Standards	Größenstandards für die SDS-PAGE	BIO-RAD	1610374
Precision Plus Protein Unstained Standards	Größenstandards für die SDS-PAGE	BIO-RAD	1610363

## 2.6 Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien

### 2.6.1 Chemikalien

Die im höchsten Reinigungsgrad angewandte Chemikalien sind in Tab. 13 zusammengestellt.

Tab. 13: Verwendete Chemikalien.

Substanz	Hersteller	Bestellnummer
A		
6-Aminocaprinsäure	Alfa Aesar	A14719
Aceton	Sigma-Aldrich	32201
Acrylamid	PanReac AppliChem	A1089
LB-Agar	Carl Roth	X969.1
Agarose, universal	VWR	35-1020
Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth	9592.2
Ampicillin	Carl Roth	K029.1
Aqua ad iniectabilia	Braun AG	02138599

Tab. 13: Verwendete Chemikalien, fortgesetzt.

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
<b>B</b>		
Bisacrylamid	PanReac AppliChem	A1096
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich	34725-61-6
<b>D</b>		
4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid	Merck	124653
<b>E</b>		
Ethylendiamintetraessigsäure	Honeywell   Fluka	34549
EGTA	AppliChem GmbH	A0878
Essigsäure	Fisher Chemical	A/0400/PB15
Ethanol, absolut ( $\geq 99,8\%$ )	Sigma-Aldrich	32221
<b>F</b>		
Formaldehyd, 36,5 % Lösung	VWR	20909.290
<b>G</b>		
Gelatine	AppliChem GmbH	A1693
Gel Loading Dye, Purple (6x)	New England Biolabs	B7024S
D-(+)-Glukose	Carl Roth	X997.1
Glycerol (99,5 %)	VWR Chemicals	56-81-5
Glycin	Sigma-Aldrich	G7126
Glyoxal-Lösung (40 %)	Sigma-Aldrich	128465
Glutaraldehyd-Lösung (25 %)	Sigma-Aldrich	G6257
<b>H</b>		
HEPES	Sigma-Aldrich	H3375
<b>I</b>		
Imidazol	Sigma-Aldrich	56749
IPTG	Carl Roth	2316,3
<b>K</b>		
Kaliumhydrogenphosphat	AppliChem GmbH	A3095
Kaliumhydroxid	Sigma-Aldrich	P5958
<b>M</b>		
Magermilchpulver	Frema Reform	0203 V03
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck	1.05833.0250
$\beta$ -Mercaptoethanol	AppliChem GmbH	A1108
Midori Green Direct	Nippon Genetics	MG06

Tab. 13: Verwendete Chemikalien, fortgesetzt.

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
<b>N</b>		
Natriumazid	Sigma-Aldrich	71289
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich	31434
Natriumacetat	Carl Roth	6713.1
Natriumcarbonat	Carl Roth	8563.1
Natriumhydrogencarbonat	AppliChem GmbH	A3590
<b>N</b>		
Natriumhydroxid	Riedel-de Haën	30620
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	AppliChem GmbH	A1883
Di-Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth	P030.1
Natriumhydrogenphosphat - Monohydrat	AppliChem GmbH	A3559
<b>S</b>		
Salzsäure (HCl) (~37%)	Fisher Chemicals	H/1200/PB15
Schwefelsäure	Carl Roth	46234
SDS	Carl Roth	CN30.3
Silbernitrat	Sigma-Aldrich	31630
SOC-Medium	New England Biolabs	B9020S
<b>S</b>		
Streptomycin	Sigma-Aldrich	S6501
Sucrose	Fisher Scientific	S/8600/60
<b>T</b>		
TB-Medium	Carl Roth	X972.3
TEMED	Carl Roth	2367.3
Tricin	Carl Roth	6977.3
Tris	Sigma-Aldrich	T1503
Tween 20	Carl Roth	9127.1
<b>W</b>		
Wasserstoffperoxid (30 %)	Carl Roth	8070.2
<b>Z</b>		
Zinkchlorid	AppliChem	A0990

## 2.6.2 Spezielle Substanzen, Puffer und Materialien

Verwendete spezielle Substanzen wie auch Puffer und Materialien sind in Tab. 14 gezeigt.

Tab. 14: Verwendete spezielle Substanzen, Puffer und Materialien.

Bezeichnung	Verwendungszweck	Hersteller	Bestellnummer
Blocker BSA (10 %) in PBS	ELISA	Thermo Scientific	37525
Blottingpapier	Western Blot-Analysen	neoLab	HN-0063
cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Inhibition der Proteasen nach Zellyse	Roche Diagnostics GmbH	T728.1
Gene Pulse Curvette	Borrelientransformation	Bio-Rad	165-2086
Filtropur S 0,45	Proteinreinigung	Sarstedt	83.1826
F8 Maxisorp Mikrotiterplatten	ELISA, WiELISA, Hämolytische Assays	Thermo Scientific	468667
Corning 96-Well Clear Flat Bottom Microplates	Borrelientransformation	Corning	3598
BioWhittaker Veronal Buffer (5x Concentrate)	WiELISA	Lonza	12-624E
NEBExpress Ni Resin	Proteinaufreinigung	New England Biolabs	S1428S
LPS from <i>Salmonella enteritidis</i>	WiELISA	Hycult Biotech	HC4059
o-Phenylenediamine	Substrat für ELISA, WiELISA	Sigma-Aldrich	P5412
PBS <sup>++</sup> (Dulbeccos's Phosphat-gepufferte Saline mit Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> )	Puffer für diverse Versuche	Gibco	14040-091
PBS (Dulbeccos's Phosphat-gepufferte Saline)	Puffer für diverse Versuche	Gibco	14190-094
PS-Microplatte 96 Well U-FORM	Micro-BCA	Greiner Bio-One	650101
KOVA Glasstic Slide 10 with grids	Zählkammer für die Zellzahlbestimmung von Erythrozyten und Borrelienzellen	Hycor	87144E
Nitrocellulose Blotting Membrane	Western Blot-Analyse	Cytiva Amersham	10600001
recomBlot Waschpuffer 5x	Western Blot-Analyse	Mikrogen GmbH	10012
recomBlot TMB Substrat	Western Blot-Analyse	Mikrogen GmbH	10038
VIVASPIN TURBO 15	Aufkonzentrieren und Umpuffern von Protein-haltigen Lösungen	Sartorius	VS15T12



Tab. 14: Verwendete spezielle Substanzen, Puffer und Materialien, fortgesetzt.

Bezeichnung	Verwendungszweck	Hersteller	Bestellnummer
Pierce Protein Concentrator PES, 10K MWCO, 5-20 ml	Aufkonzentrieren und Umpuffern von Protein-haltigen Lösungen	Thermo Scientific	88528
Dako Fluorescence Mounting Medium	Immunofluoreszenzassay	Dako / Agilent	S3023
Wasser, Bio-Science-Grade, Nuklease-frei und autoklaviert, DEPC-behandelt	Isolierung von Plasmid-DNA	Carl Roth	T143.4
500 ml Bottle Top Filter 0,45 µm	Sterilfiltrieren von Lösungen und Puffer	Corning	430514
1 L Bottle Top Filter 0,22 µm	Sterilfiltrieren von Lösungen und Puffer	Corning	430015
500 ml Bottle Top Filter 0,22 µm	Sterilfiltrieren von Lösungen und Puffer	Corning	430513

### 2.6.3 Geräte

Die Tab. 15 umfasst alle verwendeten Geräte.

Tab. 15: Verwendete Geräte.

Bezeichnung	Hersteller
<b>Agarosegel Zubehör</b>	
Netzgerät EV265	Consort
Netzgerät E443	Consort
Geldokumentationssystem – Model GP-FAS-V	Nippon Genetics
Sub-Cell GT Cell	Bio-Rad
Sub-Cell GT Cell Caster	Bio-Rad
<b>Brutschränke</b>	
Brutschrank B5060	Heraeus
Brutschrank BBD 6220	Thermo Scientific
<b>Dispenser</b>	
FrontLine™ HR Microliter Contact Dispenser	BioDot
<b>Dispergiergeräte</b>	
MiCCRA D-9 Dispergiergerät	Art Prozess- & Labortechnik GmbH
<b>ELISA-Reader/Spektrometer</b>	
Nanophotometer Pearl P 300	Implem
Power Wave HT	BioTek
Ultrospec 3100 pro	Amersham Biosciences
<b>Kamera</b>	
RT3 Camera	Visitron Systems

Tab. 15: Verwendete Geräte, fortgesetzt.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Magnetrührer</b>	
IKAMAG RET	IKA-Werke
MR Hei-Standard	Heidolph
MR 2002	Heidolph
KMO 2 Basic	IKA-Werke
<b>Mikroskope</b>	
Standard 25 mit Dunkelfeldkonsensor	Zeiss
Axio Imager M2 fluorescence microscope	Zeiss
<b>PCR-Thermocycler</b>	
T3000 Thermocycler	Biometra
TProfessional Basic Gradient	Biometra
LightCycler 480 System	Roche
<b>pH-Meter</b>	
pH-Meter 654	Metrohm
<b>Pipetten</b>	
Research und ResearchPlus	Eppendorf
Finnpipette Novus (100-1200 µl/30-300 µl)	Thermo Scientific
<b>Pipetten</b>	
Handystep Electronic	Brand
<b>Pipettierhilfen</b>	
PIPETBOY acu	IBS
Pipetus	Hirschmann-Laborgeräte
<b>Schüttler / Rüttler</b>	
MS2 Minishaker	IKA-Werke
Vortexer REAX 1DR	Heidolph
Vortexer VF2	IKA-Werke
Intelli-Mixer RM-2M	LTF - Labortechnik
Schüttler KL2	Edmund Bühler
Wipptisch Rocky	LTF Fröbel
<b>Temperierbare Schüttler/Inkubatoren</b>	
Novotron HT	Infors AG
Wasserbad 1083	GFL
Thermomixer 5437	Eppendorf
Thermomixer comfort	Eppendorf
<b>SDS-PAGE und Zubehör für den Proteintransfer</b>	
Netzgerät E835	Consort
Vertikale Elektrophoresekammer	Sigma-Aldrich

Tab. 15: Verwendete Geräte, fortgesetzt.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>SDS-PAGE und Zubehör für den Proteintransfer</b>	
Blotgerät	Peqlab
<b>Dokumentationssystem</b>	
GS-900 Calibrated Densitometer	Bio-Rad
Elektroporationssystem	
Gene Pulser II mit Pulse Controller Plus	Bio-Rad
Ultraschallgerät mit Kühlung	
Sonifier 450 mit Becherresonator 102C (CE)	Branson
Kühlungsgerät Multistar	Fryka
<b>Sterilwerkbank</b>	
Herasafe HS12	Heraeus
<b>Waagen</b>	
Analysenwaage 572	Kern
Feinwaage PNJ	Kern
<b>Zentrifugen</b>	
Multifuge X3 FR	Thermo Scientific
Multifuge 3 S-R	Heraeus / Thermo Scientific
Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf
Micro Centrifuge IR 220VAC	Carl Roth

#### 2.6.4 Software

Die in dieser Arbeit genutzte Software ist in der folgenden Tab. 16 aufgeführt.

Tab. 16: Verwendete Software.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Citavi 6	Swiss Academic Software
CLC Sequence Viewer 8	Qiagen Aarhus A/S
CorelDRAW Graphics Suite X5	Corel
GraphPad Prism 7	GraphPad Software Inc.
Gen5 1.11	Bio-Tek Instruments
GIMP 2.10.30	GIMP-Team
Image Lab 6.1	Bio-Rad
LightCycler480 Software	Roche
NEBioCalculator	New England Biolabs
SnapGene 4.2	GSL Biotech LLC

## 2.6.5 Allgemeine Puffer und Lösungen

Tab. 17 enthält die eingesetzten Puffer.

Tab. 17: Verwendete Puffer.

Puffer	Zusammensetzung
PBS (5x) (Phosphate-buffered saline)	50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 5 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 750 mM NaCl ad 2 L Aqua dest. pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt.
Der Puffer wurde autoklaviert.	
TBS (5x) (Tris-buffered saline)	250 mM Tris 1 M NaCl ad 2 L Aqua dest. pH-Wert wurde auf 7,5 eingestellt.
Der Puffer wurde autoklaviert.	
GVB <sup>++</sup>	20 ml Veronalpuffer 80 ml Aqua dest. 0,1 % (w/v) Gelatine
Lagerung bei 4 °C.	
150 mM Tris/HCl	150 mM Tris ad 250 ml Aqua dest. pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt.
Der Puffer wurde sterilfiltriert (0,22 µm).	
20 mM Tris/HCl	20 mM Tris ad 250 ml Aqua dest. pH-Wert wurde auf 7,2 eingestellt.
Der Puffer wurde sterilfiltriert (0,22 µm).	

### 2.6.6 Kulturmedien

Fortführend sind in Tab. 18 die zum Einsatz gekommenen Kulturmedien abgebildet.

Tab. 18: Verwendete Kulturmedien.

Medium	Zusammensetzung
TB-Medium	Carl Roth, #X972.3 50,8 g TB-Medium ad 1 L Aqua dest. 4 ml Glycerin
Das Medium wurde autoklaviert.	
LB-Medium (Luria/Miller)	Carl Roth, #X968.1 25 g LB-Medium ad 1 L Aqua dest.
Das Medium wurde autoklaviert.	
LB-Agar (Luria/Miller)	Carl Roth, #X969 40 g LB-Medium ad 1 L Aqua dest.
Das Medium wurde autoklaviert.	
BSK-H Medium ohne Glutamin	Bio&Sell, #BS 2.120L 500 ml BSK-H Medium werden mit 6 % hitzeinaktiviertem Kaninchenserum (Sigma- Aldrich, #R4505) (erhitzen auf 56 °C für 30 min), supplementiert
Aliquotiert in 10 ml und Lagerung bei 4 °C.	
MKP-Grundmedium (208)	Bio&Sell, Auftragsanfertigung 100 ml CMRL-1066 (10x) ohne Glutamin 900 ml Aqua bidest. 3 g Neopepton 6 g HEPES 0,7 g Natriumcitrat 3 g Glucose 0,8 Natriumpyrovat 0,4 g N-Acetylglucosamin 2 g Natriumbicarbonat
Lagerung erfolgte bei 4 °C.	

Tab. 18: Verwendete Kulturmedien, fortgesetzt.

Medium	Zusammensetzung
Medium zur Kultivierung von Rückfallfieber-Borrelien	20 ml MKP Grundmedium 20 ml hitzeinaktiviertes Humanserum 2,3 ml Rinder-Serum-Albumin (Sigma-Aldrich, A-7409) (5,5 %)
Aliquotiert in 5 ml und Lagerung bei 4 °C.	

## 2.7 Mikrobiologische Methoden

### 2.7.1 Kultivierung von *E. coli*-Zellen

Für die Kultivierung von *E. coli*-Zellen wurden diese entweder aus der eingefrorenen Stammkultur (-80 °C) oder von Einzelkolonien auf LB-Agarplatten entnommen. Dazu wurden 10 µl aus der angetauten Stammkultur oder eine mit der Impföse entnommene Kolonie von der LB-Agarplatte in ein mit Antibiotikum (1:1000) versetztes LB-Flüssigmedium (Kapitel 2.6.6) überführt. Die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C und 350 Upm inkubiert.

### 2.7.2 Kultivierung von Borrelienzellen

Zur Kultivierung der verschiedenen Borrelienstämme wurden die eingefrorenen Stammkulturen bei Raumtemperatur (RT) vollständig aufgetaut und in BSK-Medium überführt (Kapitel 2.6.6). Dabei wurden alle *B. garinii*- und *B. duttonii*-Stämme in BSK-H Medium kultiviert, welches mit Kaninchenserum versetzt wurde. Der *B. recurrentis*-Stamm PAbJ wurde in mit Humanserum supplementiertem BSK-H Medium kultiviert. Der *B. recurrentis*-Stamm A17 wurde in BSK-H Medium passagiert, welches sowohl mit Kaninchen- und auch Humanserum versetzt wurde. Die Kultivierung erfolgte bei 33 °C in einem bis zu 1 cm unterhalb des Deckels gefüllten dicht verschlossenen 13 ml Röhrchen unter mikroaerophilen Bedingungen.

### 2.7.3 Antibiotika

Zur selektiven Kultivierung der *E. coli* bzw. *B. garinii*-Transformanten wurde das Flüssigmedium, wie auch die Agarplatten, mit den entsprechenden Antibiotika versetzt.

Ampicillin und Streptomycin (Tab. 19) wurden in Aqua bidest gelöst, sterilfiltriert (0,22 µm) und anschließend aliquotiert. Diese wurden bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert.

Tab. 19: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Ampicillin	50 mg/ml	50 µg/ml
Streptomycin	50 mg/ml	50 µg/ml

#### 2.7.4 Zellzahlbestimmung von Erythrozyten und Borrelienzellen

Für die Bestimmung der Zellzahl der Schafserythrozyten wurden zuerst verschiedene Verdünnungen mit GVB<sup>++</sup> (Kapitel 2.6.5) (1:100, 1:1000, 1:2000 und 1:4000) angefertigt. Für die Bestimmung der Zellzahl von Borrelien wurden Verdünnungen gleichermaßen in PBS<sup>++</sup> hergestellt. Anschließend wurden 10 µl der Verdünnung in die Zählkammer pipettiert. Dabei wurde eine Verdünnung gewählt, sodass pro Quadrat der Zählkammer zwischen fünf und 20 Zellen vorlagen. Von diesen Quadraten wurden neun ausgezählt und anschließend der Durchschnittswert berechnet. Mithilfe des Durchschnittswerts konnte nun die Zellzahl pro µl wie folgt berechnet werden:

$$\text{Durchschnitt} \times \text{Kammerfaktor}(90) \times \text{Verdünnungsfaktor} = \frac{\text{Zellen}}{\mu\text{l}}$$

#### 2.7.5 Amplifikation und Reinigung von DNA-Fragmenten nach PCR

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR wurde standardmäßig entweder mit der *Taq* DNA-Polymerase oder mit der Hifi-DNA-Polymerase bzw. der VeriFi DNA-Polymerase durchgeführt. (Kapitel 2.3.2). Der PCR-Reaktionsansatz wurde auf Eis pipettiert und anschließend in den vorprogrammierten PCR-Thermocycler platziert. Das Standard-Pipettierschema der jeweiligen Polymerase ist in den folgenden Tabellen dargestellt. Nach Beendigung der Reaktion wurden die Amplifikate bei 4 °C gelagert.

Tab. 20: Standard-Pipettierschema der *Taq* DNA-Polymerase.

Substanz	Volumen [ $\mu$ l]
PCR-Puffer (10x)	5
50 nM MgCl <sub>2</sub>	1,5
10 mM dNTP Mix	1
FP-Starteroligonukleotid (10 $\mu$ M)	2,5
RP-Starteroligonukleotid (10 $\mu$ M)	2,5
DNA-Matrize (~ 50 – 100 ng)	1-5
<i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0,5
Aqua bidest. (Nuklease-frei)	ad 50

Tab. 21: Reaktionsschema der *Taq* DNA-Polymerase.

	Temperatur [ $^{\circ}$ C]	Zeit [s]	Reaktionsschritte
	94	180	Initiale Denaturierung
	94	45	Denaturierung
25 – 30 Zyklen	60	30	Anlagerung der Starteroligonukleotide
	72	90/kbp	Amplifikation
	72	300	Finale Amplifikation

Tab. 22: Standard-Pipettierschema der HiFi DNA-Polymerase.

Substanz	Volumen [ $\mu$ l]
PCRBIO Reactionbuffer (5x)	10
FP-Starteroligonukleotid (10 $\mu$ M)	2
RP-Starteroligonukleotid (10 $\mu$ M)	2
DNA-Matrize (~ 50 – 100 ng)	1-5
HiFi DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0,5
Aqua bidest. (Nuklease-frei)	ad 50



Tab. 23: Standard-Pipettierschema der VeriFi DNA-Polymerase.

Substanz	Volumen [ $\mu$ l]
PCRBIO VeriFi Puffer (5x)	10
VeriMax Enhancer (10x)	5
FP-Starteroligonukleotid (10 $\mu$ M)	2
RP-Starteroligonukleotid (10 $\mu$ M)	2
DNA-Matrize (~ 50 – 100 ng)	1-5
VeriFi DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0,5
Aqua bidest. (Nuklease-frei)	ad 50

Tab. 24: Reaktionsschema für die HiFi und VeriFi DNA-Polymerase.

	Temperatur [ $^{\circ}$ C]	Zeit [s]	Reaktionsschritte
	95	60	Initiale Denaturierung
	95	15	Denaturierung
25 – 35 Zyklen	60	15	Anlagerung der Starteroligonukleotide
	72	30/kbp	Amplifikation
	72	300	Finale Amplifikation

### 2.7.6 Separation von PCR-Amplifikaten mittels Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von PCR-Produkten wurde je nach Größe der erzeugten Amplifikate ein 0,5 – 2 % Agarosegel genutzt. Zur Herstellung wurde Agarose in 100 oder 150 ml 1x TAE-Puffer gegeben und dieses unter Erhitzen gelöst. Die aufgelöste Agarose wurde anschließend in die entsprechende Gießvorrichtung gegossen und diese bis zur Erhärtung abgekühlt.

5  $\mu$ l der zu analysierenden Proben wurden mit 5  $\mu$ l Aqua dest., 2  $\mu$ l Gelbeladungspuffer (Kapitel 2.6.1) und 0,5  $\mu$ l MIDORI Green (Kapitel 2.6.1) versetzt und in die Vertiefungen des Agarosegel aufgetragen. Je nach Größe des Amplifikates wurden zusätzlich 5  $\mu$ l des 100 bp- oder des 1 kbp Größenstandards (2.5.2) mit 0,5  $\mu$ l MIDORI Green versetzt und aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte je nach Größe des Agarosegels bei 120 – 180 V in 1x TAE-Puffer für 30 – 60 min. Nach erfolgter Auftrennung wurden die DNA-Fragmente unter Blaulicht visualisiert und die Ergebnisse dokumentiert.

**50x TAE-Puffer**

2 M Tris  
1 M Essigsäure  
100 mM EDTA  
ad 1 L Aqua dest.  
pH-Wert wurde auf 8,0 eingestellt.

**2.7.7 Hydrolyse von DNA-Fragmenten mittels Restriktionsendonukleasen**

Für die Hydrolyse von DNA-Fragmenten wurden die entsprechenden Restriktionsendonukleasen mit dem dazugehörigen CutSmart Puffer von New England Biolabs verwendet (Kapitel 2.3.2). Die Anwendung erfolgte nach der Anleitung des Herstellers und die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 350 Upm für 3 h oder über Nacht. Anschließend wurden die Restriktionsreaktionen nach Anleitung des MinElute Reaction Cleanup Kits (Kapitel 2.5.1) gereinigt und in 20 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert.

**2.7.8 Ligation von hydrolysierten DNA-Fragmenten in einem Vektor**

Um die hydrolysierten DNA-Fragmente mit einem zuvor linearisierten Vektor zu ligieren, wurde die T4 DNA-Ligase verwendet (Kapitel 2.3.2). Der Ansatz wurde nach Anleitung des Herstellers präpariert, wobei die zu ligierenden DNA-Fragmente im Verhältnis 3:1 oder 5:1 zum Vektor eingesetzt wurden. Dazu wurde wie in Kapitel 2.7.12 beschrieben die Konzentration der DNA gemessen. Anschließend wurde die Menge des DNA-Fragments, das in den verschiedenen Verhältnissen zu der Menge des linearisierten Vektors einzusetzen war, mit Hilfe des Webtools NEBioCalculator von New England Biolabs berechnet. Die Ligation erfolgte bei 16 °C und 350 Upm über Nacht.

**2.7.9 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* oder *B. garinii***

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen erfolgte nach Anleitung des Herstellers mit dem Monarch Plasmid Miniprep Kit für eine 5 ml Kultur und mit dem PureYield Plasmid Midiprep System für eine 50 ml Kultur (Kapitel 2.5.1). Die Plasmide aus *B. garinii* wurden ausschließlich mit dem Monarch Plasmid Miniprep Kit aus 10 ml Kulturen isoliert. Die Plasmid-DNA wurde ausschließlich mit Bio-Science-Grade Nuklease-freiem Wasser

(Kapitel 2.6.2) eluiert und anschließend bei 4 °C oder über einen längeren Zeitraum bei -20 °C gelagert.

#### **2.7.10 Isolierung von genomischer DNA aus Borrelienzellen**

Zunächst wurden die bis zur Mitte der exponentiellen Wachstumsphase kultivierten Borrelienzellen (ca.  $1 \times 10^8$  Zellen/ml) 2-mal mit 10 ml PBS<sup>++</sup> bei  $6000 \times g$  für 20 min und 4 °C gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Zellsediment in 1 ml PBS<sup>++</sup> resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei  $20817 \times g$  für 10 min und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellsediment in 180 µl ATL-Puffer resuspendiert und die genomische DNA mit dem QIAamp DNA Mini Kit (Kapitel 2.5.1) nach Anleitung des Herstellers isoliert. Abweichend vom Protokoll wurde die DNA mit Bio-Science-Grade Nuklease-freien Wasser (Kapitel 2.6.2) eluiert und bei -20 °C gelagert.

#### **2.7.11 Isolierung von RNA aus Borrelienzellen**

Zur Isolierung der RNA aus *B. duttonii* LAI wie auch V, *B. recurrentis* A17 und *B. garinii* wurde das RNAprotect Bacteria Reagent und das RNeasy Mini Kit (Kapitel 2.5.1) eingesetzt und nach Anleitung des Herstellers verfahren. Dazu wurde das Protokoll 4: “Enzymatic Lysis and Proteinase K Digestion of Bacteria”, das Protokoll 7: “Purification of Total RNA from Bacterial Lysate using the RNeasy Mini Kit”, und zusätzlich der Appendix B: “Optional On-Column DNase Digestion using the RNase-Free DNase Set” befolgt.

Die bis zur Mitte der exponentiellen Wachstumsphase kultivierten Borrelienzellen wurden zuerst 2-mal in 10 ml PBS<sup>++</sup> bei  $6000 \times g$  für 20 min und 4 °C gewaschen. Es folgte ein weiterer Waschschrift in 1 ml PBS<sup>++</sup> in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei  $20817 \times g$  für 10 min und 4 °C. Das Zellsediment wurde anschließend in 200 µl PBS<sup>++</sup> resuspendiert. Dieser Suspension wurden 500 µl RNAprotect Bacteria Reagent hinzugefügt, für 5 s geschüttelt und 5 min bei RT inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min und  $5000 \times g$  bei RT. Nach Dekantieren des Überstandes konnte das Zellsediment entweder direkt weiterverwendet oder bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

Nachfolgend wurde das Zellsediment in 200 µl TE-Puffer mit Lysozym (s. Tabelle unten) und 20 µl Proteinase K resuspendiert und für 10 s geschüttelt. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei RT und 350 Upm wurden 700 µl RLT-Puffer hinzugefügt und das Gemisch abermals geschüttelt. Zum Schluss wurden 500 µl Ethanol hinzugefügt und die Suspension vorsichtig

vermischt. Anschließend wurden zweimal hintereinander 700 µl des Lysates auf eine Säule aufgetragen und dieses bei  $8000 \times g$  und RT für 30 s zentrifugiert. Die Säule wurde mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen. Nachfolgend wurden 10 µl DNase I in 70 µl RDD-Puffer auf die Säule appliziert und diese für 15 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Säule ein weiteres Mal mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen. Darauf folgten zwei weitere Waschschrte mit jeweils 500 µl RPE-Puffer. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt wurde Restflüssigkeit entfernt und die RNA in 30 µl RNase freiem Wasser eluiert.

Um einen möglichst hohen Reinheitsgrad zu garantieren und um eine mögliche Restkontamination von DNA zu entfernen, wurde die isolierte RNA mit RQ1 RNase-freier DNase inkubiert und dieser Reaktionsansatz anschließend mit dem Monarch RNA Cleanup Kit gereinigt. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal durchgeführt. Die Konzentration der RNA wurden ermittelt und stand für die RT-qPCR zur Verfügung.

#### **TE-Puffer mit Lysozym**

30 mM Tris/HCl pH 8,0

1mM EDTA

15 mg/ml Lysozym

ad 50 ml Aqua dest.

Lagerung erfolgte bei 4 °C.

#### **2.7.12 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA**

Die Konzentration von aufgereinigten PCR-Produkten und Restriktionsreaktionen sowie der isolierten genomischen DNA, RNA und Plasmide wurden photometrisch mit den Nanophotometer Pearl P 300 gemessen. Als Referenz diente das jeweilige Elutionsmedium.

#### **2.7.13 Reverse Transkription mit anschließender quantitativer PCR (RT-qPCR-Analyse)**

Für die RT-PCR wurde das LunaScript RT Supermix Kit verwendet, während für die qPCR das Luna Universal qPCR Master Mix Kit angewendet wurde. Bei beiden erfolgte die Durchführung nach Instruktion des Herstellers. Die Standard-Pipettierschemata sowie die jeweiligen Reaktionsschemata sind in den folgenden Tabellen abgebildet.

Tab. 25: Standard-Pipettierschema für die LunaScript RT-PCR.

Substanz	Volumen
LunaScript RT Supermix (5x)	4 $\mu$ l
RNA Probe	1 $\mu$ g
Nuklease-freies Wasser	ad 20 $\mu$ l

Tab. 26: Reaktionsschema der LunaScript RT.

Temperatur [°C]	Zeit [min]	Reaktionsschritte
25	2	Anlagerung der Starternukleotide
55	10	cDNA Synthese
95	1	Denaturierung

Tab. 27: Standard-Pipettierschema für die Luna Universal qPCR.

Substanz	Volumen
Luna Universal qPCR Master Mix	10 $\mu$ l
FP (10 $\mu$ M)	0,5 $\mu$ l
RP (10 $\mu$ M)	0,5 $\mu$ l
Template DNA	1 $\mu$ l (50 ng)
Nuklease-freies Wasser	8 $\mu$ l

Tab. 28: Reaktionsschema der Luna-Universal-qPCR

	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Reaktionsschritte
	95	60	Initiale Denaturierung
40 – 45	95	15	Denaturierung
Zyklen	60	30	Amplifikation und Fluoreszenzmessung
	60-95	-	Schmelzkurvenanalyse

#### 2.7.14 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung erfolgte über den LightRun Tube Sequencing Service des Unternehmens Eurofins Genomics. Dazu wurden die gereinigten Plasmide in einer Konzentration von 80 - 100 ng/ $\mu$ l in 5  $\mu$ l mit 5  $\mu$ l des jeweiligen Starteroligonukleotids (1  $\mu$ M) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vermischt.

### **2.7.15 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen**

Die Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen (Kapitel 2.1.2) erfolgte nach der Anleitung des Herstellers. Dazu wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und anschließend 5 µl des Vektors hinzugegeben. Die Suspension wurde vorsichtig vermischt und anschließend 30 min auf Eis inkubiert. Es folgten ein Hitzeschock bei 42 °C für 30 s und eine Inkubation von 5 min auf Eis. Danach wurden 950 µl SOC-Medium zu den Zellen hinzugegeben und diese 1 h bei 37 °C und 350 Upm inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

### **2.7.16 Herstellung kompetenter *B. garinii*-Zellen und Transformation mittels Elektroporation**

Für die Transformation von Borrelienzellen wurden 90 ml einer bis zur Mitte der exponentiellen Wachstumsphase inkubierten Flüssigkultur bei 4 °C und 5000 × g für 20 min zentrifugiert. Das Zellsediment wurde zunächst 2-mal bei 5000 × g, 4 °C und 20 min mit 25 ml EPS-Puffer gewaschen, gefolgt von zwei weiteren Waschschritten mit jeweils 10 ml EPS-Puffer. Bei allen Waschschritten wurde darauf geachtet, dass keine sichtbaren Zellaggregate zu erkennen waren. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Zellsediment in 300 µl EPS-Puffer resuspendiert und in 1,5 ml Reaktionsgefäße á 60 µl aliquotiert. Die Zellen konnten nun entweder sofort weiterverwendet oder bei -80 °C bis zu sechs Monate gelagert werden.

Parallel zur Herstellung kompetenter Borrelienzellen wurde der zuvor präzipitierte Vektor (20 µg DNA in 200 µl Nuklease-freiem Wasser wurde mit 20 µl 3 M Natriumacetat-Lösung und 550 µl Ethanol über Nacht bei -80 °C präzipitiert) bei 20817 × g für 30 min zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 500 µl eiskaltem 70% Ethanol gewaschen und für 10 min bei 20817 × g zentrifugiert. Nach vollständigem Entfernen von Ethanol wurde das Pellet an der Luft getrocknet und die DNA in 5 µl Bio-Science-Grade Nuklease-freiem Wasser (Kapitel 2.6.2) gelöst.

Für die Transformation wurden die Borrelienzellen (60 µl) zusammen mit dem Vektor (20 µg) in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette (Kapitel 2.6.2) gegeben. Nach einer Inkubation von 30 s auf Eis erfolgte die Elektroporation bei 2,5 kV, 25 µF und 200 Ω für 4-5 ms. Direkt im Anschluss wurde die Zellsuspension in 10 ml BSK-H Medium (RT) überführt und das Röhrchen über Nacht bei 33 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Borrelienzellen in 90 ml BSK-H Medium verdünnt und die Suspension mit 100 µl Streptomycin (50 mg/ml) versetzt. Diese Suspension wurde á 200 µl auf Mikrotiterplatten verteilt. Die Mikrotiterplatten

wurden mit Parafilm verschlossen und bei 33 °C inkubiert, bis eine Verfärbung des Mediums stattfand. Danach wurden ausgewählte Klone in 1,5 ml mit Streptomycin supplementiertes frisches BSK-H Medium gegeben und nach sichtbarem Wachstum in ein 10 ml Röhrchen überführt. Außerdem wurden 1,5 ml Kulturen entnommen, mit 0,3 ml Glycerin versetzt und bei -80 °C gelagert.

### 3 M Natriumacetat-Lösung

3 M Natriumacetat  
ad 50 ml Aqua dest.  
pH-Wert wurde auf 5,2 mit Essigsäure  
eingestellt.

Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

### EPS-Puffer

93 g/l Sucrose (Saccharose)  
15% (v/v) Glycerol

Der Puffer wurde sterilfiltriert (0,22 µm) und bei 4 °C gelagert.

#### 2.7.17 Herstellung von Borrelienlysaten

Die Borrelienzellen wurden zunächst 2-mal mit jeweils 10 ml PBS<sup>++</sup> bei 6000 × g für 20 min und 4 °C gewaschen, gefolgt von zwei weiteren Waschsritten mit jeweils 1 ml PBS<sup>++</sup> bei 20817 × g für 10 min und 4 °C. Zum Schluss wurde das Zellsediment in 200 µl PBS<sup>++</sup> resuspendiert, das Reaktionsgefäß mit Parafilm verschlossen und 5-mal im vorgekühlten Becherresonator für jeweils 30 s sonifiziert. Um eine Denaturierung durch die entstehende Wärmeentwicklung zu verhindern, wurde die Probe nach jedem Schritt für 30 s in Eis gekühlt. Das Lysat wurde anschließend bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### 2.7.18 Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Schägger

Die Zusammenstellung des Tris/Tricin (TT)- SDS Gels nach Schägger und Jagow (209) sowie die dafür benötigten Puffer und Lösungen sind in

Tab. 29 dargestellt. Das APS wie auch TEMED wurde erst kurz vor dem Gießen des Gels hinzugefügt. Es wurde zuerst das Trenngel (10 %) gegossen und anschließend mit Ethanol

überschichtet. Nach erfolgter Auspolymerisation wurde das überschüssige Ethanol verworfen und das Sammelgel (4 %) auf das Trenngel gegeben. Anschließend konnte der Kamm der entsprechenden Größe zwischen die Glasplatten platziert werden. Das auspolymerisierte Gel konnte entweder am selben Tag verwendet oder für höchstens sieben Tage bei 4 °C gelagert werden.

Für die Gelelektrophorese wurden die Proteinproben mit PBS<sup>++</sup> auf 20 µl aufgefüllt und mit 6,8 µl TT-Inkubationspuffer versetzt. Für die Färbung mit Silbernitrat (Kapitel 2.7.21) wurden 2 µl des Precision Plus Protein Unstained Standards verwendet. Für eine Western Blot-Analyse (Kapitel 2.8.1) wurden 15 µl des Precision Plus Protein Dual Color Standards eingesetzt. Der verwendete Standard wurde ebenfalls mit PBS<sup>++</sup> auf 20 µl aufgefüllt und mit 6,8 µl TT-Inkubationspuffer versetzt. Alle Proben wurden vor der Separation für 5 min bei 95 °C und 350 Upm erhitzt, kurz anzentrifugiert und anschließend auf das SDS- Polyacrylamid-Gel appliziert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte im Sammelgel für 2 h bei 40 V und im Trenngel über Nacht bei 60-75 V.

Tab. 29: Zusammensetzung des Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gels

Substanz	Sammelgel (4 %)	Trenngel (10 %)
TT-Acrylamid-Lösung	1 ml	6 ml
TT-Gelpuffer (3x)	3 ml	10 ml
Glycerin	-	3 g
Aqua dest.	ad 12 ml	ad 30 ml
APS (10 %)	180 µl	300 µl
TEMED	18 µl	30 µl

#### TT-Acrylamid-Lösung für die Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

48 % (w/v) Acrylamid

1,5 % (w/v) Bisacrylamid

ad 500 ml mit Aqua ad iniectabilia

Der Puffer wurde sterilfiltriert (0,22 µm).



**TT-Gelpuffer (3x) für die Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

3 M Tris

0,3 % (w/v) SDS

ad 1 L Aqua bidest.

pH-Wert wurde auf 8,45 eingestellt.

Der Puffer wurde sterilfiltriert (0,22 µm).

**TT-Anodenpuffer für die Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

100 mM Tris

ad 2 L Aqua bidest.

pH-Wert wurde auf 8,9 eingestellt.

**TT-Kathodenpuffer für die Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

100 mM Tris

100 mM Tricin

0,1 % (w/v) SDS

ad 2 L Aqua bidest.

pH-Wert wurde auf 8,25 eingestellt.

**TT-Inkubationspuffer (4x)**

150 mM Tris/HCl pH 7,0

30 % (v/v) Glycerol

12 % (w/v) SDS

0,008 g Bromphenolblau

600 µl β-Mercaptoethanol

ad 10 ml Aqua bidest.

pH-Wert wurde auf 6,8-7 eingestellt.

### 2.7.19 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli

In Tab. 30 ist die Zusammensetzung des SDS-Polyacrylamid-Gels nach Laemmli (210) aufgezeigt. Dabei wurden APS und TEMED erst kurz vor dem Gießvorgang hinzugefügt. Das Trenngel (7,5 %) wurde zuerst gegossen und mit Ethanol beschichtet. Nach der Polymerisation des Gels wurde das überschüssige Ethanol abgegossen und das Sammelgel (4 %) aufgeschichtet. Anschließend wurde der Kamm der entsprechenden Größe zwischen die präparierten Glasplatten eingesetzt. Das auspolymerisierte Gel konnte entweder am selben Tag verwendet oder für höchstens sieben Tage bei 4 °C gelagert werden.

Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli et al. (211) wurden 2 µl des Precision Plus Protein Unstained Standards verwendet und mit PBS<sup>++</sup> auf 20 µl aufgefüllt. Unabhängig von der Probengröße (20 µl oder 45 µl) (Kapitel 2.9.1) wurden diese mit 6,2 µl Laemmli-Inkubationspuffer und 1,5 µl β-Mercaptoethanol versetzt. Alle Proben wurden für 5 min bei 350 Upm auf 95 °C erhitzt, kurz zentrifugiert und anschließend auf das SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Die Separierung der Proteine erfolgte im Sammelgel für 2 h bei 40 V und im Trenngel für 100 V über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Spannung nochmals für 2 h auf 200 V erhöht und die Proteine mit Silbernitrat gefärbt (Kapitel 2.7.21).

Tab. 30: Zusammensetzung des SDS-Polyacrylamid-Gels nach Laemmli et al. (211).

Substanz	Sammelgel (4 %)	Trenngel (7,5 %)
Acrylamid-Lösung	1,3 ml	8 ml
Trenngelpuffer (4x)	-	8 ml
Sammelgelpuffer	2,5	-
Aqua dest.	ad 10 ml	ad 32 ml
APS (10 %)	50 µl	150 µl
TEMED	10 µl	50 µl

#### Acrylamid-Lösung nach Laemmli

29,2 % (w/v) Acrylamid  
 0,8 % (w/v) Bisacrylamid  
 ad 400 ml mit Aqua ad iniectabilia

Der Puffer wurde sterilfiltriert (0,22 µm).

**Sammelgelpuffer nach Laemmli**

0,5 M Tris  
0,4 % (w/v) SDS  
ad 200 ml Aqua bidest.  
pH-Wert wurde auf 6,8 eingestellt.

Der Puffer wurde steril-filtriert (0,22 µm).

**Trenngelpuffer (4x) nach Laemmli**

1,5 M Tris  
0,4 % (w/v) SDS  
ad 400 ml Aqua bidest.  
pH-Wert wurde auf 8,8 eingestellt.

Der Puffer wurde sterilfiltriert (0,22 µm).

**Running Buffer (5x) nach Laemmli**

0,125 M Tris  
0,96 M Glycin  
0,5 % (w/v) SDS  
ad 2 L Aqua bidest.  
pH-Wert wurde auf 8,3 eingestellt.

**Inkubationspuffer (5x) nach Laemmli**

0,5 M Tris/HCl pH 7,0  
10 % (v/v) Glycerol  
10 % (w/v) SDS  
0,025 g Bromphenolblau  
ad 7,6 ml Aqua bidest.

**2.7.20 Transfer von separierten Proteinen auf Nitrocellulosemembranen (Western Blot)**

Für den Transfer von den in der SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese separierten Proteinen wurde zuerst die Anode mit Anodenpuffer befeuchtet. Anschließend wurden drei in Anodenpuffer getränkte Chromatographiepapiere möglichst luftblasenfrei auf die Anode platziert. Anschließend wurde die ebenfalls in Anodenpuffer getränkte Nitrocellulosemembran

aufgelegt. Das zu untersuchende TT-SDS-Polyacrylamid-Gel wurde nun vorsichtig aus der Gelapparatur entnommen, in Kathodenpuffer getränkt und auf die Nitrocellulosemembran gelegt. Danach wurden drei weitere in Kathodenpuffer getränkte Chromatographiepapiere auf das SDS-Polyacrylamid-Gel platziert, die Luftblasen vorsichtig entfernt, die Kathode befeuchtet und die Apparatur verschlossen. Der Transfer erfolgte für 2 h bei einer Stromstärke von  $1 \text{ mA/cm}^2$  Nitrocellulosemembran. Zur Überprüfung des Transfers wurde das SDS-Polyacrylamid-Gel mit dem Reversible Protein Detection Kit (Kapitel 2.5.1) gefärbt und der zu detektierende Bereich ausgeschnitten. Zur Entfärbung wurde die Membran 15 min in 0,5 mM EDTA geschwenkt.

**TT-Anoden-Blotpuffer**

300 mM Tris  
100 mM Tricin  
ad 2 L Aqua dest.  
pH-Wert wurde auf 8,7 - 8,8 eingestellt.

**TT-Kathoden-Blotpuffer**

300 mM 6-Aminocapronsäure  
30 mM Tricin  
ad 2 L Aqua dest.

**EDTA-Stammlösung**

0,5 M EDTA  
ad 2 L Aqua dest.  
pH-Wert wurde auf 8,0 eingestellt.

### 2.7.21 Färbung von Proteinen im SDS-Polyacrylamid-Gel mit Silbernitrat

Nach erfolgter Separation der Proteine wurde die SDS- Polyacrylamid-Gele (2.7.18; 2.7.19) zuerst in der Fixierlösung für 30 min ohne Schwenken inkubiert. Anschließend wurde die Fixierlösung abgeschüttet und das SDS-Polyacrylamid-Gel für weitere 30 min in Inkubationslösung unter leichtem Schwenken inkubiert. Es folgten drei Waschschrte mit Aqua dest. für jeweils 5 min bei starkem Schwenken. Danach wurde das SDS-Polyacrylamid-Gel für weitere 20 min in der Silbernitrat-Lösung bei leichtem Schütteln inkubiert, gefolgt von zwei weiteren kurzen Waschschrten mit Aqua dest. Abschließend wurde der Entwickler hinzugegeben und das Gel bis zur Visualisierung der Proteine inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe der EDTA-Lösung terminiert und die visualisierten Proteine mit dem GS-900 Densitometer digitalisiert.

#### Fixierlösung

100 ml Ethanol  
25 ml Essigsäure  
ad 250 ml Aqua dest.

#### Inkubationslösung

0,5 g Natriumthiosulfat  
17 g Natriumacetat  
1,25 ml Glutaraldehyd (25 %)  
75 ml Ethanol  
ad 250 ml Aqua dest.

#### Silbernitrat-Lösung

0,625 g Silbernitrat  
350 µl Formaldehyd (37 %) (kurz vor Gebrauch  
hinzufügen)  
ad 250 ml Aqua dest.

**Entwicklerlösung**

6,25 g Natriumcarbonat  
175 µl Formaldehyd (37%) (kurz vor Gebrauch  
hinzufügen)  
ad 250 ml Aqua dest.

**Stopplösung**

29,2 g EDTA (0,5 M)  
ad 2 L Aqua dest.

**2.7.22 Produktion und Reinigung von rekombinant hergestellten Proteinen aus *E. coli*-Zellen**

Für die Überproduktion von Proteinen mit einem Hexahistidin-Polypeptid in *E. coli* wurde zuerst eine 5 ml Kultur angesetzt. Dazu wurden 5 ml LB-Medium mit 5 µl Ampicillin (50 mg/ml) versetzt und 10 µl einer Suspension der bei -80 °C gelagerten Zellen hinzugegeben. Die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C und 180 Upm inkubiert. Am folgenden Tag wurden 50 ml LB-Medium mit 50 µl Ampicillin und mit 10 µl aus der 5 ml Vorkultur versetzt. Diese Kultur wurde über Nacht bei 37 °C und 180 Upm inkubiert. Zur Überproduktion wurden 500 ml TB-Medium mit 500 µl Ampicillin versetzt und so viel von der Übernachtskultur hinzugegeben, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,1 erreicht wurde. Diese Kultur wurde bei 37 °C und 180 Upm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 – 0,6 inkubiert. Daraufhin wurde die Kultur für 15 min bei 180 Upm auf RT abgekühlt und anschließend 400 µl IPTG (0,5 M) hinzugegeben. Die Inkubation mit dem IPTG erfolgte schließlich für 4 h bei RT. Die Kultur wurde nun in 50 ml Röhren überführt und diese bei 6000 × g und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Sedimente bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Für die Proteinreinigung wurden die Zellsedimente zunächst auf Eis aufgetaut, anschließend in je 2,4 ml Lysispuffer resuspendiert, vereinigt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde mit dem Zellaufschluss begonnen. Dazu wurden die Zellen zuerst jeweils 20 s auf Stufe D mit dem Dispergierstab homogenisiert. Gefolgt wurde dies mit einem weiteren Zellaufschluss durch sechsmaliges sonifizieren für jeweils 30 s. Nach dem Aufschluss wurden die Zellen für 20 min bei 6000 × g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde filtriert (0,45 µm) und mit 1 ml, zuvor in Lysispuffer nach Angaben des Herstellers kalibrierten,

NEBExpress Ni-NTA-Partikel versetzt. Die Suspension wurde anschließend für 1 h bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert.

Nach erfolgter Inkubation wurden die Ni-NTA Partikel einmal mit 20 ml und zweimal mit 10 ml 10 mM Imidazol bei 600 × g und 4 °C für 1 min gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Ni-NTA-Partikel in 8 ml 10 mM Imidazol resuspendiert und auf eine Chromatographie-Säule appliziert. Nach Absetzen der Partikel wurde der Durchfluss aufgefangen und die an die Säulenmatrix gebundenen Proteine mit steigenden Imidazol-Konzentrationen (50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM und 250 mM) von der Säulenmatrix eluiert. Von den einzelnen Fraktionen wurden wie in Kapitel 2.7.18 aufgeführt, 20 µl auf ein TT-SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Anschließend wurde das Gel mit Silbernitrat gefärbt (Kapitel 2.7.21) und die Fraktionen mit den geringsten Verunreinigungen vereinigt. Abschließend wurde die Proteinsuspension mittels VIVASPIN TURBO 15 oder dem Pierce Protein Concentrator PES bei 4000 × g und 4 °C in Elutionspuffer umgepuffert und gleichzeitig aufkonzentriert. Das isolierte Protein wurde entweder bei 4 °C oder -20 °C gelagert.

### **Lysispuffer**

50 mM Natriumhydrogenphosphat  
300 mM Natriumchlorid  
10 mM Imidazol  
1 mg/ml Lysozym (kurz vor Gebrauch hinzugeben)  
ad 1 L Aqua dest.  
pH-Wert wurde auf 6,8 eingestellt.

Der Puffer wurde sterilfiltriert (0,22 µm) und bei 4 °C gelagert.

### **Imidazolpuffer (10 mM)**

50 mM Natriumhydrogenphosphat  
300 mM Natriumchlorid  
10 mM Imidazol  
1 Tablette Proteaseinhibitor  
ad 1 L Aqua dest.  
pH-Wert wurde auf 8,0 eingestellt.

Lagerung erfolgte bei -20 °C.

### **Stammlösung für Imidazolpuffer**

50 mM Natriumhydrogenphosphat  
300 mM Natriumchlorid  
1 Tablette Proteaseinhibitor  
ad 1 L Aqua dest.  
pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt.

### **Imidazol-Stammlösung**

5 M Imidazol  
ad 50 ml Aqua dest.

Lagerung erfolgte bei -20 °C.



