

**Die Bedeutung
verschiedener CRASP-Proteine
für die Komplementresistenz
von *Borrelia burgdorferi* s.s.**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von
Corinna Siegel
aus Sebnitz

Frankfurt 2010
(D 30)

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

Dekan: Prof. Dr. A. Starzinski-Powitz

Gutachter: Prof. Dr. V. Müller
Prof. Dr. P. Kraiczy

Datum der Disputation:

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	VIII
I. Einleitung	1
1 Die Multisystemkrankheit Lyme-Borreliose	1
2 Der Überträger <i>Ixodes</i> spp.	2
3 Charakteristika des Erregers <i>B. burgdorferi</i> s.l.	3
3. 1 Taxonomie und Morphologie	4
3. 2 Das Genom	6
3. 3 Genetische Manipulation von <i>B. burgdorferi</i> s.l.	7
4 Das humane Immunsystem	7
4. 1 Das Komplementsystem.....	7
4. 2 Die Faktor H-Proteinfamilie	10
4. 2. 1 Faktor H und FHL-1	11
4. 2. 2 Faktor H verwandte Proteine (CFHRs)	13
5 Komplementevasion von pathogenen Mikroorganismen	14
5. 1 Komplementevasionsstrategien von <i>B. burgdorferi</i> s.l.....	16
5. 2 Eigenschaften von CRASP der humanpathogenen Spezies <i>B. burgdorferi</i> s.s.	17
6 Fragestellung und Zielsetzung	21
II. Material und Methoden	22
1 Organismen, Vektoren, Oligonukleotide, Antikörper	22
1.1 Organismen.....	22
1.2 Vektoren	22
1.3 Starteroligonukleotide.....	24
2 Antikörper, rekombinante Proteine, Humanserum	26
2.1 Antikörper	26
2.2 Rekombinante Proteine	27
2.3 Humanserum.....	27
3 Kulturmedien.....	28
3.1 Kulturmedium für <i>B. burgdorferi</i> s.l.....	28
3.2 Kulturmedium für <i>E. coli</i>	29

4 Kultivierung von Bakterien	30
4.1 Kultivierung von <i>B. burgdorferi</i> s.l.....	30
4.2 Bestimmung der Zellkonzentration von <i>B. burgdorferi</i> s.l.	31
4.3 Kultivierung von <i>E. coli</i>	31
4.4 Bestimmung der Zelldichte von <i>E. coli</i>	31
5 Molekularbiologische Methoden.....	32
5.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>B. burgdorferi</i> s.l.....	32
5.2 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	33
5.3 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung	33
5.4 Aufkonzentration von Plasmid-DNA	33
5.5 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	33
5.6 PCR aus einer Bakterienflüssigkultur	34
5.7 Gelelektrophorese	35
5.7.1 Agarose-Gelelektrophorese	35
5.7.2 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE).....	35
5.8 Aufreinigung von PCR-Fragmenten.....	36
5.9 In vitro-Mutagenese.....	36
5.10 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA	37
5.10.1 Elektroporation von <i>B. garinii</i> G1	37
5.10.2 Transformation von <i>E. coli</i> DH5 α -Zellen mittels CaCl ₂ -Hitzeschock	38
5.10.2.1 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> DH5 α -Zellen	38
5.10.2.2 CaCl ₂ -Hitzeschock-Methode	38
5.11 Southernblot-Analyse	39
5.11.1 DNA-Transfer auf Nylonmembranen mittels Vakuum	39
5.11.2 Hybridisierung immobilisierter DNA mit HRP-markierten Gensonden	40
5.12 Sequenzierung von Plasmid-DNA	40
6 Proteinbiochemische Methoden.....	41
6.1 Herstellung von Zellextrakten von <i>B. burgdorferi</i> s.l.	41
6.2 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	41
6.2.1 Separation von Proteinen in der Tris Tricin-SDS-Gelelektrophorse	41
6.2.2 Separation von Proteinen nach Laemmli	42
6.3 Westernblot- und Ligandenaffinitätsblot-Analyse	42

6.4 Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen	43
6.5 Kolloidale Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen	44
6.6 Massenspektrometrie	45
6.7 Produktion rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	45
6.8 Affinitätschromatographische Aufreinigung rekombinanter Proteine	46
6.9 Konzentrationsbestimmung rekombinanter Proteine	47
7 Immunologische Methoden	47
7.1 Hämolytischer Assay	47
7.2 Immunfluoreszenzmikroskopie	48
8 Spezielle Methoden	49
8.1 Serumadsorption mittels magnetischer Partikel	49
8.2 Serumadsorption	50
8.3 Kofaktor-Assay	52
8.4 Wachstums-Inhibitions-Assay	53
8.5 Protease-Assay	54
9 Chemikalien	55
III. Ergebnisse	56
1 Transformation von <i>B. garinii</i> G1	56
1.1 Herstellung von Vektorkonstrukten mit mutagenisierten <i>cspA</i> -Genen.....	57
1.2 Charakterisierung der verschiedenen CRASP-produzierenden Transformanten von <i>B. garinii</i> G1.....	58
1.3 Charakterisierung der Transformanten hinsichtlich ihres Plasmidprofils und genetische Lokalisation der CRASP-kodierenden Gene	62
1.4 Nachweis der CRASP-Produktion verschiedener Transformanten von <i>B. garinii</i> G1	65
1.5 Nachweis der Oberflächenständigkeit heterolog produzierter CRASP in Borrelientransformanten	67
2 Bedeutung von CRASP-1 und CRASP-2 für die Komplementresistenz von <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.....	70
2.1 Auswirkung der Interaktionspartner von CRASP-1 und CRASP-2 auf die Komplementresistenz von <i>B. garinii</i> G1	70
2.1.1 Identifizierung der Interaktionspartner von CRASP-1 und CRASP-2 aus Humanserum	71

2.1.1.1	Identifizierung von CRASP-1- und CRASP-2-interagierenden Serumproteinen mittels magnetischer Partikel	72
2.1.1.2	Identifizierung der mit CRASP-1 und CRASP-2 interagierenden Proteine mittels Serumadsorption	73
2.1.1.3	Untersuchungen zum Bindungsverhalten von Proteinen der Faktor H-Proteinfamilie an einzelne CRASP von <i>B. burgdorferi</i> s.s. mittels Ligandenaffinitätsblot-Analyse	76
2.1.2	Nachweis der funktionellen Aktivität von Faktor H und FHL-1 nach Bindung an CRASP und deren Auswirkung auf die Komplementresistenz von transformierten <i>B. garinii</i> G1	79
2.1.2.1	Etablierung eines in vitro-Testsystems zum Nachweis der regulatorischen Aktivität von zellgebundenem Faktor H.....	79
2.1.2.2	Nachweis der komplementregulatorischen Aktivität von Faktor H und FHL-1 nach Bindung an CRASP-1- oder CRASP-2-produzierende Transformanten	81
2.1.3	Nachweis aktivierter Komplementkomponenten auf der Zelloberfläche von G1/pCRASP-1 und G1/pCRASP-2	83
2.1.4	Vergleichende Untersuchungen zum Wachstumsverhalten von CRASP-1- und CRASP-2-produzierenden Transformanten in Gegenwart von Komplement	85
2.2	Untersuchungen zur molekularen Interaktion von Faktor H und FHL-1 mit veränderten CRASP-1-Molekülen und deren Auswirkung auf die Komplementresistenz von transformierten Borrelienzellen.....	87
2.2.1	Vergleichende Untersuchungen der veränderten CRASP-1-Moleküle auf die Bindung von Faktor H und FHL-1	88
2.2.2	Auswirkungen veränderter CRASP-1-Moleküle auf die Komplementresistenz der verschiedenen Transformanten.....	90
2.2.2.1	Nachweis der Kofaktoraktivität von Faktor H und FHL-1 nach Bindung an Borrelienzellen mit verändertem CRASP-1	91
2.2.2.2	Untersuchungen zum Wachstumsverhalten von Borrelienzellen mit verändertem CRASP-1 in Gegenwart von Komplement	92