**Imidazolpuffer (50 mM)**

198 ml Stammlösung für Imidazolpuffer  
2 ml 5 M Imidazol  
pH-Wert wurde auf 8,0 eingestellt.

Lagerung erfolgte bei -20 °C.

**Imidazolpuffer (100 mM)**

196 ml Stammlösung für Imidazolpuffer  
4 ml 5 M Imidazol  
pH-Wert wurde auf 8,0 eingestellt.

Lagerung erfolgte bei -20 °C.

**Imidazolpuffer (150 mM)**

194 ml Stammlösung für Imidazolpuffer  
6 ml 5 M Imidazol  
pH-Wert wurde auf 8,0 eingestellt.

Lagerung erfolgte bei -20 °C.

**Imidazolpuffer (200 mM)**

192 ml Stammlösung für Imidazolpuffer  
8 ml 5 M Imidazol  
pH-Wert wurde auf 8,0 eingestellt.

Lagerung erfolgte bei -20 °C.

**Imidazolpuffer (250 mM)**

190 ml Stammlösung für Imidazolpuffer  
10 ml 5 M Imidazol  
pH-Wert wurde auf 8,0 eingestellt.

Lagerung erfolgte bei -20 °C.

**Wasch- und Elutionspuffer für Proteine**

0,05 M Tris/HCl

ad 1 L Aqua dest.

pH-Wert wurde auf 8,0 eingestellt.

Der Puffer wurde sterilfiltriert (0,22 µm) und bei 4 °C gelagert.

**2.7.23 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Micro-BCA**

Die Bestimmung der Konzentration der gereinigten Proteine erfolgte mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit nach Anleitung des Herstellers. 25 µl von den zu den analysierenden Proteinen, die Protein-Verdünnungen, sowie verschiedene Konzentrationen des BSA-Standards wurden in eine Mikrotiterplatte mit U-Form gegeben. Zu den Ansätzen wurde anschließend 200 µl der Reaktionslösung gegeben und die Mikrotiterplatte bei 37 °C für 30 min inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde die Absorption bei 562 nm gemessen und die Proteinkonzentration anhand des BSA-Standards ermittelt.

**2.8 Immunologische Methoden****2.8.1 Western Blot-Analyse**

Um das Vorhandensein von Proteinen und Antikörpern in Proteinsuspensionen bzw. humanen Seren nachzuweisen, wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Im Folgenden sind die für die Western Blot-Analyse benötigten Substanzen und Puffer dargestellt.

**Blockierungspuffer für die Western Blot-Analyse**

TBS (1x)

0,1 % (v/v) Tween20

**Waschpuffer für die Western Blot-Analyse**

TBS (1x)

0,02 % (v/v) Tween20

### 2.8.1.1 Western Blot-Analyse zum Nachweis von Proteinen

Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (Kapitel 2.7.20) wurde diese anschließend für 1 h in Blockierungspuffer mit 5% (v/w) Magermilchpulver inkubiert. Anschließend wurde die Membran viermal für jeweils 5 min mit Blockierungspuffer gewaschen.

Zum Nachweis der Proteine wurde die Membran 1 h mit dem 1:1000 in 1x recomBlot Waschpuffer verdünnten primären Antikörper inkubiert. Es folgten vier weitere Waschschrte für jeweils 5 min mit dem Waschpuffer. Anschließend folgte eine Inkubation mit dem entsprechenden HRP-konjugierten sekundären Antikörper. Nach erneutem Waschen (4x) mit Waschpuffer wurden die Antigen-Antikörper-Komplexe durch die Zugabe von TMB detektiert. Um die Reaktion zu terminieren, wurde die Membran mehrfach mit Aqua dest. gewaschen. Die Membran wurde über Nacht getrocknet und diese anschließend mithilfe des GS-900 Densitometer digitalisiert. Alle Inkubationsschritte erfolgten unter leichtem Schwenken.

### 2.8.1.2 Western Blot-Analyse zum Nachweis von anti-Borrelien Antikörpern in Patientenseren

Zum Nachweis von gegen *B. recurrentis* gerichtete IgM und IgG Antikörper wurde eine SDS-PAGE mit Zelllysat des *B. recurrentis*-Stammes A17 (Kapitel 2.7.18) und nachfolgend eine Western Blot-Analyse (Kapitel 2.7.20) durchgeführt. Die in Streifen geschnittenen Membranen wurden mit Blockierungspuffer und 5% (v/w) Magermilchpulver für 1 h inkubiert. Danach wurden diese 4-mal mit dem Blockierungspuffer für jeweils 5 min gewaschen. Nach Zugabe von verschiedenen LRF-Patientenseren und Blutspendeseren (jeweils 1:100 in Probenpuffer verdünnt) wurden die Streifen für 1 h inkubiert. Darauffolgend wurden die Streifen wiederholt 4-mal in Waschpuffer gewaschen und mit einem HRP-konjugierten IgM- oder IgG Antikörper für 1 h inkubiert. Nach vier weiteren Waschschrten wurden die Antigen-Antikörper-Komplexe mit TMB als Substrat detektiert. Anschließend wurden die Streifen digitalisiert. Alle Inkubationsschritte erfolgten unter Schwenken und bei RT. Der Proben- und Waschpuffer sowie der sekundäre anti-human IgM Antikörper und TMB wurden aus dem Chagas IgM/IgG LineBlot-Kit entnommen.

### 2.8.1.3 IgM- und IgG Lineblot zum diagnostischen Nachweis von LRF

Zum Nachweis von gegen LRF gerichteten Antikörper in Patienten- und Blutspendeseren, wurde ein IgM- und IgG-Lineblot durchgeführt. Dazu wurden in Kooperation mit der NovaTec Immunodiagnostica GmbH für den IgM-Lineblot GIpQ in einer Konzentration von 50 µg/ml und CihC und CihC-N in einer Konzentration von 40 µg/ml eingesetzt. Für den IgG-Lineblot wurde eine Konzentration von 40 µg/ml für GIpQ und 30 µg/ml für CihC beziehungsweise für CihC-N verwendet. Die Proteinlösungen wurden mit dem FrontLine™ HR Microliter Contact dispenser bei einer Geschwindigkeit von 0,7 µl/cm auf eine Nitrozellulosemembran appliziert und anschließend getrocknet. Danach wurde die Membran in 3 mm breite Streifen geschnitten und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Für den diagnostischen Test wurden die Substanzen und Puffer aus dem Chagas IgGM/IgG LineBlot Kit verwendet und nach Anleitung des Herstellers verfahren. Dazu wurden die Patientenseren 1:100 in 1 ml IgM/IgG-Probenpuffer verdünnt, zu den einzelnen Streifen pipettiert und diese für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend folgten drei Waschschriffe á 5 min, gefolgt von einer weiteren Inkubation der Streifen mit dem IgG-/IgM-Konjugat für 1 h bei RT. Nach drei weiteren 5-minütigen Waschschriffen wurden die Streifen für 10 min bei RT mit TMB als Substrat inkubiert. Die Reaktion wurde schließlich durch mehrmaliges Waschen mit Wasser gestoppt. Die Streifen wurden schließlich getrocknet, digitalisiert und mit Hilfe der Image Lab Software ausgewertet.

## 2.8.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Um die Bindung von verschiedenen Komplementkomponenten an die gereinigten Borrelienproteine nachzuweisen, wurde ein ELISA durchgeführt. Im Folgenden sind die für den ELISA benötigten Substanzen und Puffer dargestellt.

### **Immobilisierungspuffer**

0,05 M Natriumcarbonat  
0,02 % (w/v) Natriumazid  
ad 500 ml Aqua dest.  
pH-Wert wurde mit Natriumhydrogencarbonat  
auf 9,6 eingestellt.

Der Puffer wurde sterilfiltriert (0,22 µm).

**Waschpuffer**

PBS (1x)  
0,05 % (v/v) Tween 20

**Substratpuffer**

0,1 m Kaliumhydrogenphosphat  
ad 1 L Aqua dest.  
pH-Wert wurde mit Kaliumhydroxid auf 6,0  
eingestellt.

**Stopplösung**

2,6 ml Schwefelsäure  
ad 500 ml Aqua dest.

**2.8.2.1 Bindung von Komplementkomponenten an Borrelienproteine**

Für die Untersuchung der Bindung von Komplementkomponenten an Borrelienproteine wurden 500 ng des gereinigten Proteins in 100 µl Immobilisierungspuffer verdünnt und in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte pipettiert und bei 4 °C über Nacht bei leichtem Schütteln immobilisiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Kavitäten 3-mal mit 200 µl Waschpuffer gewaschen. Um freie Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Kavitäten mit 100 µl Blocker BSA (1 %) in PBS für 1 h bei RT inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten á 200 µl Waschpuffer wurden die Kavitäten mit 500 ng des zu untersuchenden Komplementproteins in 100 µl PBS<sup>++</sup> für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurden die Kavitäten wiederholt 3-mal mit 200 µl Waschpuffer gewaschen, gefolgt von einer 1-stündigen Inkubation bei RT mit 100 µl des primären Antikörpers (1:1000 verdünnt in 1x PBS<sup>++</sup>). Im Anschluss wurden die Kavitäten wiederholt 3-mal mit 200 µl Waschpuffer gewaschen und der sekundäre Antikörper (1:1000 verdünnt in 1x PBS<sup>++</sup>) hinzugegeben. Nach einer weiteren Inkubation von 1 h bei RT und drei weiteren Waschschritten mit 200 µl Waschpuffer wurden 100 µl Substarpuffer mit *ortho*-Phenylendiamin in die Kavitäten pipettiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl Stopplösung terminiert und die Absorption bei 490 nm gemessen. Alle Inkubationen erfolgten unter leichtem Schütteln auf einem Wipptisch.

### 2.8.2.2 Konzentrationsabhängige Bindung der Komplementkomponente C5 an gereinigte Borrelienproteine

Die konzentrationsabhängige Bindung der Komplementkomponente C5 an gereinigte Proteine mit einem Hexa-Histidinpeptid erfolgte nach dem gleichen Schema wie in Kapitel 2.8.2.1 beschrieben. Abweichend wurde die Komplementkomponente C5 in verschiedenen Konzentrationen (0  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  und 25  $\mu\text{M}$  jeweils verdünnt in 100  $\mu\text{l}$  PBS<sup>++</sup>) in die Kavitäten pipettiert.

### 2.8.2.3 IgM- und IgG-ELISA zum diagnostischen Nachweis von LRF

Für den diagnostischen Nachweis von gegen LRF gerichtete Antikörper in Patientenserum wurde ein IgM- und IgG-ELISA nach Anleitung und mit den Substanzen der NovaTec Immunodiagnostic GmbH durchgeführt. Die gereinigten Proteine GlpQ, CihC und das N-terminale Fragment CihC-N (gelöst in Carbonatpuffer) wurden in einer Konzentration von 100 ng/100  $\mu\text{l}$  in Mikrotiterplatten über Nacht bei 4 °C immobilisiert. Am nächsten Tag wurden die Kavitäten mit jeweils 100  $\mu\text{l}$  Novacoat blockiert und die Mikrotiterplatten getrocknet. Danach wurden die vorbereitenden ELISA-Platten bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Anschließend wurden die Patienten- und Blutspendenserum in 100  $\mu\text{l}$  IgM/IgG-Probenpuffer 1:100 verdünnt und in die Kavitäten pipettiert. Die Mikrotiterplatten wurden 1 h bei 37 °C inkubiert und 3-mal mit jeweils 100  $\mu\text{l}$  Waschpuffer gewaschen. Weiterführend wurde das Konjugat (IgM: 1:50.000; IgG: 1:360.000) hinzupipettiert und die Mikrotiterplatten für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach weiteren drei Waschschritten mit jeweils 100  $\mu\text{l}$  Waschpuffer folgte eine Inkubation mit 100  $\mu\text{l}$  TMB für 10 min bei RT und im Dunkeln. Daraufhin wurde die Reaktion mit 100  $\mu\text{l}$  Stopp-Lösung terminiert und die Mikrotiterplatte bei 450 nm gemessen.

## **2.8.3 Komplementaktivierungs-Assay (WiELISA) für den alternativen Komplementweg**

Mithilfe eines WiELISA wurde die inhibitorische Wirkung von isolierten Borrelienproteinen auf den alternativen Komplementweg des Komplementsystems nachgewiesen. Dazu wurde 1  $\mu\text{g}$  LPS in 100  $\mu\text{l}$  ELISA-Immobilisierungspuffer (Kapitel 2.8.2) verdünnt, in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte pipettiert und durch die Inkubation bei 4 °C unter leichtem Schütteln über Nacht immobilisiert. Am nächsten Tag wurden die Kavitäten 3-mal mit jeweils 200  $\mu\text{l}$  Waschpuffer gewaschen und anschließend 100  $\mu\text{l}$  Blockierungspuffer hinzugegeben und die

Mikrotiterplatte für 1 h bei RT inkubiert. Während der Inkubation wurde NHS (15 %) mit verschiedenen Konzentrationen (0,5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 2 $\mu$ M und 4  $\mu$ M) der zu untersuchenden Proteine in 100  $\mu$ l AP-Puffer bei 37 °C für 15 min unter Schütteln bei 350 Upm inkubiert. Dabei musste beachtet werden, dass die Inkubation der Mikrotiterplatte und die Inkubation der Proteine mit NHS zum gleichen Zeitpunkt endete. Danach wurden die Kavitäten wiederholt mit 200  $\mu$ l Waschpuffer gewaschen und die vorinkubierten NHS-Reaktionsansätze in die Kavitäten pipettiert. Nach erfolgter Inkubation für 1 h bei 37 °C wurden die Kavitäten 3-mal mit jeweils 200  $\mu$ l Waschpuffer gewaschen und mit 100  $\mu$ l des Neoepitop-spezifischen anti-C5b-9 Antikörper (1:500 verdünnt in Waschpuffer) für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen der Kavitäten (3-mal) mit jeweils 200  $\mu$ l Waschpuffer wurde der sekundäre anti-Maus Antikörpers (1:1000 verdünnt in Waschpuffer) für 1 h bei RT inkubiert. Die Kavitäten wurden final 3-mal mit jeweils 200  $\mu$ l Waschpuffer gewaschen und 100  $\mu$ l des Substratpuffers (Kapitel 2.8.2) hinzugegeben. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 50  $\mu$ l Stopplösung (Kapitel 2.8.2) terminiert und die Mikrotiterplatte bei 490 nm gemessen.

#### **Blockierungspuffer für den WiELISA**

0,05 % (v/v) Tween20

1 % (w/v) BSA

ad 50 ml PBS (1x)

Der Puffer wurde bei 4 °C gelagert.

#### **Waschpuffer für den WiELISA**

TBS (1x)

0,5 % (v/v) Tween 20

**AP-Puffer für den WiELISA (Alternativer Komplementweg)**

20 mM HEPES

0,1 % (w/v) Gelatine

140 mM Natriumchlorid

5 mM Magnesiumchlorid

10 mM EGTA

ad 1 L Aqua dest.

pH-Wert wurde auf 7,5 eingestellt.

Der Puffer wurde sterilfiltriert (0,22  $\mu\text{m}$ ) und bei 4 °C gelagert.

**2.8.4 Hämolytischer Assay zum Nachweis der Inaktivierung des terminalen Komplementweges**

Der hämolytische Assay diente zur Untersuchung der inhibierenden Wirkung der gereinigten Borrelienproteine auf die Bildung des terminalen Membranangriffkomplexes (MAK). Dazu wurden 500  $\mu\text{l}$  Schaferythrozyten 3-mal mit 11,5 ml GVB<sup>++</sup> bei 900  $\times$  g und 4 °C für 5 min gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 6 ml GVB<sup>++</sup> resuspendiert und die Zellzahl wie in Kapitel 2.7.4 beschrieben ermittelt. Anschließend wurde eine Zellsuspension von  $5 \times 10^8$  Erythrozyten/ml in GVB<sup>++</sup> hergestellt.

Für den Versuch wurden steigende Konzentrationen der zu untersuchenden Proteine (0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$  und 4  $\mu\text{M}$ ) in 10  $\mu\text{l}$  GVB<sup>++</sup> vorgelegt und auf Eis gelagert. Zusätzlich wurde pro Reaktionsansatz eine Mischung, bestehend aus den Komplementkomponenten C7 (20  $\mu\text{g/ml}$ ), C8 (4  $\mu\text{g/ml}$ ) und C9 (20  $\mu\text{g/ml}$ ) in 20  $\mu\text{l}$  GVB<sup>++</sup>, vorbereitet und ebenfalls auf Eis gelagert. Danach wurden 30  $\mu\text{l}$  der Erythrozytensuspension mit jeweils 1,5  $\mu\text{g}$  C5b-6 versetzt und für 20 min bei RT unter gelegentlichem Invertieren inkubiert. 5 min vor dem Ende der Inkubation wurden zu den vorher angesetzten unterschiedlichen Proteinkonzentrationen die präparierten Komplementkomponenten gegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Hierbei wurden beide Inkubationen zeitlich so abgestimmt, dass diese gleichzeitig endeten. Anschließend wurden die Reaktionsansätze mit den gereinigten Borrelienproteinen zu den mit C5b-6 vorinkubierten Erythrozyten gegeben und für 30 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 2000  $\times$  g für 5 min und 4 °C um die Erythrozyten zu sedimentieren. Der Überstand wurde in eine Mikrotiterplatte überführt und die Absorption bei 414 nm gemessen.



### 2.8.5 Immunfluoreszenztest zum Nachweis von gegen *B. recurrentis* gerichtete IgG Antikörper in LRF-Patientenseren

Zum Nachweis von anti-Borrelien IgG Antikörper in Seren von LRF-Patienten wurde ein Immunofluoreszenztest durchgeführt. Dazu wurde eine Kultur des *B. recurrentis*-Stammes A17 bei  $6000 \times g$  für 20 min und  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  sedimentiert, der Überstand dekantiert und die Zellen mit 20 ml GVB<sup>++</sup> gewaschen. Danach wurde das Zellsediment in 1 ml GVB<sup>++</sup> resuspendiert und nochmals 2-mal bei  $20817 \times g$  und  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  für 10 min gewaschen. Im Anschluss erfolgte eine Zellzahlbestimmung wie in Kapitel 2.7.4 beschrieben. Schließlich wurden  $1,8 \times 10^6$  Zellen in 2000  $\mu\text{l}$  GVB<sup>++</sup> verdünnt und jeweils 40  $\mu\text{l}$  in die Aussparung eines zuvor mit Aceton, Methanol, Ethanol und Aqua dest. gereinigten Objektträgers pipettiert. Der Objektträger wurde über Nacht getrocknet.

Am nächsten Tag wurde der Objektträger zunächst in einer Glyoxal-Lösung für 10 min bei RT unter leichtem Schütteln fixiert. Nach der Inkubation wurde die Lösung vorsichtig entfernt und die Zwischenräume zwischen den Aussparungen mit Wattestäbchen und Ethanol gereinigt. Anschließend wurde in jede Aussparung 40  $\mu\text{l}$  LRF-Patientenseren (1:320 verdünnt in PBS<sup>++</sup> versetzt mit 1 % BSA) pipettiert und der Objektträger in einer „feuchten Kammer“ für 1 h bei RT inkubiert. Es folgten drei Waschschriffe für je 5 min in PBS unter leichtem Schütteln. Nach Trocknen der Objektträger an der Luft wurden 40  $\mu\text{l}$  eines fertig präparierten FITC-konjugierten anti-human IgG Antikörper in die jeweiligen Aussparungen pipettiert. Es folgte eine Inkubation in einer „feuchte Kammer“ von 1 h bei  $33^\circ\text{C}$  und von drei weiteren Waschschriffen für je 5 min mit PBS. Danach wurden 40  $\mu\text{l}$  einer DAPI-Lösung (1:500) in die Aussparung gegeben und der Objektträger ein weiteres Mal für 10 min bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  in einer „feuchten Kammer“ inkubiert. Es folgte ein finaler Waschschriff mit 3-mal PBS á 5 min unter leichtem Schütteln. Danach wurde der Objektträger an der Luft in einer dunklen Kammer getrocknet und anschließend mit dem Fluoreszenz-Einschluss-Medium und einem Deckgläschen verschlossen. Nachdem der Objektträger mit dem Einschluss-Medium über Nacht bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  getrocknet wurde, konnte dieser mit handelsüblichem klarem Nagellack verschlossen werden. Die Dokumentation erfolgte mithilfe eines Axio Imager M2 Fluoreszenzmikroskops und einer RT3 Kamera.

**Glyoxal-Lösung**

65,8 ml Aqua ad iniectabilia  
17,8 ml Ethanol  
7 ml Glyoxal (40%)  
675 µl Essigsäure  
pH-Wert wurde auf 5,0 eingestellt.

Lagerung erfolgte bei 4 °C.

**2.9 Spezielle Methoden****2.9.1 C9-Polymerisations-Assay**

Um die Bindung von Borrelienproteinen an die Komplementkomponente C9 und deren Auswirkung auf die C9-Autopolymerisation zu untersuchen, wurde ein C9-Polymerisations-Assay durchgeführt. Dazu wurden ein Reaktionsansatz bestehend aus unterschiedlichen Konzentrationen des zu untersuchenden Borrelienproteins (2,5 µg, 5 µg und 10 µg) und 3 µg gereinigtem C9 hergestellt und mit 20 mM Tris/HCl (pH 7,2) auf 40 µl aufgefüllt. Ein Reaktionsansatz mit gereinigtem C9-Protein diente als Positivkontrolle. Alle Ansätze wurden 40 min bei 37 °C und 350 Upm inkubiert. Anschließend wurden zu jedem Reaktionsansatz jeweils 5 µl einer 250 µM ZnCl<sub>2</sub>-Lösung gegeben und die Reaktionsansätze ein weiteres Mal für 2 h bei 37 °C und 350 Upm inkubiert. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz, welcher 1,5 µg C9 und 18,5 µl 20 mM Tris/HCl (pH 7,2) enthielt und nicht inkubiert wurde. Danach wurden die Ansätze wie in Kapitel 2.7.19 beschrieben für die SDS-PAGE vorbereitet und die Proben auf ein 7,5 % Laemmli-SDS-Polyacrylamidgel appliziert. Auf die Separation der Proteine folgte der Nachweis mittels Färbung mit Silbernitrat nach Kapitel 2.7.21. Anschließend wurde das Polyacrylamid-Gel digitalisiert.

**Zinkchlorid Stammlösung**

10 mM Zinkchlorid  
ad 100 ml 20 mM Tris/HCl (pH 7,2)

**Zinkchlorid 250  $\mu$ M Gebrauchslösung**10  $\mu$ l Zinkchlorid -Stammlösung (10 mM)390  $\mu$ l 20 mM Tris/HCl (pH 7,2)**2.9.2 Serumbakterizidie-Assay**

Der Serumbakterizidie-Assay wurde durchgeführt, um zu evaluieren, inwieweit die zu untersuchenden Borrelienproteine die Fähigkeiten besitzen das humane Komplementsystem *in vitro* zu inhibieren. Dazu wurde im ersten Versuch das NHS mit den Borrelienproteinen vorinkubiert und anschließend zu Serum-sensiblen *B. garinii*-Zellen gegeben. Im zweiten Versuchsaufbau wurde das NHS direkt zu den zuvor mit den Borrelienprotein-kodierenden Genen transformierten *B. garinii*-Zellen gegeben.

**2.9.2.1 Serumprotektions-Assay**

Für diesen Test wurden Borrelienzellen welche sich inmitten der exponentiellen Wachstumsphase befanden bei  $6000 \times g$  für 20 min und RT sedimentiert, der Überstand verworfen und das Zellsediment in 500  $\mu$ l BSK-H Medium (Tab. 18) resuspendiert. Anschließend wurden die Konzentration der Borrelien wie in Kapitel 2.7.4 beschrieben ermittelt und pro Ansatz (0 h, 2 h, 4 h und 6h)  $1 \times 10^7$  Zellen in 70  $\mu$ l BSK-H Medium in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Parallel wurden in einem Mastermix 100  $\mu$ l NHS mit 10  $\mu$ M des zu untersuchenden Proteins versetzt und 15 min bei 37 °C und 350 Upm inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden 30  $\mu$ l des jeweiligen NHS-Protein-Mastermix zu den Ansätzen 2 h, 4 h und 6 h gegeben. Zu dem 0 h Ansatz wurde 30  $\mu$ l BSK-H Medium gegeben. Die Mikrotiterplatte wurde mit einer Klebefolie verschlossen und bei 33 °C inkubiert. Bei jedem Zählzeitpunkt (0 h, 2 h, 4 h und 6 h) wurde die Folie an der entsprechenden Stelle aufgeschnitten und die Suspension für 1 min mit der Pipette resuspendiert. 10  $\mu$ l der Suspension wurde entnommen, 1:100 verdünnt und anschließend die Anzahl der beweglichen Borrelienzellen mit Hilfe eines Dunkelfeldmikroskops bestimmt.

**2.9.2.2 Serumbakterizidie-Test mit transformierten Borrelienzellen**

Borrelienzellen welche sich in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase befanden wurden bei  $6000 \times g$  für 20 min und RT sedimentiert, der Überstand verworfen und das Zellsediment in 500  $\mu$ l BSK-H Medium (Tab. 18) resuspendiert. Nachfolgend wurde wie in Kapitel 2.7.4

beschrieben die Zellzahl bestimmt und jeweils ein Mastermix für vier Reaktionen, der  $4,5 \times 10^7$  Zellen in 315  $\mu\text{l}$  BSK-H Medium enthielt (pro Ansatz  $1 \times 10^7$  Zellen in 70  $\mu\text{l}$  BSK-H Medium), hergestellt. Anschließend wurden 70  $\mu\text{l}$  des Mastermix in eine Mikrotiterplatte pipettiert und ein Ansatz mit 30  $\mu\text{l}$  BSK-H Medium sowie drei der Ansätze mit jeweils 30  $\mu\text{l}$  NHS versetzt. Die Mikrotiterplatte wurde mit einer Klebefolie verschlossen und bei 33 °C inkubiert. Beim Ansatz mit BSK-H Medium wurden die beweglichen Zellen sofort unter dem Dunkelfeldmikroskop ermittelt, der den Zählzeitpunkt  $t=0$  darstellte. Die motilen Zellen der übrigen Reaktionsansätze wurden zu den Zeitpunkten 2 h, 4 h und 6 h bestimmt. Dazu wurde die Klebefolie an den entsprechenden Positionen aufgeschnitten und die Borrelienzellen 1 min mit der Pipette resuspendiert. Es wurden 10  $\mu\text{l}$  der jeweiligen Suspension entnommen, 1:100 verdünnt und die beweglichen Zellen unter dem Dunkelfeldmikroskop gezählt.

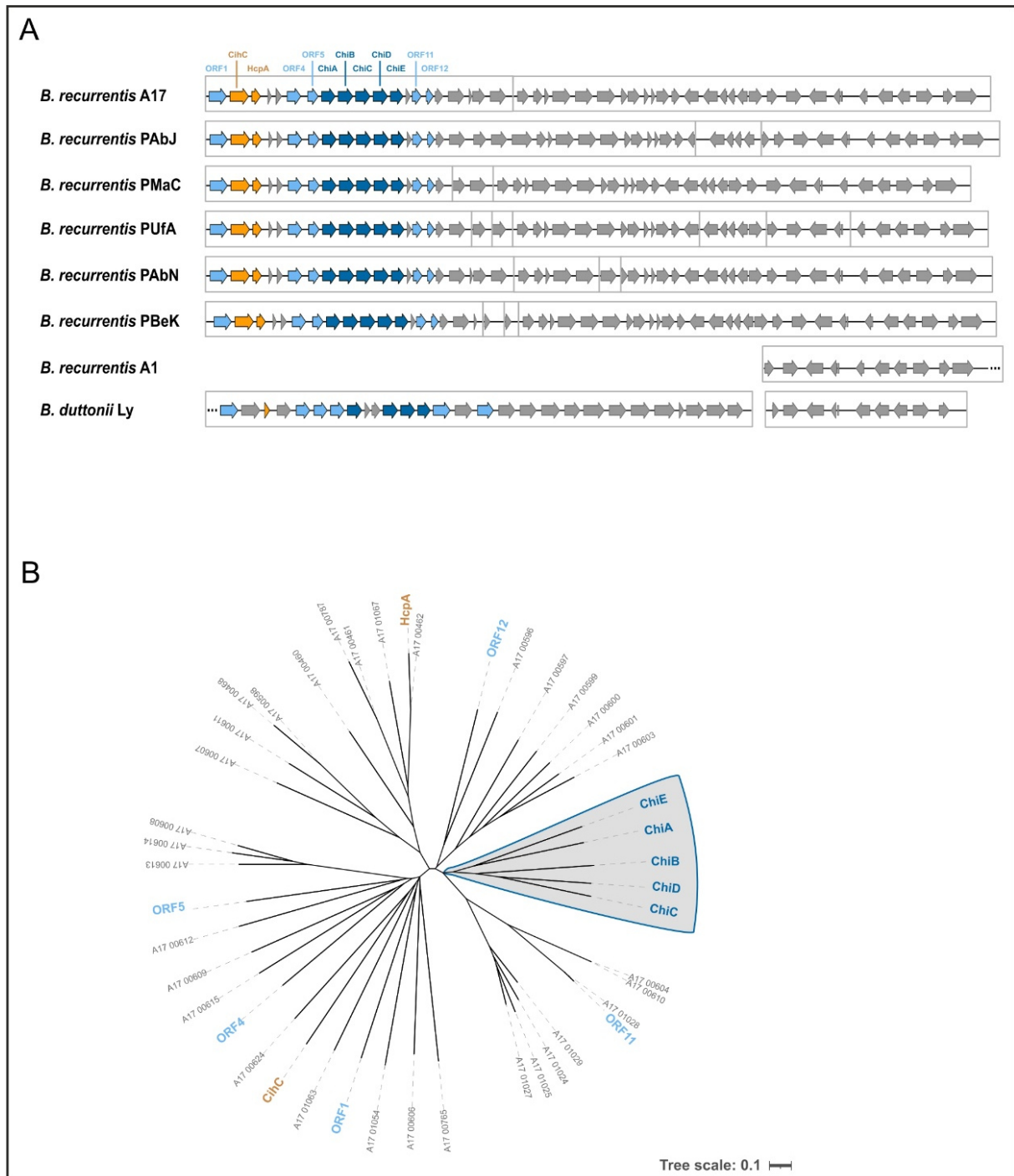
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Charakterisierung von Komplement-interagierenden Proteinen von *B. recurrentis*

#### 3.1.1 Vergleichende Sequenzanalyse des linearen Plasmids lp165 verschiedenen *B. recurrentis*-Stämme

Frühere Untersuchungen von vier verschiedenen oberflächenständigen Lipoproteinen (ORF6 bis ORF9) von *B. recurrentis* A1 zeigten, dass alle Proteine in der Lage sind den alternativen Komplementweg zu inhibieren (202). Es konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass ORF7, ORF8 und ORF9 den terminalen Komplementweg durch die Bindung an die Komplementkomponente C9 inaktivierten, sodass die Bildung des bakteriolytischen C5b-9-Komplexes (MAK) unterbunden wurde. Außerdem zeigte sich eine Interaktion von allen untersuchten Proteinen mit der Serinprotease Plasminogen. Aufgrund ihrer multiplen Bindungseigenschaften wurde vermutet, dass diese Proteine eine Rolle bei der Pathogenese und des Immunescapes von *B. recurrentis* spielen könnten. Um der Frage nach dem Grad der Konservierung der Proteine in anderen RF-Borrelienisolaten zu beantworten, wurde eine vergleichende Sequenzanalyse des linearen Plasmids lp165, auf dem die ORF-kodierenden Gene lokalisiert sind, in Kooperation mit Dr. Tilman G. Schultze (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Universitätsklinikum Frankfurt, Frankfurt am Main) durchgeführt (Abbildung 12A). Diese Ergebnisse der bioinformatischen Sequenzanalysen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Schultze für die vorliegende Dissertation zur Verfügung gestellt. Für die bioinformatischen Analysen wurden die Genome der *B. recurrentis* Referenzstämme A1 und A17 (204) sowie die Genome der *B. recurrentis* Patientenisolat PAbJ, PMaC, PUfA, PAbN und PBeK (21) miteinander verglichen. Außerdem wurde das Genom von *B. duttonii* Ly als nächste verwandte RF-Borrelienspezies mit in die Analyse eingeschlossen. Da sich die Komplement- und Plasminogen-bindenden ORF-Proteine in einem Cluster zusammenfassen ließen (Abbildung 12B), wurden diese Moleküle als „Cluster of Complement-targeting and Host-interacting Proteins“ oder Chi-Proteine bezeichnet. Dieser Sequenzvergleich offenbarte, dass dieses Cluster bestehend aus ChiA, ChiB, ChiC, ChiD und ChiE bei allen Patientenisolaten und dem Referenzstamm A17 vorhanden ist; nur bei *B. recurrentis* A1 konnte das komplette Gencluster nicht nachgewiesen werden. Bis auf das ChiB-kodierende Gen ließen sich bei *B. duttonii* Ly ebenfalls homologe Gene von ChiA, ChiC,

ChiD und ChiE identifizieren. Allerdings zeigten sich Unterschiede in der Anordnung der Gene zwischen beiden Borrelienspezies: *B. duttonii* Ly besitzt ein zusätzliches Gen, welches zwischen ORF4 und ORF5 lokalisiert ist und wahrscheinlich eine Duplikation von ORF4 darstellt, sowie ein verkürztes HcpA-kodierendes Gen, welches jedoch für kein funktionelles Protein kodiert. Mit Ausnahme von *B. recurrentis* A1 und *B. duttonii* Ly konnte bei allen anderen Stämmen auch das *cihC*-Gen nachgewiesen werden, welches für das Komplement-inhibierende und Plasminogen-bindende Protein CihC kodiert (176).



**Abbildung 12: Sequenzvergleich des linearen lp165-Plasmids verschiedener *B. recurrentis*-Stämme und *B. duttonii* Ly inklusive einer Clustal Omega-Analyse.** Sequenzvergleich der am 5'-Ende lokalisierten Gene des linearen Plasmids lp165 (hellblau: Nicht-homologe Proteine; dunkelblau: ChiA-homologe Proteine; orange: bereits charakterisierte Komplement-inhibierende Proteine). Die hellgrauen Kästen stellen die Contig-Grenzen dar (A). Clustal Omega-Analyse zur Identifizierung von Proteinen mit partiellen Chi-Sequenzidentitäten im Genom von *B. recurrentis*. Das Cluster der fünf Chi-Proteine ist farblich hervorgehoben (B). Der Längenmarker (Tree scale) ist unten rechts abgebildet. Zur Verfügung gestellt von Dr. Tilman G. Schultze.

Für ORF1, CihC, HcpA, ORF4, ORF5, ChiA, ChiB, ChiC, ChiD, ChiE, ORF11 und ORF12 wurde eine genomweite Analyse nach Proteinen mit partiellen Sequenzidentitäten in *B. recurrentis* durchgeführt. Die Analyse mit Clustal Omega ergab dabei eine hohe Homologie für ChiA, ChiB, ChiC, ChiD und ChiE (Tab. 31). Die benachbarten Gene ORF1, ORF11, ORF12 sowie HcpA und CihC wiesen keine oder eine deutlich geringere Homologie zueinander auf. Aufgrund der hohen Homologie kann davon ausgegangen werden, dass sich diese sechs Proteine zu einem Cluster von Proteinen mit ähnlichen funktionellen Eigenschaften formieren.

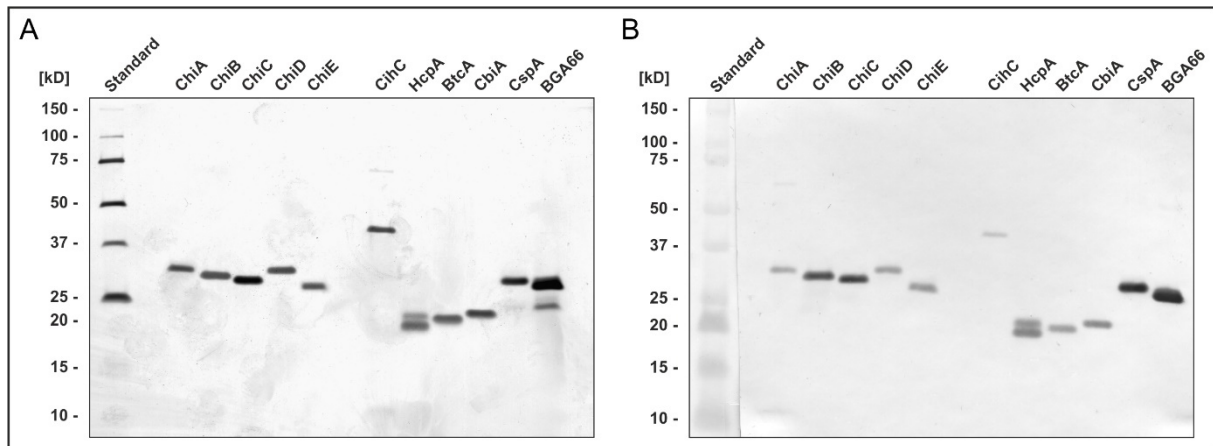
Tab. 31: Identitätsmatrix der Sequenzen verschiedener ORF-Proteine (Daten zur Verfügung gestellt von Dr. Tilman G. Schultze).

	ORF1	CihC	HcpA	ORF4	ORF5	ChiA	ChiB	ChiC	ChiD	ChiE	ORF11	ORF12
ORF1	100.00	17.36	19.15	14.80	12.75	16.49	21.63	19.14	17.39	16.95	13.33	15.38
CihC	17.36	100.00	20.13	11.25	13.66	17.70	14.67	18.99	17.19	14.55	21.74	16.77
HcpA	19.15	20.13	100.00	10.62	13.16	16.67	15.83	15.52	15.70	15.38	15.94	12.90
ORF4	14.80	11.25	10.62	100.00	29.27	19.00	17.30	16.74	18.14	16.02	13.92	17.39
ORF5	12.75	13.66	13.16	29.27	100.00	26.74	24.87	23.68	24.06	28.99	3.23	25.90
ChiA	16.49	17.70	16.67	19.00	26.74	100.00	38.70	37.55	38.46	50.00	31.94	36.05
ChiB	21.63	14.67	15.83	17.30	24.87	38.70	100.00	45.62	48.55	37.76	34.12	29.07
ChiC	19.14	18.99	15.52	16.74	23.68	37.55	45.62	100.00	58.24	34.73	26.92	34.09
ChiD	17.39	17.19	15.70	18.14	24.06	38.46	48.55	58.24	100.00	36.51	37.80	31.18
ChiE	16.95	14.55	15.38	16.02	28.99	50.00	37.76	34.73	36.51	100.00	38.36	35.93
ORF11	13.33	21.74	15.94	13.92	3.23	31.94	34.12	26.92	37.80	38.36	100.00	25.00
ORF12	15.38	16.77	12.90	17.39	25.90	36.05	29.07	34.09	31.18	35.93	25.00	100.00

### 3.1.2 Reinheitsprüfung von affinitätschromatographisch gereinigten Hexahistidin-fusionierten Chi-Proteinen

Die für eine funktionelle Charakterisierung zu analysierenden Proteine ChiA, ChiB, ChiC, ChiD und ChiE von *B. recurrentis* sowie die Kontrollproteine CihC (*B. recurrentis*), HcpA (*B. recurrentis*), BtcA (*B. turicatae*), CbiA (*B. miyamotoi* HT31), CspA (*B. burgdorferi* B31) und BGA66 (*B. bavariensis* PBi) wurden in *E. coli* produziert und anschließend mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie gereinigt (Kapitel 2.7.22). Im Anschluss wurde die Proteinkonzentration ermittelt (Kapitel 2.7.23). Zur Reinheitsprüfung wurden die gereinigten Proteine (jeweils 500 ng) wie in Kapitel 2.7.18 beschrieben auf ein Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamidgel appliziert, separiert und mittels Färbung mit Silbernitrat (Kapitel 2.7.21) und einer Western Blot-Analyse (Kapitel 2.7.20 und 2.8.1.1) mit einem anti-His<sub>6</sub> Antikörper visualisiert und das Ergebnis mittels Densitometer dokumentiert.





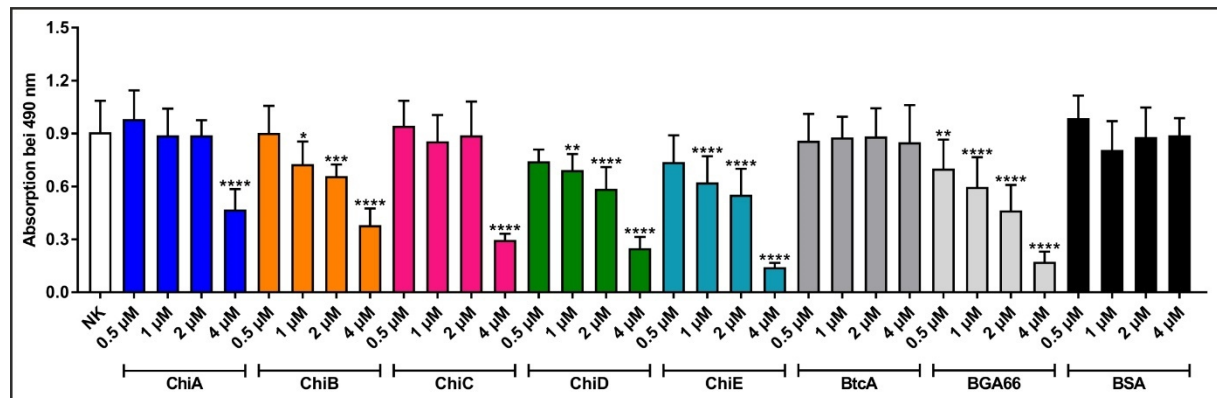
**Abbildung 13: Reinheitsprüfung isolierter Borrelienproteine.** Von den gereinigten Proteinen wurden 500 ng auf ein TT-SDS-Polyacrylamidgel appliziert und über Nacht separiert. Anschließend erfolgte die Färbung mittels Silbernitrat (A) sowie eine Western Blot-Analyse mit einem Mix aus drei monoklonalen anti-His Antikörpern (siehe Kapitel 2.3.1) (1:1000 verdünnt) (B). Der Größenstandard (Precision Plus Protein Unstained Standards bzw. Precision Plus Protein Dual Color Standards) ist jeweils links angegeben.

Alle Proteinen wurden bis zu apparenten Homogenität gereinigt (Abbildung 13A). Nur bei CihC zeigten sich geringfügige Verunreinigungen. Für HcpA und BGA66 konnte außerdem wie bereits bekannt jeweils ein zusätzliches Protein detektiert werden (176, 212). Mit diesem Ergebnis konnte sichergestellt werden, dass es bei den isolierten Proteinen zu keiner Degradation gekommen ist und diese für die nachfolgenden Versuche verwendet werden konnten. In der Western Blot-Analyse (Abbildung 13B) ließen sich alle Proteine mit einem Mix aus drei verschiedenen monoklonalen anti-His Antikörper detektieren. Wie in früheren Analysen dokumentiert, ließen sich für HcpA zwei Antigen/Antikörper-Reaktionen beobachten. Die isolierten Proteine wiesen folgende kalkulierte molekulare Massen auf: ChiA: 29,7 kDa, ChiB: 31,7 kDa, ChiC: 32,1 kDa, ChiD: 32,3 kDa, ChiE: 27,1 kDa, CihC: 40,4 kDa, HcpA: 20,5 kDa, BtcA: 20,5 kDa, CbiA: 21 kDa, CspA: 25,9 kDa und BGA66: 29 kDa.

### 3.1.3 Nachweis der Komplement-inhibierenden Eigenschaften der fünf Chi-Proteine von *B. recurrentis* auf den alternativen und terminalen Komplementweg

Um zu evaluieren, inwieweit die Oberflächenproteine ChiA, ChiB, ChiC, ChiD und ChiE von *B. recurrentis* A17 in der Lage sind den alternativen Komplementweg zu inhibieren, wurde wie in Kapitel 2.8.3 beschrieben ein funktioneller Komplementaktivierungstest (WiELISA) durchgeführt. Zur initialen Aktivierung des alternativen Komplementweges wurden Mikrotiterplatten mit jeweils 10 ng/μl LPS pro Kavität beschichtet. Am folgenden Tag wurden, um die Komplementaktivierung zu initiieren, die zu untersuchenden Proteine zunächst für

15 min in 15 % NHS vorinkubiert und anschließend die Reaktionsansätze in die Kavitäten pipettiert. Folgend wurde der terminale Membranangriffskomplex mithilfe eines Neopitop-spezifischen monoklonalen anti-C5b-9 Antikörpers detektiert. Als Negativkontrolle diente ein Reaktionsansatz ohne Zugabe von Protein (NK bzw. Pufferkontrolle), BtcA von *B. turicatae* sowie BSA und als Positivkontrolle, dass den alternativen Komplementweg inhibierende Protein BGA66 von *B. bavariensis* PBi (212).

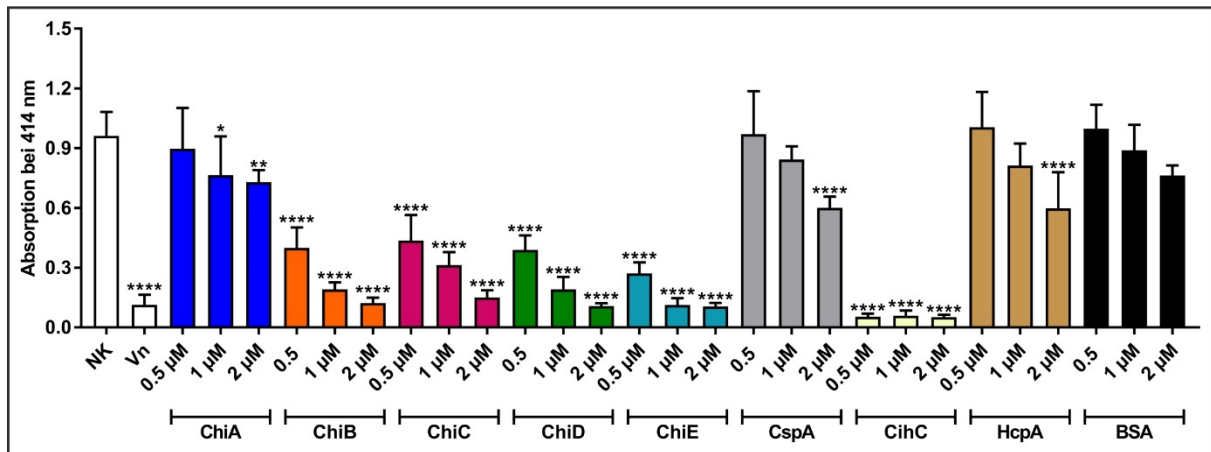


**Abbildung 14: Nachweis des inhibierenden Potentials der fünf Chi-Proteine von *B. recurrentis* auf den alternativen Komplementweg.** Mikrotiterplatten wurden mit LPS (1 µg in 100 µl AP-Puffer) über Nacht bei 4 °C beschichtet. Anschließend wurden steigende Konzentrationen (0,5 – 4 µM) der zu untersuchenden Proteine mit 15 % NHS für 15 min vorinkubiert und diese Reaktionsansätze in die beschichteten Kavitäten gegeben. Der terminale Membranangriffskomplex wurde schließlich durch einen anti-C5b-9 Antikörper (1:500) detektiert und die Absorption bei 490 nm gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen jeweils als Triplikat durchgeführten Versuche. Die statistische Analyse erfolgte ausgehend von den ermittelten Werten der Negativkontrolle (NK) und wurde mittels einfaktoriellen ANOVA-Tests mit multiplem Vergleichstest nach Bonferroni und einem Konfidenzintervall von 95 % durchgeführt. \*)  $p \leq 0,1$ ; \*\*)  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*)  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*)  $p \leq 0,0001$ .

Alle fünf untersuchten Chi-Proteine von *B. recurrentis* A17 inhibierten den alternativen Komplementweg ab einer Konzentration von 4 µM signifikant ( $p \leq 0,0001$ ) (Abbildung 14). Im Vergleich zu ChiA und ChiC stellte sich bei ChiB, ChiD und ChiE bereits ab einer Konzentration von 1 µM und 2 µM ein inhibierender Effekt ein. Eine Vorinkubation mit BGA66 führte bei allen Konzentrationen zu einer deutlichen Inhibition, während BtcA und BSA wie erwartet keinen Effekt auf die Komplementaktivierung aufwiesen. Generell konnte ein Dosis-abhängiger Effekt festgestellt werden, sodass bei steigender Proteinkonzentration eine Zunahme des inhibierenden Effektes auf den alternativen Komplementweg zu verzeichnen war.