2.2.2.3 Nachweis der Ablagerung von Komplementkomponenten auf der Zelloberfläche der CRASP-1-produzierenden Transformanten	94
2.2.3 CRASP-1 als Komplementregulator.....	95
2.2.3.1 CRASP-1 ist ein Inhibitor des terminalen Komplementkomplexes	95
2.2.3.2 Einfluss von rekombinantem CRASP-1 auf die Komplementresistenz des serumsensitiven Isolates <i>B. garinii</i> G1	98
2.3 Relevanz einzelner Aminosäuren von CRASP-2 für die Bindung der Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1 und dessen Auswirkung auf die Komplementresistenz.....	100
2.3.1 Relevanz einzelner Aminosäuren von CRASP-2 für die Bindung von Faktor H und FHL-1	101
2.3.2 Auswirkungen veränderter CRASP-2 auf die Komplementresistenz transformierter Borrelienzellen.....	104
2.3.2.1 Nachweis abgelagerter Komplementkomponenten auf der Zelloberfläche der CRASP-2-Transformanten	105
2.3.2.2 Vergleichende Untersuchungen zur Komplementempfindlichkeit der CRASP-2-produzierenden Transformanten.....	107
3 Bedeutung von CRASP-3 und CRASP-5 für die Komplementresistenz von <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.....	109
3.1 Identifizierung der mit CRASP-3 und CRASP-5 interagierenden Serumproteinen	109
3.1.1 Identifizierung interagierender Serumproteine durch CRASP-3 und CRASP-5-gekoppelte magnetische Partikel	109
3.1.2 Identifizierung der mit CRASP-3 und CRASP-5 interagierenden Proteine mittels Serumadsorption.....	111
3.1.3 Vergleichende Analysen zum Nachweis der Bindung von Faktor H an CRASP-3 und CRASP-5.....	116
3.1.4 Untersuchungen zur Bindung von CFHR-1 und CFHR-2 an CRASP-3 und CRASP-5.....	117

3.2 Vergleichende Untersuchungen zur Auswirkung der Interaktion von CRASP-3 und CRASP-5 mit verschiedenen Komplementregulatoren auf die Komplementresistenz transformierter Borrelienzellen	120
3.2.1 Nachweis der komplementregulatorischen Aktivität von CRASP-3- und CRASP-5-produzierenden Transformanten	120
3.2.2 Nachweis aktivierter Komplementkomponenten auf der Zelloberfläche transformierter Borrelienzellen	121
3.2.3 Vergleichende Untersuchungen mit verschiedenen Serumkonzentrationen und deren Auswirkung auf das Überleben von G1/pCRASP-5.....	124
3.2.4 Vergleichende Untersuchungen zum Wachstumsverhalten von CRASP-3- und CRASP-5-produzierenden Transformanten in Gegenwart von Komplement	126
IV. Diskussion	128
1 Die Bedeutung der Transformierbarkeit von Borrelien für die Untersuchung von ökologisch und medizinisch relevanten Fragestellungen.....	128
2 Die Bedeutung einzelner CRASP für die Komplementresistenz von <i>B. burgdorferi s.s.</i>	130
2.1 Die Bedeutung von CRASP-1 für die Komplementresistenz	130
2.1.1 Charakteristische Bindungseigenschaften von CRASP-1	130
2.1.2 Die Bedeutung von CRASP-1 für die Komplementregulation mittels Faktor H und FHL-1 für <i>B. burgdorferi s.s.</i>	132
2.1.3 Charakterisierung der Faktor H / FHL-1-Bindungsdomäne von CRASP-1	134
2.1.4 CRASP-1 besitzt eine intrinsische komplementregulatorische Funktion.....	135
2.2 Die Bedeutung von CRASP-2 für die Komplementresistenz	137
2.2.1 Charakteristische Bindungseigenschaften von CRASP-2.....	137
2.2.2 Die Bedeutung von CRASP-2 für die Komplementregulation mittels Faktor H und FHL-1 für <i>B. burgdorferi s.s.</i>	138
2.2.3 Die Charakterisierung der Faktor H / FHL-1-Bindungsdomäne von CRASP-2	140

2.3 Die Bedeutung von CRASP-3 und CRASP-5 für die Komplement- resistenz	142
2.3.1 Charakteristische Bindungseigenschaften von CRASP-3 und CRASP-5	142
2.3.2 Die Bedeutung von CRASP-3 und CRASP-5 für die Komplement- regulation von <i>B. burgdorferi</i> s.s.	147
3 Vergleich des Isolates <i>B. burgdorferi</i> LW2 mit den <i>B. garinii</i> G1-Transformanten	148
4 Die Bedeutung der CRASP im Infektionszyklus und Krankheitsverlauf	150
V. Zusammenfassung.....	156
VI. Literaturverzeichnis	159
VII. Anhang.....	174
Danksagung.....	181

Abkürzungsverzeichnis

A

A	Alanin
AEBSF	4-(2 Aminoethyl)-Benzosulfonyl Fluoride

B

BaCRASP	CRASP von <i>Borrelia afzelii</i>
BbCRASP	CRASP von <i>Borrelia burgdorferi</i> s.s.
BICRASP	CRASP von <i>Borrelia lusitaniae</i>
BsCRASP	CRASP von <i>Borrelia spielmanii</i>
<i>B. burgdorferi</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i>
Bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
<i>B. garinii</i>	<i>Borrelia garinii</i>
BSK-Medium	Barbour-Stoenner-Kelly-Medium

C

C3bBb	C3-Konvertase des alternativen Weges des Komplementsystems
C3bBbC3b	C5-Konvertase des alternativen Weges des Komplementsystems
CD59	Protectin
CFH	Faktor H
CFHR	<i>factor H-related protein</i>
cp	<i>circular plasmid</i>
CR1 / CD35	Komplementrezeptor 1
CRASP	<i>complement regulator acquiring surface protein</i>

D

D	Asparaginsäure
DAF / CD55	zerfallsbeschleunigender Faktor (decay accelerating factor)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate

E

E	Glutaminsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Erp	<i>OspE/F-related protein</i>
EtOH	Ethanol
F	
F	Phenylalanin
FHL-1	Faktor H-ähnliches Protein (<i>factor H-like protein / reconectin</i>)
G	
g	Konstante der relativen Erdbeschleunigung ($g = 9,80655 \text{ m/s}^2$)
H	
H	Histidin
hiNHS	hitzeinaktiviertes NHS
H ₂ O _{demin}	demineralisiertes Wasser
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
I	
iC3b	inaktiviertes Fragment der Komplementkomponente C3
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
K	
K	Lysin
KD	Kilodalton
L	
L	Leucin
lp	<i>linear plasmid</i>
M	
M	Molar
MALDI	Matrix-unterstützte Laserdesorption / Ionisation
MBp	Megabasenpaar(e)
MCP / CD46	Membran-Kofaktor-Protein
mM	Millimolar
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie

N

NHS normales humanes Serum

O

OD Optische Dichte

OspE Oberflächenprotein E

P

PAGE Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PBS *phosphate buffered saline*

PCR Polymerasekettenreaktion

PFGE Pulsfeld-Gelelektrophorese

PMSF Phenylmethylsulfonylfluorid

R

R Arginin

RCA-Gencluster *regulators of complement activation* - Gencluster

rpm Umdrehungen pro Minute

RNase Ribonuklease

Sspp. *species*SCR *short consensus repeat*

SDS Natriumdodecylsulfat

s.l. sensu lato

s.s. sensu stricto

T

TCC terminaler Komplementkomplex

U

(U Eq)/ml Äquivalent von Einheiten pro Milliliter

VVBS *veronal buffered saline*

v/v Volumen pro Volumen

W

w/v Gewicht pro Volumen

Y

Y Tyrosin

I. Einleitung

1 Die Multisystemkrankheit Lyme-Borreliose

Die Lyme-Borreliose stellt die am häufigsten in Europa vorkommende Zoonose dar. Die Prävalenz infizierter Zecken liegt in verschiedenen Regionen zwischen 5 % und 35 % (Nau et al. 2009). Ausschließlich durch den Stich einer infizierten Zecke können Borrelien auf den Menschen übertragen werden, wobei der Übertritt des Erregers erst 24 bis 48 Stunden nach dem Zeckenstich erfolgt (Tilly et al. 2008; Gern 2009). Daher besteht der wirksamste Schutz vor einer Erkrankung durch eine sofortige Entfernung der Zecke.