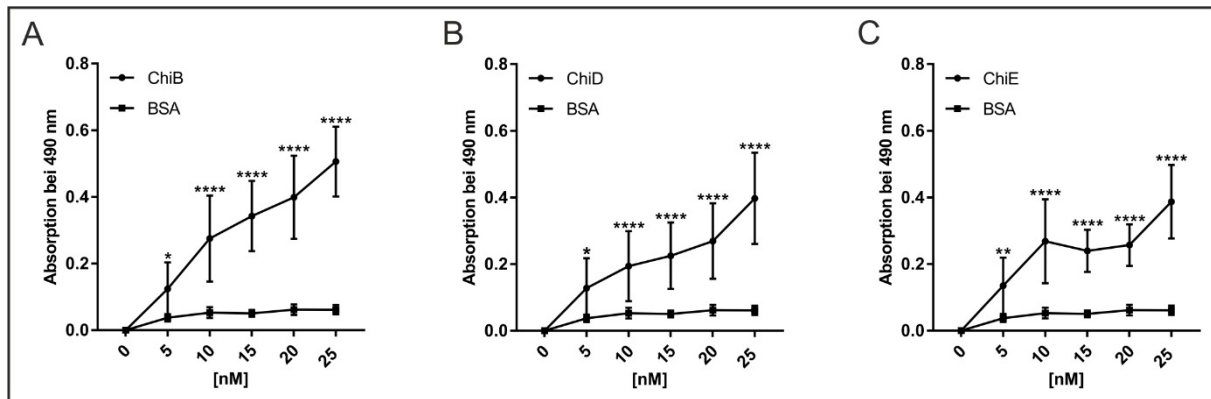
Um nachzuweisen, ob die Chi-Proteine von *B. recurrentis* nicht nur den alternativen, sondern zusätzlich auch den terminalen Komplementweg inhibieren können, wurde ein hämolytischer Assay wie in Kapitel 2.8.4 beschrieben durchgeführt. Hierfür wurden frische Schaferythrozyten als Indikatorzellen zuvor mit dem Komplementkomplex C5b-6 inkubiert, um die Zellen für die finalen Aktivierungsschritte und der Formation des terminalen Membranangriffskomplex zu sensibilisieren. Parallel dazu wurden die zu untersuchenden Proteine mit den Komplementkomponenten C7, C8 und C9 inkubiert. Anschließend wurden beide vorinkubierten Reaktionsansätze vereint und wiederholt inkubiert. Die sequenzielle Bindung von C7, C8 und C9 an den vorformierten C5b-6 Komplex aktiviert die terminale Komplementkaskade auf der Erythrozytenoberfläche, wobei die Integration des Membranangriffskomplexes C5b-9 in die Zellmembran zur Lyse führt. Die Menge an ausgetretenem Hämoglobin korreliert mit der Effizienz der Lyse und kann photometrisch bei 414 nm quantifiziert werden. Eine Interaktion der Borrelienproteine mit einzelnen Komplementkomponenten des terminalen Komplementweges könnte daher eine Hemmung der letzten Aktivierungsschritte der Kaskade begründen. Als natürlicher positiver Regulator des terminalen Komplementweges diente Vitronektin. Zusätzlich dienten CspA von *B. burgdorferi* B31 als Positivkontrolle und BSA als Negativkontrolle. Außerdem wurden zwei weitere Komplement-inhibitorische Borrelienproteine, CihC und HcpA von *B. recurrentis* A17, in die Analyse miteingeschlossen. Ein Reaktionsansatz der nur Puffer enthielt, diente als weitere Negativkontrolle (NK).

In der Abbildung 15 ist zu erkennen, dass ChiB, ChiC, ChiD und ChiE in den drei untersuchten Konzentrationen den terminalen Komplementweg signifikant inhibierten ( $p \leq 0,0001$ ). Deutliche Unterschiede zeigten sich bei ChiA, welches im Vergleich zu den anderen vier Proteinen den terminalen Komplementweg erst ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  bzw. 2  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0,1$ ;  $p \leq 0,01$ ) inhibierte. CspA als Inhibitor des terminalen Komplementweges (213) sowie HcpA zeigten eine signifikante Inhibition ( $p \leq 0,0001$ ) ab einer Konzentration von 2  $\mu\text{M}$ , während die Negativkontrolle BSA wie erwartet keine Inhibition aufwies. Interessanterweise führte die Inkubation mit CihC als Inhibitor des klassischen Komplementweges (176) ebenfalls zu einer starken Hemmung des terminalen Komplementweges bei allen drei Konzentrationen.



**Abbildung 15: Nachweis des inhibierenden Potentials der fünf Chi-Proteine von *B. recurrentis* auf den terminalen Komplementweg.** Schaferthrozyten ( $5 \times 10^8/\text{ml}$ ) wurden mit dem Komplementkomplex C5b-6 sensibilisiert. Anschließend wurden Reaktionsansätzen mit vorinkubierten Komplementkomponenten C7, C8 und C9 mit den zu untersuchenden Proteinen hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 30 min wurde die Menge des durch die Lyse freigesetzten Hämoglobins photometrisch bei 414 nm gemessen. Dargestellt sind drei unabhängig voneinander als Triplikat durchgeführte Versuche. Vitronektin diente als Positivkontrolle und ein Reaktionsansatz ohne Proteinzugabe als Negativkontrolle. Die statistische Analyse erfolgte ausgehend von den ermittelten Werten der Negativkontrolle (NK) mittels einfaktoriellem ANOVA-Tests mit multiplem Vergleichstest nach Bonferroni und einem Konfidenzintervall von 95%. \*)  $p \leq 0,1$ ; \*\*)  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*\*)  $p \leq 0,0001$ .

Nachdem nun bestätigt werden konnte, dass die fünf Chi-Proteine in der Lage waren, den alternativen und terminalen Komplementweg zu inhibieren, wurde die Interaktion mit einzelnen Komplementkomponenten untersucht. In vorangegangenen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass ChiB, ChiD und ChiE in der Lage sind, die Komplementkomponente C5 zu binden (202). Eine Bindung von C5 könnte dazu führen, dass nicht ausreichend C5b durch die C5-Konvertase generiert werden kann, um die Aktivierung der terminalen Sequenz einzuleiten (121, 129, 214). Für die Analyse der C5-Interaktion und um die bestehenden Daten zu komplettieren, wurde die Dosisabhängigkeit der Protein-Protein Interaktion mittels ELISAs ermittelt. Dazu wurden die drei Chi-Proteine ChiB, ChiD und ChiE (5 ng/ $\mu\text{l}$ ) auf eine Mikrotiterplatte immobilisiert und anschließend steigende Konzentrationen an C5 (5 bis 25 nM) verdünnt in PBS<sup>++</sup> zu den Kavitäten hinzugegeben und die Bindung mit einem polyklonalen anti-C5 Antikörper detektiert. Als Kontrolle für die unspezifische Bindung von C5 wurde BSA mitgeführt.



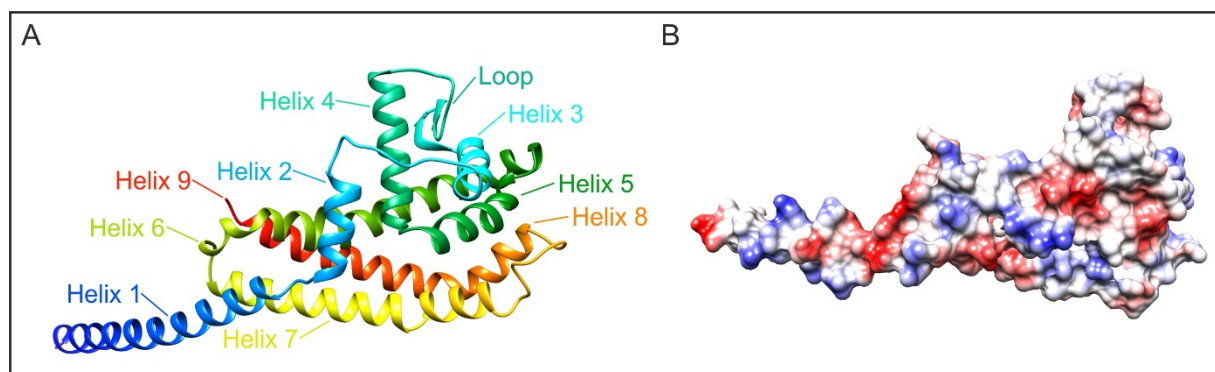
**Abbildung 16: Konzentrationsabhängige Bindung von C5 an ChiB, ChiD und ChiE von *B. recurrentis*.** Gereinigte His<sub>6</sub>-Borrelienproteine (5 ng/μl) wurden auf der Mikrotiterplatte immobilisiert und C5 in steigenden Konzentrationen (5 nM, 10 nM, 15 nM, 20 nM, 25 nM) hinzugegeben. Die Bindung wurde durch einen anti-C5 Antikörper (1:1000 verdünnt) detektiert. Die Daten repräsentieren drei unabhängig voneinander als Triplikat durchgeführte Versuche. Statistisch ausgewertet wurden die Versuche vergleichend zu den Daten von BSA mittels einfaktoriellem ANOVA-Test mit multiplem Vergleichstest nach Bonferroni und einem Konfidenzintervall von 95 %. \*)  $p \leq 0,1$ ; \*\*)  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*)  $p \leq 0,0001$ .

Für alle drei Borrelienproteine ließ sich ein Dosis-abhängiger Verlauf ab einer Konzentration von 10 nM ( $p \leq 0,0001$ ) nachweisen (Abbildung 16), wobei bei keinem der untersuchten Borrelienproteine eine Sättigung bei 25 nM erzielt werden konnte. Dabei kann ChiB mit einer Absorption von über 0,4 eine höhere finale Bindungskapazität aufweisen als ChiD und ChiE mit einer finalen Absorption von 0,4.

## 3.2 Identifikation und Untersuchung der Komplement-interagierenden Domäne in ChiB

### 3.2.1 Generierung verschiedener ChiB-Varianten von *B. recurrentis*

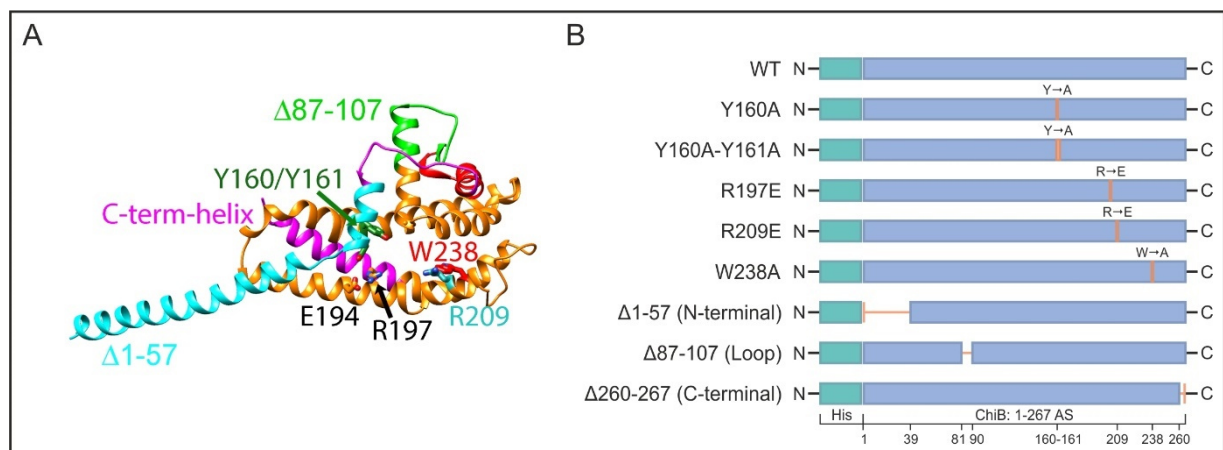
In vorangegangenen Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass alle dem Cluster zugeordneten Chi-Proteine inklusive ChiA, ChiB, ChiC, ChiD und ChiE in der Lage waren den alternativen und terminalen Komplementweg zu inhibieren (202). Um der Frage nach dem molekularen Mechanismus der Interaktion zwischen den Chi-Proteinen und Komplement nachzugehen, sollten die Komplement-interagierenden Domäne(n) in den Chi-Proteinen charakterisiert werden. Im Rahmen des LOEWE-Zentrums DRUID konnte in Kooperation mit Dr. Karin Fritz-Wolf aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jude Przyborski (Institut für Ernährungswissenschaften, Justus-Liebig-Universität Gießen) die Struktur von ChiB aufgeklärt werden (Abbildung 17).



**Abbildung 17: Dreidimensionale Struktur und Ladungsverteilung des ChiB-Proteins von *B. recurrentis*.** Dargestellt ist die dreidimensionale Struktur (A) und die Ladungsverteilung (B) des ChiB-Proteins. Die Abbildungen wurden freundlicherweise von Dr. Karin Fritz-Wolf zur Verfügung gestellt.

Das ChiB-Monomer umfasst 267 Aminosäuren und ist ein Cystein-armes Protein mit nur einem Cystein sowie einem Methionin. Die Gesamtstruktur besteht aus einem „ $\beta$ -Loop“ und neun  $\alpha$ -Helices, welche eine hydrophobe Tasche in der Mitte der Struktur umgeben. Basierend auf der dreidimensionalen Struktur wurden Aminosäuren definiert, die potenziell an der Interaktion mit Komplement beteiligt sein könnten (Abbildung 18A). Durch eine *in vitro*-Mutagenese (siehe Kapitel 2.7.5) wurden verschiedene ChiB-Varianten generiert, bei denen die entsprechenden Aminosäuren substituiert (Y160A, Y160A-Y161A, R197E, R209E, W238A) oder Bereiche des Proteins [ $\Delta$ 1-57 (N-Terminus),  $\Delta$ 87-107 (Loop-Region) und  $\Delta$ 260-267 (C-Terminus)] deletiert wurden (Abbildung 18B). Alle

*in vitro*-Mutagenese-Untersuchungen wurde mit dem Ausgangsvektor pQE-ChiB, der VeriFi DNA-Polymerase und den jeweiligen Starteroligonukleotiden (Tab. 3) durchgeführt. Die methylierte Matrizen-DNA wurde mit dem Restriktionsenzym *DpnI* hydrolysiert (Kapitel 2.7.7) und die Reaktionsansätze in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert (Kapitel 2.7.15). Von selektionierten Transformanten wurden Plasmide isoliert (Kapitel 2.7.9) und die eingeführten Mutationen mittels Sequenzierung überprüft (Kapitel 2.7.14). Für die ChiB-Varianten  $\Delta$ 1-57 (N-Terminus),  $\Delta$ 87-107 (Loop-Region) und  $\Delta$ 260-267 (C-Terminus) wurden die amplifizierten PCR-Produkte gereinigt, anschließend mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und SalI hydrolysiert und nach Ligation in den Expressionsvektor pQE-30 Xa ligiert (Kapitel 2.7.8). Die Ligationsreaktionen wurden mittels Hitzeschockmethode in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen transformiert und selektionierte Transformanten wie oben beschrieben charakterisiert und durch Sequenzierung verifiziert.

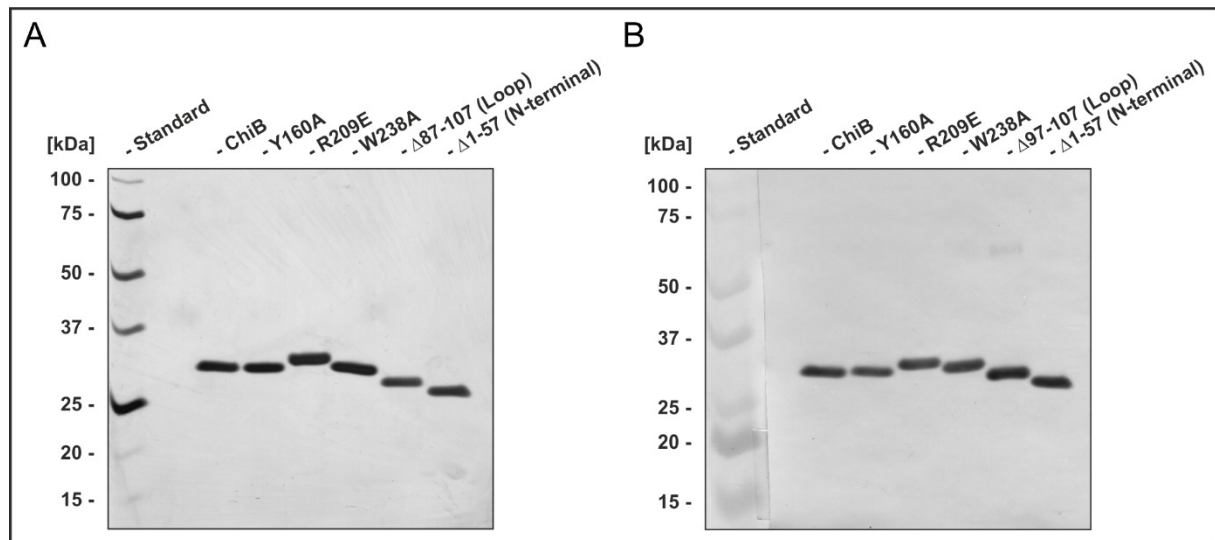


**Abbildung 18: Dreidimensionale Struktur des ChiB-Proteins von *B. recurrentis* und der mutierten Aminosäuren sowie die schematische Darstellung der generierten ChiB-Varianten.** Dargestellt ist die dreidimensionale Struktur von ChiB und die für die Interaktion mit Komplement potenziellen Aminosäuren (A). Schematische Darstellung der ChiB Varianten: Y160A, Y160A-Y161A, R197E, R209E, W238A,  $\Delta$ 1-57 (N-terminale Deletion),  $\Delta$ 87-107 (Deletion der Loop-Region),  $\Delta$ 260-267 (C-terminale Deletion) (B). Abbildung A wurde freundlicherweise von Dr. Karin Fritz-Wolf zur Verfügung gestellt.

Von den in Abbildung 18B dargestellten ChiB-Varianten konnten alle erfolgreich generiert werden. Bei der Überproduktion der ChiB-Varianten in *E. coli* BL21 (DE3) (Kapitel 2.7.22) zeigte sich allerdings, dass nur die Varianten mit den Aminosäuresubstitutionen Y160A, R209E und W238A sowie die ChiB-Varianten, bei denen die Loop-Region ( $\Delta$ 87-107) und der N-Terminus ( $\Delta$ 1-57) deletiert wurde, affinitätschromatographisch gereinigt werden konnten. Von den ChiB-Varianten Y160A-Y161A, E197A und  $\Delta$ 260-267 (C-terminal) konnten trotz

veränderter Bedingungen im Aufreinigungsprozess keines der Zielprotein im Gel identifiziert, und somit keines der Proteine aus *E. coli*-Zellen isoliert werden.

Zur Reinheitskontrolle wurde eine Tris/Tricin-SDS-PAGE (Kapitel 2.7.18) durchgeführt und die separierten Proteine durch Färbung mit Silbernitrat (Kapitel 2.7.21) und per Western Blot-Analyse (Kapitel 2.7.20) mit einem anti-His<sub>6</sub> Antikörper visualisiert.



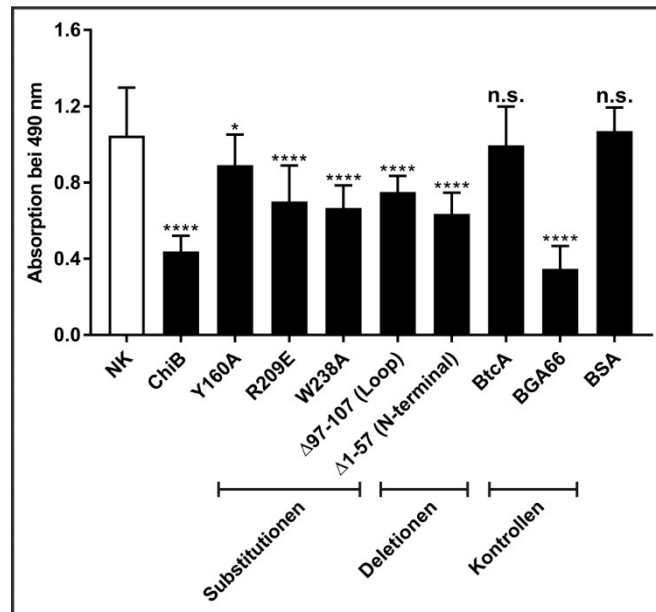
**Abbildung 19: Reinheitskontrolle der affinitätschromatographisch gereinigten ChiB-Varianten.** Von den ChiB-Varianten wurden 500 ng in einem 10% Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gel separiert und anschließend eine Färbung mit Silbernitrat (A) oder eine Western Blot-Analyse (B) mit einem Mix aus monoklonalen anti-His Antikörper (1:1000) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mittels Densitometer dokumentiert und digitalisiert. Links sind jeweils die molekularen Massen des Proteinstandards in kDa angegeben (Precision Plus Protein Unstained Standards bzw. Precision Plus Protein Dual Color Standards).

In Abbildung 19A ist zu erkennen, dass alle untersuchten Proteine bis zur apparenten Homogenität aufgereinigt werden konnten. Dies konnte ebenfalls durch die Western Blot-Analyse (Abbildung 19B) bestätigt werden. Für die ChiB-Variante Δ87-107 zeigte sich eine schwache Reaktion in der Western Blot-Analyse bei ca. 60 kDa, was für eine Dimerisierung des Proteins sprechen könnte. Wie bereits in Kapitel 3.1.2 beschrieben, besitzt ChiB eine kalkulierte molekulare Masse von 31,7 kDa. Wie zu erwarten, zeigte sich für die ChiB-Varianten mit den einzelnen Aminosäureaustauschen keine gravierenden Veränderungen in der relativen Laufweite gegenüber dem unveränderten ChiB-Protein. Nur die ChiB-Variante R209E wies eine minimal veränderte Laufweite auf. Die ChiB-Varianten mit den eingeführten Deletionen migrierten im Polyacrylamidgel wie erwartet weiter (Δ87-107 (Loop): 29,3 kDa und Δ1-57 (N-terminal): 27,4 kDa). Dieses Ergebnis bestätigte, dass die Proteine für die nachfolgenden Versuche verwendet werden konnten.



### **3.2.2 Untersuchung der Komplement-inhibierenden Eigenschaften verschiedener ChiB-Varianten auf den alternativen Komplementweg**

Wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben und in Abbildung 14 dargestellt, ist ChiB in der Lage den alternativen Komplementweg zu inhibieren. Um zu eruieren, ob die einzelnen Aminosäureaustausche oder Deletionen zur Beeinflussung des Komplement-inhibitorischen Potentials von ChiB führen, wurde ein ELISA-basierter Komplementfunktionstest (WiELISA) für den alternativen Komplementweg durchgeführt (Kapitel 2.8.3). Diese vergleichenden Untersuchungen sollten wichtige Informationen über die bei der Interaktion mit Komplement involvierten Aminosäuren bzw. Domänen liefern. Für diese Analyse wurden Mikrotiterplatten mit LPS beschichtet und Reaktionsansätze mit vorinkubierten NHS in die Kavitäten geben, um die Komplementaktivierung zu initiieren. Die Bildung des terminalen Membranangriffskomplexes wurde anschließend mit einem Neoepitop-spezifischen monoklonalen anti-C5b-9 Antikörper detektiert. Als Komplement-inhibierende Kontrollproteine dienten ChiB und BGA66 von *B. bavariensis* PBi (212) und als Negativkontrollen BtcA von *B. turicatae* und BSA sowie ein Reaktionsansatz ohne Zugabe von Protein.

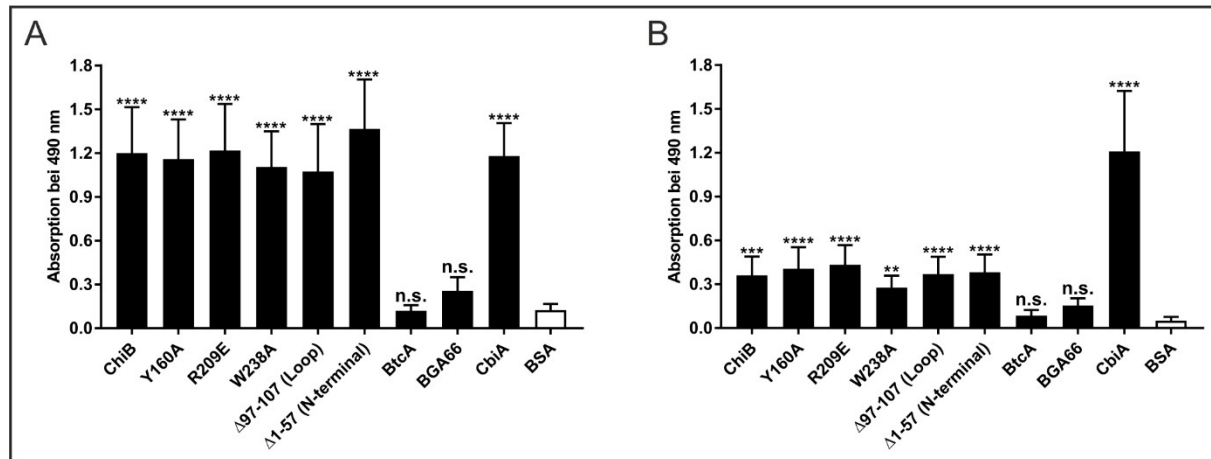


**Abbildung 20: Untersuchung zur inhibierenden Eigenschaft verschiedener ChiB-Varianten auf den alternativen Komplementweg.** Es wurden Mikrotiterplatten mit jeweils 1  $\mu\text{g}$  LPS beschichtet. Anschließend wurden 4  $\mu\text{M}$  der zu untersuchenden ChiB-Varianten mit 15 % NHS vorinkubiert und in die Kavitäten gegeben. Die Aktivierung von Komplement wurde über die Bildung des terminalen Membranangriffskomplex durch den anti-C5b-9 Antikörper (1:500) detektiert und die Absorption bei 490 nm gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander als Triplikat durchgeführten Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte in Bezug auf die NK mittels einfaktoriellen ANOVA-Tests mit multiplem Vergleichstest nach Bonferroni und einem Konfidenzintervall von 95%. n.s., nicht signifikant; \*)  $p \leq 0,1$ ; \*\*\*\*)  $p \leq 0,0001$ .

Ein inhibitorischer Effekt konnte wie erwartet bei ChiB und BGA66 ( $p \leq 0,0001$ ) nachgewiesen werden, während BtcA und BSA keine Inhibition zeigten (Abbildung 20). Die ChiB-Varianten R209E, W238A,  $\Delta 87-107$  und  $\Delta 1-57$  wiesen eine schwächere aber immer noch signifikante Inhibition auf ( $p \leq 0,0001$ ), wobei von allen untersuchten Proteinen die ChiB-Variante Y160A das geringste inhibitorische Potential entfaltete ( $p \leq 0,1$ ).

In vorangegangenen Untersuchungen ließ sich die Bindung der Komplementkomponenten C3b und C5 an ChiB feststellen (202). Beide Komplementkomponenten sind bei der zentralen Aktivierungsstufe der Komplementkaskade involviert, da zum einen C3b eine essenzielle Komponente der C3-Konvertase darstellt und zum anderen aktiviertes C5, sobald der C5b-6 Komplex gebildet wurde, den terminalen Komplementweg initiiert (121). Im Folgenden wurde untersucht, ob die ChiB-Varianten in der Lage sind die beiden erwähnten Komplementkomponenten zu binden oder ob ein Aminosäureaustausch bzw. eine Deletion zum Verlust der Bindung führt. Dazu wurden Interaktionsstudien durchgeführt, indem wie in Kapitel 2.8.2.1 beschrieben Mikrotiterplatten mit jeweils 500 ng der entsprechenden ChiB-Varianten immobilisiert wurden. Nach dem Blockieren wurden anschließend 500 ng der

Komplementkomponente C3b respektive C5 hinzugegeben und die Bindung mittels anti-C3 bzw. anti-C5 Antikörper detektiert. BtcA von *B. turicatae*, BGA66 von *B. bavariensis* PBi und BSA dienten als Negativkontrollen während das C3b und C5-bindende Protein CbiA von *B. miyamotoi* HT31 (179) als Positivkontrolle eingesetzt wurde.



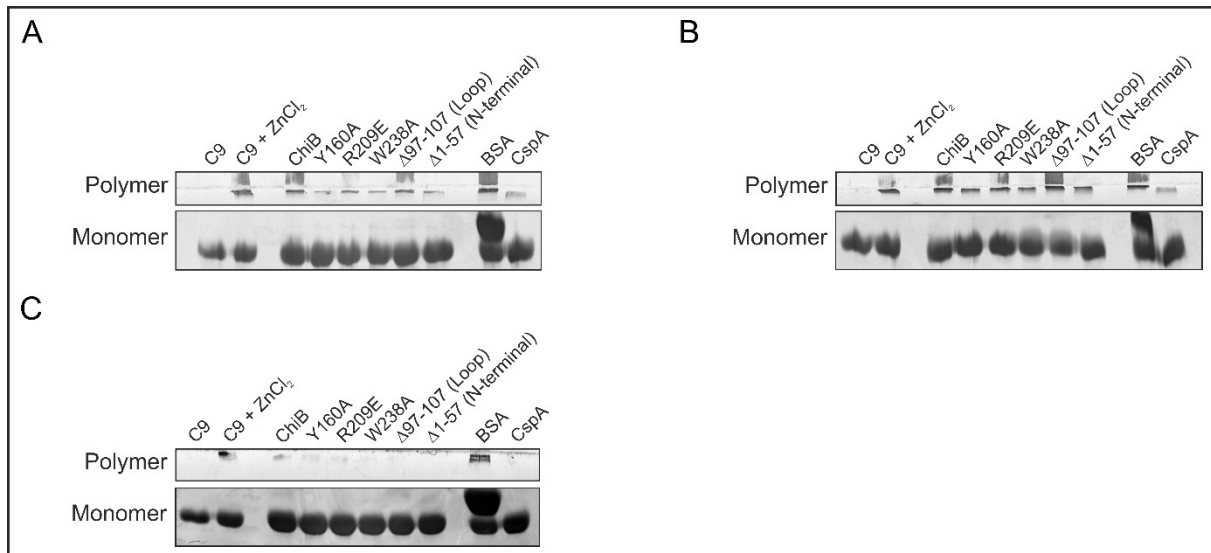
**Abbildung 21: Nachweis der Bindung der Komplementkomponenten C3b und C5 an verschiedene ChiB-Varianten.** Dargestellt ist die Bindung von C3b (A) und C5 (B) an verschiedene ChiB-Varianten. Es wurden 500 ng der zu untersuchenden Proteine pro Kavität in der Mikrotiterplatte immobilisiert. Anschließend wurden 500 ng der jeweiligen Komplementkomponente hinzugefügt sowie die Bindung durch einen polyklonalen anti-C3 bzw. anti-C5 Antikörper detektiert (1:1000) und die Absorption bei 490 nm gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen als Triplikat durchgeführten Versuchen. Die statistische Analyse erfolgte in Bezug auf BSA mittels einfaktoriellen ANOVA-Tests mit multiplem Vergleichstest nach Bonferroni und einem Konfidenzintervall von 95 %. n.s., nicht signifikant; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,0001$ ; \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ .

In Abbildung 21A ist zu erkennen, dass alle ChiB-Varianten in der Lage waren, C3b wie das unveränderte ChiB-Protein zu binden ( $p \leq 0,0001$ ). Wie erwartet, zeigte sich keine Bindung von C3b bei BtcA, BGA66 und BSA.

Hinsichtlich der Bindung von C5 (Abbildung 21B) an die ChiB-Varianten konnten keine bis nur sehr marginale Unterschiede festgestellt werden. Obwohl diese gemessenen Werte gegenüber BSA und den anderen Negativkontrollen BtcA und BGA66 signifikant erscheinen, zeigten sich für CbiA als Positivkontrolle im Vergleich zu den ChiB-Varianten deutlich höhere Adsorptionswerte.

### **3.2.3 Untersuchung der Komplement-inhibierenden Eigenschaften der verschiedenen ChiB-Varianten auf den terminalen Komplementweg**

Nachdem die ChiB-Varianten auf ihre Komplement-inhibierenden Eigenschaften auf den alternativen Komplementweg und ihre Bindungsfähigkeit gegenüber C3b und C5 analysiert wurden, wurde die Inhibition der Proteine auf die C9 Polymerisation und damit auf den terminalen Komplementweg untersucht. Die Fähigkeit von ChiB die Komplementkomponente C9 zu binden und dadurch die Autopolymerisation zu verhindern, konnte bereits in früheren Untersuchungen gezeigt werden (202). Die Polymerisation von C9 stellt dabei den letzten Schritt in der Aktivierung der Komplementkaskade dar und ist essenziell für die Formation des terminalen Membranangriffskomplexes (121). Auch in Abwesenheit der anderen im terminalen Membranangriffskomplex vorhandenen Komponenten C5b, C6, C7 und C8 polymerisieren C9 Monomere zu multimeren hochmolekularen Komplexen, insbesondere in Gegenwart von  $Zn^{2+}$ -Ionen. Dazu wurden die zu untersuchenden ChiB-Varianten in drei unterschiedlichen Konzentrationen (2,5  $\mu$ g, 5  $\mu$ g und 10  $\mu$ g) mit der Komplementkomponente C9 vorinkubiert (siehe Kapitel 2.9.1) sowie die Reaktionsansätze mit 5  $\mu$ l einer 250  $\mu$ M  $ZnCl_2$ -Lösung supplementiert und anschließend nochmals inkubiert. Alle Reaktionsansätze wurden auf ein 7,5 % Laemmli-SDS-Polyacrylamid-Gel (siehe Kapitel 2.7.19) aufgetragen und die separierten Proteine mittels einer Silbernitratfärbung visualisiert. Als Kontrolle diente C9 ohne Zugabe von Zinkchlorid sowie ein Reaktionsansatz mit autopolymerisierten C9 (C9 +  $ZnCl_2$ ). Außerdem wurden als zusätzliche Negativ- bzw. Positivkontrolle BSA bzw. CspA von *B. burgdorferi* B31 verwendet.



**Abbildung 22: Nachweis der inhibitorischen Kapazität der verschiedenen ChiB-Varianten auf die C9-Polymerisation.** Dargestellt sind die Ergebnisse der C9 Polymerisation-Tests, die mit 2,5  $\mu\text{g}$  (A), 5  $\mu\text{g}$  (B) und 10  $\mu\text{g}$  (C) der zu untersuchenden ChiB-Varianten durchgeführt wurden. C9 wurde zuerst mit gereinigten Proteinen und anschließend mit  $\text{ZnCl}_2$  inkubiert. Alle Reaktionsansätze wurden auf ein 7,5 % Laemmli-SDS-Gel appliziert und über Nacht separiert. Die Proteine wurden mit Silbernitrat visualisiert und die Farbreaktionen mittels Densitometer digitalisiert. Gereinigtes C9 und mit  $\text{ZnCl}_2$ -vorinkubiertes C9 sowie Reaktionsansätze mit BSA oder CspA dienten als Kontrollen.

Bei einer Proteinkonzentrationen von 2,5  $\mu\text{g}$  und 5  $\mu\text{g}$  konnte weder bei ChiB noch bei den untersuchten ChiB-Varianten eine Inhibition auf die C9 Polymerisation nachgewiesen werden (Abbildung 22). Im Gegensatz dazu, zeigte sich eine deutliche Inhibition so bald 10  $\mu\text{g}$  an Protein eingesetzt wurden. Wie zu erkennen, unterscheiden sich die ChiB-Varianten nicht von ChiB in ihrem inhibierenden Potential. Alle Kontrollen zeigten die erwarteten Ergebnisse, wobei CspA den stärksten inhibitorischen Effekt auf die C9 Autopolymerisation verzeichnete (213).

Zusammenfassend konnte somit bei den erfolgreich generierten ChiB-Varianten kein Verlust der Komplement-inhibitorischen Eigenschaften festgestellt werden. Weiterführend soll nun untersucht werden, inwieweit die unveränderten Chi-Proteine dem Serum-sensiblen Stamm *B. garinii* G1 eine Serumresistenz vermitteln können.

### 3.3 Untersuchung der durch verschiedene ChiB-Proteine vermittelten Serumresistenz

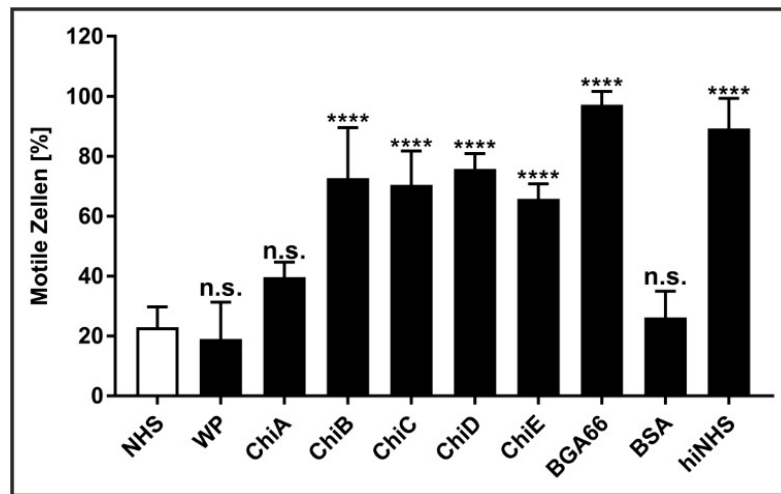
#### 3.3.1 Nachweis der durch Chi-Proteine vermittelten Serumresistenz im Serumprotektionstest

In den vorangegangenen Versuchen (202) sowie in dieser Arbeit (Kapitel 3.1.3) konnte gezeigt werden, dass alle fünf Proteine des Chi-Clusters von *B. recurrentis* A17 einen inhibierenden Effekt auf Komplement ausüben. Für zwei weitere äußere Membranproteine CihC und das Faktor H-bindende Protein HcpA wurde ebenfalls eine Komplement-inhibierende Wirkung nachgewiesen (176, 177). Im Rahmen dieser Arbeit sollte herausgefunden werden, ob der Komplement-inhibitorische Effekt der Chi-Proteine ausreicht, um den Serum-sensiblen Stamm *B. garinii* G1 in Gegenwart von Humanserum vor Bakteriolyse zu schützen. Durch die erhöhte Sensibilität dieses Borrelienstammes in Humanserum lässt sich die Wirkung der zu untersuchenden Proteine auf das Komplementsystem mit diesem besonders gut analysieren (215, 216).

Um die protektive Wirkung der Proteine zu untersuchen, wurde wie in Kapitel 2.9.2.1 beschrieben ein Serumprotektionstest durchgeführt. Dafür wurden zunächst 30 µl NHS mit 10 µM der zu untersuchenden Proteine bei 37 °C vorinkubiert. Anschließend wurden die vorinkubierten NHS-Reaktionsansätze zu jeweils  $1 \times 10^7$  Zellen von *B. garinii* G1 hinzugegeben und die Spirochäten bei 33 °C bis zu 6 h inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0 h, 2 h, 4 h sowie 6 h wurden 10 µl entnommen und die motilen Zellen unter einem Dunkelfeldmikroskop ausgezählt. Als Kontrollen dienten verschiedene Reaktionsansätze mit a) nativem NHS, b) mit hitzeinaktiviertem NHS, c) mit dem Elutionspuffer (50 mM Tris, pH 7,5), d) BSA-vorinkubiertem NHS sowie e) ein Reaktionsansatz bei dem NHS mit BGA66 von *B. bavariensis* PBi vorinkubiert wurde. Der Kontrollansatz mit Elutionspuffer wurde verwendet, um einen inhibierenden Einfluss des Puffers auf Komplement auszuschließen, sodass die Spirochäten unter den gewählten Versuchsbedingungen ungehindert absterben.

Für ChiB, ChiC, ChiD, und ChiE sowie für das Kontrollprotein BGA66 ließen sich bei einer Konzentration von 10 µM nach 4 h zwischen 65 % und 100 % motile *B. garinii*-Zellen nachweisen (Abbildung 23). Im Vergleich dazu scheint ChiA eine geringere protektive Wirkung auszuüben, da zum gleichen Zeitpunkt nur noch 40 % bewegliche Zellen nachgewiesen werden konnten. Die Kontrollen verhielten sich nach 4 h wie erwartet. Bei den

Reaktionsansätzen mit NHS, Waschpuffer und BSA wiesen nur 20 % der Zellen Motilität auf, während 90 % der Zellen in Gegenwart von hitzeinaktiviertem NHS überlebten.



**Abbildung 23: Untersuchung des protektiven Potential gereinigter Chi-Proteine von *B. recurrentis* gegenüber der bakteriolytischen Wirkung von NHS im Serumprotektionstest.** Für den Serumprotektionstest wurden 30 µl humanes Serum mit den zu untersuchenden Proteinen (10 µM) vorinkubiert. Anschließend wurden die NHS-Protein-Reaktionsansätze zu 70 µl BSK-H Medium mit  $1 \times 10^7$  *B. garinii*-Zellen hinzupipettiert und diese bei 33 °C inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0 h, 2 h, 4 h, sowie 6 h wurden 10 µl der Reaktionsansätze entnommen und die motilen Spirochäten unter dem Dunkelfeldmikroskop gezählt. Dargestellt sind die Mittelwerte von mindestens drei unabhängig durchgeführten Versuchen der 4 h-Werte. Die statistische Analyse bezieht sich auf den Datensatz von NHS und wurde mittels einfaktoriiellen ANOVA-Tests mit multiplem Vergleichstest nach Bonferroni und einem Konfidenzintervall von 95 % durchgeführt. n.s., nicht signifikant; \*\*\*\*\*)  $p \leq 0,0001$ .

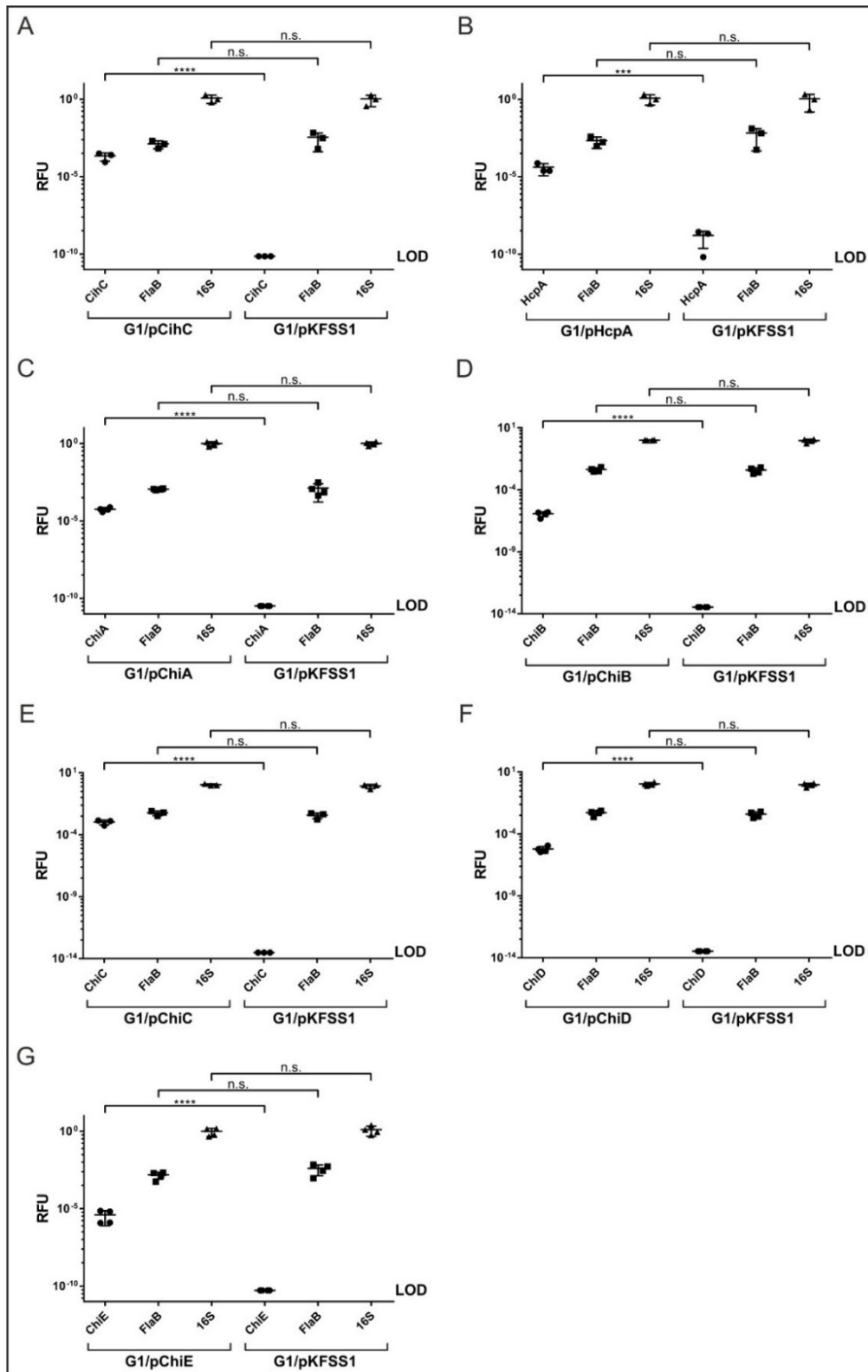
### 3.3.2 Generierung und Charakterisierung von Borrelientransformanten

Um die Bedeutung der durch Chi-Proteine vermittelten Serumresistenz zu bestätigen, wurden sogenannte „Gain-of-Function“-Borreliensämme generiert. Aufgrund der fehlenden genetischen Möglichkeiten gezielt Mutationen in *B. recurrentis* einzuführen und „Deletions“-Mutanten zu erzeugen, wurde der Serum-sensible Borreliens Stamm *B. garinii* G1 verwendet, um die betreffenden Proteine heterolog zu produzieren. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass dieser Borreliens Stamm unter Verwendung des jeweiligen nativen Promotors Komplement-interagierende Proteine verschiedener Lyme-Borrelien sowie RF-Borrelien korrekt prozessiert und auf der Borreliens oberfläche exponiert (217, 218, 213, 219, 212, 179). Diese Methodik wurde ebenfalls angewandt, um Shuttle-Vektoren zu generieren, die das entsprechende Chi-kodierende Gen (*chiA* bis *chiE*) enthalten. Dazu wurden die Chi-kodierenden Gene mittels *Taq* DNA-Polymerase und den entsprechenden Starteroligonukleotiden (Tab. 4) (Kapitel 2.7.5) amplifiziert, anschließend hydrolysiert (Kapitel 2.7.7) und in den Vektor pKFSS1 kloniert (Kapitel 2.7.8 und 2.7.15). Die generierten

Vektoren wurden in *E. coli* transformiert, aus selektionierten Klonen Plasmide isoliert und die inserierten DNA-Fragmente durch Sequenzierung überprüft. Vektoren, deren inserierte DNA-Fragmente keine Mutationen in der Sequenz aufwiesen, wurden durch Elektroporation in kompetente Borrelienzellen des *B. garinii* Stammes G1 transformiert (Kapitel 2.7.16). Zur Überprüfung der selektierten Borrelien-Transformanten wurden Plasmide isoliert, diese in *E. coli* transformiert und nach wiederholter Isolierung sequenziert. Von den beiden Proteinen CihC und HcpA ist bereits bekannt, dass diese Serumresistenz verleihen (176, 177). Allerdings wurden die vorangegangenen Untersuchungen mit dem Serum-sensiblen Borrelienstamm *B. burgdorferi* B313 durchgeführt. Um eine direkte Vergleichbarkeit der hier erzeugten Ergebnisse zu erlangen, mussten die Vektoren in den *B. garinii* Stamm G1 transformiert werden. Deswegen wurden nach dem gleichen Verfahren zusätzliche Shuttle-Vektoren, welche die kodierenden Gene für *cihC* und *hcpA* enthielten, aus bestehenden *B. burgdorferi* B313-Transformanten (176, 177) isoliert und anschließend in *E. coli*- sowie folgend in *B. garinii* G1-Zellen transformiert und überprüft.

Nach erfolgter Generierung der Transformanten wurde die Expression der entsprechenden Gene überprüft. Dementsprechend wurde RNA aus den Transformanten isoliert (Kapitel 2.7.11). Um alle Spuren von DNA zu eliminieren, wurde die RNA zwei Mal mit RNase-freier DNase behandelt und für die RT-qPCR-Analyse eingesetzt. Für die qPCR wurden anschließend 50 ng cDNA verwendet (Kapitel 2.7.13). Alle für die qPCR verwendeten Starteroligonukleotide sind in Tab. 5 aufgeführt. Für jede Transformante wurde die Expression des jeweiligen Chi-Protein kodierenden Gens getestet, sowie die Expression der Haushaltsgene *16S* rDNA- und *flaB*.



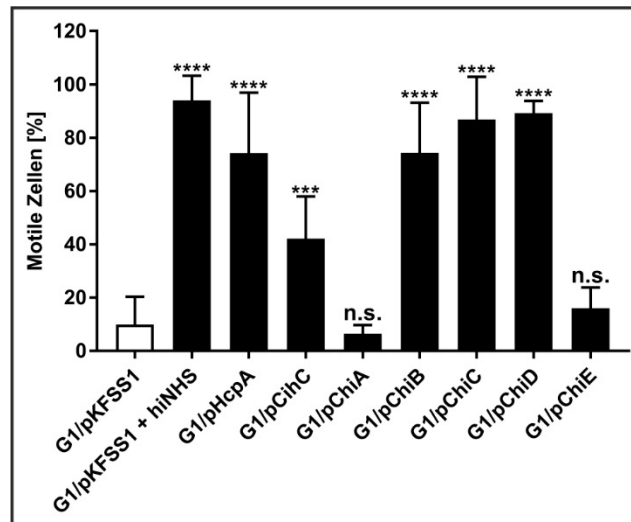


**Abbildung 24: Genexpressions-Analyse verschiedener Chi-kodierender Gene von *B. recurrentis* in *B. garinii* Transformanten.** Für die RT-qPCR wurde RNA aus den Transformanten isoliert, in cDNA transkribiert und 50 ng in die qPCR eingesetzt. Dargestellt sind die  $2^{\Delta Ct}$ -Werte von jeweils drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen für die Transformanten G1/pChiC (A), G1/pHcpA (B), G1/pChiA (C), G1/pChiB (D), G1/pChiC (E), G1/pChiD (F), und G1/pChiE (G). Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte anhand der Ct-Werte der einzelnen Transformanten im Vergleich zu den entsprechenden Ct-Werten des Kontrollstammes G1/pKFSS1. Es wurde ein ungepaarter t-Test und einem Konfidenzintervall von 95 % herangezogen. n.s., nicht signifikant; \*\*\*\*)  $p \leq 0,0001$ .

Die Ergebnisse der Genexpressions-Analyse sind in Abbildung 24 dargestellt. Bei allen untersuchten *B. garinii* G1 Transformanten konnte eine Expression der betreffenden *chi*-Gene beziehungsweise des *hcpA*- und des *cihC*-Gens nachgewiesen werden ( $p \leq 0,001$ ;  $p \leq 0,0001$ ). Wie erwartet zeigte sich keine Expression der betreffenden Gene im Kontrollstamm G1/pKFSS1, der nur den Shuttle-Vektor enthielt. Die Expression des Borrelien-spezifischen 16S-rRNA-kodierenden Gens sowie des *flaB*-Gens konnten in allen untersuchten Transformanten nachgewiesen werden.