Der Krankheitsverlauf kann typischerweise in drei Stadien unterteilt werden (Nau et al. 2009). Das häufig auftretende Erythema chronicum migrans, auch Wanderröte genannt, ist eine rötliche, sich zentrifugal ausbreitende Verfärbung der Haut um den Zeckenstich. Dieses Symptom kann einige Tage bis Wochen nach dem Zeckenstich auftreten und kennzeichnet das frühe Stadium bzw. Stadium I einer Lyme-Borreliose. Das Stadium II umfasst den Zeitraum von wenigen Wochen bis sechs Monate nach einem Zeckenstich und beschreibt die ersten Organmanifestationen der Krankheit. Das Bannwarth-Syndrom, welches durch Lähmungen, insbesondere der Gesichts- und Augenmotorik und starken Schmerzen am Rumpf oder den Extremitäten gekennzeichnet ist, ist die am häufigsten auftretende Manifestation. Die chronischen Organmanifestationen im Stadium III sind durch die Ausprägung der Acrodermatitis chronica atrophicans Herxheimer (ACA) und der borrelieninduzierten Lyme-Arthritis gekennzeichnet. Die ACA ist eine chronisch progressive Hauterkrankung, die nach einem entzündlich-ödematösen Verlauf in ein Stadium mit haarloser, pergamentpapierartiger Haut übergeht. Unbehandelt können sich noch Jahre nach dem Zeckenstich schubartig auftretende Gelenkerkrankungen zeigen.

Die Lyme-Borreliose als Infektionskrankheit ist häufig selbstlimitierend. Es wurden nicht selten Fälle von spontanen Heilungen in jeden der drei Stadien beschrieben (Nau et al. 2009). Dennoch ist eine antibiotische Therapie unumgänglich, da sie den klinischen Verlauf und das Auftreten von chronischen Erkrankungen entschieden verringert oder ganz verhindert (Nau et al. 2009).

2 Der Überträger *Ixodes* spp.

Borrelien findet man ausschließlich auf der nördlichen Hemisphäre. Das natürliche Reservoir stellen kleine und große Säugetiere sowie Vögel, seltener Reptilien dar. Dabei lässt sich *B. afzelii*, *B. bavariensis* und *B. burgdorferi* s.s. bevorzugt in kleinen Nagetieren wie Mäusen, Igel und Ratten, *B. garinii* hauptsächlich in Vögeln und *B. spielmanii* fast ausschließlich in Siebenschläfern, Igel und Füchsen nachweisen. Die Übertragung von *B. burgdorferi* s.l. erfolgt durch die Schildzecke *Ixodes* spp. (Rosa et al. 2005). In Europa treten *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. spielmanii* und *B. bavariensis* als Erreger auf. Sie werden durch *Ixodes ricinus*, dem gemeinen Holzbock, und *Ixodes persulcatus*, der Hirschzecke, übertragen.

Schildzecken sind Ektoparasiten und durchlaufen einen Lebenszyklus von drei Entwicklungsstadien (Abb. 1). Für jeden Generationswechsel ist eine Blutmalzeit an Säugetieren, Vögeln oder anderen Wirten nötig. Auch die Entwicklung der Eier im adulten Weibchen erfordert eine Blutmalzeit. Eine Infektion der Zecke mit Borrelien kann in jeden der drei Stadien während des Saugaktes, welcher typischerweise mehrere Tage dauert, erfolgen und begleitet die Zecke ein Leben lang. Die Spirochäten gelangen mit dem Blut des Wirtes in den Mitteldarm der Zecke, adhären an die Darmwand und überdauern die anstehende Häutung der Zecke. Bei der folgenden Blutmalzeit der Zecke kommt es zu einer Vermehrung der Borrelien im Mitteldarm. Schließlich wandert ein Teil der Borrelien in die Speicheldrüsen, welche anschließend beim Saugakt mit dem Speichel der Zecke in das Blut des Wirtes gelangen (Ribeiro et al. 1987; Dunham-Ems et al. 2009).

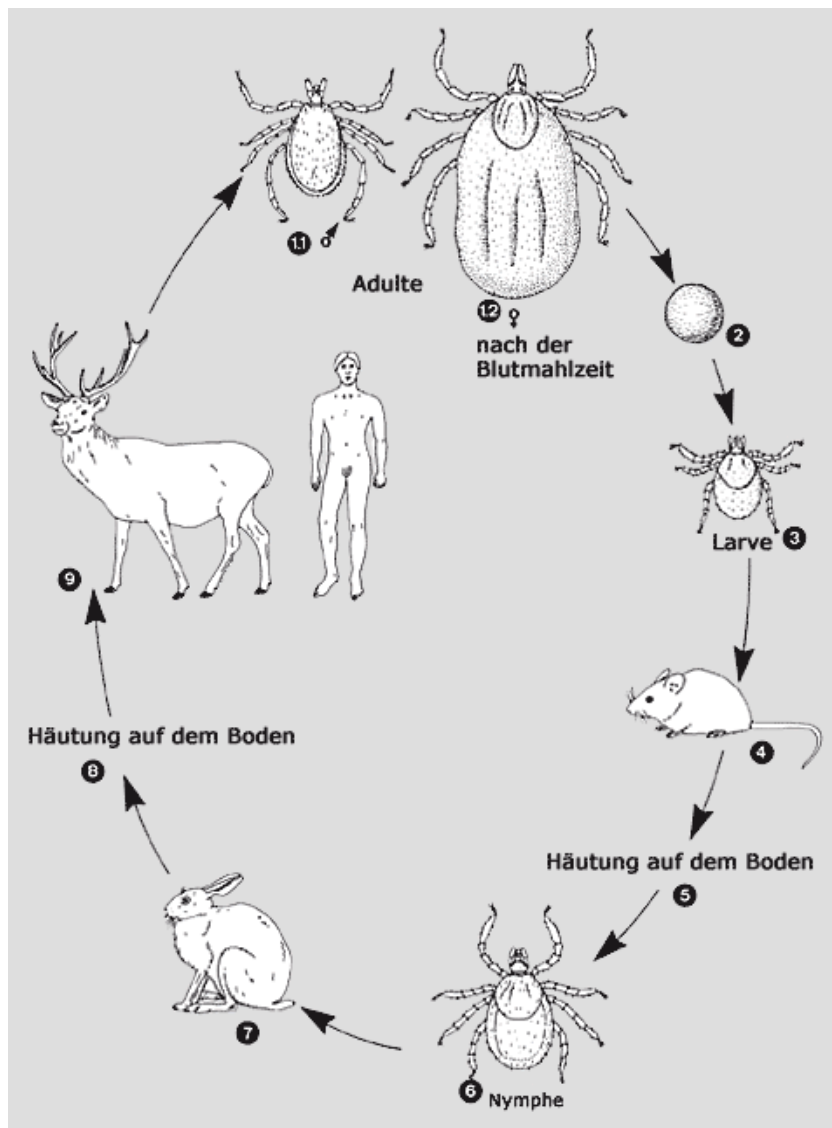


Abb. 1: Entwicklungszyklus von *Ixodes ricinus* (nach Mehlhorn 2008).