Nachdem nun verifiziert wurde, dass die Gene kodierend für die verschiedenen Borrelienproteine in den Transformanten exprimiert wurden, sollte ein Serumbakterizidie-Test klären, ob die heterolog produzierten Proteine in der Lage sind eine Resistenz gegenüber der Komplement-vermittelten Bakteriolyse im Serum-sensiblen Surrogatstamm *B. garinii* G1 zu bewirken. In diesen vergleichenden Versuchen wurden außerdem zwei weitere Borrelientransformanten als Kontrollen mituntersucht; bei denen bereits bekannt ist, dass das Komplement-inhibierende Protein CihC und HcpA eine Resistenz gegenüber Komplement verleiht (176, 177). Für diesen Test wurden  $1 \times 10^7$  Zellen mit 25 % NHS versetzt und die Reaktionsansätze bei 33 °C für 6 h inkubiert, wobei zu den Zeitpunkten 0 h, 2 h, 4 h und 6 h die motilen Zellen unter dem Dunkelfeldmikroskop ausgezählt wurden. Als Negativkontrolle dienten G1/pKFSS1 sowie ein Reaktionsansatz bei dem der Kontrollstamm in Gegenwart von 25%igen hitzeinaktiviertem NHS inkubiert wurde, um zu demonstrieren, dass die Komplementaktivität allein für die Bakteriolyse der Borrelien verantwortlich ist. Die Grundlage für das Überleben in Humanserum der Borrelienzellen bildet der sichtbare Nachweis der Motilität der Zellen. Im Gegensatz ist die Ausbildung von sogenannten Blebs oder Abschnürungen der äußeren Membran sowie der Verlust der Motilität ein eindeutiges Kennzeichen für den Zelltod (216).

Die Ergebnisse des Serumbakterizidie-Tests (Abbildung 25) ergaben, dass nach 4 h bei den Transformanten G1/pChiB, G1/ChiC und G1/ChiD sowie bei der Kontrolle G1/HcpA noch zu 70 – 90 % motile Zellen gezählt werden konnten, während bei G1/pKFSS1 im Vergleich bis zu 20% der Zellen überlebten ( $p \leq 0,0001$ ). Bei dem Stamm G1/pCihC wiesen nach 4 h ca 40 % der Zellen Motilität auf ( $p \leq 0,001$ ). Bei den Transformanten G1/pChiA und G1/pChiE konnten nach 4 h hingegen nur noch wenige motile Zellen festgestellt werden (< 20 %).



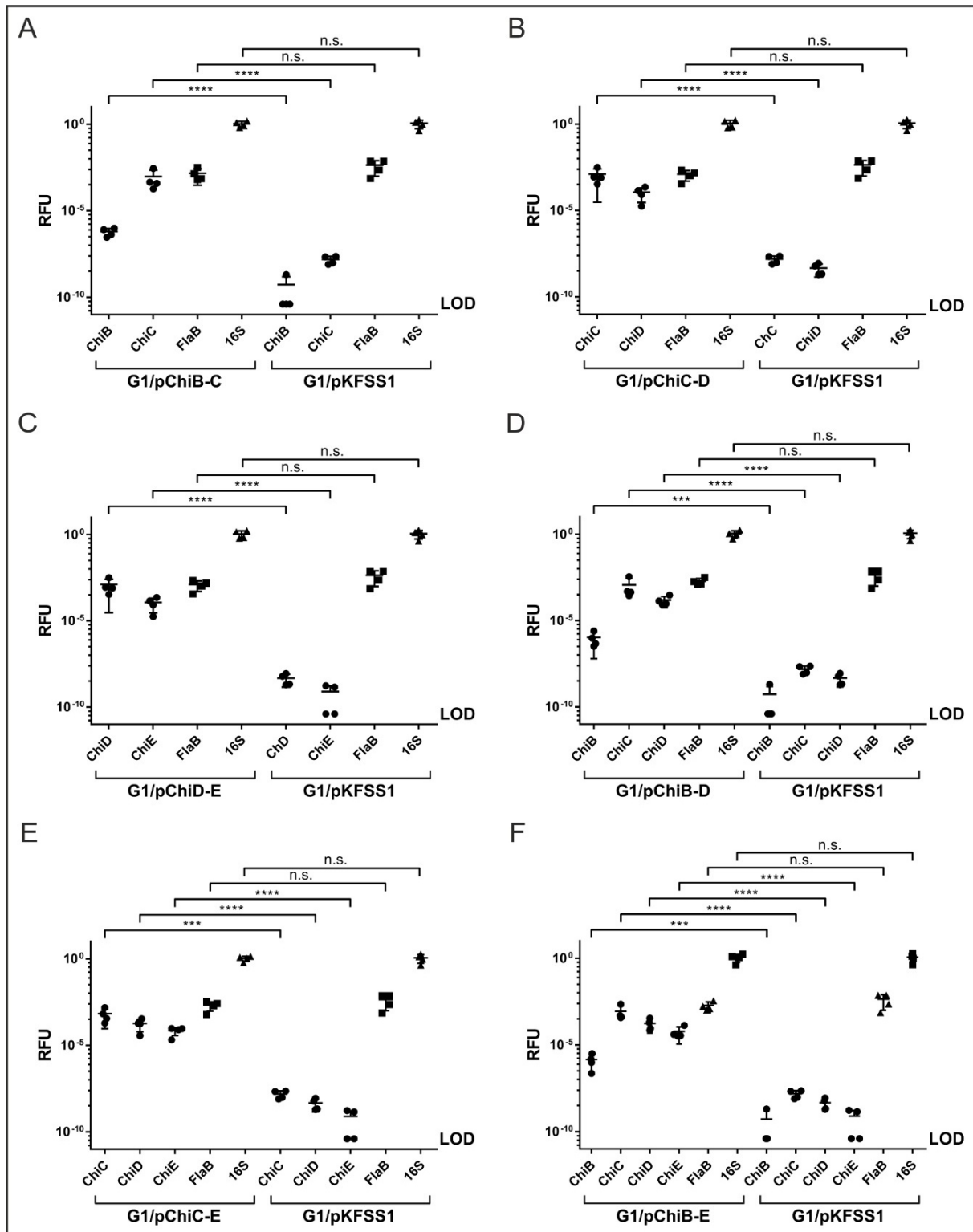
**Abbildung 25: Nachweis der Serumresistenz der verschiedenen Borrelia-Transformanten.** Die Transformanten ( $1 \times 10^7$  Zellen) wurden mit 25 % NHS versetzt und zu den Zeitpunkten  $t=0$  h, 2 h, 4 h und 6 h die motilen Zellen unter dem Dunkelfeldmikroskop gezählt. Dargestellt sind die Werte von mindestens drei unabhängig durchgeführten Versuchen zum Zeitpunkt  $t = 4$  h. Die statistische Auswertung erfolgt in Bezug auf die erhobenen Werte des Kontrollstammes G1/pKFSS1 mittels einfaktoriellen ANOVA-Tests mit multiplen Vergleichstest nach Bonferroni und einem Konfidenzintervall von 95 %. n.s., nicht signifikant; (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ ; (\*\*\*\*)  $p \leq 0,0001$ .

### 3.3.3 Generierung und Charakterisierung von Borrelia-Transformanten, die verschiedene Kombinationen von Chi-Proteinen produzieren

Um festzustellen, ob ein kumulativer Effekt durch die Anzahl und Kombination verschiedener Chi-Proteine auf die Serumresistenz zu erkennen ist, wurden zunächst Shuttle-Vektoren generiert, die unterschiedliche Kombinationen von Chi-kodierenden Genen enthielten. Zur Erzeugung der Shuttle-Vektoren wurden verschiedene Kombinationen an Starteroligonukleotiden (siehe Tab. 5) verwendet und der betreffende Bereich auf dem lp165-Plasmid wie in Kapitel 2.7.5 beschrieben mittels PCR amplifiziert. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden anschließend mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und Sall hydrolysiert, in den Vektor pKFFS1 kloniert, in *E. coli* transformiert und die Plasmide aus ausgewählten Klone isoliert. Nach Überprüfung der Sequenz wurden die Plasmide wie in Kapitel 2.7.16 und 3.3.2 beschrieben in *B. garinii* G1 durch Elektroporation transformiert. Es konnten folgende Transformanten generiert werden: G1/pChiB-C, G1/pChiC-ChiD und G1/pChiD-ChiE, G1/pChiB-ChiD, G1/pChiC-ChiE, und G1/pChiB-ChiE. Das für ChiA-kodierende Gen wurde nicht amplifiziert, da dieses Protein in den vorangegangenen Untersuchungen eine geringfügige Komplementinhibition aufwies (Abbildung 14 und Abbildung 15), bzw. auch keine Serumresistenz verlieh (Abbildung 23 und Abbildung 25).

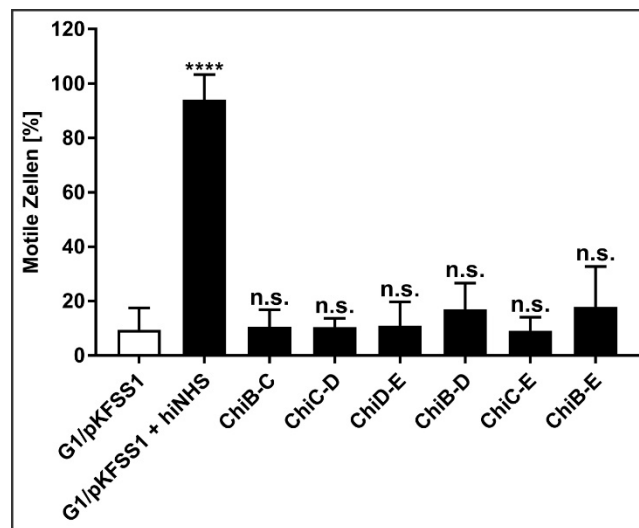
Ebenfalls wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben, wurde zuerst die Expression der betreffenden Gene mittels RT-qPCR überprüft. Dazu wurde aus den Transformanten RNA isoliert (siehe Kapitel 2.7.11) und in cDNA transkribiert, welche anschließend für die qPCR eingesetzt wurde (Kapitel 2.7.13). Die Transformante mit dem Ursprungsvektor diente als Kontrolle.

Für alle Transformanten konnte die Expression aller Chi-kodierender Gene sowie die 16S rDNA- und Flagellin-kodierenden Gene durch RT-qPCR bestätigt werden (Abbildung 26). Somit konnte mit dem Serumbakterizidie-Test fortgeführt werden.



**Abbildung 26: Nachweis der Expression verschiedener Chi-kodierender Gene in Transformanten von *B. garinii* G1.** Die aus Transformanten isolierte RNA wurde in cDNA transkribiert und 50 ng für die RT-qPCR eingesetzt. Dargestellt sind die  $2^{\Delta Ct}$ -Werte von jeweils drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen der Transformanten G1/pChiB-C (A), G1/pChiC-D (B), G1/pChiD-E (C), G1/pChiB-D (D), G1/pChiC-E (E) und G1/pChiB-E (F). Die statistische Signifikanz wurde in Bezug auf die Ct-Werte der Transformante G1/pKFSS1 mittels ungepaarten t-Test und einem Konfidenzintervall von 95 % berechnet. n.s., nicht signifikant; \*\*\*)  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*)  $p \leq 0,0001$ .

Nach erfolgreicher Überprüfung der verschiedenen Borrelientransformanten wurden wie bereits in Kapitel 2.9.2 beschrieben Serumbakterizidie-Tests durchgeführt. Für diese Versuche wurden  $1 \times 10^7$  Zellen in 75  $\mu$ l BSK-H Medium resuspendiert und mit 25  $\mu$ l NHS versetzt (Kapitel 2.9.2.2). Anschließend wurden die Reaktionsansätze bei 33°C für 6 h inkubiert und zu den Zeitpunkten  $t=0$  h, 2 h, 4 h und 6 h je 10  $\mu$ l entnommen, um die motilen Zellen unter dem Dunkelfeldmikroskop zu zählen. Als Kontrollen dienten Reaktionsansätze bei der die Transformante G1/pKFSS1 mit NHS bzw. mit hitzeinaktiviertem NHS inkubiert wurden.

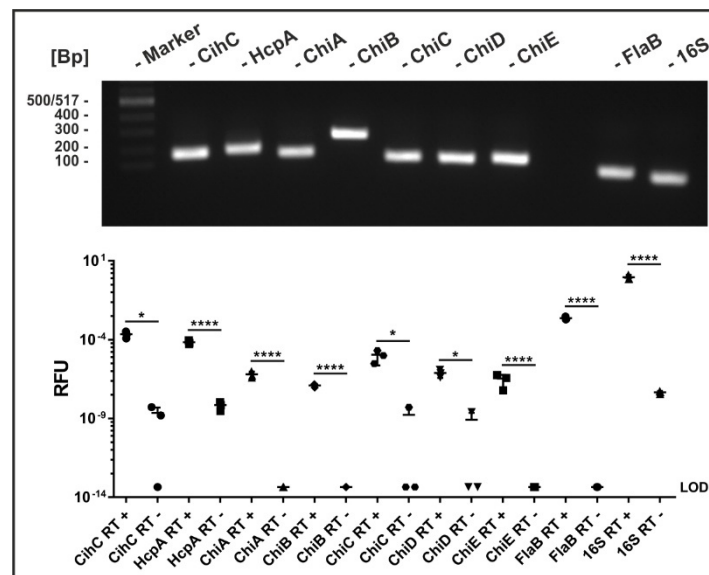


**Abbildung 27: Nachweis der Serumresistenz verschiedener Borrelientransformanten.** Für den Serumbakterizidie-Test wurden  $1 \times 10^7$  Zellen in 75  $\mu$ l BSK-H Medium mit 25  $\mu$ l NHS versetzt. Die Reaktionsansätze wurden bei 33°C für 6 h inkubiert, zu den Zeitpunkten  $t=0$  h, 2 h, 4 h und 6 h wurden je 10  $\mu$ l entnommen und der prozentuale Anteil der motilen Zellen unter dem Dunkelfeldmikroskop gezählt. Dargestellt sind die Mittelwerte der motilen Zellen zu dem Zeitpunkt  $t=4$  h von mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte in Bezug auf die Werte von G1/pKFSS1 mittels einfaktoriellen ANOVA-Tests mit multiplem Vergleichstest nach Bonferroni und einem Konfidenzintervall von 95 %. n.s., nicht signifikant; \*\*\*\*)  $p \leq 0,0001$ .

Wie in Abbildung 27 dargestellt, wurden nach 4 h Inkubation mit NHS 80% der Spirochäten bei allen Transformanten (G1/pChiB-C, G1/pChiC-D, G1/pChiD-E, G1/pChiB-D, G1/pChiC-E und G1/pChiB-E) abgetötet und wiesen somit den identischen Phänotypen wie G1/pKFSS1 auf. Nur im Kontrollansatz mit hitzeinaktiviertem NHS zeigten nach 4 h nahezu alle Zellen Motilität.

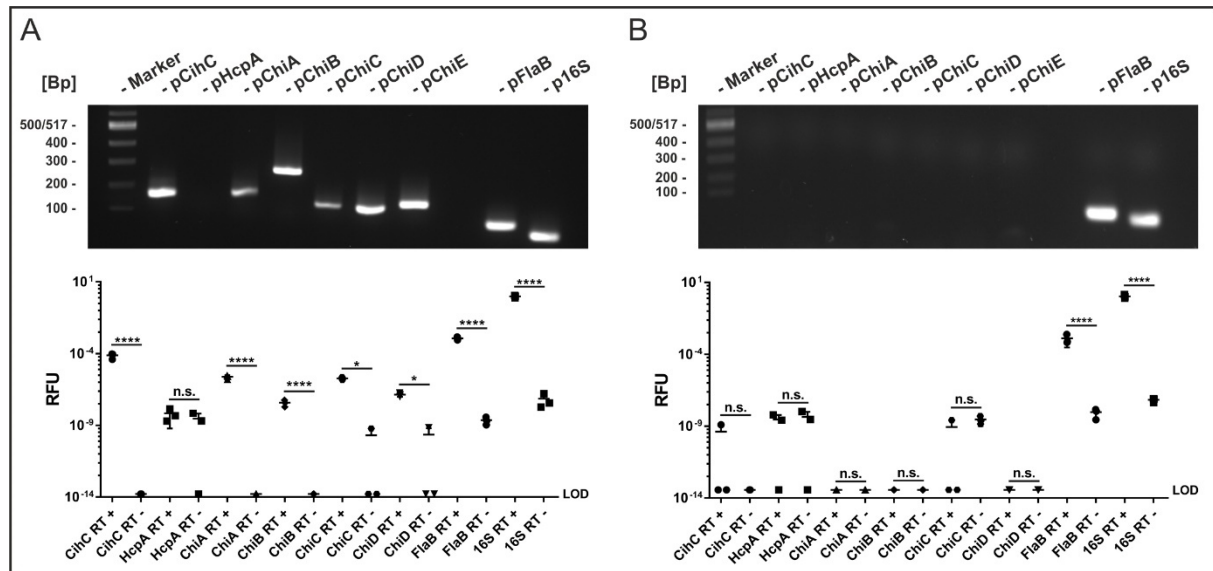
### 3.4 Nachweis von *chi*-orthologen Genen und deren Expression in *B. recurrentis* PAbJ und zwei *B. duttonii*-Stämmen

Im Rahmen dieser Arbeit sollte nachgewiesen werden, ob die für die Chi-kodierenden Gene in *in vitro* kultivierten *B. recurrentis*-Zellen exprimiert werden und ob orthologe Gene in zwei *B. duttonii* Stämmen vorhanden sind und ebenfalls exprimiert werden. Für diesen Versuch wurde aus den Borrelienkulturen genomische DNA wie in Kapitel 2.7.10 beschrieben isoliert und anschließend eine PCR mit Starteroligonukleotiden, die bei der RT-qPCR eingesetzt wurden (Tab. 5), durchgeführt (Kapitel 2.7.5). Die amplifizierten PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch separiert und anschließend mit der Geldokumentationsapparatur visualisiert (Kapitel 2.7.6). Bei einem positiven Nachweis eines Amplifikates wurde zusätzlich eine RT-qPCR für die Genexpression-Analyse unternommen. Hierfür wurde aus Borrelienkulturen RNA isoliert (siehe Kapitel 2.7.11) und in cDNA transkribiert. Diese wurde folgend in die qPCR mit den gleichen Starteroligonukleotiden (Tab. 5), welche für die vorangegangene konventionelle PCR verwendet wurden, eingesetzt (Kapitel 2.7.13). Als Negativkontrollen dienten Reaktionsansätze, die zuvor keine reverse Transkriptase enthielten.



**Abbildung 28: Nachweis der Chi-kodierenden Gene in *B. recurrentis* PAbJ und deren Expression *in vitro*.** Nach Isolierung der genomischen DNA aus *B. recurrentis* PAbJ wurde eine PCR mit 100 ng DNA durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden in einem 1% Agarosegel separiert und mittels Geldokumentationsapparatur visualisiert (oben). Für die Genexpressions-Analyse wurde RNA aus *B. recurrentis* PAbJ isoliert, transkribiert und die generierte cDNA für die RT-qPCR eingesetzt (unten). Zu sehen sind die  $2^{\Delta\Delta Ct}$ -Werte von jeweils drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte in Bezug auf die Reaktionsansätze ohne reverse Transkriptase, indem ein ungepaarter t-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 % durchgeführt wurde. \*)  $p \leq 0,1$ ; \*\*\*\*)  $p \leq 0,0001$ .

Für *B. recurrentis* PABJ konnten alle der untersuchten Chi-orthologen Gene nachgewiesen werden (Abbildung 28, oben). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass alle untersuchten Gene inklusive *chiC* und *hcpA* sowie der Kontrollen *flaB* und der 16S rDNA *in vitro* exprimiert werden (Abbildung 28, unten).

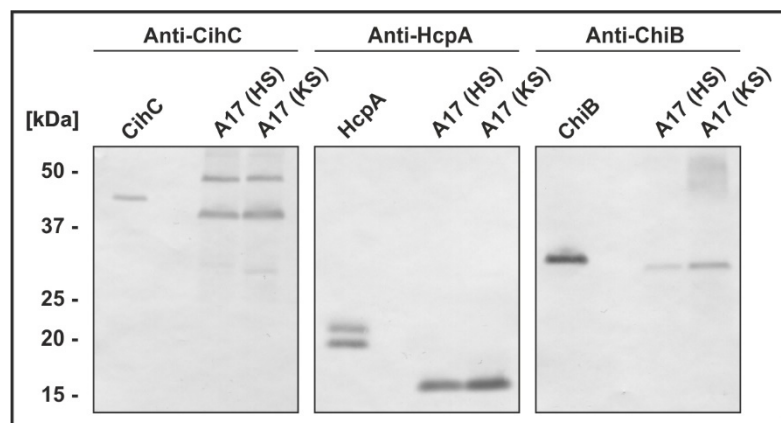


**Abbildung 29: Nachweis der *chi*-orthologen Gene in *B. duttonii* LAI und V sowie deren Expression *in vitro*.** Für die konventionelle PCR wurde genomische DNA aus *B. duttonii* LAI (A) und V (B) isoliert und anschließend 100 ng in die PCR eingesetzt. Die Reaktionsansätze wurden in einem 1% Agarosegel separiert und die Amplifikate mithilfe einer Geldokumentationsapparatur visualisiert (oben). Für die Genexpressions-Analyse wurde RNA isoliert, transkribiert und die cDNA in die RT-qPCR eingesetzt. Reaktionsansätze ohne reverse Transkriptase dienten jeweils als Negativkontrolle. Visualisiert sind die  $2^{\Delta\text{Ct}}$ -Werte von jeweils drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte in Bezug auf die Negativkontrolle der einzelnen Reaktionen und wurde aus den Ct-Werten mittels ungepaartem t-Test und einem Konfidenzintervall von 95 % errechnet. n.s., nicht signifikant; \*)  $p \leq 0,1$ ; \*\*\*\*)  $p \leq 0,0001$ .

Für die beiden untersuchten *B. duttonii*-Stämme ergaben sich deutliche Unterschiede im Nachweis und in der Expression der untersuchten Gene (Abbildung 29). Bei *B. duttonii* LAI ließen sich mit Ausnahme des HcpA-kodierenden Gens alle dem Chi-Cluster zugehörigen Gene mittels konventioneller PCR amplifizieren (Abbildung 29A). Im Gegensatz dazu konnte bei *B. duttonii* V nur eine Amplifikation der Haushaltsgene *flaB* und 16S rDNA nachgewiesen werden (Abbildung 29B). Die Genexpressions-Analyse bestätigte die Daten der PCR, dass außer dem HcpA-kodierende Gen, alle untersuchten Gene in *B. duttonii* LAI (Abbildung 29A) exprimiert werden. Wie zu erwarten konnte bei *B. duttonii* V (Abbildung 29B) nur die Expression der Haushaltsgene *flaB* und 16S rDNA detektiert werden.



Zusätzlich wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt, um nachzuweisen, ob Komplement-inhibierende Proteine des *B. recurrentis* Stammes A17 unter *in vitro* Bedingungen produziert werden. Für diese Untersuchung wurden wie in Kapitel 2.7.17 beschrieben Zellysate hergestellt und jeweils 20 µg auf ein Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen (Kapitel 2.7.18). Nach erfolgtem Transfer der separierten Proteine wurde eine Western Blot-Analyse mit Antikörpern gegen ChiC, HcpA (beide monoklonalen Antikörper zur Verfügung gestellt von Prof. Reinhard Wallich) und ChiB durchgeführt (Kapitel 2.7.20 und 2.8.1.1). Dabei stand der anti-ChiB Antikörper erst zu einem späteren Zeitpunkt der Arbeit zur Verfügung. Außerdem sollte untersucht werden, ob die Zusammensetzung des Borrelienanzuchtmediums (mit Humanserum bzw. mit Kaninchenserum) die Produktion der zu untersuchenden Proteine beeinflusst. Als Kontrollen wurden gereinigtes CihC, HcpA und ChiB mitaufgetragen.



**Abbildung 30: Nachweis von CihC, HcpA und ChiB in Zellysaten von *B. recurrentis* A17 mittels Western Blot-Analyse.** Es wurden 500 ng der gereinigten Proteine CihC, HcpA und ChiB zusammen mit 20 µg Zellysate des *B. recurrentis*-Stammes A17, der entweder in Gegenwart von Humanserum (HS) oder Kaninchenserum (KS) angezchtet wurde, auf ein 10% Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Nach Separation und Transfer auf eine Nitrocellulosemembran wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Zur Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe wurde der monoklonale anti-CihC (1:10) und anti-HcpA (1:5) Antikörper sowie ein polyklonaler anti-ChiB (1:1000) verwendet. Links dargestellt sind die molekularen Massen in kDa des Proteinstandards (Precision Plus Protein Dual Color Standards).

Für anti-CihC ergaben sich zwei starke Antigen/Antikörper-Reaktionen in der Höhe von ca. 40 und 50 kDa sowie eine sehr schwache Reaktion bei 30 kDa (Abbildung 30). Bei der Analyse mit dem anti-HcpA Antikörper zeigten sich zwei Reaktionen beim gereinigten HcpA auf der Höhe von 19 und 21 kDa, während bei beiden Zellysaten jeweils eine Reaktion auf der Höhe von 16 kDa detektiert werden konnte. Die Verwendung des anti-ChiB Antikörpers führte zu einer Detektion auf der Höhe von 31,7 kDa für das gereinigte CihC-Protein und von ca. 31 kDa

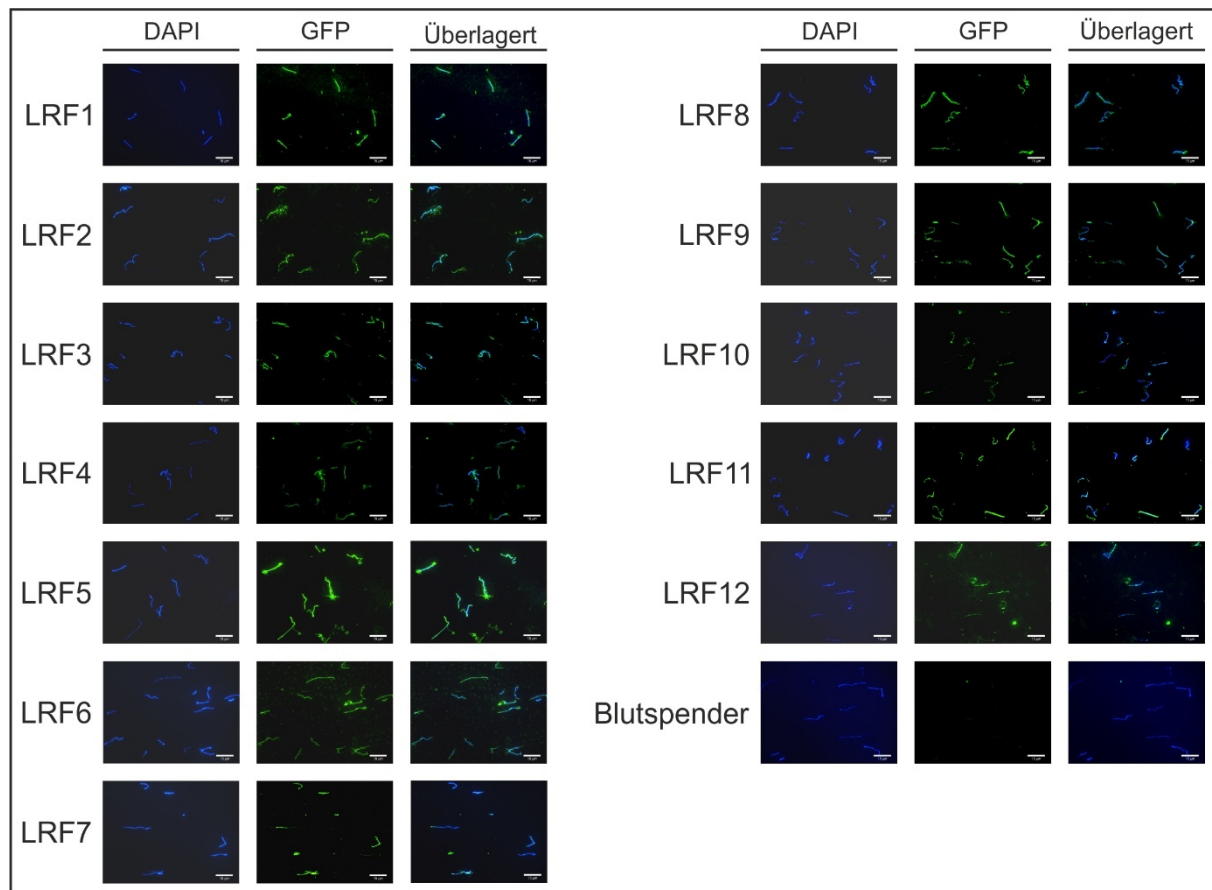
bei beiden Zelllysaten. Es konnten keine Unterschiede in Abhängigkeit des Borrelienmediums nachgewiesen werden. Damit konnten alle Gene kodierend für die Chi-Proteine sowie speziell die Genprodukte für CihC, HcpA und ChiB in *B. recurrentis* nachgewiesen werden. In dem Stamm *B. duttonii* LAI konnte zudem ebenfalls das Vorhandensein aller Gene außer *hcpA* festgestellt werden.

### **3.5 Die Entwicklung und Validierung serologischer Testverfahren zum diagnostischen Nachweis von Läuse Rückfallfieber**

#### **3.5.1 Nachweis der IgG Antikörperreaktivität bei Läuse Rückfallfieber-Patientenseren mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie**

Ein zentrales Ziel des durch das LOEWE-Zentrum DRUID geförderten Teilprojektes bestand insbesondere in der Entwicklung eines marktfähigen *in vitro* Testsystems zur Diagnose von Läuse Rückfallfieber (LRF). Zu Beginn wurden die von Dr. Volker Fingerle (Nationales Referenzzentrum für Borrelien) zur Verfügung gestellten LRF-Patientenseren auf ihre Antikörperreaktivitäten gegenüber fixierten Borrelien des Stammes *B. recurrentis* A17 mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie (Kapitel 2.8.5) überprüft. Die zu testenden Seren ( $n = 12$ ) stammen ursprünglich von Geflüchteten aus Nordafrika, die bei ihrer Ankunft in Deutschland eine deutliche Fiebersymptomatik aufwiesen und umfänglich diagnostiziert und anschließend antibiotisch therapiert wurden (96). Für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurden pro Ansatz  $3,6 \times 10^4$  Borrelien auf einem Objektträger fixiert und mit den einzelnen Patientenseren sowie mit einem Serum eines gesunden Blutspenders (Negativkontrolle) inkubiert. Kreuzreagierende anti-Borrelien Antikörper wurden mit einem FITC-konjugierten anti-human IgG Antikörper (Tab. 6) in Kombination mit DAPI, zum Nachweis der DNA, visualisiert. Die Objektträger wurden anschließend mit einem Axio Imager M2 Fluoreszenzmikroskop beurteilt und das Ergebnis mit einer RT3 Kamera dokumentiert.

Wie in Abbildung 31 dargestellt, konnten in allen LRF-Patientenseren anti-Borrelien Antikörper nachgewiesen werden. Erwartungsgemäß zeigte das Serum des gesunden Blutspenders keine Reaktivität.

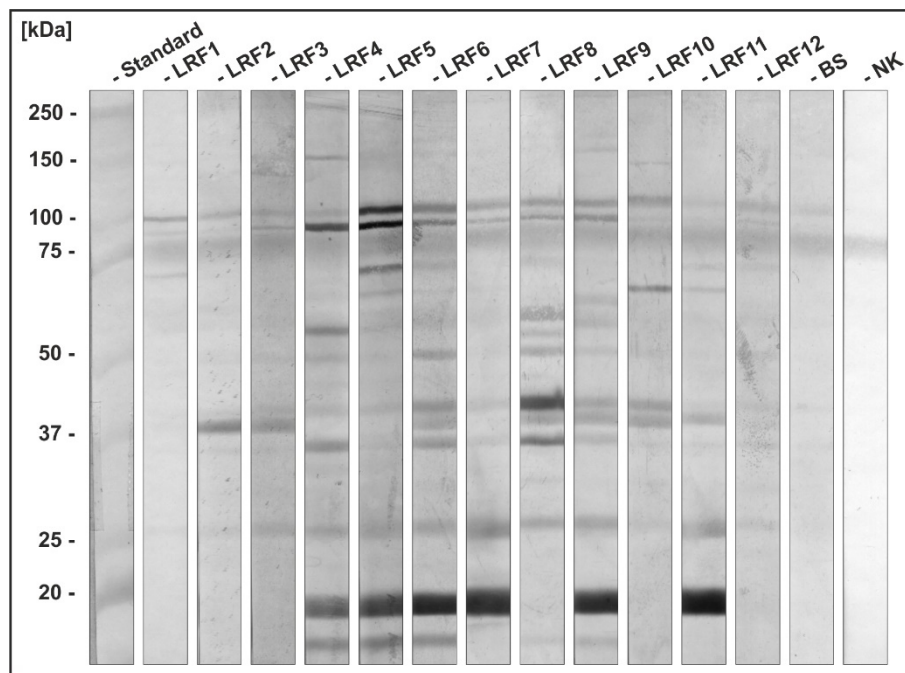


**Abbildung 31: Nachweis der IgG Antikörperreaktivität von LRF-Patientenseren im Immunfluoreszenztest.** Es wurden pro Ansatz  $3,6 \times 10^4$  Zellen des *B. recurrentis*-Stamms A17 auf einem Objektträger fixiert und dieser mit LRF-Patientenseren und als Kontrolle mit dem Serum eines gesunden Blutspenders (1:1000) inkubiert. Antigen-Antikörper-Komplexe wurden anschließend mit einem FITC-konjugierten anti-human IgG Antikörper detektiert und die Borrelienzellen mittels DAPI angefärbt. Die Dokumentation erfolgte durch ein Axio Imager M2 Fluoreszenzmikroskop und einer RT3 Kamera. Der Skalierungsbalken entspricht  $15 \mu\text{m}$ .

### 3.5.2 Nachweis der IgG- und IgM-Antikörperreaktivität der Läuserückfallfieber-Patientenseren durch eine Western Blot-Analyse

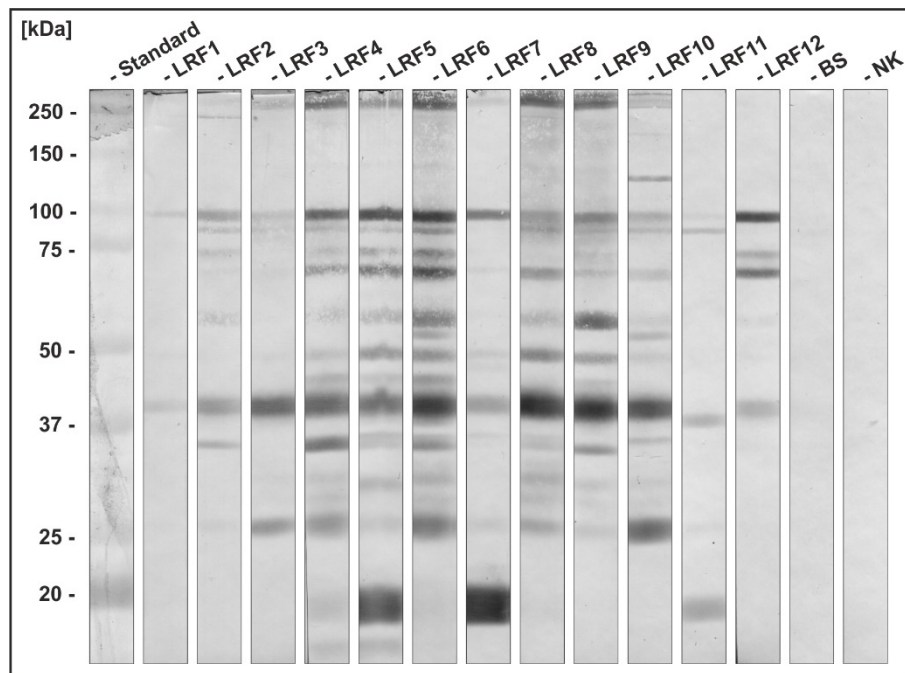
Um die Ergebnisse des Immunfluoreszenztests zu bestätigen, erfolgte ein zusätzlicher Nachweis der IgG- und der IgM-Antikörperreaktivität durch eine Western Blot-Analyse. Hierfür wurden  $360 \mu\text{g}$  Zelllysate von *B. recurrentis* A17 (siehe Kapitel 2.7.17) in einem Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gel separiert (Kapitel 2.7.18), auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (Kapitel 2.7.20) und eine Western Blot-Analyse gemäß Kapitel 2.8.1.2 durchgeführt. Einzelne Membranstreifen wurden mit den zu untersuchenden LRF-Patientenseren (1:100) sowie mit dem Serum eines gesunden Blutspenders inkubiert. Als weitere Kontrolle wurde eine Membran nur mit dem Inkubationspuffer inkubiert, um eine Kreuzreaktivität der sekundären anti-IgM und anti-IgG Antikörper auszuschließen. Anschließend wurden die reagierenden Antikörper entweder mit einem anti-IgM Antikörper

(1:10.000) oder mit einem anti-IgG Antikörper (1:96.000) (Novatec Immundiagnostica GmbH) detektiert und jede einzelne Membran mithilfe des Densitometers dokumentiert.



**Abbildung 32: Nachweis der IgM-Antikörperreaktivität bei verschiedenen LRF-Patientenseren.** Für die Western Blot-Analyse wurden 360 µg Zellysate von *B. recurrentis* A17 in einem 10 % Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gel separiert und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Einzelne Membranstreifen wurden mit LRF-Patientenseren bzw. einem Blutspenderserum (BS) (1:100) inkubiert. Als Antikörperkontrolle diente zusätzlich eine Membran, die nur mit Puffer (NK) inkubiert wurde. Die Detektion erfolgte durch einen anti-IgM Antikörper (1:10.000). Die Ergebnisse wurden mittels Densitometer digitalisiert. Links dargestellt sind die molekularen Massen in kDa des Proteinstandards (Precision Plus Protein Dual Color Standards).

Von den getesteten LRF-Seren zeigten sieben eine ausgeprägte IgM-Immunreaktivität (LRF4, LRF5, LRF6, LRF7, LRF8, LRF9 und LRF11 (Abbildung 32)). Die Seren LRF1, LRF2, LRF3, LRF10 und LRF12 verzeichneten hingegen eine schwächer ausgeprägte Immunreaktivität. Hervorzuheben sind die deutlichen Reaktionen gegenüber Antigenen von 18 kDa bei sechs LRF-Patientenseren (LRF4, LRF5, LRF6, LRF7, LRF9 und LRF11), von 37 - 40 kDa bei acht LRF-Patientenseren (LRF2, LRF3, LRF4, LRF6, LRF8, LRF9, LRF10 und LRF11) und bei ca. 100 kDa bei zehn LRF-Patientenseren (LRF1, LRF2, LRF3, LRF4, LRF5, LRF6, LRF7, LRF8, LRF9 und LRF10). Außerdem sind schwächere Immunreaktionen gegenüber Antigenen von 27 kDa, 35 kDa, 48 kDa, 60 kDa und 70 kDa in verschiedenen LRF-Patientenseren zu erkennen.

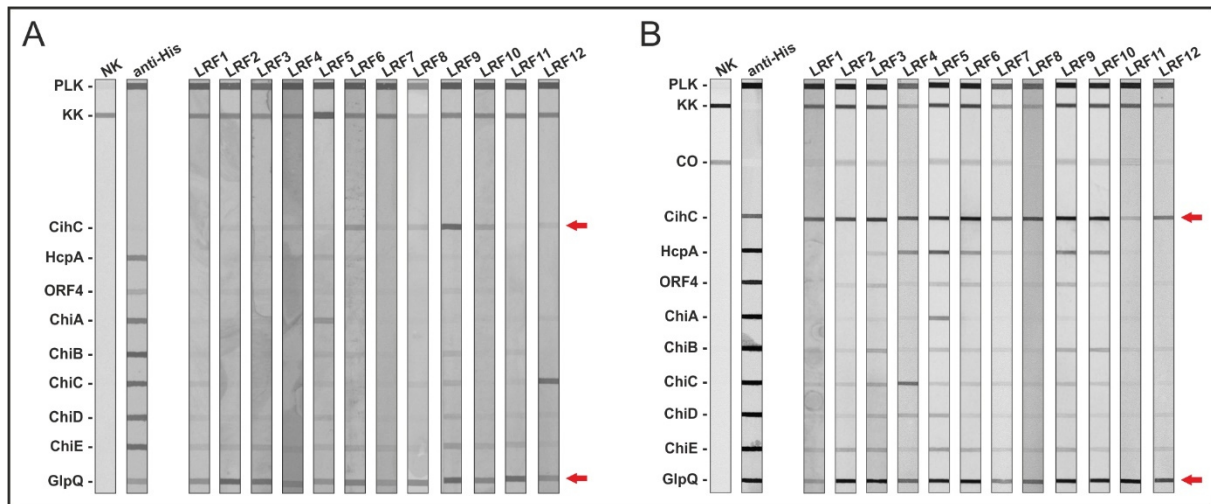


**Abbildung 33: Nachweis der IgG-Antikörperreaktivität bei verschiedenen LRF-Patientenseren.** Für die Western Blot-Analyse wurden 360 µg Zellysate von *B. recurrentis* A17 in einem 10% Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gel separiert und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Einzelne Membranstreifen wurden mit LRF-Patientenseren bzw. einem Blutspenderserum (BS) (1:100) inkubiert. Als Antikörperkontrolle diente zusätzlich eine Membran, die nur mit Puffer (NK) inkubiert wurde. Die Detektion erfolgte durch einen anti-IgG Antikörper (1:96.000). Die Ergebnisse wurden mittels Densitometer digitalisiert. Links dargestellt sind die molekularen Massen in kDa des Proteinstandards (Precision Plus Protein Dual Color Standards).

Die Western Blot-Analyse zum Nachweis der IgG-Immunreaktivität (Abbildung 33) zeigte eine noch eindeutigere Reaktivität der untersuchten LRF-Patientenseren gegenüber RF-Borrelien-Antigenen. Bei drei LRF-Patientenseren (LRF5, LRF7 und LRF11) zeigten sich deutliche Reaktionen für Antigene von 18 kDa sowie von 40 kDa und 100 kDa bei allen getesteten Seren. Ein breites Spektrum an Immunreaktivitäten gegenüber Antigenen von 27 kDa, 35 kDa, 48 kDa, 60 kDa und 70 kDa ließen sich in den LRF-Patientenseren LRF4, LRF5, LRF6, LRF8, LRF9 und LRF10 detektieren. Insbesondere drei LRF-Patientenseren (LRF4, LRF5 und LRF6) wiesen ein nahezu identisches, sehr breites Reaktivitätsspektrum für IgG auf.

### 3.5.3 Identifizierung geeigneter Antigene für die serologische Diagnostik von Läuse Rückfallfieber

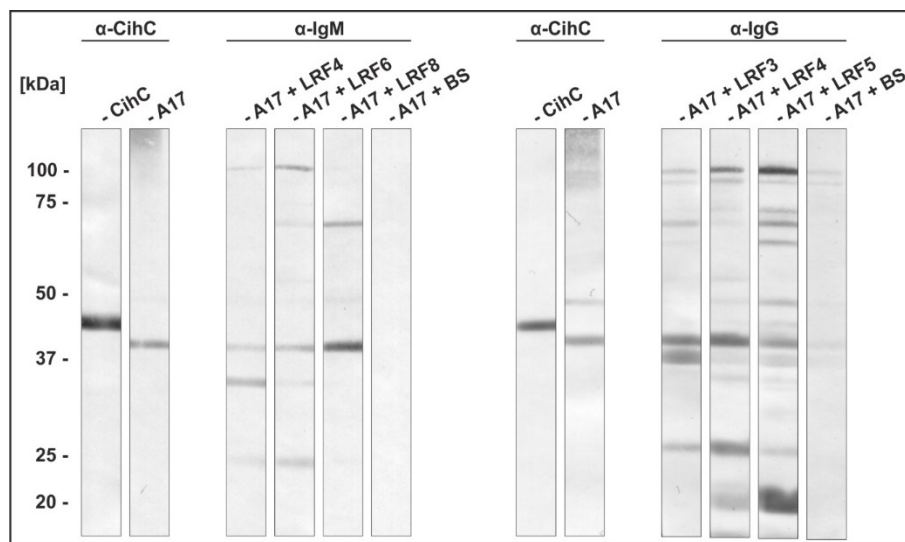
Nach dem erfolgten Nachweis der IgM- und IgG-Immunreaktivität der LRF-Patientenseren (Kapitel 3.5.2) wurden verschiedene Antigene ausgewählt, für die eine immunmodulatorische Wirkung bekannt sind. Da Komplement-interagierende Proteine direkt mit dem humanen Immunsystem interagieren und zudem als äußere Membranproteine auf der Zelloberfläche exponiert sind, sind diese prädestiniert für diese Untersuchungen. Deswegen wurden folgende Proteine für initiale Tests verwendet: CihC, HcpA, ChiA, ChiB, ChiC, ChiD und ChiE. Außerdem wurde das als ORF4-bezeichnete Protein, welches ebenfalls von einem Gen auf dem linearen Plasmid lp165 kodiert wird und zwischen dem HcpA- und ChiA-kodierenden Gen lokalisiert ist, sowie Glycerophosphodiester-Phosphodiesterase (GlpQ), welches aus früheren Studien als potentiell Antigen für die Diagnostik von ZRF und LRF beschrieben wurde, ausgetestet (94, 95, 220). Für diese Untersuchungen wurde in Kooperation mit der Novatec Immundiagnostica GmbH zunächst ein Western Blot-basiertes Testsystem (Lineblot-Immunoassay) eingesetzt. Dafür wurden wie in Kapitel 2.8.1.3 beschrieben die verschiedenen Antigene von *B. recurrentis* in einer Konzentration von 10 µg/ml mittels FrontLine™ HR Microliter Contact Dispenser auf eine Membran gesprüht. Nach dem Trocknen wurde die Membran in Streifen geschnitten und diese mit den verschiedenen LRF-Patientenseren inkubiert (1:100). Als Negativkontrolle (Antikörperkontrolle) dienten ein Membranstreifen, der zunächst nur mit dem Inkubationspuffer inkubiert wurde. Zur Detektion von reagierenden IgM (1:15.000) bzw. IgG (1:15.000) Antikörpern wurden entsprechende sekundäre Antikörper der Novatec Immundiagnostica GmbH verwendet. Die applizierten Antigene wurden mit einem anti-His<sub>6</sub> Antikörper (1:1000) detektiert. Das Ergebnis jedes einzelnen Membranstreifens wurde anschließend mittels Densitometer dokumentiert. Die aufgesprühte Probenladekontrolle und die Konjugatkontrolle dienten als weitere standardmäßige Prozesskontrollen des durchgeführten Tests.



**Abbildung 34: Identifizierung von geeigneten Antigenen für die serologische Diagnostik von LRF mithilfe eines Lineblot-Immunoassays.** Verschiedene Antigene wurden in einer Konzentration von 10 µg/ml auf eine Membran gesprüht. Anschließend wurde die getrocknete Membran in Streifen geschnitten und diese mit verschiedenen LRF-Patientenseren (1:100) inkubiert. Die Antikörper-Antigen-Komplexe wurden mit einem anti-IgM Antikörper (A) (1:15000) und einem anti-IgG Antikörper (B) (1:15000) der Novatec Immundiagnostica GmbH detektiert. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz, welcher nur mit dem Inkubationspuffer inkubiert wurde (NK). Außerdem wurden die aufgespritzten Antigene mit einem anti-His<sub>6</sub> Antikörper (1:1000) detektiert. Die roten Pfeile indizieren die immunreaktivsten Antigene. PLK, Probenladekontrolle; KK, Konjugatkontrolle, CO, „Cut off“-Kontrolle.

Die Ergebnisse dieser Tests indizierten, dass sowohl CihC als auch GlpQ als potenzielle Antigene für die Entwicklung eines *in vitro* Diagnostikums als geeignet erschienen. Wie in Abbildung 34A zu erkennen, zeigte GlpQ bei allen LRF-Patientenseren eine ausgeprägte Immunreaktivität für IgM. Im Vergleich mit den anderen Komplement-inhibierenden Proteinen ließ sich nur für CihC bei vier LRF-Patientenseren eine eindeutige Reaktion nachweisen. Alle anderen Antigene reagierten nur bei einzelnen LRF-Patientenseren positiv, wie z.B. LRF5 bei ChiA und LRF12 bei ChiC. Für den IgG-Nachweis (Abbildung 34B) zeigte sich bei allen Patientenseren für CihC und GlpQ eine eindeutige Immunreaktivität. Außerdem ließen sich IgG Antikörper gegen einzelne Antigene wie zum Beispiel für HcpA bei den LRF-Patientenseren LRF4, LRF5, LRF6, LRF9 und LRF10 sowie für ChiC bei dem Patientenserum LRF4 und für ChiA bei dem Patientenserum LRF5 detektieren. Die übrigen schwachen Reaktionen beim IgG-Nachweis wurden als unspezifisch interpretiert, da sich die Reaktionsstärken nicht von der „Cut off“-Kontrolle unterschieden.