Schildzecken durchlaufen einen Lebenszyklus von drei Stadien. Aus dem Ei (2) schlüpft die sechsbeinige Larve (3). Nach der ersten Blutmahlzeit, welche häufig an kleineren Säugetieren oder Vögeln stattfindet (4), folgt die mehrere Wochen andauernde Häutung (5) und Entwicklung zur achtbeinigen Nympe (6). Eine weitere Blutmahlzeit, bevorzugt an kleinen Säugetieren wie Igel, Mäusen, Kaninchen oder Eichhörnchen (7) aber auch am Menschen, führt schließlich zur zweiten Häutung (8) und zur Entwicklung einer geschlechtsreifen, adulten Zecke (1.1, 1.2). Um Eier zu entwickeln benötigt das weibliche Tier eine weitere Blutmahlzeit, welche häufig an größeren Säugetieren (9) stattfindet. Nach der folgenden erfolgreichen Paarung von männlicher (1.1) und weiblicher (1.2) Zecke stirbt das Männchen. Die weibliche Zecke legt einige Wochen später 2000 bis 3000 Eier und stirbt anschließend ebenfalls.

3 Charakteristika des Erregers *B. burgdorferi s.l.*

Die Borreliose kann durch verschiedene Spezies der Gattung *Borrelia* verursacht werden. Dabei fasst der sogenannte *B. burgdorferi s.l.*-Komplex alle Borrelienspezies zusammen, die sich von den Rückfallfieberborrelien taxonomisch abgrenzen lassen

und potentiell Lyme-Borreliose auslösen können (Tab. 1). In den USA handelt es sich dabei vorrangig um *B. burgdorferi* s.s. (Baranton et al. 1992a). In Europa wurden hauptsächlich *B. afzelli*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* s.s., *B. spielmanii* und *B. bavariensis* als Erreger identifiziert (Baranton et al. 1992a; Wilske 2005).

Tab. 1: Geographisches Vorkommen und Pathogenität der verschiedenen *Borrelia* spp.

Spezies	Pathogenität für den Menschen	Geographisches Vorkommen	Referenz
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	ja	USA , Westeuropa	Johnson et al. (1984b)
<i>B. garinii</i>	ja	Europa und Asien	Baranton et al. (1992b)
<i>B. afzelli</i>	ja	Europa und Asien	Canica et al. (1993)
<i>B. spielmanii</i>	ja	Westeuropa	Richter et al. (2006)
<i>B. bavariensis</i>	ja	Westeuropa	Margos et al. (2009)
<i>B. japonica</i>	nicht gesichert	Japan	Marconi et al. (1995)
<i>B. andersonii</i>	nicht gesichert	Nordamerika	Marconi et al. (1995)
<i>B. tanukii</i>	nicht gesichert	Japan	Fukunaga et al. (1996)
<i>B. turdi</i>	nicht gesichert	Japan	Fukunaga et al. (1996)
<i>B. valaisiana</i>	nicht gesichert	Europa	Wang et al. (1997)
<i>B. lusitaniae</i>	nicht gesichert	Europa	Le Fleche et al. (1997)
<i>B. sinica</i>	nicht gesichert	China	Masuzawa et al. (2001)
<i>B. bissettii</i>	nicht gesichert	USA	Postic et al. (1998)
<i>B. californensis</i>	nicht gesichert	USA	Postic et al. (2007)
<i>B. yagtze</i>	nicht gesichert	China	Kurtenbach et al. (2010)
<i>B. americana</i>	nicht gesichert	USA	Kurtenbach et al. (2010)
<i>B. carolinensis</i>	nicht gesichert	USA	Kurtenbach et al. (2010)

Tabelle nach Krupka et al., 2007 verändert

3. 1 Taxonomie und Morphologie

Das Eubakterium *B. burgdorferi* s.l. bildet zusammen mit den Rückfallfieberborrelien, dessen häufigste Vertreter *B. recurrentis*, *B. duttoni* und *B. hermsii* sind, die Gattung *Borrelia*. Mit den ebenfalls humanpathogenen Gattungen *Leptospira*, *Treponema* und *Brachyspira* und den weniger bekannten Gattungen *Brevinema*, *Clevelandina*, *Cristispira*, *Diplocalyx*, *Hollandina*, *Leptonema*, *Pillotina*, *Serpulina* und *Spirochaeta*

gehört sie in die Familie der Spirocheataceae und schließlich in die Ordnung der Spirocheatales (Johnson et al. 1984a).

Das Gram-negative, spiralförmig gewundene Bakterium ist 10 μm – 30 μm lang und 0,2 μm - 0,3 μm breit (Abb. 2A). Der morphologische Aufbau von innen nach außen zeigt den proteoplasmatischen Zylinder, die Peptidoglykanschicht, die Endoflagellen im periplasmatischen Raum, die äußere Membran und eine amorphe, mukoide Schicht, welche auch als S-Layer beschrieben wird (Barbour and Hayes 1986; Rosa et al. 2005; Kudryashev et al. 2009) (Abb. 2B). Die helikale Form der Bakterien wird durch die Flagellen verursacht. Sie befinden sich im periplasmatischen Raum und umwinden linksdrehend den zytoplasmatischen Zylinder über die gesamte Zelllänge wobei sie distal an beiden Polen der Zelle in der Zytoplasmamembran verankert sind (Charon and Goldstein 2002). Die Anzahl an Flagellen, welche häufig in Flagellenbündeln organisiert sind, variiert bei den verschiedenen Spezies zwischen zwei und 14 und korreliert mit der hohen Beweglichkeit der Bakterien (Limberger 2004; Krupka et al. 2007; Kudryashev et al. 2009). Die humanpathogenen Spezies *B. afzelii*, *B. burgdorferi* s.s. und insbesondere *B. garinii* weisen dabei eine hohe Anzahl an Flagellen und eine hohe Beweglichkeit auf (Kudryashev et al. 2009). Die äußere Membran gleicht der von Gram-negativen Bakterien mit dem Unterschied, dass sie keine Lipopolysaccharide, dafür aber einen sehr hohen Gehalt an Lipoproteinen besitzt (Barbour and Hayes 1986). Dieser Unterschied im Aufbau führt schließlich dazu, dass das Bakterium mittels Gram-Färbung nur schwer anfärbbar ist. Geeigneter ist eine Silberfärbung oder eine Giemsa-Färbung.

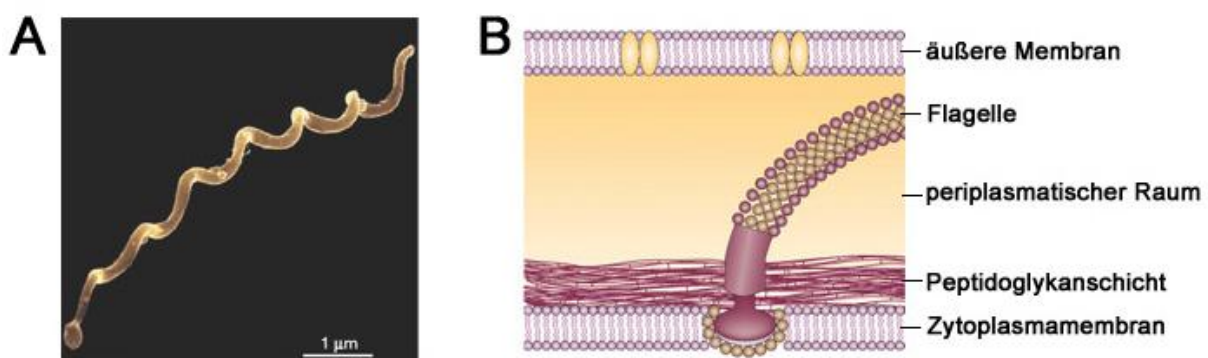


Abb. 2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme (A) und morphologischer Aufbau (B) einer Borrelienzelle (nach Rosa et al. 2005).