Im vorangegangenen Versuch konnten CihC und GlpQ als geeignete Antigene identifiziert werden. Im Folgenden sollte durch eine vergleichende Western Blot-Analyse mit einem spezifischen monoklonalen anti-CihC-Antikörper und ausgewählten LRF-Patientenseren die Kreuzreaktivität gegenüber nativem CihC untersucht werden. Dazu wurde zuerst wie in Kapitel 2.7.17 beschrieben Gesamtzelllysate von *B. recurrentis* A17 sowie gereinigtes His<sub>6</sub>-CihC in einem Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gel separiert (Kapitel 2.7.18) und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die einzelnen Membranstreifen (Kapitel 2.7.20) wurden entweder mit dem anti-CihC Antikörper oder mit ausgewählten LRF-Patientenseren, welche in Abbildung 32 und Abbildung 33 die stärkste Immunreaktion aufwiesen, inkubiert und anschließend die IgM- bzw. IgG-Immunkomplexe detektiert (Kapitel 2.8.1.1 und 2.8.1.2).



**Abbildung 35: Nachweis von spezifischen anti-CihC Antikörper in LRF-Patientenseren.** Es wurden 500 ng des gereinigten CihC-Proteins sowie 20 µg Zelllysate vom *B. recurrentis* A17 in einem Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gel separiert und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membranstreifen wurden entweder mit dem anti-CihC Antikörper (1:10) oder mit LRF-Patientenseren (1:1000) inkubiert und die Antigenreaktionen mit entsprechenden sekundären Antikörpern (1:1000) detektiert. Anschließend wurde das Ergebnis mittels Densitometer dokumentiert.

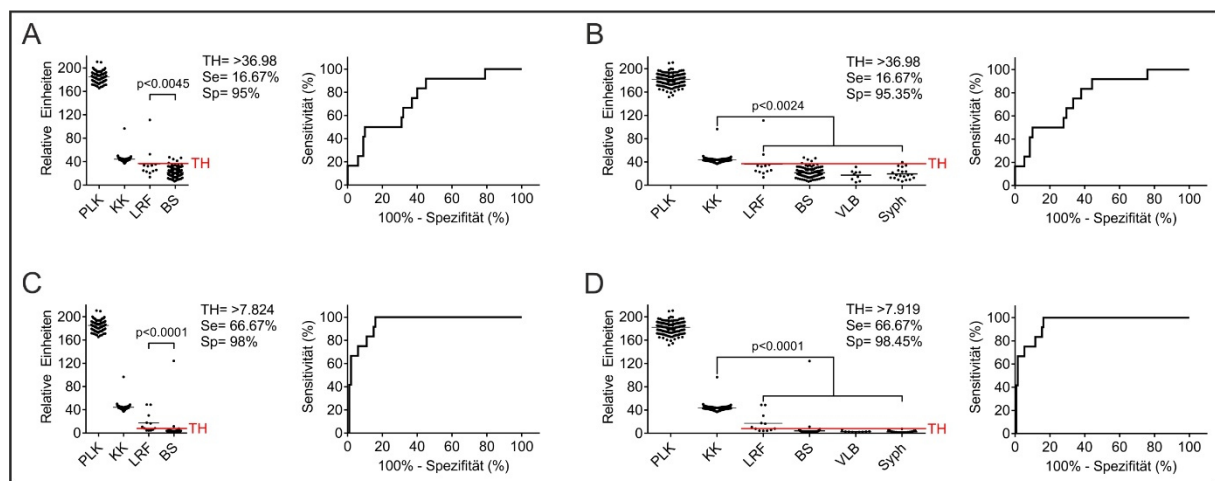
In Abbildung 35 ist deutlich zu erkennen, dass der monoklonale anti-CihC Antikörper wie zu erwarten eine deutliche Reaktion gegenüber dem gereinigten CihC-Protein aufwies sowie natives CihC in Zelllysaten von *B. recurrentis* A17 detektierte. Auf Höhe der entsprechenden Position von ca. 40 kDa konnten auch bei den verwendeten LRF-Patientenseren immunreaktive Reaktionen sowohl für IgM als auch für IgG nachgewiesen werden. Bei den Kontrollstreifen, die mit dem gesunden Blutspenderserum inkubiert wurden, zeigte sich wie erwartet keine Reaktion. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die immunreaktiven Reaktionen bei den LRF-Patientenseren dem CihC zuzuordnen sind.



### **3.5.4 Entwicklung und Evaluation eines Lineblot-Immunoassays für die serologische Diagnostik von Läuserückfallfieber**

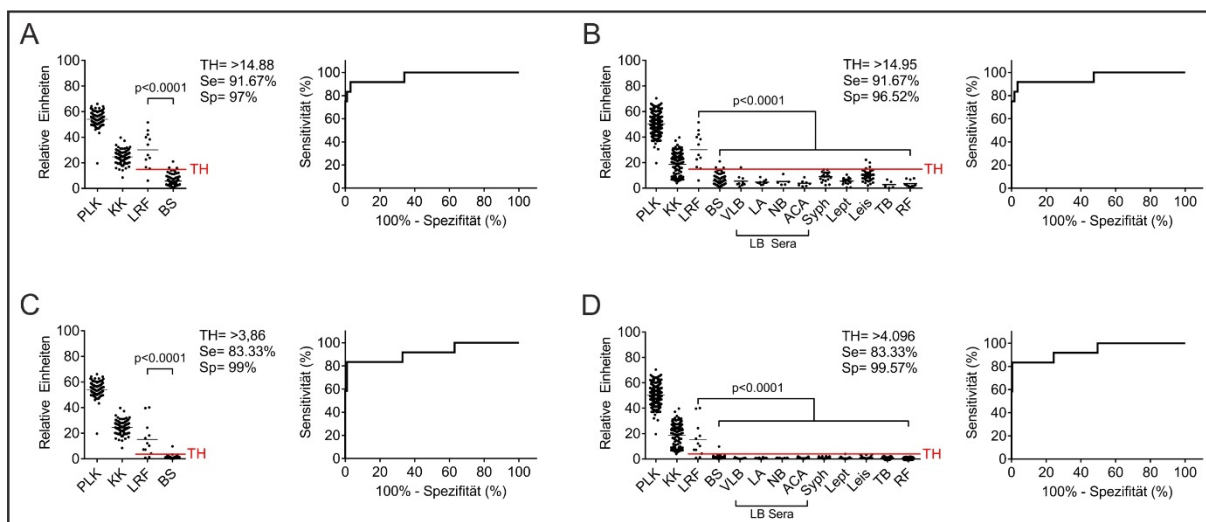
Nachdem CihC und GlpQ als geeignete Kandidaten für ein serologisches Testsystem identifiziert werden konnten, wurde basierend auf dem Portfolio der Novatec Immundiagnostica GmbH ein Lineblot-Immunoassay entwickelt. Hierfür wurden wie in Kapitel 2.8.1.3 beschrieben, gereinigtes CihC und GlpQ (jeweils N-terminal mit einem Hexahistidinpeptid fusioniert) auf eine Membran gesprüht und diese in Streifen geschnitten. Die Membranstreifen wurden mit den LRF-positiven (LRF) und zur Evaluierung des Testsystems mit verschiedenen LRF-negativen Patientenseren sowie Blutspenderseren (BS), Seren von Patienten mit gesicherter Lyme-Borreliose (LB) inklusive Verdacht auf Lyme-Borreliose (VLB), Lyme-Arthritis- (LA), Neuroborreliose- (NB) und Acrodermatitis chronica atrophicans Patientenseren (ACA) inkubiert. Außerdem wurde die Kreuzreaktivität von Patientenseren mit gesicherte Syphilis- (Syph), Leptospirose- (Lept), Leishmaniose- (Leis) und Tuberkulose (TB) sowie Seren von Patienten mit rheumatoider Arthritis (RF) untersucht. Die Anzahl der untersuchten Patientenseren ist in Tab. 33 zusammengefasst. Nach erfolgter Inkubation wurden die Streifen anschließend mit dem anti-IgM und anti-IgG Antikörper detektiert und nach dem Trocknen mit einem Densitometer digitalisiert. Alle Antigen/Antikörper-Reaktionen wurden densitometrisch ausgewertet und die erhaltenen Werte in relative Einheiten umgerechnet. Diese Daten wurden statistisch ausgewertet und eine Grenzwertoptimierungskurve (ROC-Kurve) erstellt, indem die relativen Einheiten der LRF-positiven Patientenseren in Bezug auf die relativen Einheiten der LRF-negativen Patientenseren gesetzt wurden. Aus dieser Berechnung ergab sich der Wert für die Fläche unter der ROC-Kurve (AUC) und dessen Konfidenzintervall (KI) sowie der Grenzwert (Threshold) womit die Sensitivität und Spezifität ermittelt werden konnten.

In der IgM-Immunoblot-Analyse ergab sich für CihC im Vergleich mit den Blutspendeseren ein signifikanter p-Wert von 0,0045 (Abbildung 36) bei einem Grenzwert von >36,96 und einer Sensitivität von >16,67 % sowie einer Spezifität von 95 % (AUC 0,7517; 95 % KI 0,6136 - 0,8898) (Abbildung 36A). Unter Einbeziehung aller LRF-negativer Seren konnte ein p-Wert von 0,0024 berechnet werden, wobei der Grenzwert, die Sensitivität und die Spezifität (AUC 0,7655; 95 % KI 0,6351 - 0,8959) unberührt blieben (Abbildung 36B). Im Vergleich zu CihC zeigte GIpQ mit einem p-Wert von jeweils 0,0001 eine sehr hohe statistische Signifikanz, sowohl im Vergleich mit den Blutspendeseren als auch im Vergleich aller LRF-negativer Patientenseran. Eine Sensitivität von 66,67 % und die Spezifität von 98 % bei einem Grenzwert von >7,824 (AUC 0,9508; 95 % KI 0,9083 - 0,9934) Abbildung 36C) bzw. >7,919 (AUC 0,9522; 95 % KI 0,9114 - 0,993) (Abbildung 36D) zeigt deutlich, dass dieses Antigen für ein diagnostisches Testsystem, zumindest für die Detektion von anti-IgG Antikörpern, potentiell eignen könnte.



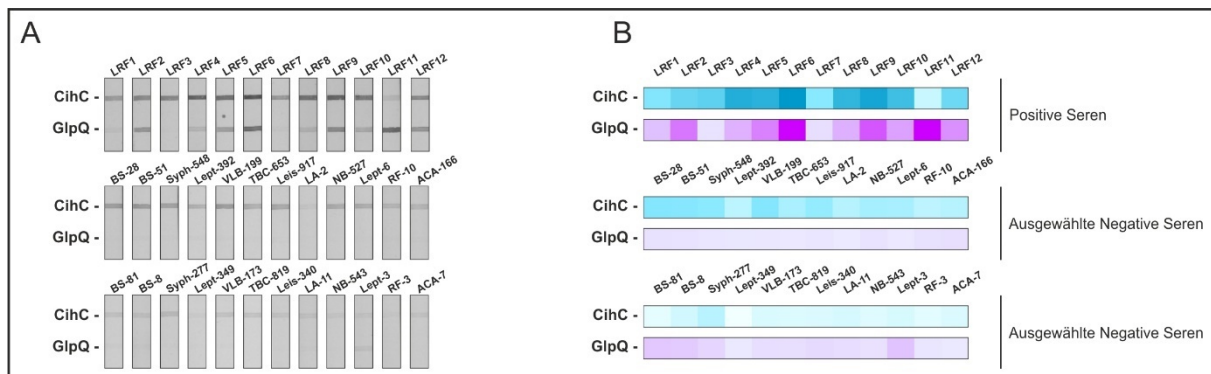
**Abbildung 36: Entwicklung und Evaluierung eines IgM-Lineblot-Immunoassays.** CihC und GIpQ wurden in einer Konzentration von 50 µg/ml respektive 40 µg/ml auf eine Nitrozellulosemembran mit einer Geschwindigkeit von 0,7 µl/cm aufgesprüht. Nach dem Trocknen wurde die Membran in Streifen geschnitten. Die Membranstreifen wurden mit verschiedenen LRF-positiven und LRF-negativen Patientenseran inkubiert (jeweils 1:100) und die Immunkomplexe anschließend mit einem anti-IgM Antikörper (1:10.000) detektiert. Die immunreaktiven Antigen/Antikörper-Reaktionen wurden densitometrisch ausgewertet und sind als relative Einheiten angegeben. Es wurde eine Grenzwertoptimierungskurve (ROC-Kurve) mit einem Konfidenzintervall von 95 % erstellt und mit dieser der Grenzwert (TH) und die daraus resultierende Sensitivität (Se) und Spezifität (Sp) ermittelt. Für CihC sind die getesteten LRF-Patientenseran im Vergleich zu den Blutspendeseren (A) und im Vergleich zu allen getesteten LRF-negativen Seren (B) dargestellt. Für GIpQ sind die LRF-Patientenseran ebenfalls im Vergleich zu den Blutspendeseren (C) und im Vergleich zu allen getesteten LRF-negativen Patientenseran (D) gezeigt. PLK, Probenladekontrolle; KK, Konjugatkontrolle.

Die Ergebnisse des IgG-Lineblot-Immunoassays sind in Abbildung 37 dargestellt und wiesen eine sehr hohe statistische Signifikanz mit einem p-Wert von 0,0001 auf. Die Tests erzielten mit CihC als Antigen eine Sensitivität von 91,67 % bei einer Spezifität von 97 % und einem Grenzwert von >14,88 (AUC 0,9683; 95 % KI 0,9141 - 1,023) (Abbildung 37A). Wenn alle LRF negativen Seren in die Berechnung miteinbezogen wurden, erreichte der Lineblot-Immunoassay die gleiche Sensitivität von 91,67 %, einer Spezifität von 96,52 % und einem Grenzwert von >14,95 (AUC 0,9563; 95 % KI 0,882 - 1,03) (Abbildung 37B). Im Vergleich zu CihC erzielte der Lineblot-Immunoassay mit GlpQ als Antigen bei einem Grenzwert von >4,096 eine Sensitivität von 83,33 % und eine Spezifität von 99,57 % in Korrelation mit den Blutspenderseren (>0,9175; 95 % KI 0,8095 - 1,025) (Abbildung 37C) als auch mit den LRF-negativen Seren (>0,9373; 95 % KI 0,8536 - 1,021) (Abbildung 37D).



**Abbildung 37: Entwicklung und Evaluierung eines IgG-Lineblot-Immunoassays.** Für diesen Test wurden die Antigene in einer Konzentration von 40 µg/ml für CihC und 30 µg/ml für GlpQ in einer Geschwindigkeit von 0,7 µl/cm auf eine Membran gesprüht. Anschließend wurden die Membranstreifen mit verschiedenen LRF-positiven und LRF-negativen Patientenseren inkubiert (1:100) und die Immunkomplexe mit einem anti-IgG Antikörper (1:96.000) detektiert. Die immunreaktiven Antigen/Antikörper-Reaktionen wurden densitometrisch ausgewertet und sind als relative Einheiten angegeben. Anschließend wurde eine Grenzwertoptimierungskurve (ROC-Kurve) mit einem Konfidenzintervall von 95 % erstellt, indem die relativen Einheiten der LRF-Patientenseren den LRF-negativen Seren gegenübergestellt wurden. Dargestellt sind für CihC die LRF-Patientenseren im Vergleich zu den Blutspenderseren (A) und im Vergleich zu allen LRF-negativen Seren (B). Für GlpQ ist der Vergleich zu den Blutspenderseren in (C) und der Vergleich mit allen LRF-negativen Seren in (D) zu sehen. PLK, Probenladekontrolle; KK, Konjugatkontrolle; TH, Grenzwert; Se, Sensitivität; Sp, Spezifität.

Die aus der Intensität der Antigen/Antikörper-Reaktion ermittelte relative Einheit ist essenziell zur Ermittlung der Sensitivitäten und Spezifitäten. Allerdings ist das eigentliche Ziel der Entwicklung eines diagnostischen Lineblots, dass die positiven Reaktionen von den negativen auch rein visuell und ohne Hilfe einer Software unterschieden werden können. Bei genauer Analyse der eingescannten Lineblots in Abbildung 38A fällt auf, dass bei CihC bei allen Lineblots, inkubiert mit den positiven LRF-Patientenseren, Antigen/Antikörper-Reaktionen sichtbar sind. Auch für GlpQ können starke Antigen/Antikörper-Reaktionen für die Seren LRF2, LRF5, LRF6, LRF9, LRF10, LRF11 und LRF12 verzeichnet werden, während bei den Seren LRF1, LRF4 und LRF8 nur schwache Reaktion sichtbar sind. Bei den Seren LRF3 und LRF7 sind hingegen keine Verfärbungen vorhanden. Allerdings können bei dem Antigen CihC und den ausgewählten LRF negativen Seren in allen Lineblots auch noch schwache bis leicht stärkere unspezifische Reaktionen beobachtet werden, wohingegen für das Antigen GlpQ nur bei dem Patientenserum Lept-3 eine leichte Verfärbung sichtbar ist. Der Reaktionsstärke entsprechend ist in Abbildung 38B für alle Antigen/Antikörper Reaktionen die korrelierende Heatmap abgebildet.



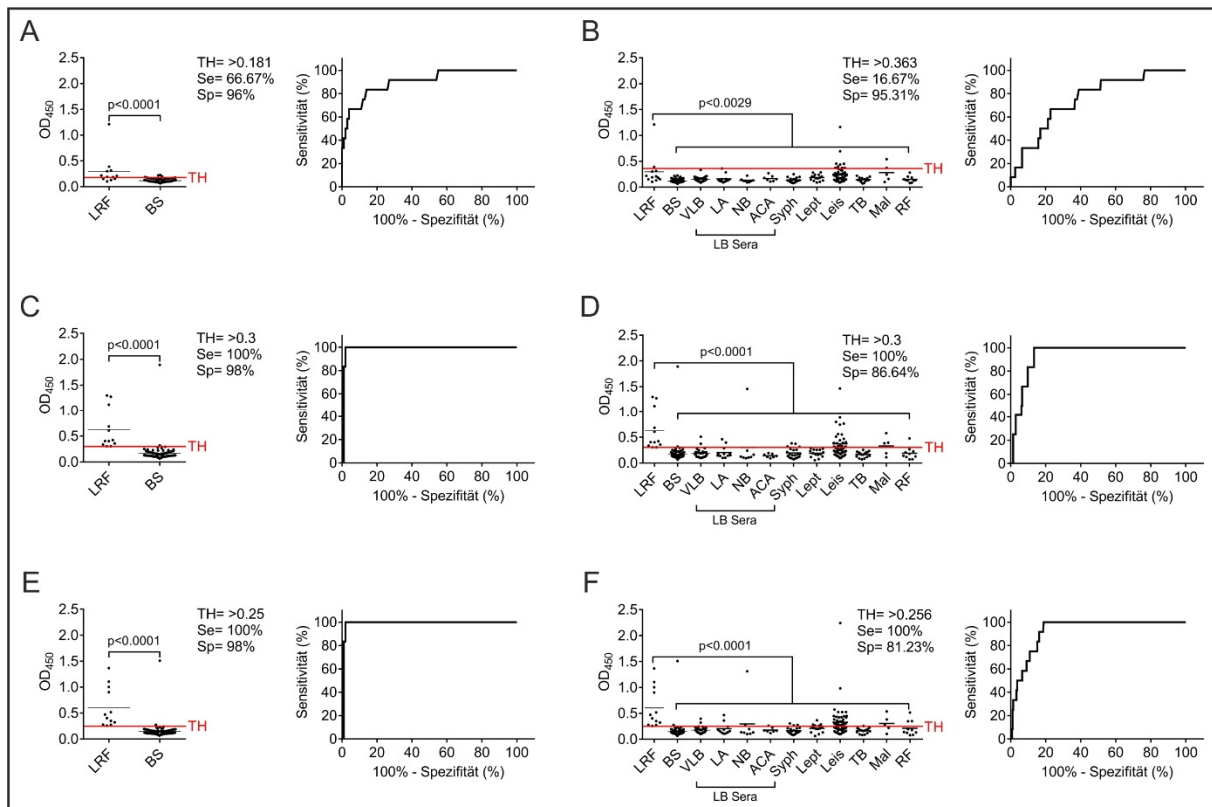
**Abbildung 38: Vergleichende Analyse ausgewählter Lineblot-Immunoassays zur Erstellung einer Farbkodierungsskala (Heatmap) für die Beurteilung der Signalintensitäten der erhaltenen Antigen/Antikörper-Reaktionen.** Von CihC und GlpQ wurden 40  $\mu\text{g/ml}$  bzw. 30  $\mu\text{g/ml}$  in einer Geschwindigkeit von 0,7  $\mu\text{l/cm}$  auf eine Membran gesprüht. Die Membranstreifen wurden mit verschiedenen Seren (1:100) inkubiert und die Antigen-Antikörper-Komplexe mit dem anti-IgG Antikörper (1:96.000) detektiert. Alle Antigen/Antikörper-Reaktionen wurden densitometrisch dokumentiert und mithilfe der Software Image Lab konnten die Reaktionsintensitäten quantifiziert werden. In der Abbildung sind die Lineblot-Immunoassays der positiven LRF-Patientenseren sowie ausgewählte Lineblot-Immunoassays mit den stärksten unspezifischen Reaktionen von LRF-negativen Seren dargestellt (A). Die korrelierende Farbkodierungsskala aus den ermittelten relativen Einheiten ist ebenfalls abgebildet (B).

### 3.5.5 Entwicklung und Evaluation eines ELISA-basierten Immunoassays zum serologischen Nachweis von Läuse Rückfallfieber

Für die serologische Diagnostik von Infektionskrankheiten wird häufig eine Zwei-Stufen-Diagnostik, wie z.B. bei der Lyme-Borreliose, angewandt. D.h., dass zunächst ein „Screening-Test“ in Form eines ELISA zum Einsatz kommt und bei einem fragwürdigen bzw. positiven Ergebnis ein sogenannter Immunoblot zur Bestätigung durchgeführt wird. Üblicherweise sind die Sensitivität und Spezifität bei einem ELISA stringenter als in einem Line blot-basierten Immunoassay eingestellt. Aus diesem Grund beinhaltet diese Arbeit auch die Entwicklung eines ELISA-basierten Testsystems. Hierfür wurde wie in Kapitel 2.8.2.3 beschrieben verfahren. Das ELISA-Format beinhaltete zu Beginn die Überprüfung der einzelnen Antigene CihC sowie GlpQ und die Berechnung der individuellen Spezifitäten und Sensitivitäten wie auch die Kombination beider Antigene. Es wurden jeweils 500 ng von CihC oder GlpQ bzw. CihC gemeinsam mit GlpQ in Mikrotiterplatten immobilisiert. Nach dem Blockieren wurden die zu untersuchenden Seren (1:100 verdünnt) in die Kavitäten appliziert und die Antigen-Antikörper-Komplexe mittels anti-IgG bzw. anti-IgM Antikörper detektiert und die Absorption bei 450 nm gemessen. Mit den erhobenen Werten wurden die Grenzwertoptimierungskurve (ROC-Kurve) mit der daraus resultierenden Fläche unter der ROC-Kurve (AUC, „area under the curve“) und das Konfidenzintervall (KI) berechnet. Diese Auswertung erlaubte es den Grenzwert wie auch die Sensitivität und Spezifität zu ermitteln. Hierbei wurden alle in Tab. 33 aufgeführten Seren in die Evaluierung miteingeschlossen.

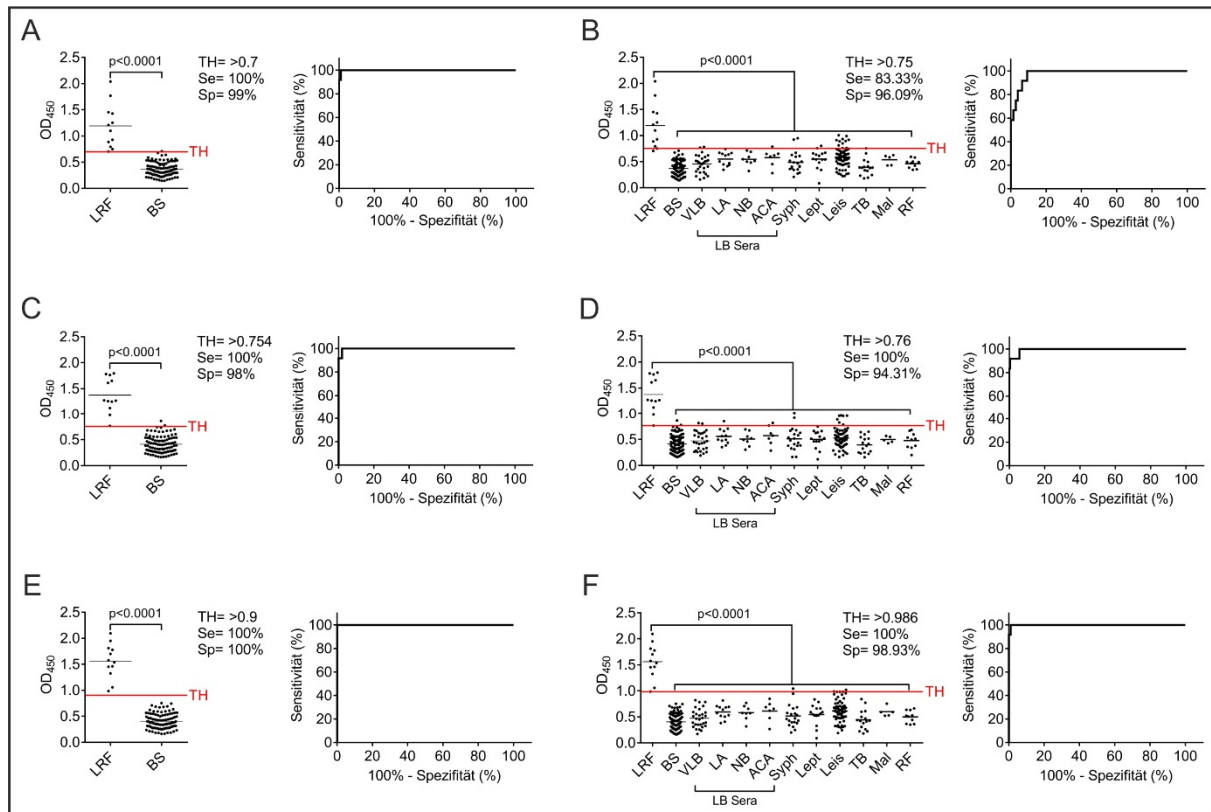
Wie erwartet, konnten im IgM-ELISA alle LRF-Patientenseren als eindeutig positiv detektiert werden (Abbildung 39). Für CihC (Abbildung 39A) ergab sich im direkten Vergleich mit den Seren von gesunden Blutspendern eine Sensitivität von 66,67 % bei einer Spezifität von 96 % und einem Grenzwert von 0,181 (AUC 0,9033; 95 % KI 0,8108 - 0,9958). Unter Einbeziehung aller LRF-negativer Seren (Abbildung 39B), musste der Grenzwert auf 0,363 angehoben werden, wobei eine Sensitivität von 16,67 % und eine Spezifität von 95,31 % (AUC 0,7541; 95 % KI 0,6275 - 0,8806) errechnet wurde. Für GlpQ (Abbildung 39C) erzielte der ELISA bei einem Grenzwert von 0,3 eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 98 % (AUC 0,9883; 95 % KI 0,9684 - 0,1008), wenn nur die Blutspenderseren in die Kalkulation mit einbezogen wurden. Wie erwartet sank die Spezifität auf 86,64 % so bald alle LRF-negativen Seren berücksichtigt wurden (Abbildung 39D). Die Sensitivität (100 %) und der Grenzwert (0,3) (AUC 0,9371; 95 % KI 0,9041 - 0,9702) blieben unberührt. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich, wenn beide Antigene kombiniert wurden und erzielten für den IgM-ELISA eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 98 % bei einem Grenzwert von 0,25

(AUC 0,9883; 95 % CI 0,9684 - 1,008) (Abbildung 39E). Wenn alle LRF-negativen Seren in der Kalkulation miteinbezogen wurden (Abbildung 39F), ließ sich eine deutlich niedrigere Spezifität von 81,23 % bei einer Sensitivität von 100 % und einem Grenzwert von 0,256 (AUC 0,927; 95 % KI 0,8852 - 0,9689) ermitteln.



**Abbildung 39: Entwicklung und Evaluierung eines IgM-ELISA.** Es wurden 500 ng CihC und GlpQ (jeweils einzeln oder in Kombination) auf Mikrotiterplatten immobilisiert und diese mit den zu untersuchenden Seren (1:100) inkubiert. Die Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgte durch einen anti-IgM Antikörper (1:50.000). Die bei 450 nm gemessenen Absorptionswerte wurden zur Berechnung der Grenzwertoptimierungskurve (ROC-Kurve) verwendet unter Einbeziehung eines Konfidenzintervalls von 95 %. Mithilfe der ROC-Kurve wurde der Grenzwert (TH) sowie die Sensitivität (Se) und Spezifität (Sp) ermittelt. Dargestellt sind die Werte für CihC und die LRF-Patientenseren in Bezug zu den Blutspendeseren (A) sowie in Bezug zu allen LRF-negativen Seren (B), die Werte für GlpQ in Bezug zu den Blutspendeseren (C) sowie allen LRF-negativen Seren (D). Die Werte mit beiden Antigenen sind in (E) (nur Blutspendeseren) und (F) (allen LRF-negativen Seren) dargestellt. TH, Grenzwert; Se, Sensitivität; Sp, Spezifität.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Evaluierung des IgG-ELISA sind in Abbildung 40 zusammengefasst. Dieser Test zeigte für alle Antigen- und Patientenseren-Kombinationen ein signifikantes Ergebnis ( $p < 0,0001$ ). Für den IgG-ELISA mit CihC konnte bei den Blutspendeseren mit einem festgelegten Grenzwert von 0,7 eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 98 % erreicht werden (AUC 0,9992; 95 %; KI 0,9964 - 1,002) (Abbildung 40A). Unter Einbeziehung aller LRF-negativen Patientenseren wurde ein Grenzwert von 0,75 angesetzt, um auf eine Sensitivität von 83,33 % und eine Spezifität von 96,09 % (AUC 0,9801; 95 %; KI 0,961 - 0,9993) zu erzielen (Abbildung 40B). Für GlpQ zeigte der IgG-ELISA mit Blutspendeseren bei einem Grenzwert von 0,75 eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 98 % (AUC 0,9983; 95 %; KI 0,9939 - 0,1003) (Abbildung 40C). Wurden alle LRF-negativen Seren in die Kalkulation miteinbezogen und ein Grenzwert von 0,75 festgelegt, konnte eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 94,31 % (AUC 0,995; 95 %; KI 0,9855 - 1,004) für den IgG-ELISA berechnet werden (Abbildung 40D). Für die Kombination von CihC und GlpQ erreichte der IgG-ELISA in Bezug auf die Blutspendeseren, bei einem Grenzwert von 0,9, eine Sensitivität und Spezifität von 100 % (AUC 1; 95 % KI 1 - 1) (Abbildung 40E). Bei einem Grenzwert von 0,96 konnte unter Einbeziehung aller LRF-negativen Seren eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 98,93 % (TH  $> 0,986$ ) (AUC 0,991; 95 % KI 0,9969 - 1,001) (Abbildung 40F) erzielt werden.



**Abbildung 40: Entwicklung und Evaluierung eines IgG-ELISA.** Es wurden 500 ng CihC und GlpQ (jeweils einzeln oder in Kombination) auf Mikrotiterplatten immobilisiert und diese mit den zu untersuchenden Seren (1:100) inkubiert. Die Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgte durch einen anti-IgG Antikörper (1:360.000). Die bei 450 nm gemessenen Absorptionswerte wurden zur Berechnung der Grenzwertoptimierungskurve (ROC-Kurve) unter Einbeziehung eines Konfidenzintervalls von 95 % herangezogen. Mithilfe der ROC-Kurve wurde der Grenzwert (TH) sowie die Sensitivität (Se) und Spezifität (Sp) ermittelt. Dargestellt sind die Werte für CihC und den LRF-Patientenseren in Bezug zu den Blutspendeseren (A) sowie in Bezug zu allen LRF-negativen Seren (B), die Werte für GlpQ in Bezug zu den Blutspendeseren (C) sowie allen LRF-negativen Seren (D). Die Werte mit beiden Antigenen sind in (E) (nur Blutspendeseren) und (F) (allen LRF-negative Seren) dargestellt. TH, Grenzwert; Se, Sensitivität; Sp, Spezifität.

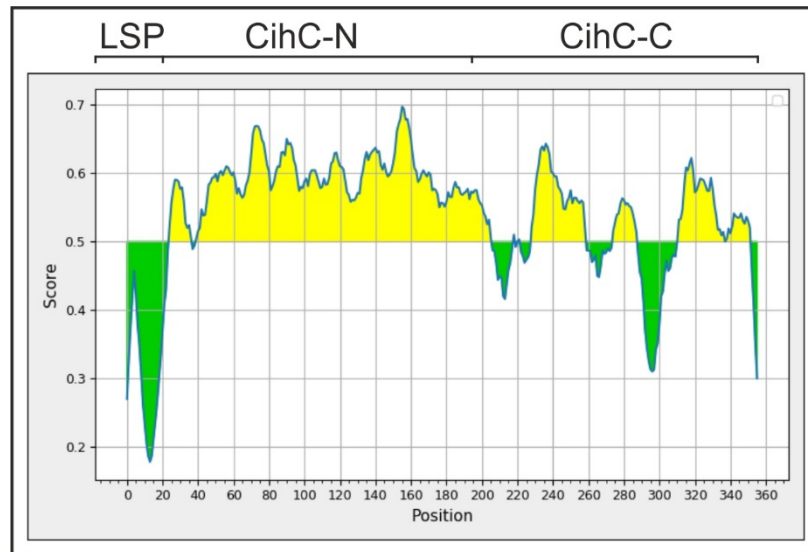
### 3.5.6 *In silico*-Analyse zur Detektion immunogener Regionen in CihC

Die ermittelten Sensitivitäten des IgM-Lineblot-Immunoassays von 16,67 % für CihC sind für ein marktfähiges diagnostisches Testsystem zu unspezifisch. Außerdem wiesen die IgG-Lineblot-Immunoassays für das Antigen CihC zu hohe unspezifische Hintergrundreaktionen auf, sodass eine rein visuelle Zuordnung der Seren in positiv und negativ nicht gewährleistet werden konnte. Zudem gestaltet sich die Aufreinigung des CihC-Proteins als schwierig und ging mit geringen Ausbeuten und zusätzlichen Verunreinigungen einher. Aus diesen Gründen wurde eine *in silico*-Analyse mittels Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0 durchgeführt, um die immunogene(n) Region(en) innerhalb des Proteins einzugrenzen (Kapitel 2.6.4).

Alle in Abbildung 41 grün dargestellten Bereiche mit einem Wert von  $< 0.5$  stellten die nicht immunogenen Regionen im CihC-Protein dar, während die gelben Bereiche mit einem Wert



von  $>0.5$  als immunogen interpretiert wurden. Bei dieser Analyse fällt auf, dass der N-terminale Bereich des Proteins ab der Aminosäure 20 bis 210 scheinbar besonders immunogen zu sein scheint, während zwischen den Aminosäuren 210 bis 356 nur einzelne Bereiche als immunogen gekennzeichnet sind. Basierend auf diesen Daten wurden zwei CihC-Fragmente generiert, die zum einen die Aminosäuren 20-194 (CihC-N) und zum anderen die Aminosäuren 195-356 (CihC-C) enthielten.



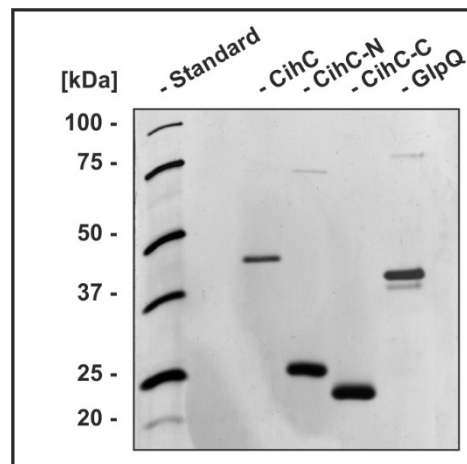
**Abbildung 41: Identifizierung immunogener Regionen im CihC-Protein durch *in-silico*-Analyse.** Zur Bestimmung immunogener Regionen wurde eine *in silico*-Analyse mithilfe des „Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0“ durchgeführt. Grün eingezeichnete Regionen mit einem Wert von  $<0,5$  stellen nicht-immunogene Bereiche dar und gelb gekennzeichnete Bereiche mit einem Wert von  $>0,5$  die immunogenen Abschnitte. LSP, Lipoprotein-Signalpeptid, CihC-N, N-terminales Fragment, CihC-C, C-terminales Fragment.

Um die beiden Fragmente CihC-N und CihC-C herzustellen wurde wie in Kapitel 2.7.5 beschrieben eine PCR mit dem Plasmid pQE-CihC und den entsprechenden Starteroligonukleotiden (Tab. 3) durchgeführt. Die amplifizierten Fragmente wurden anschließend mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen hydrolysiert (Kapitel 2.7.7), in den Vektor pQE-30 Xa kloniert (Kapitel 2.7.8) und die Ligationsprodukte in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert (Kapitel 2.7.15). Aus selektierten Klonen wurden Plasmide isoliert und die Sequenz der inserierten DNA-Fragmente überprüft (Kapitel 2.7.14). Schlussendlich wurden die Proteine in *E. coli* produziert und affinitätschromatographisch aufgereinigt (Kapitel 2.7.22). Folglich wurden die erfolgreich aufgereinigten Proteine hinsichtlich ihrer Reinheit überprüft.

### 3.5.7 Reinheitskontrolle der im Lineblot und ELISA verwendeten Antigene

Zur Überprüfung des Reinheitsgrads der generierten CihC-Fragmente wurde eine SDS-PAGE mit anschließender Färbung mit Silbernitrat durchgeführt. Von CihC, CihC-N, CihC-C sowie GlpQ wurden jeweils 500 ng der betreffenden Proteine gelelektrophoretisch separiert (Kapitel 2.7.18) und die Proteine mittels Silbernitrat angefärbt (Kapitel 2.7.21). Die Ergebnisse wurden schließlich mit Hilfe eines Densitometers dokumentiert.

Wie in Abbildung 42 zu erkennen, konnten alle untersuchten Proteine bis zur apparenten Homogenität aufgereinigt werden. Nur bei CihC-N und GlpQ zeigten sich zusätzliche Proteine in Höhe von 70 kDa bzw. 37 und 75 kDa. Die molekularen Massen der separierten Proteine unterschieden sich nur marginal von den errechneten molekularen Massen: CihC (40,8), CihC-N (21,9 kDa), CihC-C (21,3 kDa), und GlpQ (39,1 kDa).

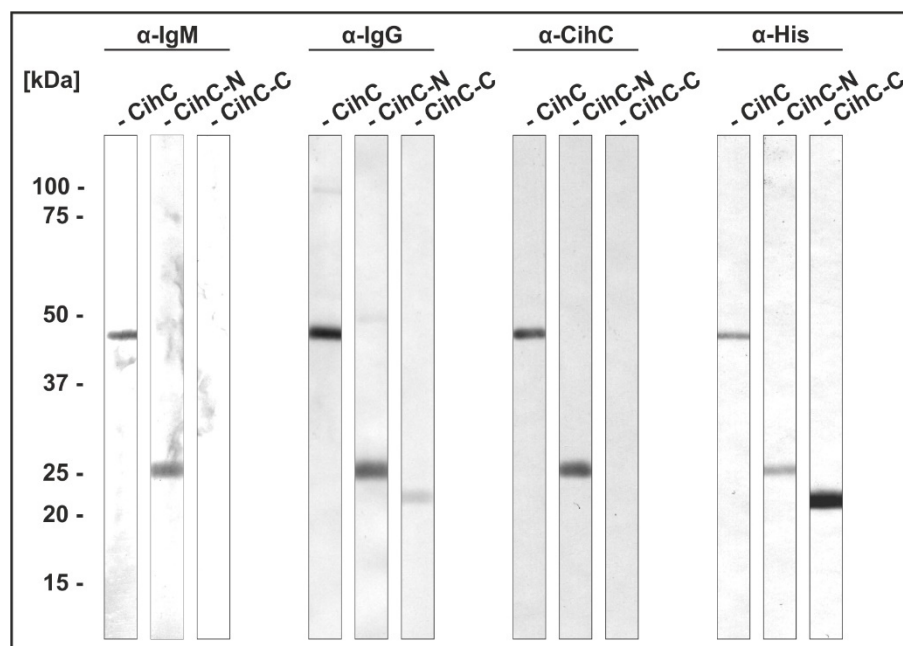


**Abbildung 42: Reinheitskontrolle isolierter Proteine mittels SDS-PAGE.** Es wurden 500 ng der zu untersuchenden Proteine auf ein SDS-Polyacrylamidgel appliziert und eine Färbung mit Silbernitrat durchgeführt. Links dargestellt ist die molekulare Masse des Größenstandards (Precision Plus Protein Unstained Standards).

### 3.5.8 Immunreaktivitätskontrolle der im Lineblot und ELISA verwendeten Antigene

Um die Immunreaktivität der neu generierten Fragmente CihC-N und CihC-C zu überprüfen, wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Dazu wurden jeweils 500 ng von CihC und von den beiden Fragmenten gelelektrophoretisch separiert (Kapitel 2.7.18) und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (Kapitel 2.7.20). Mittels Western Blot-Analyse wurde anschließend die IgG- und IgM-Immunreaktivitäten nachgewiesen sowie die Proteine mittels anti-CihC und anti-His<sub>6</sub> Antikörper detektiert und die Ergebnisse dokumentiert.

Wie in Abbildung 43 zu erkennen, konnte für CihC und CihC-N eine Immunreaktivität für IgM und IgG verzeichnet werden. Eine schwache IgG-Immunreaktivität wurde zusätzlich für CihC-C festgestellt. Wie erwartet konnten alle drei Proteine mit dem anti-His<sub>6</sub> Antikörper detektiert werden. CihC und CihC-N wiesen außerdem eine Reaktion mit dem monoklonalen anti-CihC Antikörper auf, sodass die immunreaktive Region innerhalb des N-Terminus lokalisiert werden konnte. Die Positionen im SDS-Polyacrylamidgel entsprachen hierbei der kalkulierten molekularen Massen von 40,8 kDa (CihC), 21,9 kDa (CihC-N) und 21,3 kDa (CihC-C).



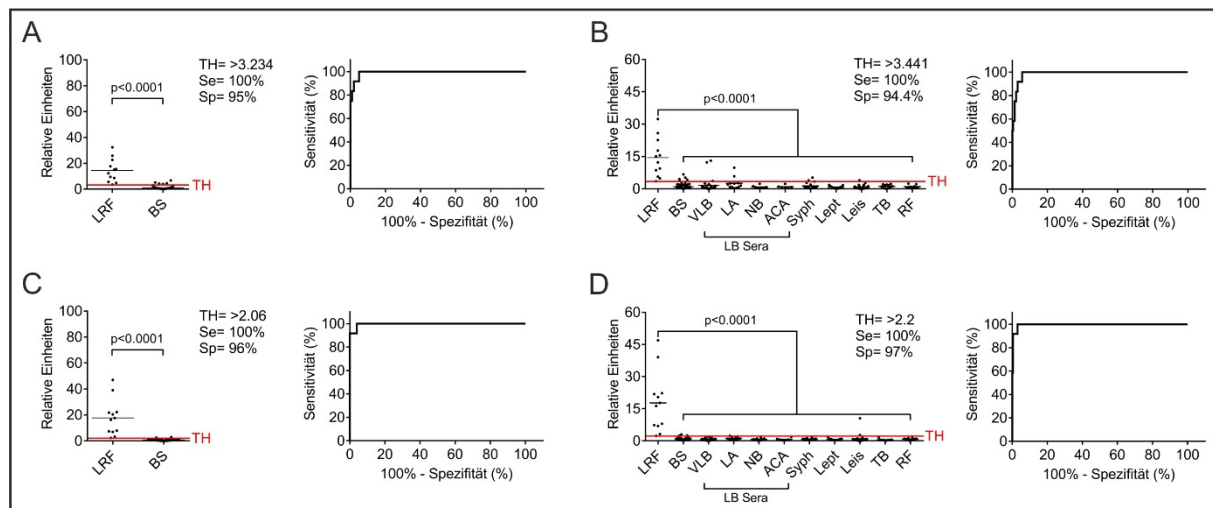
**Abbildung 43: Immunreaktivitätskontrolle der generierten CihC-Fragmente.** 500 ng der zu untersuchenden Proteine wurde auf ein SDS-Polyacrylamidgel appliziert, separiert und anschließend eine Western-Blot Analyse durchgeführt. Nach dem Transfer der separierten Proteine wurden diese zum einen mit Patientenseren und einem anschließenden anti-IgG (1:96.000) bzw. anti-IgM Antikörper (1:10000) inkubiert, und zum anderen wurden die Proteine durch einen anti-CihC Antikörper (1:1000) und mit einem Mix aus drei monoklonalen anti-His<sub>6</sub> Antikörpern (1:1000) direkt detektiert. Links ist die molekulare Masse des Größenstandards (Precision Plus Protein Dual Color Standards) dargestellt.

### 3.5.9 Verwendung des N-terminalen Fragmentes des CihC-Proteins zur Optimierung des Lineblot-Immunoassays

Nachdem das Fragment CihC-N die erforderlichen Kriterien bezüglich einer höheren Ausbeute aus *E. coli*, einem verbesserten Reinheitsgrad sowie einer vergleichbaren Immunogenität zu CihC erfüllte, wurde dieses Fragment als Antigen zusammen mit GlpQ im Format eines Lineblot-Immunoassays ausgetestet. Durch den verbesserten Reinheitsgrad des Proteins wurde erwartet, dass die unspezifischen Reaktionen deutlich reduziert werden können und sich die Sensitivität und Spezifität verbessert. CihC-N und GlpQ wurden wie in Kapitel 2.8.1.3 beschrieben auf eine Nitrozellulosemembran gesprüht und die Membranstreifen mit den verschiedenen Seren inkubiert (Tab. 33). Anschließend erfolgte die Detektion der Antigen/Antikörper-Reaktionen mittels anti-IgM oder anti-IgG Antikörper und die Dokumentation der Ergebnisse mittels Densitometers sowie die Berechnung der relativen Einheiten. Mit den Werten wurde folgend die Grenzwertoptimierungskurve (ROC-Kurve), die Fläche unter der ROC-Kurve (AUC), der Grenzwert, die Sensitivität und die Spezifität ermittelt.

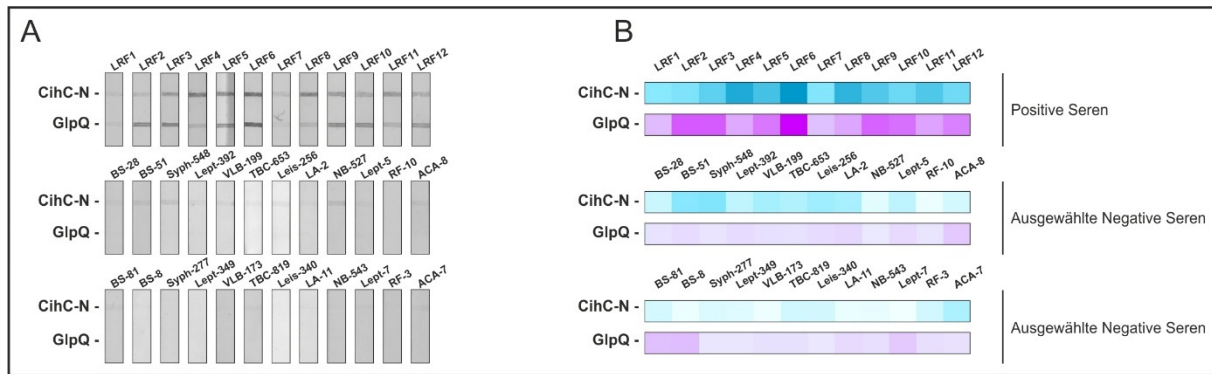
Für den IgM-Lineblot-Immunoassays zeigte sich jedoch keine signifikante Verbesserung bezüglich der Sensitivität oder Spezifität des Testsystems, sodass eine weitere Optimierung zu diesem Zeitpunkt nicht erwägt wurde.

Der IgG-Lineblot-Immunoassay mit CihC-N als Antigen ergab unter Einbeziehung der Blutspendeseren bei einem Grenzwert von 3,23 eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 95 % (AUC 0,933; 95 % KI 0,9822 - 1,004) (Abbildung 44A). Wurden alle LRF-negativen Seren miteinbezogen, ließ sich bei einem festgelegten Grenzwert von 3,44 eine Sensitivität von 100 % und eine leicht erniedrigte Spezifität von 94,4 % (AUC 0,9866; 95 % KI 0,9762 - 1,001) (Abbildung 44B) erzielen. Wenn nur die Blutspendeseren miteinbezogen wurden, konnte für GlpQ eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 96 % bei einem Grenzwert von 2,06 (AUC 0,9967; 95 % KI 0,989 - 1,004) erzielt werden (Abbildung 44C). Sofern alle LRF-negativen Seren berücksichtigt wurden, lag die Spezifität bei 97 % bei einem Grenzwert von 2,2 (AUC 0,9961; 95 % KI 0,9897 - 1,002) (Abbildung 44D).



**Abbildung 44: Optimierung und Evaluierung des IgG-Lineblot-Immunoassay bei Verwendung von CihC-N und GlpQ.** Für den Test wurden 50 µg/ml von CihC-N und 40 µg/ml von GlpQ in einer Geschwindigkeit von 0,7 µl/cm auf eine Nitrozellulosemembran gesprüht. Die Membranstreifen wurden mit Patientenseren inkubiert (1:10.000) und die Antigen-Antikörper-Komplexe mit einem anti-IgG Antikörper detektiert (1:96.000). Die Antigen/Antikörper-Reaktionen wurden densitometrisch ausgewertet und mit den berechneten relativen Einheiten eine Grenzwertoptimierungskurve (ROC-Kurve) mit einem Konfidenzintervall von 95 % erstellt. Dargestellt sind die Spezifität und Sensitivität von CihC-N im Vergleich mit den Blutspendeseren (A) und allen LRF-negativen Seren (B), sowie die Spezifität und Sensitivität von GlpQ mit den Blutspendeseren (C) und allen LRF-negativen Seren (D). TH, Grenzwert; Se, Sensitivität; Sp, Spezifität.