3. 2 Das Genom

Das Genom von Borrelien des *B. burgdorferi* s.l.-Komplexes besteht aus einem linearen Chromosom und einer variablen Anzahl an linearen als auch zirkulären Plasmiden (Fraser et al. 1997). Das Chromosom ist im Vergleich zu anderen bakteriellen Chromosomen mit etwa 1 MBp sehr klein und seine lineare Struktur für Bakterien eher ungewöhnlich (Krupka et al. 2007). Die hohe Anzahl an Plasmiden (bis zu 24), die als Einzelkopien vorkommen, findet man bei Bakterien selten (Fraser et al. 1997).

Die 842 chromosomal vorhandenen Gene kodieren vorwiegend für Proteine, welche in die Replikation, die Genexpression, den Metabolismus, den Nährstoff- und Ionentransport, die DNA-Reparatur, die Chemotaxis und die homologe Rekombination involviert sind sowie für Hitzeschockproteine (Krupka et al. 2007). Einige Genprodukte von zirkulären und linearen Plasmiden sind ebenfalls unabdingbar für den natürlichen Infektionszyklus und die Persistenz in den verschiedenen Wirten (Labandeira-Rey et al. 2003; Byram et al. 2004; Jewett et al. 2007). So existieren plasmidkodierende Sequenzen für wesentliche Proteine im Metabolismus und der DNA-Replikation, wie die Nicotinamidase, Elemente des Glucose-Phosphotransferase-Systems oder die Telomerresolvase (Labandeira-Rey and Skare 2001; Labandeira-Rey et al. 2003; Purser et al. 2003; Jewett et al. 2007). Bestimmte Plasmide sind daher für das Überleben des Erregers essentiell und können bei Verlust den Metabolismus oder die Zellteilung stark beeinträchtigen. Deutlich wird die parasitäre Lebensweise durch die geringen metabolischen Möglichkeiten der Borrelien, da Enzymkaskaden für die Herstellung von Aminosäuren, Fettsäuren, Nukleotiden und Kofaktoren als auch Siderophore fehlen oder nur kryptisch vorhanden sind (Posey and Gherardini 2000; Krupka et al. 2007). Die Aufnahme dieser lebenswichtigen Substanzen muss daher über Transportsysteme erfolgen. Des Weiteren fehlen die Enzyme des Citratzyklus und die der oxidativen Phosphorylierung (Fraser et al. 1997). Die Energiegewinnung erfolgt über den Embden-Meyerhoff-Weg, bei dem Glukose, der Hauptenergielieferant für Borrelien, entsprechend der Glykolyse zu Pyruvat und anschließend anaerob zu Laktat metabolisiert wird (Johnson et al. 1984a; Barbour and Hayes 1986; Fraser et al. 1997). Die Energieausbeute ist im Vergleich zur Zellatmung sehr gering. Daher muss verstärkt Glukose aufgenommen, und, um eine

Ansäuerung des Zellinneren zu vermeiden, Laktat in die Umgebung abgegeben oder zu unschädlichen Endprodukten metabolisiert werden.

3. 3 Genetische Manipulation von *B. burgdorferi* s.l.

Die genetische Manipulation der Spirochäten mittels Transformation ist heute ein wichtiges Werkzeug, auch wenn sie nur eine geringe Frequenz und Effizienz aufweist und bis zu mehreren Wochen in Anspruch nimmt (Rosa et al. 2005). Sie gelang erstmals 1994 durch Einbringen eines Gens mittels Elektroporation in *B. burgdorferi* s.s. (Samuels et al. 1994; Samuels 1995). Bis heute ist kein Verfahren zur genetischen Manipulation bekannt, welches eine höhere Ausbeute an Transformanten erzeugt. Im Jahr 2000 wurde der erste Vektor, abstammend von *Lactococcus lactis* entdeckt, der auch in *Borrelia* spp. repliziert (Sartakova et al. 2000). Auf Grund seiner geringen Stabilität in *Borrelia* spp. wird er heute nicht mehr verwendet, und ist durch „Shuttle“-Vektoren, welche von zirkulären Plasmiden von *B. burgdorferi* s.s. abstammen und stabiler in den Zellen exprimiert werden, ersetzt wurden (Stewart et al. 2001; Frank et al. 2003).

4 Das humane Immunsystem

Um den Körper vor eindringenden Mikroorganismen zu schützen ist eine Abwehr durch das humane Immunsystem entscheidend. Das Eindringen von Erregern wird zuerst durch physikalische und biochemische Barrieren wie die Haare, Haut und Schleimhäute, den niedrigen pH-Wert des Magens oder Enzyme im Speichel und Sekreten erschwert. Durchdringen Erreger diese Barrieren wird ihr Vorankommen im Organismus durch angeborene und erworbene Abwehrmechanismen verhindert.

4. 1 Das Komplementsystem

Das Komplementsystem ist Teil des angeborenen Immunsystems des Menschen. Die Aufgaben im menschlichen Körper sind vielfältig und reichen von der Abwehr eingedrungener Mikroorganismen bis hin zur Beseitigung körpereigener apoptotischer und nekrotischer Zellen (Walport 2001b; Walport 2001a). Durch seinen schnellen Angriff und der Lyse körperfremder Zellen zählt es zur „First-line“-Abwehr.

Lösliche Effektor- und Regulatorproteine und membranständige Rezeptorproteine bilden die Komponenten dieses komplexen Systems. Die im Blut gelösten Proenzyme sind in sequentiellen Enzymkaskaden organisiert, welche nach Aktivierung des Systems schließlich zur Lyse von Mikroorganismen führen.

Es sind drei verschiedene Wege der Komplementaktivierung beschrieben, die durch ihre jeweilige Enzymkaskade zur Bildung von C3-Konvertasen auf der Oberfläche angegriffener Zellen und damit zur verstärkten Proteolyse der zentralen Komplementkomponente C3 zu C3a und C3b nahe der Zelloberfläche führen (Walport 2001b) (Abb. 3). C3b bindet verstärkt an die Zelloberfläche der Mikroorganismen. Nach Bildung der C5-Konvertase auf der Oberfläche wird die Komplementkomponente C5 verstärkt zu C5a und C5b gespalten und die Anlagerung des Spaltproduktes C5b an die Zellmembran führt schließlich zur Bildung des terminalen Komplementkomplexes (TCC) durch die Bindung der Komplementkomponenten C6, C7, C8 und C9 (Walport 2001b). Es kommt nach Ausbildung dieses porenbildenden Komplexes zur Perforation und Lyse der Zelle. Gleichzeitig bewirken die Komplementspaltprodukte C3b, inaktiviertes C3b (iC3b) und C5b auf der Zellmembran eine Opsonisierung der zu eliminierenden Zelle (Walport 2001b; Gros et al. 2008). Durch verstärkte Bildung des Spaltproduktes C5a werden Lymphozyten angelockt, welche die opsonisierten Zellen durch Phagozytose eliminieren (Gasque 2004; Zipfel et al. 2006; Rooijackers and van Strijp 2007; Gros et al. 2008; Lambris et al. 2008; Klos et al. 2009). Ebenfalls wirken die Komplementspaltprodukte C3a und C5a als Anaphylatoxine und lösen lokal Entzündungsreaktionen aus (Walport 2001b; Nordahl et al. 2004; Lambris et al. 2008).

Die Aktivierung des Komplementsystems erfolgt über drei Wege: den klassischen Weg, den Lektin-Weg und den alternativen Weg. Der **klassische Weg** stellt eine Verbindung zwischen angeborener und erworbener Immunabwehr dar (Walport 2001a; Zipfel et al. 2006). Er wird durch auf Zelloberflächen gebundene Immunkomplexe aktiviert und ist auf Grund der Abhängigkeit von gebildeten Antikörpern, erst im späteren Verlauf einer Krankheit von Bedeutung (Walport 2001b). Der **Lektin-Weg** wird direkt über die Erkennung von endständigen Zuckergruppen, wie Mannose, Fukose oder N-Acetylglucosamin, auf der

Pathogenoberfläche aktiviert (Pangburn et al. 1977; Walport 2001b; Gros et al. 2008).

Die Aktivierung des Komplementsystems über den **alternativen Weg** ist eine der wichtigsten Strategien des humanen Immunsystems (Abb. 3). Praktisch fortwährend liegt im Serum aktiviertes C3b vor, welches durch spontane Hydrolyse von C3 mit einer geschätzten Rate von 0,005 % pro Minute gebildet wird (Pangburn 1998; Walport 2001b). Dringen Mikroorganismen in das Blut oder die Lymphe ein, erfolgt ein direkter Angriff auf selbige. C3b bindet über eine reaktive Thioestergruppe kovalent an die Zelloberfläche des Mikroorganismus (Gros et al. 2008). Durch die Bindung und Aktivierung von im Blut gelösten Faktor B durch Faktor D entsteht C3bBb, die C3-Konvertase des alternativen Weges. Eine zusätzliche Stabilisierung erfährt sie durch die Anlagerung von Properdin (Lambris et al. 2008). Es kommt zu einer explosionsartigen Spaltung von C3 zu C3a und C3b an der Zelloberfläche, zur Bindung von C3b und zur Bildung weiterer zelloberflächengebundener C3-Konvertasen (Pangburn 1998). Schließlich kommt es zur Bildung der C5-Konvertase C3bBbC3b durch Anlagerung eines weiteren C3b-Moleküls an die C3-Konvertase (Zipfel et al. 2006). Die Komplementkomponente C5 wird zu C5b und dem starken Anaphylatoxin C5a gespalten (Zipfel et al. 2006). C5b lagert sich an die Membranoberfläche an und initiiert die Bildung des terminalen Komplementkomplexes (Zipfel et al. 2006). Die Anlagerung der Komplementkomponenten C6, C7, C8 und schließlich die Assemblierung des TCC durch die Integration von bis zu 15 C9 Komponenten in die Membran führen schließlich zur Perforation der Zelle.

Die Unterscheidung zwischen „Eigen“ und „Fremd“ kann durch die Komponenten der Komplementkaskade nicht erfolgen. Sowohl humane als auch fremde Zellen werden gleichermaßen durch dieses unspezifische System angegriffen. Zum Schutz körpereigener Zellen vor der Schädigung durch aktiviertes Komplement stehen eine Reihe von Regulatorproteinen wie etwa der Komplementrezeptor 1 (CR1 oder CD35), das Membran-Kofaktor-Protein (MCP oder CD46), der zerfallsbeschleunigende Faktor (DAF oder CD55) und CD59 auf der Zelloberfläche zur Verfügung (Zipfel et al. 2006; Lambris et al. 2008). Des Weiteren werden die Zellen durch verschiedene, im Serum gelöste Proteine, wie Faktor H, das Faktor H-ähnliche Protein 1 („factor H-like protein 1“, FHL-1) und CFHR-1, welche zur Faktor H-Proteinfamilie gehören, sowie durch den C1-Inhibitor, das C4b-bindende Protein,

Vitronektin und Clusterin geschützt (Dahlback and Podack 1985; Murphy et al. 1989; Su 1996; Ferreira et al. 2006; Zipfel et al. 2006).

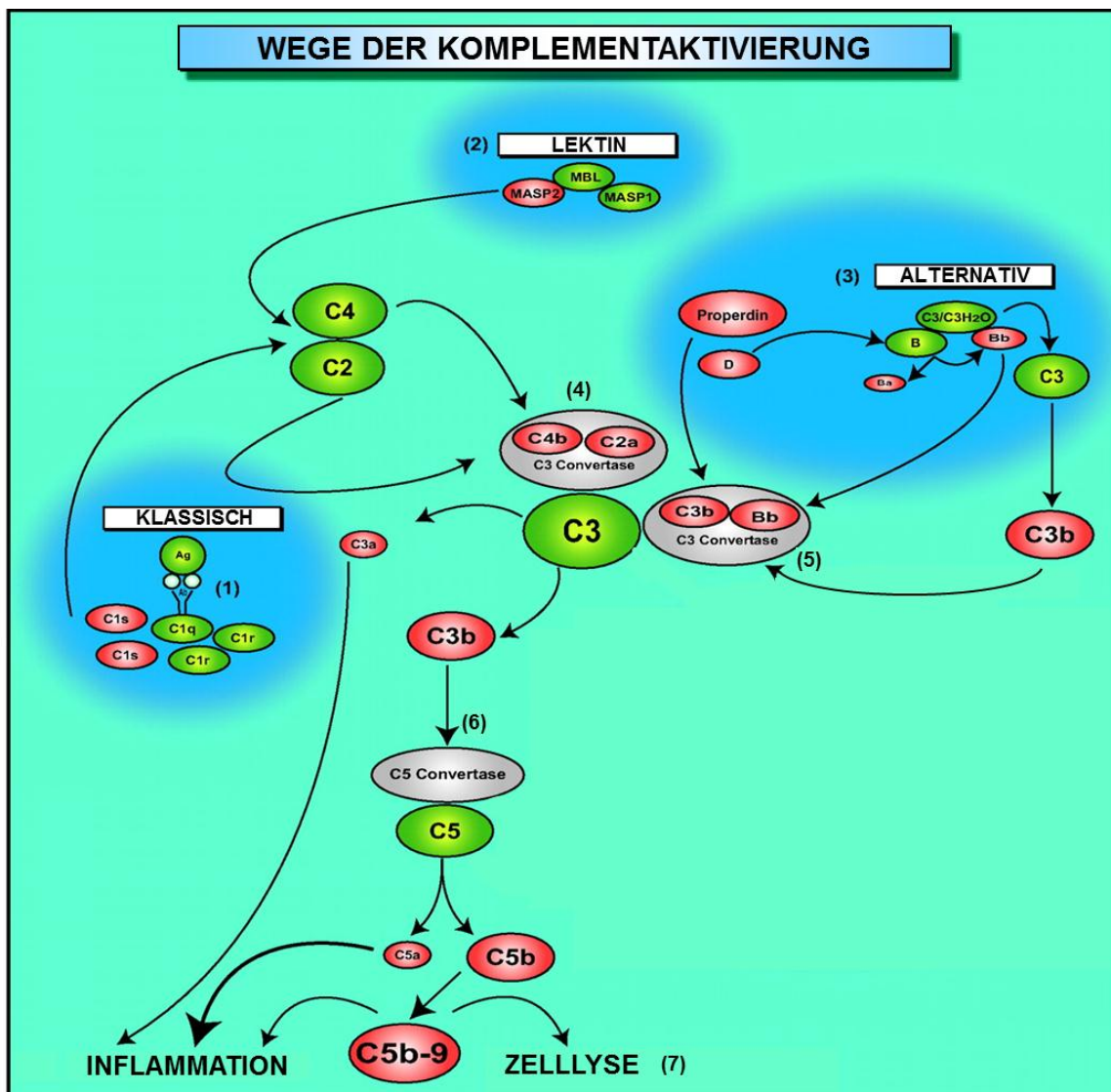


Abb. 3: Schematische Darstellung der Komplementaktivierung über den klassischen Weg, den Lektin-Weg und den alternativen Weg (nach Markiewski and Lambris 2007, verändert).