Wie in Abbildung 45A dargestellt, zeigten nahezu alle LRF-Patientenseren (LRF2-LRF12) eine deutliche Immunreaktivität die bei Patientenserum LRF1 schwächer ausfällt. Einige LRF-negative Seren, wie z.B. BS-51, Syph-548 und NB-527, wiesen schwache Kreuzreaktivitäten auf. Im Gegensatz zu CihC-N lassen sich für GlpQ jedoch keine unspezifischen Kreuzreaktionen bei den ausgewählten Seren beobachten. Die Analyse densitometrisch ausgewerteter Daten lässt vermuten, dass die Verwendung von CihC-N im Vergleich zu CihC zu einer deutlichen Verbesserung geführt hat und durch die niedrigeren Antigen/Antikörper-Reaktionsintensitäten in der Farbkodierungsskala bestätigt wird (vergleiche Abbildung 38 mit Abbildung 45).

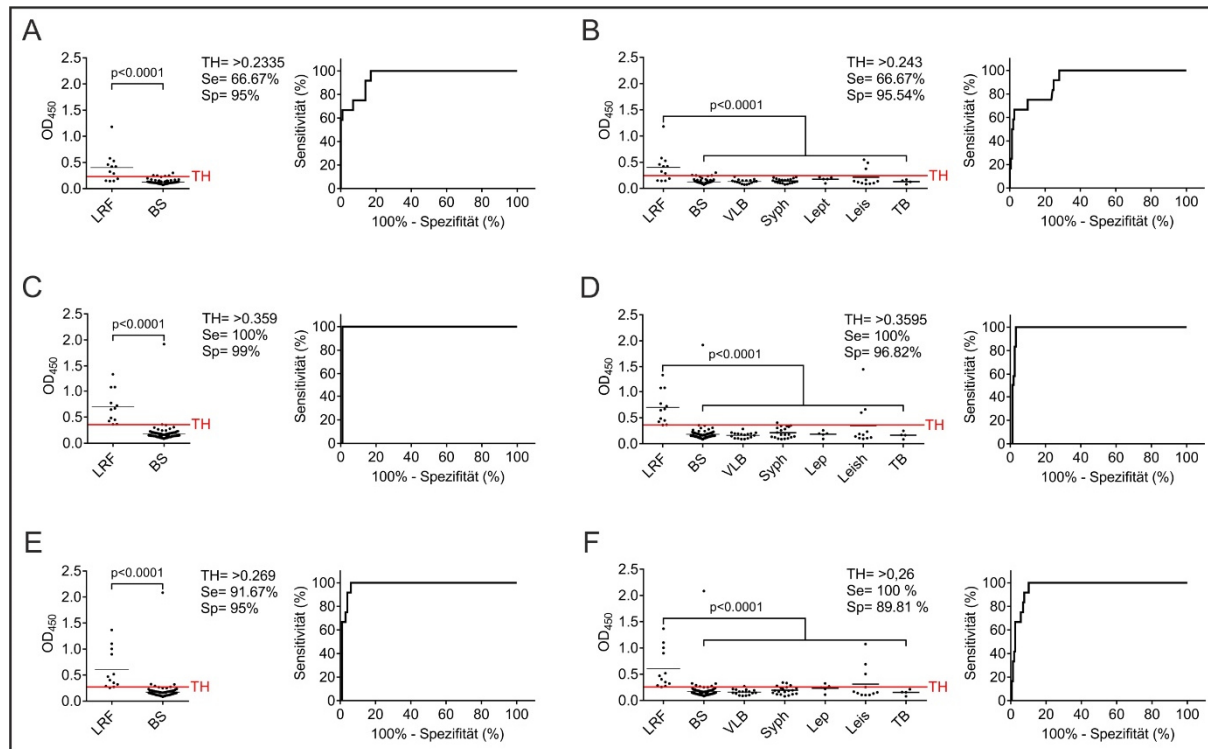


**Abbildung 45: Beurteilung der Signalintensitäten der Antigen/Antikörper-Reaktion ausgewählter IgG-Lineblot-Immunoassays zur Erstellung einer Farbkodierungsskala (Heatmap) mit CihC-N und GlpQ.** CihC-N und GlpQ wurden in einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  respektive 40  $\mu\text{g/ml}$  auf eine Nitrozellulosemembran mit einer Geschwindigkeit von 0,7  $\mu\text{l/cm}$  gesprüht. Die Membranstreifen wurden mit verschiedenen Patientenseren (1:100) inkubiert und Antigen-Antikörper-Komplexe mit einem anti-IgG Antikörper (1:96.000) detektiert und densitometrisch ausgewertet. Links dargestellt sind die mit Seren inkubierten Membranstreifen (A) und rechts die zugehörige Farbkodierungsskala (B).

### 3.5.10 Optimierung des ELISA durch Verwendung des N-terminalen CihC-Fragmentes

Unter Verwendung von CihC-N konnte eine deutliche Verbesserung der Signifikanz und Spezifität des IgG-Lineblot-Immunoassays erzielt werden, sodass dieses Antigen für die Optimierung des ELISA verwendet wurde. Wie bereits in Kapitel 3.5.5 beschrieben, wurde CihC-N und GlpQ einzeln und in Kombination auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert (Kapitel 2.8.2.3). Anschließend wurden die Patientenseren appliziert und die Antigen-Antikörper-Komplexe mit anti-IgM bzw. anti-IgG Antikörpern detektiert. Mit den gemessenen Werten wurde eine Grenzwertoptimierungskurve (ROC-Kurve), die resultierende Fläche unter der ROC-Kurve (AUC) und dessen Konfidenzintervall (KI) sowie der Grenzwert, die Spezifität und Sensitivität ermittelt. Die für diese Analyse analysierten Seren sind in Tab. 33 zusammengefasst. Unter Einbeziehung der Blutspendeseren wies der IgM-ELISA mit CihC-N eine Sensitivität von 66,67 % und eine Spezifität von 95 % bei einem Grenzwert von 0,23 (AUC 0,9558; 95 % CI 0,913 - 0,9987) auf (Abbildung 46A). Diese Werte waren nahezu identisch, wenn die LRF-negativen Seren in die Berechnung miteinbezogen wurden und zeigten bei einem Grenzwert von 0,24 eine Spezifität von 95,54 % (AUC 0,9201; 95 % KI 0,8556 - 0,9846) (Abbildung 46B). Für GlpQ konnte eine Sensitivität von 100 % bei einer Spezifität von 99 % und einem Grenzwert von 0,359 für die Blutspendeseren (AUC 0,99; 95 % KI 0,9705 - 1,01) errechnet werden (Abbildung 46C) sowie eine Spezifität von 96,82 % bei einem Grenzwert von 0,35 bei den LRF-negativen Seren (AUC 0,9804; 95 % KI 0,9604 - 1) (Abbildung 46D). Für die Kombination mit beiden Antigenen erreichte der ELISA bei den Blutspendeseren eine Sensitivität von 91,67 % und eine Spezifität von 95 % bei einem Grenzwert von 0,26

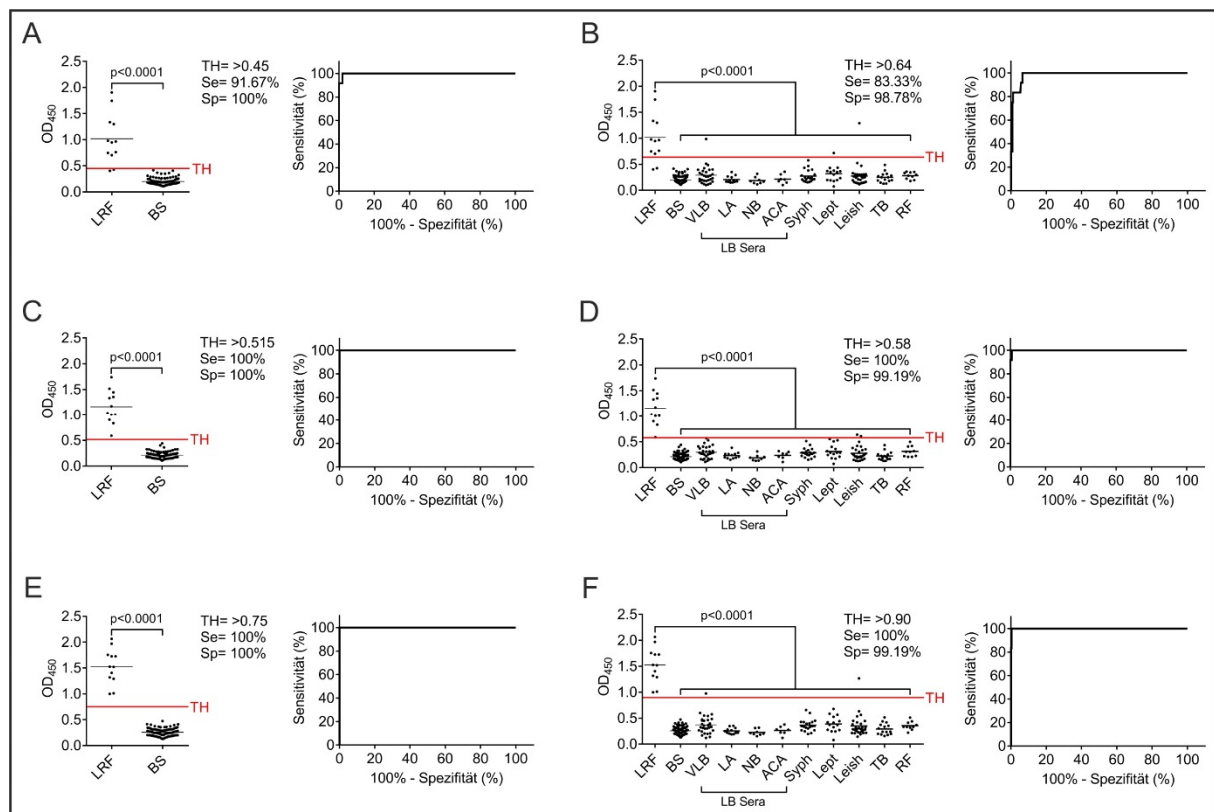
(AUC 0,9792; 95 % KI 0,9548 – 1,004) (Abbildung 46E), während bei der Einbeziehung aller LRF-negativen Seren eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 89,81 % bei einem Grenzwert 0,26 berechnet werden konnte (AUC 0,9634; 95 % KI 0,9352 - 0,9916) (Abbildung 46F).



**Abbildung 46: Optimierung und Evaluierung des IgM-ELISA unter Verwendung von CihC-N und GlpQ.** Es wurden 500 ng von CihC-N und GlpQ einzeln oder in Kombination in einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Anschließend wurden verschiedene Patientenserum (1:100) appliziert und die Antigen-Antikörper-Komplexe durch einen anti-IgM Antikörper (1:50.000) detektiert. Mit den resultierenden Werten wurde die Grenzwertoptimierungskurve (ROC-Kurve) mit einem Konfidenzintervall von 95 % erstellt und der Grenzwert mit den resultierenden Sensitivitäten und Spezifitäten kalkuliert. Dargestellt sind die Ergebnisse für CihC-N und der Vergleich der LRF-positiven Seren und Blutspendeseren (A) und aller LRF-negativen Seren (B) sowie die Ergebnisse für GlpQ mit den Blutspendeseren (C) und mit allen LRF-negativen Seren (D), wie auch die Ergebnisse für die Kombination aus beiden Antigenen mit den Blutspendeseren (E) und allen LRF-negativen Seren (F). TH, Grenzwert; Se, Sensitivität; Sp, Spezifität.

Für den IgG-ELISA mit CihC-N konnte für die Berechnung mit den Blutspendeseren bei einem Grenzwert von 0,45 eine Sensitivität von 91,67 % und eine Spezifität von 100 % (AUC 0,9983; 95 % KI 0,9939 - 1,003) ermittelt werden (Abbildung 47A). Wobei sich mit allen LRF-negativen Seren eine Sensitivität von 83,33 % und eine Spezifität von 98,78 % bei einem Grenzwert von 0,64 zeigte (AUC 0,9856; 95 % KI 0,9705 - 1,001) (Abbildung 47B). Mit GlpQ konnte bei dem Vergleich mit den Blutspendeseren und einem Grenzwert von 0,51 eine Sensitivität und Spezifität von 100 % erreicht werden (AUC 1; 95 % KI 1 - 1) (Abbildung 47C).

Wenn alle LRF-negativen Seren in die Berechnung mit einbezogen wurden, konnte bei einem Grenzwert von 0,58 ebenfalls eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 99,19 % (AUC 0,9993; 95 % KI 0,9975 - 1,001) ermittelt werden (Abbildung 47D). Wurden beide Antigene CihC-N und GlpQ eingesetzt, wurde sowohl mit den Blutspendeseren als auch mit allen LRF-negativen Seren eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 100 % bei einem Grenzwert von 0,75 (AUC 1; 95 % KI 1 - 1) (Abbildung 47E) respektive bei einer Spezifität von 99,19 % und bei einem Grenzwert von 0,9 (AUC 0,9993; 95 % KI 0,9975-1,001) erzielt (Abbildung 47F).



**Abbildung 47: Optimierung und Evaluierung des IgG-ELISA durch Verwendung von CihC-N und GlpQ.** Es wurden jeweils 500 ng von CihC-N und GlpQ sowie beide Antigene kombiniert in einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Anschließend wurden die zu testenden Seren (1:100) appliziert und die Antigen-Antikörper-Komplexe mittels anti-IgG Antikörper (1:360.000) detektiert. Die resultierenden Werte wurden verwendet, um eine Grenzwertoptimierungskurve (ROC-Kurve) mit einem Konfidenzintervall von 95 % zu generieren sowie der Grenzwert (TH), die Sensitivität (Se) und Spezifität (Sp). Dargestellt sind die Ergebnisse für den IgG-ELISA mit CihC-N und den Blutspendeseren (A) oder mit allen LRF-negativen Seren (B) sowie mit GlpQ und den Blutspendeseren (C) wie auch mit allen LRF-negativen Seren (D). Die Werte der Kombination beider Antigene sind für die Blutspendeseren (E) und allen LRF-negativen Seren (F) dargestellt. TH, Grenzwert; Se, Sensitivität; Sp, Spezifität.



### 3.5.11 Zusammenfassung der Ergebnisse der Evaluation und der Optimierung der verschiedenen Lineblot-Immunoassays und ELISA

Um einen besseren Überblick über die Ergebnisse zu gewinnen, wurden in der Tab. 32 alle Grenzwerte, Sensitivitäten, Spezifitäten sowie die Werte für die Fläche unter der ROC-Kurve (AUC) und dessen Konfidenzintervall zusammengefasst.

Tab. 32: Zusammenfassung der für die Lineblot-Immunoassays und ELISA ermittelten Daten.

Method	Antigen	Grenzwert	Sensitivität [%]	Spezifität [%]	AUC	95 % KI
<b>Lineblot (IgM)</b>	<b>CihC</b>	>36,98	<b>16,67</b>	<b>95,35</b>	0,7655	0,6351 - 0,8959
	<b>GlpQ</b>	>7,919	<b>66,67</b>	<b>98,45</b>	0,9522	0,9114 - 0,993
<b>Lineblot (IgG)</b>	<b>CihC</b>	>14,95	<b>91,67</b>	<b>96,52</b>	0,9563	0,882 - 1,03
	<b>GlpQ</b>	>4,069	<b>83,33</b>	<b>99,57</b>	0,9373	0,8536 - 1,021
<b>ELISA (IgM)</b>	<b>CihC</b>	>0,363	<b>16,67</b>	<b>95,31</b>	0,7541	0,6275 - 0,8806
	<b>GlpQ</b>	>0,3	<b>100</b>	<b>86,64</b>	0,9371	0,9041 - 0,9702
	<b>CihC + GlpQ</b>	>0,256	<b>100</b>	<b>81,23</b>	0,927	0,8852 - 0,9689
<b>ELISA (IgG)</b>	<b>CihC</b>	>0,75	<b>83,33</b>	<b>96,09</b>	0,9801	0,961 - 0,9993
	<b>GlpQ</b>	>0,76	<b>100</b>	<b>94,31</b>	0,995	0,9855 - 1,004
	<b>CihC + GlpQ</b>	>0,986	<b>100</b>	<b>98,93</b>	0,991	0,9969 - 1,001
<b>Lineblot (IgG)</b>	<b>CihC-N</b>	>3,441	<b>100</b>	<b>94,4</b>	0,9866	0,9762 - 1,001
	<b>GlpQ</b>	>2,2	<b>100</b>	<b>97</b>	0,9961	0,9897 - 1,002
<b>ELISA (IgM)</b>	<b>CihC-N</b>	>0,243	<b>66,67</b>	<b>95,54</b>	0,9201	0,8556 - 0,9846
	<b>GlpQ</b>	>0,3595	<b>100</b>	<b>96,82</b>	0,9804	0,9604 - 1
	<b>CihC-N + GlpQ</b>	>0,26	<b>100</b>	<b>89,81</b>	0,9634	0,9352 - 0,9916
<b>ELISA (IgG)</b>	<b>CihC-N</b>	>0,64	<b>83,33</b>	<b>98,78</b>	0,9856	0,9705 - 1,001
	<b>GlpQ</b>	>0,58	<b>100</b>	<b>99,19</b>	0,9993	0,9975 - 1,001
	<b>CihC-N + GlpQ</b>	>0,90	<b>100</b>	<b>99,19</b>	0,9993	0,9975 - 1,001

AUC, area under the curve, Fläche unter der ROC-Kurve; KI, Konfidenzintervall.

### 3.5.12 Zusammenfassung der verwendeten Seren für die Entwicklung, Optimierung und Evaluierung des Lineblot-Immunoassays und des ELISA

Da nicht alle LRF-negativen Patientenseren oder ausreichend Probenmaterial zu den betreffenden Zeitpunkten der Austestungen zur Verfügung standen, konnten nicht immer alle LRF-negativen Patientenseren in allen Versuchsansätzen ausgetestet werden. Zur besseren Übersicht wurde die entsprechende Anzahl an analysierten Patienten- und Blutspenderseren in Tab. 33 zusammengefasst.

Tab. 33: Zusammenfassung der für die Lineblot-Immunoassays und ELISA getesteten Patientenseren.

Methode	Antigen	Anzahl Patientenseren												Sensitivität [%]	Spezifität [%]	
		LRF	BS	VLB	LA	NB	ACA	Syph	Lept	Leis	TB	Mal	RF			Total
<b>Lineblot (IgM)</b>	CihC	12	100	9	n.t.	n.t.	n.t.	20	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	<b>141</b>	16,67	95,35
	GlpQ	12	100	9	n.t.	n.t.	n.t.	20	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	<b>141</b>	66,67	98,45
<b>Lineblot (IgG)</b>	CihC	12	100	9	10	5	7	20	16	48	5	n.t.	10	<b>242</b>	91,67	96,52
	GlpQ	12	100	9	10	5	7	20	16	48	5	n.t.	10	<b>242</b>	83,33	99,57
<b>ELISA (IgM)</b>	CihC	12	100	29	12	8	7	20	15	55	16	5	10	<b>289</b>	16,67	95,31
	GlpQ	12	100	29	12	8	7	20	15	55	16	5	10	<b>289</b>	100	86,64
	CihC + GlpQ	12	100	29	12	8	7	20	15	55	16	5	10	<b>289</b>	100	81,23
<b>ELISA (IgG)</b>	CihC	12	100	29	12	8	7	20	15	69	16	5	10	<b>303</b>	75	96,44
	GlpQ	12	100	29	12	8	7	20	15	69	16	5	10	<b>303</b>	100	94,31
	CihC + GlpQ	12	100	29	12	8	7	20	15	69	16	5	10	<b>303</b>	100	98,78
<b>Lineblot (IgG)</b>	CihC-N	12	100	29	12	8	6	20	9	28	11	n.t.	10	<b>245</b>	100	94,42
	GlpQ	12	100	29	12	8	6	20	9	28	11	n.t.	10	<b>245</b>	100	97
<b>ELISA (IgM)</b>	CihC-N	12	100	17	n.t.	n.t.	n.t.	20	5	11	4	n.t.	n.t.	<b>169</b>	66,67	95,54
	GlpQ	12	100	17	n.t.	n.t.	n.t.	20	5	11	4	n.t.	n.t.	<b>169</b>	100	96,82
	CihC-N + GlpQ	12	100	17	n.t.	n.t.	n.t.	20	5	11	4	n.t.	n.t.	<b>169</b>	100	89,81
<b>ELISA (IgG)</b>	CihC-N	12	100	30	12	8	7	20	15	29	15	n.t.	10	<b>258</b>	83,33	98,78
	GlpQ	12	100	30	12	8	7	20	15	29	15	n.t.	10	<b>258</b>	100	99,19
	CihC-N + GlpQ	12	100	30	12	8	7	20	15	29	15	n.t.	10	<b>258</b>	100	99,19

n.t., nicht getestet; LRF, Läuserückfallfieber; BS, Blutspender; VLB, Verdacht auf Lyme-Borreliose; LA, Lyme Arthritis; NB, Neuroborreliose; ACA, Acrodermatitis chronica atrophicans; Syph, Syphilis; Lept, Leptospirose; Leis, Leishmaniose; TB, Tuberkulose; Mal, Malaria; RF, Rheumatoide Arthritis.

## 4 Diskussion

### 4.1 *B. recurrentis*, der Erreger des Läuserückfallfiebers und Mechanismen der Immunevasion

*B. recurrentis* wird soweit bisher bekannt, ausschließlich durch Läuse der Gattung *Pediculus humanus* auf den Menschen übertragen. Heutzutage tritt das von *B. recurrentis* verursacht LRF nur noch in den Ländern am Horn von Afrika endemisch auf, wo es in Äthiopien noch immer die siebthäufigste Ursache für eine Krankenhauseinweisung und die fünft häufigste Todesursache im Hochland darstellt (221–223). Verschiedene Fallberichte aus den letzten Jahren dokumentieren, dass dieser Erreger weiterhin regional fokussierte epidemische Ausbrüche in den umliegenden Ländern wie z.B. Eritrea, Süd-Sudan und Somalia verursachen kann (59, 61, 66). Ebenfalls zahlreiche Fälle ( $n = 78$ ) von LRF wurden während der Flüchtlingskrise zwischen 2014 und 2016 in acht europäischen Ländern dokumentiert (69). Durch die verbesserten hygienischen Standards ist mit keiner massiven Epidemie zu rechnen. Allerdings zeigte die Flüchtlingskrise, dass diese armutsassoziierte und weitgehend vernachlässigte Infektionskrankheit jederzeit ausbrechen kann, sofern die Gegebenheiten (Kriege, Hungersnöte, durch politische Unruhen verursachte Flüchtlingsströme) einen günstigen Nährboden schaffen.

Unmittelbar nach dem Eindringen von Mikroorganismen in den menschlichen Organismus wird das Komplementsystem, welches Teil des angeborenen Immunsystems darstellt, aktiviert. Dieses kaskadenförmige Aktivierungssystem dient als erste effektive Verteidigungslinie gegenüber eindringenden Krankheitserregern und besteht aus zahlreichen Regulatoren, Inhibitoren und aktivierbaren Vorläufermolekülen, die in der Flüssigkeitsphase oder gebunden an der zellulären Membran lokalisiert sind (156). Der typische Krankheitsverlauf des LRF mit rekurrenden Fieberschüben und einer hohen Spirochätenlast im Blut ( $10^5 - 10^6$  Bakterien/ml) lässt vermuten, dass Borrelien in der Lage sind diese erste Verteidigungslinie des menschlichen Immunsystems erfolgreich zu umgehen bzw. zu inaktivieren. Allerdings wird die Rolle des Komplementsystems bei der Eliminierung der Spirochäten kontrovers diskutiert. Es konnte gezeigt werden, dass anti-IgM Antikörper in der Lage sind in infizierten C3- und C5-defizienten Mäusen im Verlauf einer Bakteriämie *B. hermsii*-Zellen durch einen Komplement-unabhängigen Mechanismus effizient abzutöten. B-Zell-defiziente Mäuse wiesen dagegen eine sehr hohe Spirochätenlast im Blut auf (224, 225). Dies kann darauf hindeuten, dass die

angeborene Immunität bei der Pathogenese des LRF zu Beginn des Krankheitsverlaufes eine eher untergeordnete Rolle spielt. Andererseits besitzen RF-Borrelien verschiedene Komplement-bindende Proteine um der durch Komplement vermittelten Bakteriolyse zu entgehen (172–177, 179). Von *B. recurrentis* konnten bereits zwei Komplement-interagierende und inhibierende Proteine CihC und HcpA identifiziert werden (176, 177). CihC inhibiert den klassischen Komplementweg wie auch den Lektin-Weg durch die Bindung des C1-Inhibitors und des C4BP (177), während das mit dem Komplementregulator Faktor H interagierende HcpA-Protein den alternativen Komplementweg inaktiviert (176). Im Rahmen des vom LOEWE-Zentrums DRUID geförderten Projektes wurden fünf Proteine (ChiA – ChiE), deren kodierende Gene auf demselben linearen Plasmids lp165 in direkter Nachbarschaft mit dem HcpA- bzw. CihC-kodierenden Gen lokalisiert sind, auf ihre Fähigkeit zur Inaktivierung von Komplement analysiert und charakterisiert.

Der Goldstandard für die Diagnose von LRF ist immer noch die klassische Mikroskopie von Blutastrichen, wie sie ebenfalls bei der Diagnostik der Malaria Verwendung findet. Bei diesem diagnostischen Verfahren ist die Sensitivität stark von der Konzentration der Spirochäten im Blut abhängig (82–84, 226, 227). Aus diesem Grund wird die Sensitivität mit nur 38 % beziffert, sofern Blutproben in der afebrilen Phase entnommen wurden (85). Wegen einer höheren Spirochätenkonzentration lässt sich eine Steigerung der Sensitivität durch eine Abnahme während der febrilen Phase erzielen. Eine weitere Herausforderung stellt die korrekte Anfangsdiagnose dar. Das LRF kann leicht mit anderen Fieber-induzierten Erkrankungen verwechselt werden, wie zum Beispiel mit Malaria und Typhus oder mit anderen bakteriellen Infektionskrankheiten (63, 64). Eine wesentlich sensitivere diagnostische Methode stellt die PCR bzw. die RT-qPCR dar, die jedoch in den betroffenen Ländern nur in Speziallaboratorien zur Verfügung steht, aber nicht in ländlichen Kliniken (90, 91). Um den translationalen Aspekt des Projekts im LOEWE-Zentrum DRUID zu adressieren, wurde im zweiten Teil dieser Arbeit ein zuverlässiger serologischer Test auf der Grundlage eines Lineblots und eines ELISA als zukünftige Alternative zur Mikroskopie entwickelt und evaluiert. Unter der Annahme, dass Komplement-interagierende Proteine sich direkt dem Immunsystem präsentieren und auf der Oberfläche des Erregers lokalisiert sind, wurde die Immunreaktivität von HcpA, CihC und den fünf zu charakterisierenden Proteinen mit definierten Seren von klinisch und diagnostisch gesicherten Patienten mit LRF untersucht. Aus den durchgeführten Analysen kristallisierte sich das CihC als ein potenzielles Antigen für die serologische Diagnostik des LRF heraus.

## 4.2 Charakterisierung der Oberflächenproteine ChiA, ChiB, ChiC, ChiD und ChiE von *B. recurrentis*

Um der Komplementvermittelten Bakteriolyse zu entgehen, haben humanpathogene Mikroorganismen verschiedene Strategien entwickelt, wie z.B. das molekulare Mimikry, die Akquisition von löslichen Komplementregulatoren, die proteolytische Degradation von Komplementkomponenten sowie die Destabilisierung von aktivierten Komplementkomplexen (C3- und C5-Konvertasen) und das Blockieren der Assemblierung des MAK (181, 228, 229). In ähnlicher Weise wie die Spirochäten, die die Lyme-Borreliose verursachen, lassen sich für RF-Borrelien zwei zentrale Strategien zur Immunevasion aufführen: (i) Rekrutierung von Komplementregulatoren des alternativen oder klassischen Komplementweges, die zur Inaktivierung der Schlüsselkomponenten C3b bzw. C4b führt und (ii) die Inhibition der Assemblierung des Membranangriffskomplexes durch die Interaktion mit den terminalen Komplementkomponenten C7 und C9 (177, 230, 231). Zur Inaktivierung besitzen Borrelien verschiedene auf der Zelloberfläche lokalisierte Komplement-interagierende Proteine. In vorangegangenen Untersuchungen konnten zusätzlich zu den bereits beschriebenen Proteinen HcpA und CihC (176, 177) vier weitere mit Komplement-interagierende Lipoproteine (ORF6 bis ORF9) von *B. recurrentis* identifiziert werden (202). Zusätzlich wurde im Rahmen dieser Arbeit ein weiteres Lipoprotein ORF10 in die vergleichenden Untersuchungen miteinbezogen.

### 4.2.1 Charakteristika des Chi-Genclusters von *B. recurrentis*

Eine vergleichende Sequenzanalyse der auf dem linearen Plasmid lp165 lokalisierten ORF-kodierenden Gene, welche uns freundlicherweise von Dr. Tilman G. Schultze (Bioinformatiker am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Universitätsklinikum Frankfurt, Frankfurt am Main) zur Verfügung gestellt wurde, ergab, dass die sich in direkter Nachbarschaft zu den *cihC* und *hcpA* befindenden *orf*-Genen aufgrund ihrer erhöhten Homologie in einem Cluster zusammengefasst werden können (Abbildung 12). Diese fünf ORF-Proteine wurden aufgrund ihres Bindungsverhaltens mit Komplementkomponenten als „Cluster of Complement-targeting and Host-interacting Proteins“, Chi, bezeichnet. Die Identitätsmatrix (Tab. 31) zeigt eine deutlich höhere Homologie innerhalb der fünf *chi*-Gene (34,73 – 58,26 %) im Vergleich der *chi*-Gene mit dem *cihC*- (14,55 – 18,99 %) bzw. *hcpA*-Gen (15,38 – 16,67 %). Ein solches Cluster von Komplement-inhibierenden Proteinen ist bisher nur für *Staphylococcus aureus* bekannt. In diesem Cluster sind die Komplementinhibierenden Proteine SAK (Staphylokinase), SCIN (Staphylococcal complement inhibitor), CHIPS

(hemotaxis inhibitory protein of staphylococci) und das SEA (Staphylococcal enterotoxin A) auf der Pathogenitätsinsel-5 (SaPI5) lokalisiert (232). Diese bakteriellen Proteine wirken ebenfalls inhibierend auf unterschiedlichen Aktivierungsstufen der Komplementkaskade. Der Sequenzvergleich von *B. recurrentis* Isolaten zeigte außerdem, dass das gesamte Gencluster in der identischen Reihenfolge und Orientierung zusammen mit *cihC* und *hcpA* in allen *B. recurrentis* Patientenisolaten, deren Sequenzen des lp165-Plasmids zur Verfügung standen sowie dem Referenzstamm A17, nachgewiesen werden konnte. Die sehr hohe Konservierung der dem Cluster zugeordneten Gene (100% Sequenzidentität zwischen den einzelnen Genen) in Stämmen die bereits 1994 (Referenzstamm A1 und A17) und Borrelienstämmen, die 2015 während der Flüchtlingskrise isoliert wurden (z.B. PAbJ), lässt vermuten, dass die Genprodukte eine besondere Bedeutung für die Pathogenese dieses Erregers besitzen und daher einer positiven Selektion unterworfen sein könnten.

Das Chi-Gencluster ist allerdings nicht nur in *B. recurrentis* vorhanden, sondern ein Teil von diesem lässt sich ebenfalls in *B. duttonii* nachweisen (32). In einer Studie von Lescot et al. zur Phylogenese von *B. recurrentis* und *B. duttonii* konnte zwischen *B. recurrentis* A1 und *B. duttonii* Ly festgestellt werden, dass beide Chromosomen zu fast 100% kollinear sind und, dass für alle Plasmide in *B. recurrentis* A1 ein entsprechendes orthologes Protein in *B. duttonii* zu finden ist (32). Allerdings wies das lineare Plasmid lp165 in *B. recurrentis* A1 in der genannten Studie eine Deletion von ca 40 kbp auf, die auch das Chi-Gencluster beinhaltet (32). Eine Deletion am linken Ende von lp165 in *B. recurrentis* A1 ließ sich jedoch in einer nachfolgenden Studie von Marosevic et al. nicht bestätigen (21). Für die Deletion dieses großen Genabschnittes könnten hauptsächlich zwei Gründe verantwortlich sein: Einerseits ist bekannt, dass die Langzeitkultivierung und wiederholte Passagierung ohne Selektionsdruck zu Deletionen und sogar zum Verlust ganzer Plasmide in Borrelien führt (233). Andererseits könnten Sequenzierungsfehler Grund für den fehlenden Genabschnitt sein, da in einer anderen Studie mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese bereits ein komplettes 180-190 kbp langes lp165 Plasmid in *B. recurrentis* A1 nachgewiesen werden konnte (2). Außerdem ließ sich das auf dem betreffenden Genabschnitt lokalisierte *cihC*-Gen von *B. recurrentis* A1 mittels PCR amplifizieren, sodass davon ausgegangen werden kann, dass lp165 ursprünglich keine Deletion aufwies (177). Wie bereits erwähnt, wurden in *B. duttonii* Ly homologe für ChiA, ChiC, ChiD und ChiE kodierende Gene nachgewiesen, allerdings fehlten homologe Gene, die für CihC und ChiB kodieren (Abbildung 12). Das Gencluster von *B. duttonii* Ly wies außerdem eine zusätzliche Genduplikation des für ORF4 kodierenden Gens zwischen den Genen von ORF4 und ORF5 auf und das für HcpA kodierende homologe Gen war deutlich verkürzt. Es kann

daher vermutet werden, dass dieses Gen für kein funktionelles Protein kodiert, sondern ein Pseudogen darstellt. Interessanterweise konnte konträr zu den vorliegenden Ergebnissen ein orthologes CihC-kodierendes Gen mit einer Sequenzidentität von 91 % in *B. duttonii* LAI nachgewiesen werden (177). Gründe für die genetischen Unterschiede zwischen verschiedenen *B. duttonii*-Stämmen werden in Kapitel 4.5 im Detail diskutiert.

#### 4.2.2 Reinheitsgrad der verwendeten Proteine

Grundsätzlich sind Proteine mit einem größtmöglichen Reinigungsgrad für die funktionellen Analysen (z.B. Komplementinhibitions-Tests), für die Untersuchungen zur Protein-Protein Interaktion und für die Verwendung in *in vitro*-Diagnostika zu verwenden. Die in dieser Arbeit analysierten Proteine wiesen dies entsprechend wenige Verunreinigungen auf (Abbildung 13), mit Ausnahme von CihC von *B. recurrentis* und BGA66 von *B. bavariensis*. Dort zeigten sich in der Färbung mit Silbernitrat weitere Proteine, die anhand ihrer molekularen Massen eher für eine Dimerisierung der beiden Proteine sprechen als für Verunreinigungen. Im Fall von BGA66 konnte zumindest für die homologen Proteine BGA71 von *B. bavariensis* (Sequenzidentität mit BGA66 von 46,72%) und für CspA von *B. burgdorferi* (Sequenzidentität mit BGA66 von 53,91%) eine Dimerisierung mittels Kristallisation nachgewiesen werden (212, 234–237). Ein potenzieller Einfluss von Verunreinigungen auf die durchgeführten Interaktions- und Komplementinhibitions-Analysen kann daher nahezu ausgeschlossen werden. Allerdings sind Verunreinigungen nicht vollkommen auszuschließen, die dem Aufreinigungsprozess zuzuschreiben sind und durch zu viel Ni-NTA-Agarosepartikel, einer zu langen Inkubationszeit des Bakterienlysates mit der Ni-NTA-Agarose, oder durch unspezifische Bindung von Proteinen an die Ni-NTA-Agarose begründet werden können.

#### 4.2.3 Komplement-inhibitorische Eigenschaften von Cih-homologen Proteinen

Die erwähnten Borrelienproteine sind in der Lage das Komplement auf unterschiedlichen Aktivierungsstufen zu inhibieren. Die Ergebnisse der funktionellen Analysen ergaben, dass alle fünf untersuchten Cih-Proteine den alternativen Komplementweg inhibierten (Abbildung 14). Die Proteine ChiB, ChiD und ChiE wiesen die stärksten inhibitorischen Eigenschaften auf und führten bereits ab einer Konzentration von 1  $\mu$ M zu einer Terminierung dieses Aktivierungsweges. Demzufolge besitzen diese drei Proteine von *B. recurrentis* eine vergleichbare inhibitorische Kapazität wie BGA66 von *B. bavariensis*, das als Kontrollprotein eingesetzt wurde (212). Damit reihen sich die Proteine in eine Vielzahl von anderen ein, die in

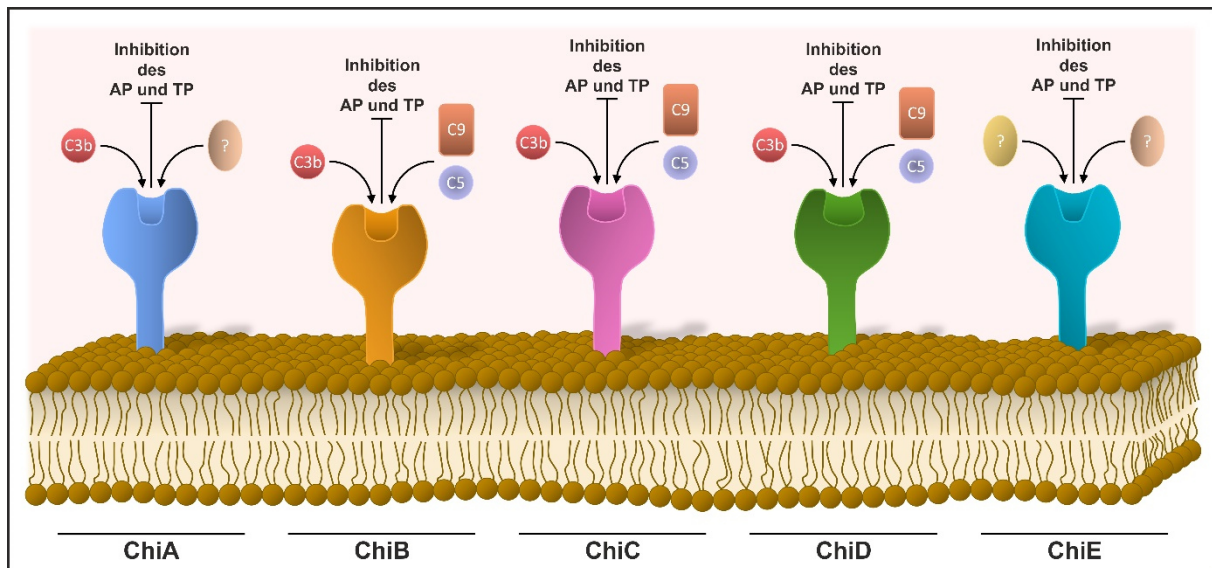
der Lage sind den alternativen Weg zu inhibieren. Dazu gehört z.B. das CspA von *B. burgdorferi* (238), aber auch Proteine von anderen Bakterien, wie das PspA von *Streptococcus pneumoniae* (239) oder das SCIN von *Staphylococcus aureus* (240).

Die vergleichbaren Untersuchungen zur Inaktivierung des terminalen Komplementweges (Kapitel 3.1.3) ergaben, dass zusätzlich zu CihC von *B. recurrentis* dessen inhibitorische Wirkung auf den terminalen Weg bereits festgestellt wurde (208), auch alle anderen Chi-Proteine die Assemblierung des MAK inhibieren können (Abbildung 15). Aus den Daten lässt sich entnehmen, dass ChiA im Vergleich die geringste inhibitorische Wirkung aufwies, während ChiB, ChiC, ChiD und allen voran ChiE die stärksten inhibitorischen Eigenschaften besaßen. Allerdings am eindeutigsten konnte eine Inhibition für CihC festgestellt werden. Die Inhibition des terminalen Weges durch die Proteine ChiB-ChiE und des CihC ist hierbei vergleichbar mit dem des bereits untersuchten Proteins CbiA von *B. miyamotoi* (179).

Die Inaktivierung des terminalen Komplementweges impliziert, dass die Komplementkomponenten C5b, C6, C7, C8 sowie C9 an der Protein-Protein Interaktion beteiligt sein könnten. In vorangegangenen Arbeiten konnte bereits festgestellt und diskutiert werden, dass die Proteine ChiB, ChiC und ChiD in der Lage sind die Komplementkomponente C9 zu binden (202). Da außerdem bereits bekannt ist, dass die selben drei Proteine ChiB, ChiD und ChiE zusätzlich die Fähigkeit besitzen die Komplementkomponente C5 zu binden (202), wurde für eine detailliertere Protein-Protein-Interaktion eine Analyse zur dosisabhängigen Bindung durchgeführt (Kapitel 3.1.3). Die Komplementkomponente C5 ist das Zielmolekül der C3-Konvertasen und wird enzymatisch in C5a und C5b gespalten. Während C5a als Anaphylatoxin inflammatorische Prozesse initiiert, bindet das aktivierte und kurzlebige C5b-Molekül an mikrobielle Oberflächen und leitet die Aktivierung der terminalen Sequenz ein, die schlussendlich zu Assemblierung des MAK führt (Abbildung 7) (121). Neben ChiB, ChiD und ChiE von *B. recurrentis* ließ sich auch für CbiA von *B. miyamotoi* eine Bindung an C5 sowie eine Inhibition des terminalen Komplementweg nachweisen (179, 184, 202). Vergleichbar mit CbiA ließ sich auch für die drei untersuchten Chi-Proteine eine konzentrationsabhängige Bindung von C5 bestätigen, wobei eine eindeutige Sättigung bei keinem der drei Chi-Proteine erzielt werden konnte (Abbildung 16). Diese Kurvenverläufe zeigten sich bereits bei CbiA von *B. miyamotoi*. Auch bei diesem Borrelienprotein konnte keine Sättigung in der C5-Bindung festgestellt werden (179), sodass vermutet werden kann, dass die Interaktion von ChiB, ChiD und ChiE mit C5 eher schwach ausgeprägt ist. Zur Bestätigung dieser Annahme müssten allerdings andere Methoden zur Protein-Protein Interaktionsstudien wie z.B. die SPR (Surface Plasmon Resonance) oder MST (MicroScale Thermophoresis)-Analyse herangezogen werden.



Die inhibitorischen Eigenschaften der einzelnen Chi-Proteine sind zusammengefasst in der folgenden Abbildung 48 dargestellt:



**Abbildung 48: Zusammenfassende Darstellung der komplementinhibitorischen Eigenschaften der Chi-Proteine.** Dargestellt sind die fünf Chi-Proteine ChiA (blau), ChiB (orange), ChiC (pink), ChiD (grün) und ChiE (türkis). Die Proteine ChiA, ChiB, ChiC, und ChiD sind in der Lage durch die Bindung der Komplementkomponente C3b eine Inhibition des alternativen Komplementweges herbeizuführen. Zusätzlich führt die Bindung der Komplementkomponenten C5 und C9 durch die Proteine ChiB, ChiC wie auch ChiD zu einer Inhibition des terminalen Komplementweges. Schließlich ist das Protein ChiE ebenso in der Lage den alternativen Komplementweg zu inhibieren. Allerdings ist der Bindungspartner, durch dessen Bindung der inhibitorische Effekt herbeigeführt wird, bisher unbekannt. Ebenso noch unbekannt ist die Komplementkomponente, durch deren Bindung von ChiE und ChiA die Inhibition des terminalen Komplementweges hervorgerufen wird. (©Florian Röttgerding).

### 4.3 Auswirkung von Struktur-basierten Mutationen der generierten ChiB-Varianten auf die Komplement-inhibitorische Wirkung und Komplementinteraktion

Im Vergleich zu bereits bekannten Proteinstrukturen anderer Komplement-bindender Borrelienproteine, wie z. B. das CspA von *B. burgdorferi* und das BGA71 von *B. bavariensis*, lässt sich auch für ChiB ein ähnliches Muster in der Faltung, die aus neun  $\alpha$ -Helices und einem  $\beta$ -loop besteht, erkennen (Abbildung 17). Basierend auf der Proteinstruktur wurden vereinzelte Aminosäuren und Regionen ausgewählt, welche potenziell in der Interaktion von ChiB mit den identifizierten Komplementkomponenten involviert sind. Insgesamt konnten fünf ChiB-Varianten erfolgreich generiert werden, während es bei drei Varianten nicht möglich war, diese affinitätschromatographisch zu reinigen (Kapitel 3.2.1).

Die vergleichenden Untersuchungen zur Komplementinhibition der generierten ChiB-Varianten (Abbildung 18) gegenüber des unveränderten ChiB-Proteins ergaben (Kapitel 3.1.3 und 3.2.2), dass die eingeführten Aminosäuresubstitutionen oder Deletionen keinen Einfluss auf das inhibitorische Potential der einzelnen Proteine besaßen (Abbildung 20). Nur bei der Variante ChiB\_Y160A zeigte sich eine minimale Auswirkung auf die Eigenschaft Komplement zu inhibieren. Sowohl die C3b- und C5-Bindungsanalysen (Abbildung 21) sowie die Untersuchung zur Inhibition der C9-Polymerisation (Abbildung 22) bestätigten, dass die eingeführten Substitutionen oder Deletionen weder die Bindung der beiden Komplementkomponenten noch die Fähigkeit die C9-Polymerisation zu inhibieren, beeinflussten. Daher sind weitere Untersuchungen notwendig, um zu klären, welche Regionen innerhalb von ChiB zur Komplementinhibition und zur Interaktion mit Komplement beitragen.

Bereits eine frühere Studie zur Charakterisierung der Komplement-interagierenden Domänen in CihC von *B. recurrentis* führte zu keinem eindeutigen Ergebnis, obwohl verschiedene Varianten mit z.T. größeren Deletionen am N- und C-Terminus generiert wurden (177). Keine der ChiC-Varianten zeigte eine verminderte Bindung gegenüber C4BP und C1-Inhibitor auf, was vermutet lässt, dass die Komplementkomponenten entweder in der zentralen Region von CihC binden oder überlappende Regionen an der Bindung beteiligt sind (177). Konträr zu CihC und in Anlehnung an die Untersuchungen zur Faktor H-Bindung des CspA-Proteins von *B. burgdorferi* (235, 236, 241), führten die Mutationsanalysen mit BhCRASP-1 von *B. hermsii* (175) zur Identifizierung der bindenden Region am C-terminalen Ende dieses Proteins, während bei den Proteinen HcpA von *B. recurrentis* (176), FhbA von *B. hermsii* (172, 173, 242) sowie BpcA und FHBP28 von *B. parkeri* (178) multiple Regionen an der Bindung mit Faktor H

beteiligt zu sein scheinen. Es wird daher vermutet, dass die Protein-Komplement-Interaktion höchst wahrscheinlich konformationsabhängig ist (176, 178).

#### **4.4 Chi-Proteine determinieren die Komplementresistenz von *B. recurrentis* und *B. garinii***

Im Rahmen dieser Arbeit konnte für alle untersuchten Chi-Proteine eine inhibierende Wirkung auf den alternativen und terminalen Komplementweg nachgewiesen werden (Abbildung 14 und Abbildung 15). Um diese Daten zu bestätigen, wurde Humanserum mit den gereinigten Chi-Proteinen vorinkubiert, um anschließend die bakteriolytische Wirkung auf Borrelienzellen eines Serum-sensiblen *B. garinii*-Stammes zu untersuchen. (Kapitel 3.3.1). Diese Methodik wurde bereits bei der Untersuchung von Komplement-bindenden Oberflächenproteinen der RF-Borrelienspezies *B. myiamotoi* und *B. bavariensis* angewandt und validiert (215, 216). Die für die Chi-Proteine erhobenen Daten zeigten, dass ChiB, ChiC, ChiD und ChiE in der Lage sind, die Komplementaktivierung deutlich zu inhibieren, sodass zwischen 70 – 80 % der Serum-sensiblen *B. garinii*-Zellen nach 4 Stunden überlebten (Abbildung 23). Für ChiA ließ sich jedoch keine signifikante inhibitorische Wirkung unter diesen Versuchsbedingungen erzielen. Sowohl bei ChiA als auch bei dem Kontrollprotein BSA sowie bei dem Negativkontrollansatz ohne Protein konnten nur 20 – 40 % überlebende Zellen nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Daten aus den funktionellen Komplementinhibitions-Tests, denn ChiA zeigte im Vergleich mit den anderen vier Chi-Proteinen die schwächste Inhibition auf den alternativen oder terminalen Komplementweg (Abbildung 14 und Abbildung 15). Obwohl diese Versuchsansätze weitestgehend die Daten zur Komplement-inhibierenden Wirkung der Chi-Proteine bestätigten, wurden Serum-sensible Borrelienzellen mit verschiedenen Vektoren, die die einzelnen oder multiple Chi-kodierenden Gene enthielten, transformiert (Kapitel 3.3.2). Untersuchungen mit sogenannten „Gain-of-Function“-Borrelienstämmen sollten Aufschluss über das Komplementinhibitorische Potential der Chi-Proteine liefern, wenn die Proteine auf der Zelloberfläche von Serum-sensiblen Borrelien exponiert sind. Zahlreiche Studien zur Komplementresistenz mit transformierten serum-sensiblen Borrelienzellen zeigten deutlich, dass sich Transformanten zur Beantwortung solcher Fragestellungen eignen, sofern keine Möglichkeit besteht gezielt Gene zu deletieren (175, 176, 178, 179, 212, 213, 217, 219, 243–247).

Die Expression der entsprechenden Gene in den erfolgreich generierten Transformanten wurde mittels RT-qPCR überprüft und konnte auch bestätigt werden. Diese Analyse ergab, dass in

allen Transformanten die Expression des jeweiligen transformierten *chi*-Gens nachgewiesen werden konnte (Abbildung 24). Die mit diesen Transformanten durchgeführten Serumbakterizidietests ergaben, dass ChiB, CihC und ChiD Serumresistenz vermitteln. Nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden konnten mikroskopisch bis zu 90 % bewegliche Spirochäten nachgewiesen werden. Bei den beiden Transformanten welche ChiA und ChiE produzierten lag der prozentuale Anteil an beweglichen Borrelienzellen unter 20 % der Gesamtpopulation. Die Ergebnisse für ChiA decken sich mit denen aus den Versuchen mit gereinigtem Protein (Abbildung 23). Konträr zu den übereinstimmenden Ergebnissen von ChiA, ergaben sich deutliche Unterschiede zwischen dem Ergebnis mit gereinigtem ChiE-Protein und dem Ergebnis mit der ChiE-produzierenden Transformante, da letztere keine Serumresistenz aufwies. Ein möglicher Grund für diese Diskrepanz könnte sein, dass die höhere Konzentration von ChiE im vorinkubierten Humanserum eher zu einer Inhibition führt, als wenn ChiE auf der Zelloberfläche der Transformanten präsentiert wird. Es könnte auch daran liegen, dass ChiE nicht seine ursprüngliche Struktur auf der Zelloberfläche entfaltet. Es kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass das gereinigte Protein eine veränderte Konformation besitzt und fälschlicherweise in gereinigter Form inhibierend auf Komplement wirkt. Zur weiteren Bestätigung wurden Transformanten von *B. garinii* G1 erzeugt, die CihC bzw. HcpA produzierten. Wie erwartet, konnten beide Moleküle eine Serumresistenz nach Inkubation in 25 % Humanserum in *B. garinii* bewirken und bestätigten die bereits erhobenen Daten mit dem Serum-sensiblen *B. burgdorferi*-Stamm B313 (176, 177). Eine genauere Analyse lässt vermuten, dass CihC scheinbar eine schwächere Serumresistenz vermittelt als die anderen Chi-Proteine, da der prozentuale Anteil an überlebenden Spirochäten nach 4 h mit ca. 50 % geringer ausfällt. Von allen untersuchten Borrelienproteinen mit Komplement-inhibitorischer Wirkung von RF-Borrelien ist allein CihC von *B. recurrentis* in der Lage den klassischen und Lektin-Weg zu inhibieren (184). Allerdings erfolgt die Komplementaktivierung bei *B. garinii* G1 bevorzugt über den alternativen Weg, welcher schlussendlich dann auch für 80 – 90 % der Gesamtaktivierung verantwortlich ist. Daher ist die schwächere Inaktivierungskapazität des CihC nachvollziehbar, da dieses Protein wie erwähnt nur den klassischen und Lektin Weg inhibiert (139). Dies könnte schließlich erklären, warum der Anteil an überlebenden Borrelienzellen bei der CihC-Transformante im Vergleich zu den anderen drei Chi-Transformanten geringer ist. Dabei ist das CihC nicht das einzige Protein unter den RF-Borrelienspezies welches nur den klassischen bzw. Lektin-Weg inhibiert. Zwei weitere erst kürzlich identifizierte Proteine von *B. miyamotoi*, FbpA und FbpB, welche die

Komplementkomponente C1r binden, blockieren sogar spezifisch nur den klassischen Weg (246).

Um sich der Komplement-vermittelten Lyse zu entziehen besitzen Borrelien generell über eine Vielzahl an Proteinen mit Komplement-inhibierendem Potential (243). Bei *B. burgdorferi* konnten bis zu fünf sogenannter Complement Regulator-Acquiring Surface Proteins (CRASPs) identifiziert werden, von denen zwei Proteine CspA und CspZ den alternativen Weg durch die Interaktion mit den Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1 inhibieren und C3b inaktivieren (217, 241, 248). Orthologe CspA-Proteine wurden auch bei den humanpathogenen Borrelienspezies *B. afzelii*, *B. bavariensis*, *B. spielmanii* und *B. mayonii* beschrieben (212, 216, 219, 244, 249). Bei den ZRF-Borrelien ließen sich ebenfalls Proteine mit Komplement-inhibitorischen Eigenschaften identifizieren (184). Dazu zählen z.B. BhCRASP-1 sowie FhbA von *B. hermsii* (173, 175) FHBP28 und BpcA von *B. parkeri* (178), CbiA, BOM1093, FbpA und FbpB von *B. miyamotoi* (179, 245, 246), sowie CihC und HcpA von *B. recurrentis* (176, 177). Da bislang nur einzelne Proteine in „Gain-of-Function“-Transformanten untersucht wurden, deren kodierende Gene auf unterschiedlichen Plasmiden lokalisiert sind, das Chi-Cluster aber aus fünf hintereinander angeordneten Genen besteht, könnte ein kumulativer Effekt bei der Komplementinhibition infrage kommen. Aus diesem Grund wurden Vektoren, die verschiedene Kombinationen an Chi-kodierenden Genen enthielten, generiert und für die Transformation von *B. garinii* G1-Zellen verwendet (Kapitel 3.3.3). Mittels RT-qPCR konnten bei allen Borrelientransformanten die Expression der jeweiligen Chi-kodierenden Gene nachgewiesen werden (Abbildung 26). Die mit diesen Transformanten durchgeführten Bakterizidietests mit 25 % humanen Serum ergaben, dass nach 4 Stunden weniger als 20 % der Zellen überlebten; im Gegensatz zu über 90 % an Zellen in den Kontrollansätzen mit hitzeinaktiviertem Serum (Abbildung 27). D. h., dass im Vergleich zu den ChiB, ChiC- und ChiD-Transformanten keine Serumresistenz bei Borrelien, die mehrere Chi-Proteine gleichzeitig produzierten, beobachtet werden konnte. Da die Expression der einzelnen Gene durch die RT-qPCR bestätigt werden konnte, lässt sich spekulieren, dass die Konzentration der einzelnen Chi-Proteine auf der Zelloberfläche geringer ist als im Vergleich zu den Transformanten, die nur ein einzelnes Protein produzieren. Da bisher keine geeigneten Antikörper gegen die verschiedenen Chi-Proteine produziert werden konnten, ist außerdem die Frage, ob oder in welchem Maße die Proteine auf der Zelloberfläche exponiert werden, nicht abschließend zu klären. Ferner ist es nicht vollkommen auszuschließen, dass die Produktion mehrerer, „fremder“ Chi-Proteine zu einer verminderten Fitness von *B. garinii* geführt hat, woraus eine erhöhte Sensibilität der Borrelienzellen gegenüber Komplement resultieren könnte.

#### 4.5 Das Chi-Gencluster in *B. recurrentis* und *B. duttonii*

Phylogenetischen Untersuchungen zu Folge soll *B. recurrentis* ursprünglich aus *B. duttonii* entstanden sein (32). Da diese Annahme jedoch u.a. auf dem Verlust eines großen Abschnittes am linken Ende des linearen Plasmids lp165 beruht, welches das Chi-Gencluster umfasst, wurden die entsprechenden orthologen Gene und deren Expression in verschiedenen *B. recurrentis* und *B. duttonii*-Stämmen untersucht (Kapitel 3.4). Diese vergleichenden Untersuchungen schlossen den im Jahr 2015 in München aus einem LRF-Patienten isolierte *B. recurrentis*-Stamm PAbJ und die beiden *B. duttonii*-Stämme LAI und V ein. Die konventionelle PCR sowie die RT-qPCR ergab, dass in dem *B. recurrentis*-Stamm PAbJ die Anwesenheit aller Gene sowie deren Expression nachgewiesen werden konnte (*cihC*, *hcpA*, *chiA*, *chiB*, *chiC*, *chiD*, und *chiE*) (Abbildung 28). Der Nachweis verdeutlicht, dass diese Cluster über einen langen Zeitraum in *B. recurrentis* konserviert sein muss, da bisherige Genomanalysen und Sequenzdaten hauptsächlich auf den beiden Stämme A1 und A17 beruhen, die 1994 aus Patienten aus Addis Abeba, Äthiopien, isoliert wurden (205). Übereinstimmend mit den Expressionsdaten zu CihC und HcpA konnte auch bei *B. recurrentis* A1 die Lokalisation beider Proteine auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden (176, 177). Die Tatsache, dass die Gene aus dem *chi*-Gencluster in *B. recurrentis* PAbJ in gleichem Maße exprimiert werden wie die *cihC*- und *hcpA*-Gene, könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese eine Rolle für die Pathogenese von *B. recurrentis* spielen könnten. Im Vergleich zu *B. recurrentis* PAbJ konnten in *B. duttonii* LAI alle Chi-kodierenden Gene bis auf das *hcpA*-Gen in der konventionellen PCR und deren Expression in der RT-qPCR nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu ließen sich keine Amplifikate für *B. duttonii* V generieren (Abbildung 29). Eine Sequenzanalyse publizierter Daten des *B. duttonii*-Stammes Ly (32) zeigte (Kapitel 3.1.1), dass bei *B. duttonii* Ly das *hcpA*-Gen nur partiell vorhanden ist und daher für kein funktionelles Protein kodiert. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass in *B. duttonii* LAI ebenfalls das *hcpA*-Gen nur teilweise vorhanden ist und deshalb kein Amplifikat generiert werden konnte. Zum direkten Vergleich des Chi-Gencluster mit den beiden anderen untersuchten *B. duttonii*-Stämme standen keine weiteren Sequenzdaten zur Verfügung, sodass keine eindeutige Aussage zur Struktur des Genclusters bei diesen Borrelienstämmen getroffen werden kann. Übereinstimmend mit bisher veröffentlichten Daten (177) konnte in *B. duttonii* LAI das Vorhandensein des CihC-kodierenden Gens und dessen Expression im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden.

Zur weiteren Charakterisierung vorhandener Komplement-inhibierender Proteine bei *B. recurrentis* und zur Bestätigung bereits veröffentlichter Daten, standen monoklonale

Antikörper gegen CihC und HcpA zur Verfügung. Zum späteren Verlauf der Arbeit konnte ein polyklonaler anti-ChiB Antikörper generiert werden. Alle drei erwähnten Borrelienproteine wurden in *B. recurrentis* A17 mittels einer Western Blot-Analyse nachgewiesen (Abbildung 30). Das gereinigte HcpA- und ChiB-Protein wiesen eine höhere molekulare Masse auf als die nativen Proteine in den präparierten Zelllysaten. Gereinigte Proteine können ein verändertes Laufverhalten aufweisen, insbesondere durch den veränderten N-Terminus, der das fusionierte Hexahistidinpeptid und die Schnittstelle für Faktor Xa enthält. HcpA zeigte wie bereits erwähnt den Nachweis von zwei Antigen-Antikörper-Komplexen auf, sodass eine partielle Degradation des Proteins nicht vollkommen ausgeschlossen werden kann. Der anti-CihC Antikörper reagierte in der Western Blot-Analyse mit jeweils zwei Proteinen mit den ermittelten molekularen Massen von 40 kDa und 50 kDa. Obwohl die gleichmäßige Stärke der Antikörperbindung darauf schließen könnte, dass sich CihC zu einem Homodimer formiert, wie z.B. CspA und BBA73 von *B. burgdorferi* oder BGA71 von *B. bavariensis* (235–237, 250), so wäre für ein Dimer eine molekulare Masse von ca. 80 kDa zu erwarten, nicht jedoch von 50 kDa. Es kann daher nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass der Antikörper mit einem anderen Borrelienprotein kreuzreagiert.

Die Produktion vieler Borrelienproteine wird durch externe Bedingungen (Vektor-Wirt-Zyklus) beeinflusst (251–253). Aus diesem Grund wurde der Einfluss von Serumkomponenten tierischen (Kaninchen) oder humanen Ursprungs auf die Produktion von CihC, HcpA und ChiB miteinander verglichen. Allerdings scheint die Kultivierung der Borrelienzellen mit Kaninchen- oder Humanserum unter *in vitro* Bedingungen keinen Unterschied in der Genexpression zu bewirken, sodass eine durch äußere Einflüsse verursachte Veränderung der Expression dieser drei Gene, z.B. durch den Eintritt der Borrelien in den menschlichen Wirt, eher unwahrscheinlich ist.

#### **4.6 Entwicklung eines serologisch basierten Testsystems zum diagnostischen Nachweis des Läuserückfallfiebers**

Das LRF ist eine vernachlässigte Vektor-assoziierte Infektionskrankheit, die während der letzten Flüchtlingskrise im Jahr 2015 in den Fokus gerückt ist (60, 71, 96). Obwohl es derzeit keine Anzeichen für eine erneute weltweite Ausbreitung gibt, ist ein potenzielles Risiko eines erneuten Auftretens von LRF aufgrund unbemerkter endemischer Herde in Flüchtlingslagern oder durch eine Verschlechterung bereits prekärer Hygienestandards durch weitere humanitäre Katastrophen jederzeit möglich. Daher ist eine frühzeitige Diagnose von entscheidender

Bedeutung, um eine Infektion frühzeitig zu erkennen und ihre Folgen sowie die Gefahr einer Fehlbehandlung zu vermeiden. Dies gilt insbesondere zur Unterscheidung zwischen LRF und anderen fieberhaften Erkrankungen wie Malaria, Typhus sowie nicht-typhoides Fieber, Schützengrabenfieber und ZRF in Hochrisikogebieten, in denen die entsprechenden Erreger zirkulieren. Auch die begrenzten Ressourcen in den Entwicklungsländern und das Fehlen von standardisierten Tests machen die Entwicklung von neuen *in vitro*-Diagnostika mit hoher Spezifität und Sensitivität erforderlich (71, 84, 254). Heutzutage ist die mikroskopische Untersuchung von Blutaussstrichen immer noch der diagnostische Goldstandard. Um dies zu ändern, wurden im Rahmen des LOEWE-Zentrum DRUID serologische Tests, basierend auf einem Lineblot-Immunoassay und ELISA, für die Diagnose von LRF entwickelt.

#### **4.6.1 Untersuchung der Immunreaktivität der LRF-Patientenserum auf verschiedene Antigene von *B. recurrentis***

Für die Entwicklung eines zuverlässigen, serologischen Tests ist die Identifizierung von immunreaktiven Antigenen von größter Bedeutung. Dafür wurden Serumproben von klinischen erkrankten Kultur- und Laborbestätigten LRF-Patienten verwendet. Diese Proben stammten von zwölf Patienten, welche im Zuge der Flüchtlingskrise 2015 aus Ostafrika nach Deutschland immigrierten und anhand ihrer klinischen Symptomatik nach ihrer Ankunft mit LRF diagnostiziert wurden (96). Um die IgG-Reaktivität der Seren und damit deren Verwendbarkeit für die Entwicklung eines serologischen Tests zu überprüfen, wurde ein Immunofluoreszenztest durchgeführt (Kapitel 3.5.1). In allen zwölf Patientenserum konnten IgG Antikörper gegen *B. recurrentis* nachgewiesen werden (Abbildung 31). Die gewonnenen Ergebnisse stimmten mit den Daten einer früheren Studie, in der die Reaktivität von Serumproben von LRF-Patienten aus Äthiopien in der akuten und rekonvaleszenten Phase auf Ganzzell-Lysate von *B. recurrentis* untersucht wurden, überein (94). In der zitierten Studie zeigte sich, dass der Titer für Seren aus der akuten Phase bei 1:83 und für Seren aus der rekonvaleszenten Phase bei 1:575 lag. Diese Werte stimmten mit der in dieser Arbeit verwendeten Verdünnung von 1:320 überein.

Um das Ergebnis zu bestätigen, und um die IgM- und IgG-Reaktivität der zur Verfügung gestellten Humanserum zu überprüfen, wurde eine Western Blot-Analyse mit Zelllysate von *B. recurrentis* A17 durchgeführt (Kapitel 3.5.2). Diese Analyse ergab, dass alle zwölf der hier untersuchten LRF-Serumproben eine Reaktivität für IgM und IgG gegenüber einer Reihe von Borrelienantigenen im Bereich von <20 bis 100 kDa aufwiesen (Abbildung 32 und Abbildung 33). Sieben von zwölf LRF-Serum (58 %) zeigten eine starke Reaktion gegenüber



einem 20 kDa großem Protein (IgM-Reaktivität in sechs von zwölf Seren; IgG-Reaktivität in drei von zwölf Seren). Aufgrund der molekularen Masse und der starken Immunreaktivität ist davon auszugehen, dass dieses Protein zur Familie der „variable major proteins, Vmp“ gehört, die in die „variable large proteins“ (Vlp) und „variable small proteins (Vsp)“ unterteilt wird (188–190). Die mittlerweile durchgeführten massenspektrometrischen Analysen lassen vermuten, dass dieses immunreaktive Protein tatsächlich zu den Vsp-Proteinen zählt. In der zuvor erwähnten Studie berichteten Porcella et al. (94), dass 67 % der von ihnen analysierten Serumproben von LRF-Patienten, die sich in der Rekonvaleszenzphase befanden, eine starke Immunreaktivität gegenüber einem Protein von 22 kDa von *B. recurrentis* aufwiesen. Diese Autoren nahmen ebenfalls an, dass dieses Protein aufgrund seiner molekularen Masse den Vsp-Proteinen zuzuordnen ist. In den in dieser Arbeit durchgeführten Analysen konnten außerdem ein weiteres immunogenes Protein von ca. 40 kDa identifiziert werden, welches von elf der zwölf LRF-Seren erkannt wurde. Die Vermutung liegt nahe, dass es sich bei diesem speziellen Protein entweder um CihC (berechnete molekulare Masse von 40,5 kDa) oder um GlpQ (berechnete molekulare Masse von 38,1 kDa) handeln könnte, da sich beide in ihrer molekularen Masse und Immunogenität ähnlich sind.

Um ein geeignetes Antigen für die serologischen Tests zu identifizieren, wurden verschiedene Oberflächenproteine von *B. recurrentis* in einem ersten Screening getestet (Kapitel 3.5.3). Bei den untersuchten Lipoproteinen wurde das Protein CihC, da es in allen getesteten LRF-Seren eine starke IgG-Reaktivität und in vier Serumproben eine schwächere IgM-Reaktivität aufwies, als vielversprechendes Antigen identifiziert (Abbildung 34). Darüber hinaus zeigten fünf LRF-Seren eine IgG-Reaktivität gegenüber HcpA und in zwei Seren reagierten ChiA und ChiC. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Proteine mit immunmodulatorischen Funktionen wie CihC und HcpA geeignete Antigene für serologische diagnostische Tests darstellen. Dies wurde bereits für das Faktor-H-bindende Protein FhbA von *B. hermsii* sowie für diverse Vmp-Proteine von *B. hermsii* und *B. miyamotoi* diskutiert (198, 95, 220, 255–258). Über die Eignung von GlpQ als passendes Antigen für die serologische Diagnose von ZRF und im Speziellen von *B. miyamotoi*-Infektionen wurde bereits berichtet (63, 94, 95, 220, 255, 256, 93). Darüber hinaus hat sich gezeigt, dass eine starke Antikörperreaktion für GlpQ in Seren von Patienten, die mit *B. recurrentis* infiziert waren, nachgewiesen werden konnte. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Studien überein, in denen insbesondere anti-GlpQ Antikörper in Serumproben von Patienten aus der akuten Phase der Infektion und der Rekonvaleszenzphase nachgewiesen werden konnten (94).

Zur weiteren Bestätigung, dass das identifizierte Protein von 40 kDa mit CihC korrespondiert, wurden eine vergleichende Analyse durchgeführt. Die nachgewiesenen Immunreaktivitäten, die sich für das gereinigte CihC und dem Ganzzell-Lysat von *B. recurrentis* A17 durch die Verwendung des monoklonalen anti-CihC Antikörpers und verschiedener LRF-Seren zeigten, lassen darauf schließen, dass dieses Protein mit ChiC übereinstimmen könnte (Abbildung 35).

#### **4.6.2 Evaluierung eines Lineblots und ELISA auf Grundlage der Antigene CihC und GlpQ**

Basierend auf den Ergebnissen der initialen Versuche wurden für die Evaluierung des serologischen Tests ausschließlich die Antigene CihC und GlpQ verwendet. Zur Berechnung der Spezifität und Sensitivität des diagnostischen Tests wurden Seren von 100 Blutspendern benutzt. Außerdem wurden, um Kreuzreaktionen auszuschließen, Seren von Patienten in die Studie eingeschlossen, welche an anderen durch Spirochäten hervorgerufenen Infektionen wie z.B. Lyme-Borreliose (57), Syphilis (20) und Leptospirose (16) erkrankt waren. Zusätzlich wurden Seren von Patienten mit anderen durch Vektoren übertragenen bakteriellen oder parasitären Krankheiten miteinbezogen, die in Ostafrika endemisch sind, wie z.B. Leishmaniose (69), Tuberkulose (16) und Malaria (5) (siehe Tab. 33).

Die initiale Evaluierung des IgM Lineblots (Kapitel 3.5.4) ergab bei der Verwendung des gereinigten CihC-Protein eine Sensitivität von 16,67 %, bei einer hohen Spezifität von 95,35 % (Abbildung 36). Eine Sensitivität von 66,67 % und eine Spezifität von 98,52 % konnte allerdings unter Verwendung von GlpQ als Antigen erreicht werden. Bei dem IgG Lineblots konnte mit beiden Antigenen hingegen sehr hohe Sensitivitäten (CihC: 91,67 %, GlpQ: 83,33 %) und Spezifitäten (CihC: 96,52 %, GlpQ: 99,57 %) erzielt werden (Abbildung 37). Allerdings zeigten sich für CihC unspezifische Bindungen, wodurch die visuelle Interpretation der Testergebnisse erheblich erschwert wurde (Abbildung 38). Dies könnte, insbesondere in ressourcenarmen Regionen, in denen keine spezielle Laborausstattung, wie z.B. ein Densitometer für die Datenauswertung zur Verfügung steht, sich als problematisch und sehr zeitaufwendig erweisen.

Um spezifische Antikörperreaktionen nachzuweisen, werden üblicherweise *in vitro* Diagnostika in Form eines ELISA als immunologischer Suchtest verwendet. Obwohl der IgM-ELISA (Kapitel 3.5.5) mit den einzelnen Antigenen eine geringe Sensitivität aufweist (16,67 %), insbesondere für CihC, konnte eine deutliche Steigerung der Sensitivität erzielt werden, wenn beide Antigene kombiniert wurden (100 %) (Abbildung 39). In ähnlicher Weise

wurden auch im IgG ELISA für CihC in Verbindung mit GlpQ hohe Sensitivitäten (100 %) und Spezifitäten (98,78 %) erreicht (Abbildung 40, Tab. 32).

#### 4.6.3 Optimierung des ELISA und Lineblots durch die Identifizierung immunogener Regionen mittels *in silico* Analyse

Um einen möglichst robusten und zuverlässigen diagnostischen Test gegen LRF zu entwickeln, wurde auf Grundlage der oben diskutierten Ergebnisse versucht, die Spezifitäten aber vor allem auch die Sensitivitäten des ELISA sowie die auffallend starken unspezifischen Antigen/Antikörper-Reaktionen des Lineblot-Immunoassays zu verbessern. Um dies zu erreichen, sollte die Isolierung des Antigens CihC im Hinblick auf die Ausbeute und die Reinheit des Proteins optimiert werden. Hierfür wurde eine *in silico* Analyse durchgeführt, mit der sich für das CihC-Antigen eine prominente immunogene Region identifizieren ließ, die mit Ausnahme der am N-Terminus lokalisierten Signalsequenz für die posttranslationale Modifikation des Lipoproteins, den gesamten N-Terminus bis zur Aminosäure 195 umfasste (Kapitel 3.5.6). Der C-Terminus scheint nach dieser Analyse weniger stark ausgeprägte immunogene Regionen zu enthalten. Daher wurden zwei Fragmente von CihC generiert, CihC-N und CihC-C (Abbildung 41). Obwohl sich mit der durchgeführten *in silico* Analyse nur eine vage Vorhersage treffen lässt, welche Regionen eines Proteins potenziell immunogen sind, bestätigte die Western Blot-Analyse (Kapitel 3.5.8) allerdings, dass das CihC-N Fragment eine deutliche IgM- und IgG-Immunreaktivität aufwies (Abbildung 43). Konträr dazu zeigte sich bei dem Antigen CihC-C eine deutlich schwächere Immunreaktivität für IgG, während für IgM sogar gar keine Reaktion nachgewiesen werden konnte. Die erhöhte Immunogenität des Proteins scheint auch der Grund dafür zu sein, dass der monoklonale anti-CihC Antikörper bevorzugt das CihC-N Fragment erkennt, aber nicht das CihC-C.

Die Überprüfung der Reinheit der Proteine mittels Silberfärbung (Kapitel 3.5.7) ergab, dass alle Proteine in einem hohen Reinheitsgrad vorlagen (Abbildung 42). Nur zwei schwache Verunreinigungen konnten bei den Proteinen CihC und CihC-N sowie eine dritte bei dem Protein GlpQ detektiert werden. Dies könnte wie in Kapitel 4.2 bereits diskutiert, auf eine Dimerisierung oder unspezifischen Bindungen an der Ni-NTA-Agarose zurückzuführen sein.

Obwohl die Verwendung von CihC-N für den IgM-Lineblot zu keiner verbesserten Sensitivität und Spezifität geführt hat (Kapitel 3.5.9) (Daten nicht gezeigt), konnte im Vergleich zum Lineblot-Immunoassay mit CihC eine 100 % Sensitivität für IgG erzielt werden (Abbildung 44). Allerdings sank die Spezifität marginal von 96,52 % auf 94,42 % (Tab. 32). Die Applikation

von CihC-N erlaubte außerdem eine eindeutiger visuelle Unterscheidung zwischen negativen und positiven Testergebnissen ohne weitere Digitalisierung, was die Analyse ohne weitere Laborgeräte ermöglicht und zu einer Verringerung des Zeitaufwands für die Diagnosestellung führt (Abbildung 45).

Beim IgM-ELISA mit CihC-N (Kapitel 3.5.10) konnte die Sensitivität im Vergleich zu CihC deutlich von 16,67 % auf 66,67 % um bis zu 50 % verbessert werden (Tab. 32). Allerdings standen für den optimierten ELISA-Test mit CihC-N weniger Kontrollseren von Patienten mit anderen Spirochäteninfektionen zur Verfügung (Tab. 33), was die Berechnung der Sensitivität beeinträchtigen könnte. Wie zu erwarten, konnte der IgG-ELISA nur geringfügig verbessert werden, aber insgesamt ermöglichte die Verwendung von CihC-N als Antigen eine verbesserte Unterscheidung im Vergleich mit dem CihC-Protein, und der „Cut-off“ wurde erheblich gesteigert (Abbildung 47 im Vergleich zu Abbildung 40).

Im Vergleich zu PCR-basierten Tests, die in erster Linie in entsprechenden Speziallaboratorien zur Speziesdifferenzierung von RF-Borrelien etabliert sind (91, 259), sind beide Immunoassays aufgrund ihrer hohen Sensitivität und Spezifität für die „Point-of-Care-Diagnostik“ von Vorteil. Insbesondere erfordert der Lineblot-Immunoassay als *in vitro* Diagnostikum keine kostenintensive Laborausstattung und ist ubiquitär einsetzbar. Es bleibt jedoch zu erwähnen, dass falsch-negative Ergebnisse in Serumproben aus der akuten Phase der Infektion beim IgM-Lineblot-Immunoassay auftreten, die entweder keine oder in niedrigen Konzentrationen anti-CihC- und/oder anti-GlpQ Antikörper enthalten. Allerdings zeigten acht LRF-Patienten erste Symptome erst kurz vor oder nach ihrer Ankunft in Bayern, während die anderen RF-Patienten auch nur eine und keine wiederkehrende Fieberepisode aufwiesen. Dies lässt auf eine Blutentnahme in einem bereits frühen Krankheitsstadium schließen (69, 96). Diese Serumproben wurden positiv auf GlpQ und/oder CihC getestet, was darauf hindeutet, dass die Antikörper gegen beide Antigene in einer sehr frühen Phase der Infektion vorhanden sind. Daher unterstützen die vorliegenden Daten das Konzept zwei verschiedene Antigene für einen serologischen Test zur Diagnose von RF zu verwenden, um eine deutlich höhere Spezifität und Sensitivität zu erzielen. Die erhobenen Ergebnisse korrelieren mit denen einer Studie von Koetsveld et al., bei der festgestellt wurde, dass anti-*B. miyamotoi* Antikörper spezifischer in Seren nachgewiesen werden konnte, wenn GlpQ in Kombination mit einem weiteren Vmp-Protein verwendet wurde (95, 220).

Die geringere Sensitivität des IgM-Lineblots verdeutlicht, dass eine weitere Optimierung notwendig ist und zusätzliche Antigene mit besserer Immunreaktivität in nachfolgenden

Studien zu analysieren sind. Wie bereits erwähnt, scheinen vor allem Vmp-Proteine geeignete Kandidaten zu sein, wie sie schon für die Serodiagnostik von *B. miyamotoi* favorisiert werden (220). Allerdings müssten verschiedene Vsp- und Vlp-Proteine auf ihre Immunreaktivität untersucht werden, da diese Proteine der Antigenvariation unterliegen (siehe Kapitel 1.5). Dies bedeutet, dass, je nach Selektion im humanen Wirt, die RF-Borrelien ein unterschiedliches Repertoire an Vmp produzieren, wodurch sich die Immunantwort von Patient zu Patient unterscheiden kann. Nichtsdestotrotz sollten die entwickelten serodiagnostischen Immunoassays die derzeitige mikrobiologische Diagnostik von LRF, der es bekanntermaßen an Sensitivität mangelt, ergänzen, insbesondere in der fieberfreien Phase, wenn die Erregerlast im Blut sehr gering ist und eine konventionelle mikroskopische Diagnostik keine Hinweise auf Spirochäten liefern würde (84, 88). Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten und evaluierten Testverfahren könnten außerdem, um grundsätzliche epidemiologische Daten zu erheben, für die Serodiagnose aktiver Fälle in einer menschlichen Bevölkerung die wiederholt LRF ausgesetzt ist und bei der der Nachweis zirkulierender Antikörper vermutet wird, hilfreich sein.

Für die meisten serologischen Tests ist bekannt, dass kreuzreagierende Antikörper in Serumproben von Patienten mit anderen bakteriellen Infektionen zu falsch-positiven Testergebnissen führen können. Vergleichende Sequenzanalysen ergaben, dass GlpQ kodierende Gene in verschiedenen humanpathogenen Bakterien wie z. B. in *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella spp.*, *Klebsiella spp.* und *Yersinia spp.* vorhanden sind, aber nicht in LB-Borrelien oder in *Treponema pallidum* vorkommen. In Übereinstimmung mit früheren Studien (94, 256, 93, 260–263) konnten in den in dieser Arbeit untersuchten Seren keine kreuzreagierenden Antikörper gegen GlpQ nachgewiesen werden. Da GlpQ bei den ZRF-Borrelien *B. hermsii*, *B. turicatae*, *B. parkeri*, *B. coriaceae* sowie *B. duttonii* hoch konserviert ist und Sequenzidentitäten von 82 bis 99,4 % aufweist, können Kreuzreaktivitäten innerhalb von RF-Borrelienspezies nicht ausgeschlossen werden (91, 94). Trotzdem bleibt die Aussagekraft der serologischen Diagnostik aufgrund der geographischen Differenzierung der Erreger ungeschmälert, da *B. hermsii* und *B. turicatae* in Nordamerika und *B. recurrentis*, *B. duttonii*, *B. hispanica*, *B. crocidurae* in Nordafrika RF beim Menschen verursachen. Zur Differenzierung zwischen der von LB-Borrelien hervorgerufenen Borreliose und des RF bleibt GlpQ nach wie vor ein geeignetes Zielantigen für den serologischen Nachweis von ZRF. Leider standen in der vorliegenden Arbeit keine Serumproben von ZRF-Patienten zur Verfügung, um diese Fragestellung zu adressieren.

Bioinformatische Vergleichsanalysen des CihC-kodierenden Gens von *B. recurrentis* A1 lieferten keine Hinweise auf ein homologes Gen in *B. hermsii*, *B. turicatae*, *B. parkeri* und

*B. crociduræ* sowie *B. miyamotoi*, während ein homologes *cihC*-Gen in *B. duttonii* mit einer Sequenzidentität von 89,2 % gefunden werden konnte. Dies lässt darauf schließen, dass CihC nur in *B. recurrentis* und *B. duttonii* vorkommt. Daher kann angenommen werden, dass kreuzreagierende Antikörper gegen CihC auch in Seren von mit *B. duttonii* infizierten Patienten detektiert werden sollten. Es ist bekannt, dass eine serologische Diagnostik nicht sensitiv genug ist um zwischen Infektionen, hervorgerufen durch die zirkulierenden RF-Borrelien in endemischen Regionen in Nord- und Ostafrika, zu differenzieren (69, 259). Aus klinischer Sicht hätte die Unterscheidung zwischen dem von *B. duttonii* verursachten ZRF und LRF allerdings keine Auswirkungen auf die Therapie und wäre damit von rein wissenschaftlichem Interesse um, wie bereits erwähnt, aktuelle epidemiologische Daten zu sammeln (61). Somit käme der hier entwickelte diagnostische Test primär bei Patienten zum Einsatz, die sich in endemischen Regionen aufhielten und an einem unklaren oder wiederkehrenden Fieber erkrankt sind. Auf diese Weise lässt sich das durch Borrelien verursachte RF von Infektionskrankheiten unterscheiden die einen ähnlichen Verlauf aufweisen, wie etwa Malaria oder Typhus. Zu erwähnen ist außerdem, dass alle getesteten LB-Seren aus dem verwendeten Kollektiv keine Kreuzreaktivität gegenüber CihC aufwiesen. Allerdings ermöglichen die in dieser Arbeit entwickelten diagnostischen Testverfahren eine Unterscheidung zwischen LRF und ZRF-, *B. miyamotoi*-Infektionen sowie Lyme-Borreliose, da keine CihC-orthologen Proteine in diesen Borrelienspezies gefunden wurden, mit Ausnahme von *B. duttonii*.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der vorliegenden Arbeit zwei serodiagnostische Testverfahren mit jeweils hohen Sensitivitäten und Spezifitäten entwickelt wurden, die in Zukunft zuverlässige Instrumente für die Serodiagnose von LRF darstellen könnten. Das Fragment CihC-N kombiniert mit GlpQ dient dabei als vielversprechendes Zielantigen für den Nachweis von IgM und IgG Antikörpern in Seren von LRF-Patienten. Beide serodiagnostische Testverfahren ermöglichen eine zuverlässige und schnelle Diagnose von Patienten mit Fieber unbekannter Genese und können insbesondere in Krankenhäusern mit eingeschränkter technischer Ausstattung und limitierten Ressourcen als kostengünstige Point-of-Care-Diagnostik dienen. Um jedoch ein falsch-negatives Ergebnis der diagnostischen Tests aufgrund des Fehlens von Antikörpern gegen *B. recurrentis* in frühen Phasen der Infektion auszuschließen, wäre es in Zukunft notwendig, den Zeitpunkt des ersten Auftretens von IgG Antikörpern gegen LRF bei Patienten nach einer Primärinfektion zu bestimmen. Des Weiteren müssen ZRF-Patientenproben hinsichtlich kreuzreagierender Antikörper analysiert werden. Sobald diese Daten vorliegen, könnten die entwickelten und optimierten *in vitro* Diagnostika wichtige Instrumente für die frühzeitige Erkennung von LRF in endemischen Regionen sein,

wodurch eine schnelle und verbesserte Therapie von Patienten erzielt und epidemische Ausbrüche schneller erkannt und verhindert werden könnten.

## 5 Zusammenfassung

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit beinhaltet die funktionelle Analyse von fünf Oberflächenproteinen von *B. recurrentis* die die Fähigkeit besitzen, die Aktivierung von humanen Komplement zu inhibieren und Borrelien vor Bakteriolyse zu schützen. Im zweiten Teil der Arbeit wurden zwei immunologische Testverfahren mit hoher Sensitivität sowie Spezifität entwickelt und mit zahlreichen Patientenseren evaluiert. Die entwickelten Tests könnten in Zukunft als zuverlässige Instrumente für eine gesicherte Diagnose von LRF eingesetzt werden.

Eine Sequenzanalyse führte zur Identifizierung eines neuen Proteinclusters, welches die fünf untersuchten Komplement-inhibierenden Proteine als „Cluster of Complement-targeting and Host-interacting Proteins“ oder „Chi-Gencluster“, zusammenfasst. Diese Oberflächenproteine wurden als ChiA, ChiB, ChiC, ChiD und ChiE bezeichnet. Weiterführende Sequenzanalysen ergaben, dass das Chi-Gencluster extrem hoch konserviert ist und sowohl in den ersten *B. recurrentis*-Isolaten aus den 1990er Jahren als auch in *B. recurrentis*-Stämmen nachgewiesen werden konnte, die 2015 aus Patienten isoliert wurden.

Durch funktionelle Analysen konnte gezeigt werden, dass alle fünf Chi-Proteine in der Lage sind den alternativen und terminalen Komplementweg zu inhibieren. Ebenfalls konnte für die Proteine ChiB, ChiD sowie ChiE nachgewiesen werden, dass die Interaktion mit der Komplementkomponente C5 dosisabhängig verläuft.

Die strukturelle Aufklärung des Proteins ChiB ermöglichte es Aminosäuren zu identifizieren, von denen angenommen wurde, dass sie für die Interaktion mit Komplement eine Rolle spielen könnten. Durch *in vitro* Mutagenese konnten insgesamt fünf verschiedene Varianten von ChiB generiert werden, die jedoch keine Veränderungen in ihrem Komplement-inhibierenden Potential gegenüber dem unveränderten ChiB-Protein aufwiesen. Weder in der Inhibition des alternativen oder des terminalen Komplementweges, noch in der Interaktion mit den untersuchten Komplementkomponenten C3b, C5 und C9.

Weiter konnte gezeigt werden, dass die lytische Aktivität von Humanserum durch Vorinkubation mit ChiB, ChiC, ChiD und ChiE drastisch reduziert werden konnte, sodass Serum-sensible Borrelienzellen in Gegenwart von Komplement überlebten. „Gain-of-function“ *B. garinii*-Transformanten, welche mit dem entsprechendem Chi-kodierenden Gen transformiert wurden, bestätigten die mit den gereinigten Proteinen erhobenen Ergebnisse. So konnte nachgewiesen werden, dass ChiB-, ChiC- oder ChiD-produzierende „Gain-of-function“



*B. garinii* Transformanten, nicht jedoch ChiE- produzierende Zellen, in der Lage waren einen Serum-resistenten Phänotypen auszubilden. Für Transformanten, die zwei-, drei- oder vier Chi-Proteine in verschiedenen Kombinationen gleichzeitig produzierten, konnte allerdings die Fähigkeit in Gegenwart von Humanserum zu überleben nicht bestätigt werden.

Molekulare Analysen mit verschiedenen RF-Borrelienstämmen führten zum Nachweis, dass die fünf Chi-kodierenden Gene bei allen Isolaten vorhanden sind und unter *in vitro* Bedingungen exprimiert werden. Im Gegensatz zu *B. recurrentis* PAbJ, ließ sich das HcpA kodierende Gen in *B. duttonii* LAI nicht nachweisen, jedoch alle dem Chi-Cluster zugehörigen Gene. Bei *B. duttoni* V fehlte das gesamte Chi-Cluster sowie die für CihC- und HcpA-kodierenden Gene. Durch eine Western Blot-Analyse konnte mit spezifischen Antikörpern bestätigt werden, dass die Proteine CihC, HcpA und ChiB in *B. recurrentis* A17 unter *in vitro* Bedingungen produziert wurden.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden durch die Analyse der IgM- und IgG-Immunreaktivitäten der LRF-Patientenserum zwei Proteine identifiziert, CihC und GlpQ, die als potenzielle Antigene für die Serodiagnostik des LRF evaluiert wurden. Eine initiale Evaluierung des IgM Lineblot-Immunoassays zeigte jedoch nur eine geringe Sensitivität für die beiden Antigene, während der IgG Lineblot-Immunoassay eine sehr hohe Sensitivität aufwies. Der ELISA hingegen zeigte bei einer Kombination beider Antigene sehr gute Sensitivitäten und Spezifitäten. Um die starke Hintergrundfärbung bei den Lineblot-Immunoassays, welche eine korrekte Bewertung der Reaktivitäten gegenüber CihC erheblich erschwerten, zu minimieren, wurde ein „Epitop-Mapping“ durchgeführt, um immunogene Regionen innerhalb des CihC-Proteins zu lokalisieren. Eine zweite Evaluierung mit dem immunreaktiven N-terminalen CihC-Fragment CihC-N führte zu einer deutlichen Verbesserung der IgG Lineblot-Immunoassays mit einer Sensitivität von 100 % und einer starken Reduktion der Hintergrundfärbung. Zusätzlich konnte die Sensitivität der IgM-ELISA deutlich verbessert werden. Die Verwendung von CihC-N führte beim IgG-ELISA zur Herabsetzung des Cut-off-Wertes und zu einer besseren Unterscheidung zwischen den positiven LRF-Seren und den verwendeten Kontrollseren. Im Rahmen dieser Arbeit konnten somit zwei serologische *in vitro* Diagnostika entwickelt werden, die als zuverlässige Point-of-Care-Diagnostik in klinischen Studien eingesetzt werden könnten. Zur Steigerung der Sensitivität des IgM-Lineblot-Immunoassays sollten allerdings weiterführende Untersuchungen mit weiteren immunreaktiven Antigenen, wie z.B. den Vmp-Proteinen von *B. recurrentis*, angestrebt werden.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Nakamura S. Spirochete flagella and motility. *biomolecules* 2020; 10(4).
2. Cutler SJ, Moss J, Fukunaga M, Wright DJ, Fekade D, Warrell D. *Borrelia recurrentis* characterization and comparison with relapsing-fever, Lyme-associated, and other *Borrelia* spp. *Int J Syst Bacteriol* 1997; 47(4):958–968.
3. Hougen KH. Electron microscopy of *Borrelia merionesi* and *Borrelia recurrentis*. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol* 1974; 82(6):799–809.
4. Hulínská D, Jirous J, Valesová M, Herzogová J. Ultrastructure of *Borrelia burgdorferi* in tissues of patients with Lyme disease. *J Basic Microbiol* 1989; 29(2):73–83.
5. Fraser GM. Bacterial physiology: The ties that bind. *Nat Microbiol* 2016; 1(10):16192.
6. Bergström S, Zueckert W. Structure, function and biogenesis of the *Borrelia* cell envelope. In: *Borrelia*, molecular biology, host interactions and pathogenesis . Edited by Samuels DS and Radolf JD. Norfolk, UK: Caister Academic Press; 2010. p. 139–166.
7. Takayama K, Rothenberg RJ, Barbour AG. Absence of lipopolysaccharide in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 1987; 55(9):2311–2313.
8. Bessler WG, Cox M, Lex A, Suhr B, Wiesmüller KH, Jung G. Synthetic lipopeptide analogs of bacterial lipoprotein are potent polyclonal activators for murine B lymphocytes. *J Immunol* 1985; 135(3):1900–1905.
9. Eiffert H, Lotter H, Jarecki-Khan K, Thomssen R. Identification of an immunoreactive non-proteinaceous component in *Borrelia burgdorferi*. *Med Microbiol Immunol* 1991; 180(5):229–237.
10. Wheeler CM, Garcia Monco JC, Benach JL, Golightly MG, Habicht GS, Steere AC. Nonprotein antigens of *Borrelia burgdorferi*. *J Infect Dis* 1993; 167(3):665–674.
11. Jones JD, Bourell KW, Norgard MV, Radolf JD. Membrane topology of *Borrelia burgdorferi* and *Treponema pallidum* lipoproteins. *Infect Immun* 1995; 63(7):2424–2434.
12. Radolf JD. Role of outer membrane architecture in immune evasion by *Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi*. *Trends Microbiol* 1994; 2(9):307–311.
13. Walker EM, Borenstein LA, Blanco DR, Miller JN, Lovett MA. Analysis of outer membrane ultrastructure of pathogenic *Treponema* and *Borrelia* species by freeze-fracture electron microscopy. *J Bacteriol* 1991; 173(17):5585–5588.
14. Brandt ME, Riley BS, Radolf JD, Norgard MV. Immunogenic integral membrane proteins of *Borrelia burgdorferi* are lipoproteins. *Infect Immun* 1990; 58(4):983–91.
15. Kraiczky P. Hide and Seek: How lyme disease spirochetes overcome complement attack. *Front Immunol* 2016; 7:385.
16. Haake DA, Yang XF. Spirochetes. In: *Encyclopedia of Microbiology*. Edited by Schmidt TM. Fourth edition. Elsevier, imprint Academic Press, 2019:283–298.
17. Skerman VBD, editor. Approved lists of bacterial names. Washington: American Society for Microbiology; 1989.
18. Takano A, Goka K, Une Y, Shimada Y, Fujita H, Shiino T, Watanabe H, Kawabate H. Isolation and characterization of a novel *Borrelia* group of tick-borne borreliae from imported reptiles and their associated ticks. *Environ Microbiol* 2010; 12(1):134–146.

19. Margos G, Gofton A, Wibberg D, Dangel A, Marosevic D, Loh S-M Oskam C, Fingerle V. The genus *Borrelia* reloaded. PLoS One 2018; 13(12):e0208432.
20. Casjens SR, Mongodin EF, Qiu W-G, Luft BJ, Schutzer SE, Gilcrease EB, Huang WM, Vujadinovic M, Aron JK, Vargas LC, Freeman C, Freeman A, Radune D, Weidman JF, Dimitrov GI, Khouri HM, Sosa JE, Halpin RA, Dunn JJ, Fraser CM. Genome stability of Lyme disease spirochetes: comparative genomics of *Borrelia burgdorferi* plasmids. PLoS One 2012; 7(3):e33280.
21. Marosevic D, Margos G, Wallich R, Wieser A, Sing A, Fingerle V. First insights in the variability of *Borrelia recurrentis* genomes. PLoS Negl Trop Dis 2017; 11(9):e0005865.
22. Miller SC, Porcella SF, Raffel SJ, Schwan TG, Barbour AG. Large linear plasmids of *Borrelia* species that cause relapsing fever. J Bacteriol 2013; 195(16):3629–3639.
23. Elbir H, Abi-Rached L, Pontarotti P, Yoosuf N, Drancourt M. African relapsing Fever *borreliae* genomospecies revealed by comparative genomics. Front Public Health 2014; 2:43.
24. Dobrindt U. Whole genome plasticity in pathogenic bacteria. Current opinion in microbiology 2001; 4(5):550–557.
25. Fraser CM, Casjens S, Huang WM, Sutton GG, Clayton R, Lathigra R, White O, Ketchum KA, Dodson R, Hickey EK, Gwinn M, Dougherty B, Tom JF, Fleischmann RD, Richardson D, Peterson J, Kerlavage AR, Quackenbush J, Salzberg S, Hanson M, van Vugt R, Palmer N, Adams MD, Gocayne J, Weidman J, Utterback T, Watthey L, McDonald L, Artiach P, Bowman C, Garland S, Fuji C, Cotton MD, Horst K, Roberts K, Hatch B, Smith HO, Venter JC. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. Nature 1997; 390(6660):580–586.
26. Adeolu M, Gupta RS. A phylogenomic and molecular marker based proposal for the division of the genus *Borrelia* into two genera: the emended genus *Borrelia* containing only the members of the relapsing fever *Borrelia*, and the genus *Borrelia* gen. nov. containing the members of the Lyme disease *Borrelia* (*Borrelia burgdorferi* sensu lato complex). Antonie Van Leeuwenhoek 2014; 105(6):1049–1072.
27. Hovind-Hougen K. A morphological characterization of *Borrelia anserina*. Microbiology (Reading) 1995; 141 (Pt 1):79–83.
28. Talagrand-Reboul E, Boyer PH, Bergström S, Vial L, Boulanger N. Relapsing fevers: Neglected tick-borne diseases. Front Cell Infect Microbiol 2018; 8:98.
29. Platonov AE, Karan LS, Kolyasnikova NM, Makhneva NA, Toporkova MG, Maleev VV, Fish D, Krause PK. Humans infected with relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia. Emerg Infect Dis 2011; 17(10):1816–1823.
30. Cook GC, Zumla A., Manson P. Manson's Tropical Diseases. Edition Edited by Cook GC and Alimuddin I. 21st Edition. W.B. Saunders, 2003:1153–1161.
31. Nakao R, Kasama K, Boldbaatar B, Ogura Y, Kawabata H, Toyoda A, Hayashi T, Takano A, Maeda K. The evolution of hard tick-borne relapsing fever *borreliae* is correlated with vector species rather than geographical distance. BMC Ecol Evol 2021; 21(1):105.
32. Lescot M, Audic S, Robert C, Nguyen TT, Blanc G, Cutler SJ, Wincker P, Couloux A, Claverie J-M, Raoult D, Drancourt M. The genome of *Borrelia recurrentis*, the agent of deadly louse-borne relapsing fever, is a degraded subset of tick-borne *Borrelia duttonii*. PLoS Genet 2008; 4(9):e1000185.
33. Cutler SJ, Scott JC, Wright DJ. Phylogenetic origins of *Borrelia recurrentis*. International Journal of Medical Microbiology 2008; 298:193–202.