1: klassischer Weg, 2: Lektin-Weg, 3: alternativer Weg, 4: Bildung der C3-Konvertase des klassischen und des Lektin-Weges, 5: Bildung der C3-Konvertase des alternativen Weges, 6: Bildung der C5-Konvertase, 7: Zellyse durch Bildung des terminalen Komplementkomplexes C5b-9. Ag: Antigen, MASP: MBL-assoziierte Serinprotease, MBL: Mannose-Bindungslektin, D: Faktor D, B: Faktor B, Ba und Bb: Spaltprodukte von Faktor B.

4. 2 Die Faktor H-Proteinfamilie

Die Mitglieder der Faktor H-Proteinfamilie sind Komplementregulatoren des alternativen und terminalen Weges. Besondere Bedeutung erhalten diese Glykoproteine durch ihre Eigenschaft im Serum gelöst vorzuliegen und daher nahezu

überall regulierend eingreifen zu können. Der Schutz einiger humaner Zellen und epithelialer Gewebe, wie z.B. Erythrozyten und die Membranen von Glomeruli wird fast ausschließlich durch diese Proteine bewirkt, so dass Mutationen oder andere Gendefekte im RCA-Gencluster schwere angeborene Krankheiten, wie z.B. das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS), die membranproliferative Glomerulonephritis (MPGN) oder die altersbedingte Makulardegeneration (AMD), verursachen können (Ferreira et al. 2006; Zipfel et al. 2006).

Die Faktor H-Proteinfamilie umfasst sieben distinkte Proteine. Das wohl am besten untersuchte Mitglied stellt Faktor H (CFH) dar, welches auch namensgebend für die gesamte Proteinfamilie ist. Weitere Mitglieder sind FHL-1 und fünf Faktor H-verwandte Proteine („factor H-related proteins“, CFHR-1 – CFHR-5) (Estaller et al. 1991; Sim et al. 1993; McRae et al. 2001; Zipfel et al. 2002). Die kodierenden Gene sind im RCA-Gencluster auf Chromosom 1q32 lokalisiert (Hellwage et al. 1997; Diaz-Guillen et al. 1999; Zipfel et al. 1999; Male et al. 2000; Hellwage et al. 2002; McRae et al. 2002; Heinen et al. 2006; Józsi and Zipfel 2008). Alle Proteine, die zur Faktor H-Proteinfamilie gehören, werden in der Leber synthetisiert und meist als glykosylierte Form ins Blut abgegeben (Zipfel et al. 1999).

4. 2. 1 Faktor H und FHL-1

Faktor H ist mit 150 KD das, von der molaren Masse her gesehen, schwerste der sieben zur Familie gehörenden Proteine und ist im Blut in einer Konzentration von 500 µg / ml enthalten (Zipfel et al. 1999). Es besteht aus 20 globulären Proteindomänen, welche auch als „short consensus repeats“ oder SCRs bezeichnet werden (Zipfel et al. 1999). Verschiedenen SCRs werden unterschiedliche Funktionen zugeschrieben (Abb. 4). In den vier N-terminalen SCRs ist die komplementregulatorische Aktivität von Faktor H lokalisiert. Die regulatorische Aktivität (Kofaktoraktivität) von Faktor H, gelöst im Serum oder an Zelloberflächen gebunden, führt zusammen mit Faktor I zur Inaktivierung und Spaltung von C3b in die Spaltprodukte C3c, C3f und dem membrangebundenen Teil C3dg (Whaley and Ruddy 1976; Pangburn et al. 1977). Die SCRs 1-4, 6-8, 12-15 und 19-20 sind an der Bindung von C3b und deren Spaltprodukten beteiligt (Jokiranta et al. 2000; Józsi and Zipfel 2008). Das membrangebundene C3dg bewirkt eine verstärkte Anlagerung und

Polymerisation von Faktor H-Molekülen an der Zelloberfläche und bietet damit einen größeren Schutz für die Zelle (Okemefuna et al. 2009). Gleichzeitig verhindert Faktor H die Neubildung der C3-Konvertase und führt zu einem verstärkten Zerfall der bereits bestehenden C3-Konvertasen, was als zerfallsbeschleunigende Aktivität oder „decay accelerating activity“ bezeichnet wird (Whaley and Ruddy 1976; Pangburn et al. 1977). Dadurch wird eine verstärkte Spaltung weiterer C3-Moleküle durch die C3-Konvertase unterbunden. Beide Aktivitäten führen zu einem Abbruch der Komplementkaskade auf der Stufe von C3. Die Bindung an humane Zellen wird bevorzugt durch die SCRs 19-20 aber auch über SCR 7, 9, 12-13 und 15 vermittelt (Meri and Pangburn 1994; Blackmore et al. 1996; Blackmore et al. 1998; Ormsby et al. 2006). Sie enthalten Bindungsstellen, welche polyanionische Oberflächen, vor allem Sialinsäuren und sulfatierte Polysaccharide wie Heparin erkennen, welche auf humanen Zellen vorkommen oder gebunden werden (Meri and Pangburn 1990; Ferreira et al. 2006; Schmidt et al. 2008).

FHL-1 resultiert aus einem alternativen Spleißungsprozeß der Faktor H-mRNA und besteht aus den sieben N-terminalen SCRs des Faktor H-Moleküls und den zusätzlichen Aminosäuren Serin, Phenylalanin, Threonin und Leucin am C-Terminus (Estaller et al. 1991; Timmann et al. 1991; Zipfel et al. 1999). Das 42 KD schwere Protein ist im Blut in einer Konzentration von 10 – 50 µg / ml vorhanden (Zipfel et al. 2002). Auf Grund der Ähnlichkeit zu Faktor H verfügt FHL-1 ebenfalls über Kofaktoraktivität und inhibiert die Komplementaktivierung auf der Stufe von C3 (Abb. 4) (Zipfel et al. 1999). Dennoch ist die regulatorische Aktivität, gemessen an Faktor H, um das Vierfache geringer (Kraiczky et al. 2003; Hartmann et al. 2006).

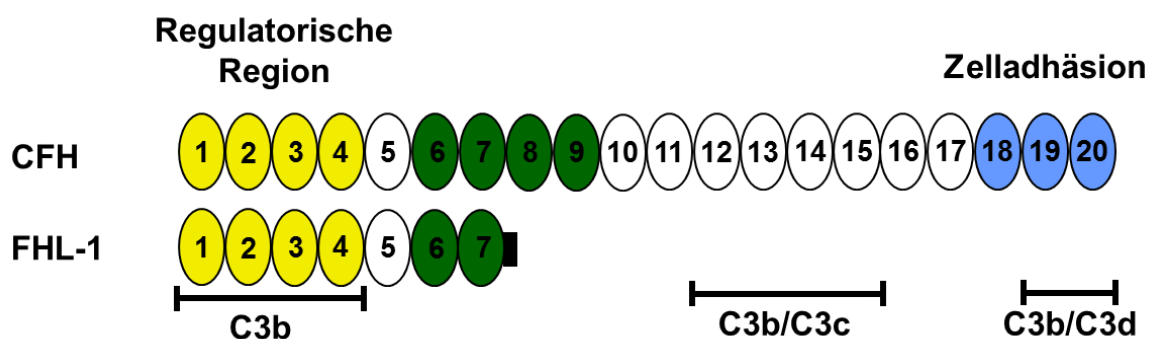


Abb. 4: Schematische Darstellung der Komplementregulatoren Faktor H (CFH) und FHL-1 mit ihren funktionellen SCR-Domänen (nach Józsi and Zipfel 2008, verändert).