34. Elbir H, Haitham E, Gimenez G, Sokhna C, Bilcha KD, Ali J, Barker SC, Culter SJ, Raoult D, Drancourt M. Multispacer sequence typing relapsing fever *Borreliae* in Africa. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6(6):e1652.
35. Hippocrates, Lloyd GER, Chadwick J, Mann WN. Hippocratic writings. Edited by Lloyd GER. Penguin Random House; 1983.
36. Mac Arthur W. Historical notes on some epidemic diseases associated with jaundice. *Br Med Bull* 1957; 13(2):146–149.
37. Rutton J. A chronological history of the weather and seasons, and of the prevailing diseases in Dublin. Printed for Robinson and Roberts; 1770.
38. Guellil M, Kersten O, Namouchi A, Bauer EL, Derrick M, Jensen AØ, Stenseth NC, Bramanti B. Genomic blueprint of a relapsing fever pathogen in 15th century Scandinavia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018; 115(41):10422–10427.
39. Oumarou Hama H, Barbieri R, Guirou J, Chenal T, Mayer A, Ardagna Y, Signoli M, Aboudharam G, Raoult D, Drancourt M. An outbreak of relapsing fever unmasked by microbial paleoserology, 16th century, France. *Am J Phys Anthropol* 2020; 173(4):784–789.
40. Raoult D, Dutour O, Houhamdi L, Jankauskas R, Fournier P-E, Ardagna Y, Drancourt M, Signoli M, La VD, Macia Y, Aboudharam G. Evidence for louse-transmitted diseases in soldiers of Napoleon's Grand Army in Vilnius. *J Infect Dis* 2006; 193(1):112–120.
41. Craigie D. Notice of a febrile disorder which has prevailed at Edinburgh during the summer of 1843. *Edinb Med Surg J* 1843; 60(157):410–418.
42. Henderson W. On some of the characters which distinguish the fever at present epidemic from typhus fever. *Edinb Med Surg J* 1844; 61(158):201–225.
43. Kligler IJ, Robertson OH. The cultivation and biological characteristics of *Spirochaeta obermeieri* (*recurrentis*). *J Exp Med* 1922; 35(3):303–316.
44. Noguchi H. The pure cultivation of *Spirochaeta duttoni*, *Spirochaeta Kochi*, *Spirochaeta obermeiri*, and *Spirochaeta novyi*. *J Exp Med* 1912; 16(2):199–210.
45. Wright DJM, Maria B. Ich bin ein Berliner\*. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17(4):484–486.
46. Moulton FR. A symposium on relapsing fever in the Americas. Washington, D.C.; 1942. (Publ. Amer. Assoc. Advanc. Sci.).
47. Mackie FP. The part played by *Pediculus corporis* in the transmission of relapsing fever. *Br Med J* 1907; 2(2450):1706–1709.
48. Sangaré AK, Doumbo OK, Raoult D. Management and treatment of human lice. *Biomed Res Int* 2016; 2016:8962685.
49. Bryceson AD, Parry EHO, Perine PL, Warrel DA, Vukotich D, Leithead CS. A clinical and laboratory study of 62 cases in ethiopia and a reconsideration of the literature. *Quarterly Journal of Medicine* 1970; (39):129–170.
50. Candy K, Amanzougaghene N, Izri A, Brun S, Durand R, Louni M, Raoult D, Fenollar F, Mediannikov O. Molecular survey of head and body Lice, *Pediculus humanus*, in France. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2018; 18(5):243–251.
51. Boutellis A, Abi-Rached L, Raoult D. The origin and distribution of human lice in the world. *Infect Genet Evol* 2014; 23:209–217.
52. Ferris GF. Contributions toward a monograph of the sucking lice. Part VII. Stanford University Publications 1933; (Biological Sciences Vol. 2):415–634.

53. Maunder JW. The appreciation of lice. Proceeding of the royal institution of Great Britain 1983; (55):1–31.
54. Boutellis A, Mediannikov O, Bilcha KD, Ali J, Campelo D, Barker SC, Raoult D. *Borrelia recurrentis* in head lice, Ethiopia. *Emerg Infect Dis* 2013; 19(5):796–798.
55. Amanzougaghene N, Akiana J, Mongo Ndombe G, Davoust B, Nsana NS, Parra H-J, Fenollar F, Raoult D, Mediannikov O. Head lice of pygmies reveal the presence of relapsing fever *Borreliae* in the Republic of Congo. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10(12):e0005142.
56. Roux V, Raoult D. Body lice as tools for diagnosis and surveillance of reemerging diseases. *J Clin Microbiol* 1999; 37(3):596–599.
57. Sholdt LL, Holloway ML, Fronk WD. The epidemiology of human pediculosis in Ethiopia. Special Publication, Navy Disease Vector Ecology and Control Center, Naval Air Station, Jacksonville, Florida 1979.
58. Brouqui P. Arthropod-borne diseases associated with political and social disorder. *Annu Rev Entomol* 2011; 56:357–374.
59. Barbour AG. Relapsing fever and other *borrelia* diseases. *Trop Infect Dis Elsevier Inc* 2011; 295–302.
60. Warrell DA. Louse-borne relapsing fever (*Borrelia recurrentis* infection). *Epidemiol Infect* 2019; 147:e106.
61. Cutler SJ. Relapsing fever - a forgotten disease revealed. *J Appl Microbiol* 2010; 108(4):1115–1122.
62. Chikeka I, Dumler JS. Neglected bacterial zoonoses. *Clin Microbiol Infect* 2015; 21(5):404–415.
63. Nordstrand A, Bunikis I, Larsson C, Tsogbe K, Schwan TG, Nilsson M, Bergström S. Tickborne relapsing fever diagnosis obscured by malaria, Togo. *Emerg Infect Dis* 2007; 13(1):117–123.
64. Poulsen LW, Iversen G. Relapsing fever: a differential diagnosis to malaria. *Scand J Infect Dis* 1996; 28(4):419–420.
65. Kisinza WN, McCall PJ, Mitani H, Talbert A, Fukunaga M. A newly identified tick-borne *Borrelia* species and relapsing fever in Tanzania. *Lancet* 2003; 362(9392):1283–1284.
66. Cutler SJ, Abdissa A, Trape J-F. New concepts for the old challenge of African relapsing fever borreliosis. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15(5):400–406.
67. Sundnes K. Epidemic of louse-borne relapsing fever in Ethiopia. *Lancet* 1993; 342(8881):1213–1215.
68. Nordmann T, Feldt T, Bosselmann M, Tufa TB, Lemma G, Holtfreter M, Häussinger D. Outbreak of louse-borne relapsing fever among urban dwellers in Arsi Zone, Central Ethiopia, from July to November 2016. *Am J Trop Med Hyg* 2018; 98(6):1599–1602.
69. Kahlig P, Paris DH, Neumayr A. Louse-borne relapsing fever-A systematic review and analysis of the literature: Part 1-Epidemiology and diagnostic aspects. *PLoS Negl Trop Dis* 2021; 15(3):e0008564.
70. ECDC. Rapid Risk Assessment: Louse-borne relapsing fever in the EU. Stockholm; 2015.
71. Kahlig P, Neumayr A, Paris DH. Louse-borne relapsing fever - A systematic review and analysis of the literature: Part 2 - Mortality, Jarisch-Herxheimer reaction, impact on pregnancy. *PLoS Negl Trop Dis* 2021; 15(3):e0008656.

72. Beveridge CEG. The Louse-borne type of relapsing fever as prevalent in the Anglo-Egyptian Sudan, 1926 and 1927. *Medical Journal of Australia* 1928; 1(4):110–112.
73. Borgnolo G, Hailu B, Ciancarelli A, Almaviva M, Woldemariam T. Louse-borne relapsing fever. A clinical and an epidemiological study of 389 patients in Asella Hospital, Ethiopia. *Trop Geogr Med* 1993; 45(2):66–69.
74. Seboxa T, Rahlenbeck SI. Treatment of louse-borne relapsing fever with low dose penicillin or tetracycline: a clinical trial. *Scand J Infect Dis* 1995; 27(1):29–31.
75. Steen R, Townsend RS. Relapsing Fever in Bulandshahr District. *Ind Med Gaz* 1913; 48(9):338–341.
76. Antinori S, Mediannikov O, Corbellino M, Grande R, Parravicini C, Bestetti G, Longhi E, Ricaboni D, Ehounoud CB, Fenollar F, Raoult D, Rimoldi SG. Louse-borne relapsing fever (*Borrelia recurrentis*) in a Somali refugee arriving in Italy: A re-emerging infection in Europe? *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10(5):e0004522.
77. Oliver MR, Conrad Liles W, Spach DW. Relapsing fever. *Wilderness & Environmental Medicine* 1996; 7(1):46–55.
78. Kirk R. The Epidemiology of Relapsing Fever in the Anglo-Egyptian Sudan. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 1939; 33(2):125–40.
79. Garnham P, Davies CW, Heisch RB, Timms GL. An epidemic of louse-borne relapsing fever in Kenya. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1947; 41(1):141–170.
80. Warrell DA, Pope HM, Parry EH, Perine PL, Bryceson AD. Cardiorespiratory disturbances associated with infective fever in man: studies of Ethiopian louse-borne relapsing fever. *Clin Sci* 1970; 39(1):123–145.
81. Butler T. The Jarisch-Herxheimer reaction after antibiotic treatment of spirochetal infections: A review of recent cases and our understanding of pathogenesis. *Am J Trop Med Hyg* 2017; 96(1):46–52.
82. Cutler SJ, Rudenko N, Golovchenko M, Cramaro WJ, Kirpach J, Savic S, Christova I, Amaro A. Diagnosing borreliosis. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2017; 17(1):2–11.
83. Cadavid D, Barbour AG. Neuroborreliosis during relapsing fever: review of the clinical manifestations, pathology, and treatment of infections in humans and experimental animals. *Clinical Infectious Diseases* 1998; 26(1):151–164.
84. Southern PM, Sanford JP. Relapsing fever: A clinical and microbiological review. *Medicine* 1969; 48, 129–149.
85. Robinson P. Relapsing fever in Addis Ababa. *Br Med J* 1942; 2(4259):216–217.
86. Jakab Á, Kahlig P, Kuenzli E, Neumayr A. Tick borne relapsing fever - a systematic review and analysis of the literature. *PLoS Negl Trop Dis* 2022; 16(2):e0010212.
87. Hovette P, Aubron C, Perrier-Gros-Claude JD, Schieman R, N'Dir MC, Camara P. Intérêt du Quantitative Buffy Coat (QBC) dans la co-infection borréliose-paludisme. *Med Trop (Mars)* 2001; 61(2):196–197.
88. Wieser A, Löscher T, Schunk M, Seilmaier M, Balzer L, Margos G, von Both U, Schulzki T, Kopf S, Hoch M, Sing A, Fingerle V. Rückfallfieber. *Dtsch Med Wochenschr* 2016; 141(14):1009–1013.
89. Felsenfeld O. The problem of relapsing fever in the Americas. *IMS Ind Med Surg* 1973; 42(3):7–10.

90. Jiang J, Temenak JJ, Richards AL. Real-time PCR duplex assay for *Rickettsia prowazekii* and *Borrelia recurrentis*. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 990:302–310.
91. Elbir H, Henry M, Diatta G, Mediannikov O, Sokhna C, Tall A, Socolovschi C, Cutler SJ, Bilcha KD, Ali J, Campelo D, Barker SC, Raoult D, Drancourt M. Multiplex real-time PCR diagnostic of relapsing fevers in Africa. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; 7(1):e2042.
92. Ross A. *Borrelia*, strains, vectors, human and animal borreliosis. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1973; 126(4):565.
93. Schwan TG, Schrumpf ME, Hinnebusch BJ, Anderson DE, Konkel ME. GlpQ: an antigen for serological discrimination between relapsing fever and Lyme borreliosis. *J Clin Microbiol* 1996; 34(10):2483–2492.
94. Porcella SF, Raffel SJ, Schrumpf ME, Schriefer ME, Dennis DT, Schwan TG. Serodiagnosis of louse-borne relapsing fever with glycerophosphodiester phosphodiesterase (GlpQ) from *Borrelia recurrentis*. *J Clin Microbiol* 2000; 38(10):3561–3571.
95. Koetsveld J, Kolyasnikova NM, Wagemakers A, Stukolova OA, Hoornstra D, Sarksyant DS, Toporkova MG, Henningsson AJ, Hvidsten D, Ang W, Dessau R, Platonov AE, Hovius JW. Serodiagnosis of *Borrelia miyamotoi* disease by measuring antibodies against GlpQ and variable major proteins. *Clin Microbiol Infect* 2018; 24(12):1338.e1-1338.e7.
96. Hoch M, Wieser A, Löscher T, Margos G, Pürner F, Zühl J, Steilmaier M, Balzer L, Guggemos W, Rack-Hoch A, von Both U, Hauptvogel K, Schönberger K, Hautmann W, Sing A, Fingerle V. Louse-borne relapsing fever (*Borrelia recurrentis*) diagnosed in 15 refugees from northeast Africa: epidemiology and preventive control measures, Bavaria, Germany, July to October 2015. *Euro Surveill* 2015; 20(42).
97. Leibler JH, Robb K, Joh E, Gaeta JM, Rosenbaum M. Self-reported animal and ectoparasite exposure among urban homeless people. *J Health Care Poor Underserved* 2018; 29(2):664–675.
98. Sasaki T, Kobayashi M, Agui N. Detection of *Bartonella quintana* from body lice (*Anoplura: Pediculidae*) infesting homeless people in Tokyo by molecular technique. *J Med Entomol* 2002; 39(3):427–429.
99. Bonilla DL, Cole-Porse C, Kjemtrup A, Osikowicz L, Kosoy M. Risk factors for human lice and bartonellosis among the homeless, San Francisco, California, USA. *Emerg Infect Dis* 2014; 20(10):1645–1651.
100. Brouqui P, Stein A, Dupont HT, Gallian P, Badiaga S, Rolain JM, Mege JL, La Scola B, Berbis P, Raoult D. Ectoparasitism and vector-borne diseases in 930 homeless people from Marseilles. *Medicine* 2005; 84(1):61–68.
101. Ly TDA, Touré Y, Calloix C, Badiaga S, Raoult D, Tissot-Dupont H, Brouqui P, Gautret P. Changing demographics and prevalence of body lice among homeless persons, Marseille, France. *Emerg Infect Dis* 2017; 23(11):1894–1897.
102. Brouqui P, Raoult D. Arthropod-borne diseases in homeless. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1078:223–235.
103. Cheslock MA, Embers ME. Human Bartonellosis: An underappreciated public health problem? *Trop Med Infect Dis* 2019; 4(2).
104. Leibler JH, Zakhour CM, Gadhoke P, Gaeta JM. Zoonotic and vector-borne infections among urban homeless and marginalized people in the United States and Europe, 1990-2014. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2016; 16(7):435–444.

105. Angelakis E, Diatta G, Abdissa A, Trape J-F, Mediannikov O, Richet H, Raoult D. Altitude-dependent *Bartonella quintana* genotype C in head lice, Ethiopia. *Emerg Infect Dis* 2011; 17(12):2357–2359.
106. Drali R, Shako J-C, Davoust B, Diatta G, Raoult D. A new clade of African body and head lice infected by *Bartonella quintana* and *Yersinia pestis* - Democratic Republic of the Congo. *Am J Trop Med Hyg* 2015; 93(5):990–993.
107. Amanzougaghene N, Fenollar F, Sangaré AK, Sissoko MS, Doumbo OK, Raoult D, Mediannikov O. Detection of bacterial pathogens including potential new species in human head lice from Mali. *PLoS One* 2017; 12(9):e0184621.
108. Boutellis A, Veracx A, Angelakis E, Diatta G, Mediannikov O, Trape J-F, Raoult D. *Bartonella quintana* in head lice from Sénégal. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2012; 12(7):564–567.
109. Diatta G, Mediannikov O, Sokhna C, Bassene H, Socolovschi C, Ratmanov P, Fenollar F, Raoult D. Prevalence of *Bartonella quintana* in patients with fever and head lice from rural areas of Sine-Saloum, Senegal. *Am J Trop Med Hyg* 2014; 91(2):291–293.
110. El Hamzaoui B, Laroche M, Bechah Y, Bérenger JM, Parola P. Testing the competence of *Cimex lectularius* bed bugs for the transmission of *Borrelia recurrentis*, the agent of relapsing fever. *Am J Trop Med Hyg* 2019; 100(6):1407–1412.
111. Tauber AI, Chernyak L. The birth of immunology. II. Metchnikoff and his critics. *Cell Immunol* 1989; 121(2):447–473.
112. Skarnes RC, Watson DW. Antimicrobial factors of normal tissues and fluids. *Bacteriol Rev* 1957; 21(4):273–294.
113. Nesargikar PN, Spiller B, Chavez R. The complement system: history, pathways, cascade and inhibitors. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)* 2012; 2(2):103–111.
114. Morgan BP. *Complement: Clinical aspects and relevance to disease*. London, San Diego: Academic Press; 1990.
115. Kaufmann SHE. Immunology's foundation: the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff. *Nat Immunol* 2008; 9(7):705–712.
116. Zipfel PF, Skerka C. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol* 2009; 9(10):729–740.
117. Köhl J. Self, non-self, and danger: a complementary view. *Adv Exp Med Biol* 2006; 586:71–94.
118. Lambris JD. The multifunctional role of C3, the third component of complement. *Immunology Today* 1988; 9(12):387–393.
119. Zipfel PF, Würzner R, Skerka C. Complement evasion of pathogens: common strategies are shared by diverse organisms. *Mol Immunol* 2007; 44(16):3850–3857.
120. Rooijackers SHM, van Strijp JAG. Bacterial complement evasion. *Mol Immunol* 2007; 44(1-3):23–32.
121. Walport MJ. Complement. First of two parts. *The New England journal of medicine* 2001; 344(14):1058–1066.
122. Walport MJ. Complement. Second of two parts. *The New England journal of medicine* 2001; 344(15):1140–1144.



123. Ogden CA, Elkon KB. Role of complement and other innate immune mechanisms in the removal of apoptotic cells. *Curr Dir Autoimmun* 2006; 9:120–142.
124. Medzhitov R, Janeway CA. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 2002; 296(5566):298–300.
125. Meri S. Self-nonsel self discrimination by the complement system. *FEBS Lett* 2016; 590(15):2418–2434.
126. Zipfel PF, Mihlan M, Skerka C. The alternative pathway of complement: a pattern recognition system. *Adv Exp Med Biol* 2007; 598:80–92.
127. Holers VM. The spectrum of complement alternative pathway-mediated diseases. *Immunol Rev* 2008; 223:300–316.
128. Kemper C, Atkinson JP. T-cell regulation: with complements from innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2007; 7(1):9–18.
129. Trouw LA, Pickering MC, Blom AM. The complement system as a potential therapeutic target in rheumatic disease. *Nat Rev Rheumatol* 2017; 13(9):538–547.
130. Gaboriaud C, Thielens NM, Gregory LA, Rossi V, Fontecilla-Camps JC, Arlaud GJ. Structure and activation of the C1 complex of complement: unraveling the puzzle. *Trends Immunol* 2004; 25(7):368–373.
131. Wallis R, Mitchell DA, Schmid R, Schwaeble WJ, Keeble AH. Paths reunited: Initiation of the classical and lectin pathways of complement activation. *Immunobiology* 2010; 215(1):1–11.
132. Nordahl EA, Rydengård V, Nyberg P, Nitsche DP, Mörgelin M, Malmsten M, Björck L, Schmidtchen A. Activation of the complement system generates antibacterial peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(48):16879–16884.
133. Gros P, Milder FJ, Janssen BJC. Complement driven by conformational changes. *Nat Rev Immunol* 2008; 8(1):48–58.
134. Gál P, Barna L, Kocsis A, Závodszky P. Serine proteases of the classical and lectin pathways: similarities and differences. *Immunobiology* 2007; 212(4-5):267–77.
135. Ward PA. Functions of C5a receptors. *J Mol Med (Berl)* 2009; 87(4):375–378.
136. Chen C-B, Wallis R. Two mechanisms for mannose-binding protein modulation of the activity of its associated serine proteases. *J Biol Chem* 2004; 279(25):26058–26065.
137. Dobó J, Harmat V, Beinrohr L, Sebestyén E, Závodszky P, Gál P. MASP-1, a promiscuous complement protease: structure of its catalytic region reveals the basis of its broad specificity. *J Immunol* 2009; 183(2):1207–1214.
138. Rawal N, Rajagopalan R, Salvi VP. Activation of complement component C5: comparison of C5 convertases of the lectin pathway and the classical pathway of complement. *J Biol Chem* 2008; 283(12):7853–7863.
139. Harboe M, Mollnes TE. The alternative complement pathway revisited. *J Cell Mol Med* 2008; 12(4):1074–1084.
140. Bexborn F, Andersson PO, Chen H, Nilsson B, Ekdahl KN. The tick-over theory revisited: formation and regulation of the soluble alternative complement C3 convertase (C3(H<sub>2</sub>O)Bb). *Mol Immunol* 2008; 45(8):2370–2379.

141. Pangburn MK, Schreiber RD, Müller-Eberhard HJ. Formation of the initial C3 convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3. *J Exp Med* 1981; 154(3):856–867.
142. Pangburn MK, Ferreira VP, Cortes C. Discrimination between host and pathogens by the complement system. *Vaccine* 2008; 26 Suppl 8:115-21.
143. Sahu A, Kozel TR, Pangburn MK. Specificity of the thioester-containing reactive site of human C3 and its significance to complement activation. *Biochem J* 1994; 302 (Pt 2):429–436.
144. Spitzer D, Mitchell LM, Atkinson JP, Hourcade DE. Properdin can initiate complement activation by binding specific target surfaces and providing a platform for de novo convertase assembly. *J Immunol* 2007; 179(4):2600–2608.
145. Fearon DT, Austen KF. Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. *J Exp Med* 1975; 142(4):856–863.
146. Müller-Eberhard HJ. The killer molecule of complement. *J Invest Dermatol* 1985; 85(1 Suppl):47s-52s.
147. Bubeck D. The making of a macromolecular machine: assembly of the membrane attack complex. *Biochemistry* 2014; 53(12):1908–15.
148. Hadders MA, Bubeck D, Roversi P, Hakobyan S, Forneris F, Morgan BP, Pangburn MK, Llorca O, Lea SM, Gros P. Assembly and regulation of the membrane attack complex based on structures of C5b6 and sC5b9. *Cell Rep* 2012; 1(3):200–207.
149. Preissner KT, Podack ER, Müller-Eberhard HJ. The membrane attack complex of complement: relation of C7 to the metastable membrane binding site of the intermediate complex C5b-7. *J Immunol* 1985; 135(1):445–451.
150. Hadders MA, Beringer DX, Gros P. Structure of C8alpha-MACPF reveals mechanism of membrane attack in complement immune defense. *Science* 2007; 317(5844):1552–1554.
151. Bhakdi S, Trantum-Jensen J. Complement lysis: a hole is a hole. *Immunology Today* 1991; 12(9):318–320.
152. Cole DS, Morgan BP. Beyond lysis: how complement influences cell fate. *Clinical science (London, England: 1979)* 2003; 104(5):455–466.
153. Koski CL, Ramm LE, Hammer CH, Mayer MM, Shin ML. Cytolysis of nucleated cells by complement: cell death displays multi-hit characteristics. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80(12):3816–3820.
154. Zipfel PF, Skerka C. FHL-1/reconectin: a human complement and immune regulator with cell-adhesive function. *Immunology Today* 1999; 20(3):135–140.
155. Hourcade DE. Properdin and complement activation: a fresh perspective. *Curr Drug Targets* 2008; 9(2):158–164.
156. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* 2010; 11(9):785–797.
157. Davis AE, Mejia P, Lu F. Biological activities of C1 inhibitor. *Mol Immunol* 2008; 45(16):4057–4063.
158. Blom AM, Villoutreix BO, Dahlbäck B. Complement inhibitor C4b-binding protein-friend or foe in the innate immune system? *Mol Immunol* 2004; 40(18):1333–1346.

159. Beinrohr L, Dobó J, Závodszy P, Gál P. C1, MBL-MASPs and C1-inhibitor: Novel approaches for targeting complement-mediated inflammation. *Trends Mol Med* 2008; 14(12):511–521.
160. Davis AE, Lu F, Mejia P. C1 inhibitor, a multi-functional serine protease inhibitor. *Thromb Haemost* 2010; 104(5):886–893.
161. Schwarz M, Spath L, Lux CA, Paprotka K, Torzewski M, Dersch K, Koch-Brandt C, Husmann M, Bhakdi S. Potential protective role of apoprotein J (clusterin) in atherogenesis: binding to enzymatically modified low-density lipoprotein reduces fatty acid-mediated cytotoxicity. *Thromb Haemost* 2008; 100(1):110–118.
162. Heinen S, Hartmann A, Lauer N, Wiehl U, Dahse H-M, Schirmer S, Gropp K, Enghardt T, Wallich R, Hälbig S, Mihlan M, Schlötzer-Schrehardt U, Zipfel PF, Skerka C. Factor H-related protein 1 (CFHR-1) inhibits complement C5 convertase activity and terminal complex formation. *Blood* 2009; 114(12):2439–2447.
163. Preissner KT, Seiffert D. Role of vitronectin and its receptors in haemostasis and vascular remodeling. *Thrombosis Research* 1998; 89(1):1–21.
164. Zipfel PF, Skerka C. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol* 2009; 9(10):729–740.
165. Nam-Ho C, Toshio M, Motowo T. A serum protein SP40,40 modulates the formation of membrane attack complex of complement on erythrocytes. *Mol Immunol* 1989; 26(9):835–840.
166. Preissner KP, Podack ER, Müller-Eberhard HJ. SC5b-7, SC5b-8 and SC5b-9 complexes of complement: ultrastructure and localization of the S-protein (vitronectin) within the macromolecules. *Eur J Immunol* 1989; 19(1):69–75.
167. Skidgel RA, Erdös EG. Structure and function of human plasma carboxypeptidase N, the anaphylatoxin inactivator. *Int Immunopharmacol* 2007; 7(14):1888–1899.
168. Mueller-Ortiz SL, Wang D, Morales JE, Li L, Chang J-Y, Wetsel RA. Targeted disruption of the gene encoding the murine small subunit of carboxypeptidase N (CPN1) causes susceptibility to C5a anaphylatoxin-mediated shock. *J Immunol* 2009; 182(10):6533–6539.
169. Kim DD, Song W-C. Membrane complement regulatory proteins. *Clin Immunol* 2006; 118(2-3):127–136.
170. Dempsey PW, Allison ME, Akkaraju S, Goodnow CC, Fearon DT. C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science* 1996; 271(5247):348–350.
171. Barbour AG, Hayes SF. Biology of *Borrelia* species. *Microbiological reviews* 1986; 50(4):381–400.
172. McDowell JV, Tran E, Hamilton D, Wolfgang J, Miller K, Marconi RT. Analysis of the ability of spirochete species associated with relapsing fever, avian borreliosis, and epizootic bovine abortion to bind factor H and cleave c3b. *J Clin Microbiol* 2003; 41(8):3905–3910.
173. Hovis KM, McDowell JV, Griffin L, Marconi RT. Identification and characterization of a linear-plasmid-encoded factor H-binding protein (FhbA) of the relapsing fever spirochete *Borrelia hermsii*. *J Bacteriol* 2004; 186(9):2612–2618.
174. Hovis KM, Jones JP, Sadlon T, Raval G, Gordon DL, Marconi RT. Molecular analyses of the interaction of *Borrelia hermsii* FhbA with the complement regulatory proteins factor H and factor H-like protein 1. *Infect Immun* 2006; 74(4):2007–2014.

175. Rossmann E, Kraiczy P, Herzberger P, Skerka C, Kirschfink M, Simon MM, Zipfel PF, Wallich R. Dual binding specificity of a *Borrelia hermsii*-associated complement regulator-acquiring surface protein for factor H and plasminogen discloses a putative virulence factor of relapsing fever spirochetes. *J Immunol* 2007; 178(11):7292–7301.
176. Grosskinsky S, Schott M, Brenner C, Cutler SJ, Kraiczy P, Zipfel PF, Simon MM, Wallich R. *Borrelia recurrentis* employs a novel multifunctional surface protein with anti-complement, anti-opsonic and invasive potential to escape innate immunity. *PLoS One* 2009; 4(3).
177. Grosskinsky S, Schott M, Brenner C, Cutler SJ, Simon MM, Wallich R. Human complement regulators C4b-Binding protein and C1 esterase inhibitor interact with a novel outer surface protein of *Borrelia recurrentis*. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4(6).
178. Schott M, Grosskinsky S, Brenner C, Kraiczy P, Wallich R. Molecular characterization of the interaction of *Borrelia parkeri* and *Borrelia turicatae* with human complement regulators. *Infect Immun* 2010; 78(5):2199–2208.
179. Röttgerding F, Wagemakers A, Koetsveld J, Fingerle V, Kirschfink M, Hovius JW, Wallich R, Kraiczy P. Immune evasion of *Borrelia miyamotoi*: CbiA, a novel outer surface protein exhibiting complement binding and inactivating properties. *Sci Rep* 2017; 7(1):303.
180. Kraiczy P, Würzner R. Complement escape of human pathogenic bacteria by acquisition of complement regulators. *Mol Immunol* 2006; 43(1-2):31–44.
181. Lambris JD, Ricklin D, Geisbrecht BV. Complement evasion by human pathogens. *Nat Rev Microbiol* 2008; 6(2):132–142.
182. Hovingh ES, van den Broek B, Jongerius I. Hijacking Complement regulatory proteins for bacterial immune evasion. *Front Microbiol* 2016; 7:2004.
183. Meri T, Cutler SJ, Blom AM, Meri S, Jokiranta TS. Relapsing fever spirochetes *Borrelia recurrentis* and *B. duttonii* acquire complement regulators C4b-binding protein and factor H. *Infect Immun* 2006; 74(7):4157–4163.
184. Röttgerding F, Kraiczy P. Immune evasion strategies of relapsing fever spirochetes. *Front Immunol* 2020; 11:1560.
185. Nguyen NTT, Röttgerding F, Devraj G, Lin Y-P, Koenigs A, Kraiczy P. The complement binding and inhibitory protein CbiA of *Borrelia miyamotoi* degrades extracellular matrix components by interacting with plasmin(ogen). *Front Cell Infect Microbiol* 2018; 8:23.
186. Barthel D, Schindler S, Zipfel PF. Plasminogen is a complement inhibitor. *J Biol Chem* 2012; 287(22):18831–18842.
187. Barbour AG. Immunobiology of relapsing fever. *Contrib Microbiol Immunol* 1987; 8:125–137.
188. Restrepo BI, Kitten T, Carter CJ, Infante D, Barbour AG. Subtelomeric expression regions of *Borrelia hermsii* linear plasmids are highly polymorphic. *Mol Microbiol* 1992; 6(22):3299–3311.
189. Barbour AG, Tessier SL, Stoenner HG. Variable major proteins of *Borrellia hermsii*. *J Exp Med* 1982; 156(5):1312–1324.
190. Dai Q, Restrepo BI, Porcella SF, Raffel SJ, Schwan TG, Barbour AG. Antigenic variation by *Borrelia hermsii* occurs through recombination between extragenic repetitive elements on linear plasmids. *Mol Microbiol* 2006; 60(6):1329–1343.

191. Coffey EM, Eveland WC. Experimental relapsing fever initiated by *Borrelia hermsii*. II. Sequential appearance of major serotypes in the rat. *J Infect Dis* 1967; 117(1):29–34.
192. Stoenner HG, Dodd T, Larsen C. Antigenic variation of *Borrelia hermsii*. *J Exp Med* 1982; 156(5):1297–1311.
193. Kitten T, Barbour AG. Juxtaposition of expressed variable antigen genes with a conserved telomere in the bacterium *Borrelia hermsii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87(16):6077–6081.
194. Restrepo BI, Carter CJ, Barbour AG. Activation of a vmp pseudogene in *Borrelia hermsii*: an alternate mechanism of antigenic variation during relapsing fever. *Mol Microbiol* 1994; 13(2):287–99.
195. Shamaei-Tousi A, Martin P, Bergh A, Burman N, Brännström T, Bergström S. Erythrocyte-aggregating relapsing fever spirochete *Borrelia crocidurae* induces formation of microemboli. *J Infect Dis* 1999; 180(6):1929–1938.
196. Pennington PM, Cadavid D, Barbour AG. Characterization of VspB of *Borrelia turicatae*, a major outer membrane protein expressed in blood and tissues of mice. *Infect Immun* 1999; 67(9):4637–4645.
197. Hamase A. Homology of variable major protein genes between *Borrelia hermsii* and *Borrelia miyamotoi*. *FEMS Microbiol Lett* 1996; 140(2-3):131–137.
198. Wagemakers A, Koetsveld J, Narasimhan S, Wickel M, Deponte K, Bleijlevens B, Jahfari S, Spring H, Karan LS, Sarksyas DS, van der Poll T, Bockenstedt LK, Bins AD, Platonov AE, Fikrig E, Hovius JW. Variable major proteins as targets for specific antibodies against *Borrelia miyamotoi*. *J Immunol* 2016; 196(10):4185–4195.
199. Vidal V, Scragg IG, Cutler SJ, Rockett KA, Fekade D, Warrell DA, Wright DA, Wright DJ, Kwiatkowski D. Variable major lipoprotein is a principal TNF-inducing factor of louse-borne relapsing fever. *Nat Med* 1998; 4(12):1416–1420.
200. Stone BL, Brissette CA. Host immune evasion by lyme and relapsing fever *Borreliae*: Findings to lead future studies for *Borrelia miyamotoi*. *Front Immunol* 2017; 8:12.
201. Barbour AG, Dai Q, Restrepo BI, Stoenner HG, Frank SA. Pathogen escape from host immunity by a genome program for antigenic variation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(48):18290–18295.
202. Röttgerding F. Funktionelle Charakterisierung verschiedener Lipoproteine aus *Borrelia recurrentis*, dem Erreger des Rückfallfiebers [Masterarbeit]. Frankfurt am Main: Johann Wolfgang Goethe-Universität; 2018.
203. Kraiczy P, Hunfeld K-P, Breitner-Ruddock S, Würzner R, Acker G, Brade V. Comparison of two laboratory methods for the determination of serum resistance in *Borrelia burgdorferi* isolates. *Immunobiology* 2000; 201(3-4):406–419.
204. Cutler SJ, Akintunde CO, Moss J, Fukunaga M, Kurtenbach K, Talbert A, Zhang H, Wright DJ, Warrell DA. Successful in vitro cultivation of *Borrelia duttonii* and its comparison with *Borrelia recurrentis*. *Int J Syst Bacteriol* 1999; 49 Pt 4:1793–1799.
205. Cutler SJ, Fekade D, Hussein K, Knox KA, Melka A, Cann K, Emilianus AR, Warrel DA, Wright DJ. Successful in-vitro cultivation of *Borrelia recurrentis*. *Lancet* 1994; 343(8891):242.
206. Miller JC, El-Hage N, Babb K, Stevenson B. *Borrelia burgdorferi* B31 Erp proteins that are dominant immunoblot antigens of animals infected with isolate B31 are recognized by only a subset of human lyme disease patient sera. *J Clin Microbiol* 2000; 38(4):1569–1574.

207. Miller JC, Stevenson B. Immunological and genetic characterization of *Borrelia burgdorferi* BapA and EppA proteins. *Microbiology (Reading)* 2003; 149(Pt 5):1113–1125.
208. Margos G, Stockmeier S, Hizo-Teufel C, Hepner S, Fish D, Dautel H, Sing A, Dzaferovic E, Rieger M, Jungnick S, Binder K, Straubinger RK, Fingerle V. Long-term in vitro cultivation of *Borrelia miyamotoi*. *Ticks Tick Borne Dis* 2015; 6(2):181–184.
209. Schägger H. Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc* 2006; 1(1):16–22.
210. Cleveland DW, Fischer SG, Kirschner MW, Laemmli UK. Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J Biol Chem* 1977; 252(3):1102–1106.
211. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(5259):680–685.
212. Hammerschmidt C, Klevenhaus Y, Koenigs A, Hallström T, Fingerle V, Skerka C, Pos KM, Zipfel PF, Wallich R, Kraiczy P. BGA66 and BGA71 facilitate complement resistance of *Borrelia bavariensis* by inhibiting assembly of the membrane attack complex. *Mol Microbiol* 2016; 99(2):407–424.
213. Hallström T, Siegel C, Mörgelin M, Kraiczy P, Skerka C, Zipfel PF. CspA from *Borrelia burgdorferi* inhibits the terminal complement pathway. *mBio* 2013; 4(4).
214. Sarma JV, Ward PA. The complement system. *Cell Tissue Res* 2011; 343(1):227–235.
215. Schmidt FL, Sürth V, Berg TK, Lin Y-P, Hovius JW, Kraiczy P. Interaction between *Borrelia miyamotoi* variable major proteins Vlp15/16 and Vlp18 with plasminogen and complement. *Sci Rep* 2021; 11(1):4964.
216. Rollins RE, Wülbern J, Röttgerding F, Nowak TA, Hepner S, Fingerle V, Margos G, Lin Y-P, Kraiczy P, Becker NS. Utilizing Two *Borrelia bavariensis* isolates naturally lacking the PFam54 gene array to elucidate the roles of PFam54-encoded proteins. *Appl Environ Microbiol* 2022; 88(5):e0155521.
217. Siegel C, Schreiber J, Haupt K, Skerka C, Brade V, Simon MM, Stevenson B, Wallich R, Zipfel PF, Kraiczy P. Deciphering the ligand-binding sites in the *Borrelia burgdorferi* complement regulator-acquiring surface protein 2 required for interactions with the human immune regulators factor H and factor H-like protein 1. *J Biol Chem* 2008; 283(50):34855–34863.
218. Siegel C, Hallström T, Skerka C, Eberhardt H, Uzonyi B, Beckhaus T, Karas M, Wallich R, Stevenson B, Zipfel PF, Kraiczy P. Complement factor H-related proteins CFHR2 and CFHR5 represent novel ligands for the infection-associated CRASP proteins of *Borrelia burgdorferi*. *PLoS One* 2010; 5(10):e13519.
219. Hammerschmidt C, Koenigs A, Siegel C, Hallström T, Skerka C, Wallich R, Zipfel PF, Kraiczy P. Versatile roles of CspA orthologs in complement inactivation of serum-resistant Lyme disease spirochetes. *Infect Immun* 2014; 82(1):380–392.
220. Harris EK, Harton MR, Mello Marques MA de, Belisle JT, Molins CR, Breuner N, Wormser GP, Gilmore RD. Immunoproteomic analysis of *Borrelia miyamotoi* for the identification of serodiagnostic antigens. *Sci Rep* 2019; 9(1):16808.
221. Yimer M, Abera B, Mulu W, Bezabih B, Mohammed J. Prevalence, and risk factors of louse-borne relapsing fever in high-risk populations in Bahir Dar city Northwest, Ethiopia. *BMC Res Notes* 2014; 7:615.

222. Yimer M, Mulu W, Ayalew W, Abera B. Louse-borne relapsing fever profile at Felegehiwot referral hospital, Bahir Dar city, Ethiopia: a retrospective study. *BMC Res Notes* 2014; 7:250.
223. Eguale T, Abate G, Balcha F. Relapsing Fever in Hossana, Ethiopia: A Clinical and Epidemiological Study. 1 2002; 12(2).
224. Newman K, Johnson RC. In vivo evidence that an intact lytic complement pathway is not essential for successful removal of circulating *Borrelia turicatae* from mouse blood. *Infect Immun* 1981; 31(1):465–469.
225. Connolly SE, Benach JL. Cutting edge: the spirochetemia of murine relapsing fever is cleared by complement-independent bactericidal antibodies. *J Immunol* 2001; 167(6):3029–3032.
226. Gaud M, Morgan MT. Epidemiological study on relapsing fever in North Africa (1943-1945). *Bull World Health Organ* 1948; 1(1):69–92.
227. Larsson C, Bergström S. A novel and simple method for laboratory diagnosis of relapsing fever borreliosis. *Open Microbiol J* 2008; 2:10–12.
228. Serruto D, Rappuoli R, Scarselli M, Gros P, van Strijp JAG. Molecular mechanisms of complement evasion: learning from *staphylococci* and *meningococci*. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8(6):393–399.
229. Jongerius I, Ram S, Rooijackers S. Bacterial complement escape. *Adv Exp Med Biol* 2009; 666:32–48.
230. Alitalo A, Meri T, Rämö L, Jokiranta TS, Heikkilä T, Seppälä IJ', Viljanen M, Meri S. Complement evasion by *Borrelia burgdorferi*: serum-resistant strains promote C3b inactivation. *Infect Immun* 2001; 69(6):3685–3691.
231. Kraiczy P, Skerka C, Kirschfink M, Brade V, Zipfel PF. Immune evasion of *Borrelia burgdorferi* by acquisition of human complement regulators FHL-1/reconnectin and Factor H. *Eur J Immunol* 2001; 31(6):1674–1684.
232. Rooijackers SHM, van Kessel KPM, van Strijp JAG. *Staphylococcal* innate immune evasion. *Trends Microbiol* 2005; 13(12):596–601.
233. Lopez JE, Schrumph ME, Raffel SJ, Policastro PF, Porcella SF, Schwan TG. Relapsing fever spirochetes retain infectivity after prolonged in vitro cultivation. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2008; 8(6):813–820.
234. Cordes FS, Kraiczy P, Roversi P, Skerka C, Kirschfink M, Simon MM, Brade V, Lowe ED, Zipfel P, Wallich R, Lea SM. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of BbCRASP-1, a complement regulator-acquiring surface protein of *Borrelia burgdorferi*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2004; 60(Pt 5):929–932.
235. Cordes FS, Roversi P, Kraiczy P, Simon MM, Brade V, Jahraus O, Wallis R, Skerka C, Zipfel PF, Wallich R, Lea SM. A novel fold for the factor H-binding protein BbCRASP-1 of *Borrelia burgdorferi*. *Nat Struct Mol Biol* 2005; 12(3):276–277.
236. Kraiczy P, Hanssen-Hübner C, Kitiratschky V, Brenner C, Besier S, Brade V, Simon MM, Skerka C, Roversi P, Lea SM, Stevenson B, Wallich R, Zipfel PF. Mutational analyses of the BbCRASP-1 protein of *Borrelia burgdorferi* identify residues relevant for the architecture and binding of host complement regulators FHL-1 and factor H. *Int J Med Microbiol* 2009; 299(4):255–268.

237. Brangulis K, Akopjana I, Petrovskis I, Kazaks A, Kraiczy P, Tars K. Crystal structure of the membrane attack complex assembly inhibitor BGA71 from the lyme disease agent *Borrelia bavariensis*. *Sci Rep* 2018; 8(1):11286.
238. Kenedy MR, Vuppala SR, Siegel C, Kraiczy P, Akins DR. CspA-mediated binding of human factor H inhibits complement deposition and confers serum resistance in *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 2009; 77(7):2773–2782.
239. Tu AH, Fulgham RL, McCrory MA, Briles DE, Szalai AJ. Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 1999; 67(9):4720–4724.
240. Rooijackers SHM, Ruyken M, Roos A, Daha MR, Presanis JS, Sim RB, van Wamel WJB, van Kessel KPM, van Strijp JAG. Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases. *Nat Immunol* 2005; 6(9):920–927.
241. Kraiczy P, Hellwage J, Skerka C, Becker H, Kirschfink M, Simon MM, Brade V, Zipfel PF, Wallich R. Complement resistance of *Borrelia burgdorferi* correlates with the expression of BbCRASP-1, a novel linear plasmid-encoded surface protein that interacts with human Factor H and FHL-1 and is unrelated to Erp proteins. *J Biol Chem* 2004; 279(4):2421–2429.
242. Hovis KM, Freedman JC, Zhang H, Forbes JL, Marconi RT. Identification of an antiparallel coiled-coil/loop domain required for ligand binding by the *Borrelia hermsii* FhbA protein: additional evidence for the role of FhbA in the host-pathogen interaction. *Infect Immun* 2008; 76(5):2113–2122.
243. Marcinkiewicz AL, Kraiczy P, Lin Y-P. There is a method to the madness: Strategies to study host complement evasion by lyme disease and relapsing fever spirochetes. *Front Microbiol* 2017; 8:328.
244. Walter L, Sürth V, Röttgerding F, Zipfel PF, Fritz-Wolf K, Kraiczy P. Elucidating the immune evasion mechanisms of *Borrelia mayonii*, the causative agent of lyme disease. *Front Immunol* 2019; 10:2722.
245. Sato K, Kumagai Y, Sekizuka T, Kuroda M, Hayashi T, Takano A, Gaowa, Taylor KR, Ohnishi M, Kawabata H. Vitronectin binding protein, BOM1093, confers serum resistance on *Borrelia miyamotoi*. *Sci Rep* 2021; 11(1):5462.
246. Booth CE, Powell-Pierce AD, Skare JT, Garcia BL. *Borrelia miyamotoi* FbpA and FbpB are immunomodulatory outer surface lipoproteins with distinct structures and functions. *Front Immunol* 2022; 13:886733.
247. Garcia BL, Zhi H, Wager B, Höök M, Skare JT. *Borrelia burgdorferi* BBK32 Inhibits the classical pathway by blocking activation of the C1 complement complex. *PLoS Pathog* 2016; 12(1):e1005404.
248. Meri T, Amdahl H, Lehtinen MJ, Hyvärinen S, McDowell JV, Bhattacharjee A, Meri S, Marconi R, Goldman A, Jokiranta TS. Correction: Microbes bind complement inhibitor factor H via a common site. *PLoS Pathog* 2013; 9(4).
249. Herzberger P, Siegel C, Skerka C, Fingerle V, Schulte-Spechtel U, van Dam A, Wilske B, Brade V, Zipfel PF, Wallich R, Kraiczy P. Human pathogenic *Borrelia spielmanii* sp. nov. resists complement-mediated killing by direct binding of immune regulators factor H and factor H-like protein 1. *Infect Immun* 2007; 75(10):4817–4825.
250. Brangulis K, Petrovskis I, Kazaks A, Baumanis V, Tars K. Structural characterization of the *Borrelia burgdorferi* outer surface protein BBA73 implicates dimerization as a functional mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 434(4):848–853.



251. Anguita J, Hedrick MN, Fikrig E. Adaptation of *Borrelia burgdorferi* in the tick and the mammalian host. *FEMS Microbiol Rev* 2003; 27(4):493–504.
252. Iyer R, Caimano MJ, Luthra A, Axline D, Corona A, Iacobas DA, Radolf JD, Schwartz I. Stage-specific global alterations in the transcriptomes of Lyme disease spirochetes during tick feeding and following mammalian host adaptation. *Mol Microbiol* 2015; 95(3):509–538.
253. Samuels DS, Samuels LRN. Gene regulation during the enzootic cycle of the Lyme disease spirochete. *For Immunopathol Dis Therap* 2016; 7(3-4):205–212.
254. Larsson C, Andersson M, Bergström S. Current issues in relapsing fever. *Curr Opin Infect Dis* 2009; 22(5):443–9.
255. Lopez JE, Porcella SF, Schrumph ME, Raffel SJ, Hammer CH, Zhao M, Robinson MA, Schwan TG. Identification of conserved antigens for early serodiagnosis of relapsing fever *Borrelia*. *Microbiology (Reading)* 2009; 155(Pt 8):2641–2651.
256. Jahfari S, Sarkisyan DS, Kolyasnikova NM, Hovius JW, Sprong H, Platonov AE. Evaluation of a serological test for the diagnosis of *Borrelia miyamotoi* disease in Europe. *J Microbiol Methods* 2017; 136:11–16.
257. Tokarz R, Tagliaferro T, Caciula A, Mishra N, Thakkar R, Chauhan LV, Sameroff S, Delaney S, Wormser GP, Marques A, Lipkin WI. Identification of immunoreactive linear epitopes of *Borrelia miyamotoi*. *Ticks Tick Borne Dis* 2020; 11(1):101314.
258. Hovis KM, Schriefer ME, Bahlani S, Marconi RT. Immunological and molecular analyses of the *Borrelia hermsii* factor H and factor H-like protein 1 binding protein, FhbA: demonstration of its utility as a diagnostic marker and epidemiological tool for tick-borne relapsing fever. *Infect Immun* 2006; 74(8):4519–4529.
259. Fotso Fotso A, Drancourt M. Laboratory diagnosis of tick-borne African relapsing fevers: Latest developments. *Front Public Health* 2015; 3:254.
260. Jahfari S, Herremans T, Platonov AE, Kuiper H, Karan LS, Vasilieva O, Koopmans MPG, Hovius JWR, Sprong H. High seroprevalence of *Borrelia miyamotoi* antibodies in forestry workers and individuals suspected of human granulocytic anaplasmosis in the Netherlands. *New Microbes New Infect* 2014; 2(5):144–149.
261. Krause PJ, Narasimhan S, Wormser GP, Rollend L, Fikrig E, Lepore T, Barbour A, Fish D. Human *Borrelia miyamotoi* infection in the United States. *The New England journal of medicine* 2013; 368(3):291–293.
262. Molloy PJ, Telford SR, Chowdri HR, Lepore TJ, Gugliotta JL, Weeks KE, Hewins ME, Goethert HK, Berardi VP. *Borrelia miyamotoi* disease in the northeastern United States: A case series. *Ann Intern Med* 2015; 163(2):91–98.
263. Krause PJ, Narasimhan S, Wormser GP, Barbour AG, Platonov AE, Brancato J, Lepore T, Dardick K, Mamula M, Rollend L, Steeves TK, Diuk-Wasser M, Usmani-Brown S, Williamson P, Sarkisyan DS, Fikrig E, Fish D. *Borrelia miyamotoi* sensu lato seroreactivity and seroprevalence in the northeastern United States. *Emerg Infect Dis* 2014; 20(7):1183–1190.
264. Frank KL, Bundle SF, Kresge ME, Eggers CH, Samuels DS. *aadA* confers streptomycin resistance in *Borrelia burgdorferi*. *J Bacteriol* 2003; 185(22):6723–6727.
265. Groshong AM, Blevins JS. Chapter Two - Insights into the biology of *Borrelia burgdorferi* gained through the application of molecular genetics. In: *Advances in Applied Microbiology*. Edited by Sariaslani S, Gadd GM. Volume 86. Elsevier, Academic Press, 2014:41–143.