SCR-Domänen mit wichtigen Funktionen sind farblich hervorgehoben: komplementregulatorische Region (gelb), Bindung an mikrobiellen Oberflächen (grün), Zelladhäsion (blau).

4. 2. 2 Faktor H verwandte Proteine (CFHRs)

Die fünf Faktor H verwandten Proteine CFHR-1, CFHR-2, CFHR-3, CFHR-4 und CFHR-5 ähneln in ihrer Struktur Faktor H. Sie besitzen vier bis neun globuläre SCRs, die eine hohe Identität insbesondere zu den C-terminalen SCRs von Faktor H aufweisen (Zipfel et al. 1999; Zipfel et al. 2002). Da der C-Terminus von Faktor H vor allem für die Erkennung und Bindung an humane Oberflächen verantwortlich ist, scheinen CFHR-Proteine in gleicher Weise an Zellen zu binden. Ebenfalls wurde, zumindest für CFHR-1, eine Funktion bei der Regulation der Komplementkaskade beschrieben (Heinen et al. 2009). Im Blut kommen sie gelöst, aber auch mit Lipoproteinpartikeln (Lipoproteins) assoziiert vor (Park and Wright 1996; McRae et al. 2005; Józsi and Zipfel 2008).

Das 34 KD bzw. 37 KD schwere CFHR-1 besteht aus fünf SCRs (Estaller et al. 1991; Skerka et al. 1991). Die zwei unterschiedlichen molaren Massen sind auf unterschiedliche Glykosylierungsmuster zurückzuführen (Estaller et al. 1991; Skerka et al. 1991). Im Blut ist CFHR-1 in einer Konzentration von 50 – 100 µg / ml vorhanden (Józsi and Zipfel 2008). Auf Grund der fast 100 %igen Identität der drei C-terminalen SCRs zu SCR18, SCR19 und SCR20 von Faktor H wird hier ein Mechanismus der Feinregulation der Komplementkaskade durch Verdrängung von Faktor H von der Zelloberfläche diskutiert (Zipfel et al. 1999; Józsi and Zipfel 2008). Weiterhin stellt CFHR-1 ein Regulatorprotein des terminalen Komplementweges dar, da dieses Protein die C5-Konvertase inhibiert und damit die Assemblierung des terminalen Komplementkomplexes verhindert (Heinen et al. 2009).

CFHR-2 ist mit den unterschiedlich glykosylierten Formen von 24 KD und 29 KD das leichteste der Faktor H verwandten Proteine (Skerka et al. 1992; Zipfel et al. 1999). Es besteht aus vier SCRs, wobei die zwei C-terminalen SCRs eine hohe Identität zu SCR19 und SCR20 von Faktor H aufweisen (Skerka et al. 1992; Zipfel et al. 1999). Inwieweit CFHR-2 über eine komplementregulatorische Funktion verfügt ist bisher nicht bekannt. Trotzdem wird auf Grund der hohen Ähnlichkeit zu Faktor H eine regulierende Funktion diskutiert.

Die unterschiedlich glykosylierten Moleküle von CFHR-3 besitzen eine molare Masse von 36 KD bis 50 KD. Es besteht aus fünf SCRs, wobei hier eine hohe Identität der drei N-terminalen SCRs zu SCR6, SCR7 und SCR8 von Faktor H besteht. CFHR-3

bindet C3b, C3d und Heparin und verstärkt die Kofaktoraktivität von Faktor H (Józsi and Zipfel 2008).

CFHR-4 kommt in zwei unterschiedlichen Spleißvarianten, CFHR-4A und CFHR-4B, im Blut vor (Józsi and Zipfel 2008). CFHR-4A mit neun SCRs und 86 KD ist das schwerste der Faktor H verwandten Proteine. CFHR-4B besteht aus fünf SCRs und besitzt eine molare Masse von 42 KD. Es bindet wie CFHR-3 C3b und C3d und unterstützt die Kofaktoraktivität von Faktor H (Józsi and Zipfel 2008).

Das 63 KD schwere CFHR-5 besteht aus neun Domänen (McRae et al. 2001). Neben den hohen Identitäten im N-terminalen Teil zu SCR6 und SCR7 von Faktor H und im C-terminalen Teil zu SCR19-20 von Faktor H besitzt das Protein einen Mittelteil von fünf SCRs, welche in ihrer Aminosäuresequenz stark den SCRs 10 bis 14 von Faktor H ähneln (Skerka and Zipfel 2008). Damit ist es das strukturell vielfältigste Faktor H verwandte Protein. Die Konzentration im Blut beträgt 3 - 6 µg / ml (McRae et al. 2005). Es bindet C3b und Heparin und besitzt im Vergleich zu Faktor H eine deutlich verminderte Kofaktoraktivität als auch eine zerfallsbeschleunigende Aktivität (McRae et al. 2005).

5 Komplementevasion von pathogenen Mikroorganismen

Das Komplementsystem stellt eine der ersten Barrieren des Immunsystems für in den Menschen eingedrungene Erreger dar. Um sich vor diesem unspezifischen Abwehrsystem zu schützen, haben Mikroorganismen vielfältige Strategien entwickelt. Insbesondere Bakterien, wie Gruppe A Streptokokken, *Serratia marcescens* und *Pseudomonas aeruginosa*, besitzen Proteasen, welche durch die Spaltung der Komplementkomponenten C1q, C3 oder C5a zu nicht funktionellen Fragmenten den Angriff des Komplements abwähren (Kraiczky and Wurzner 2006; Lambris et al. 2008). Eine direkte Interaktion von bakteriellen Proteinen mit Molekülen des Komplementsystems ist ebenfalls eine Möglichkeit, das Komplementsystem zu regulieren. Der nosokomiale Erreger *S. aureus*, Pneumokokken als auch Herpes Virus und Parasiten wie Schistosomen und Trypanosomen besitzen inhibitorische Proteine, welche die Ausbildung der C3-Konvertase des klassischen Weges oder die Einlagerung des terminalen Komplementkomplexes in die Membran verhindern (Ren et al. 2004; Lambris et al. 2008). Gruppe A Streptokokken als auch *S. aureus*

besitzen Proteine, welche mit dem iC3b erkennenden Komplementrezeptor CR3 und dem C5a erkennenden Rezeptor C5aR auf Neutrophilen interagieren und damit die Neutrophilenantwort zur Phagozytose stark abschwächen (Rooijackers and van Strijp 2007). Eine weitere von Pathogenen entwickelte Strategie der Immunevasion ist die Bindung von komplementregulierenden, nicht-bakteriellen Proteinen. Insbesondere werden wirtseigene Komplementregulatoren der flüssigen Phase wie die Regulatoren des alternativen Weges Faktor H und FHL-1 sowie der Regulator des klassischen Weges, das C4-bindende Protein an die Erregeroberfläche gebunden. Da diese Regulatorproteine vom Wirt selbst zur Regulation des Komplementsystems genutzt werden, sind sie immer im ausreichenden Maße im Wirt vorhanden und besitzen die schützende Aktivität vor komplementvermittelnder Lyse. Bakterielle Erreger wie *Haemophilus influenzae*, Sepsis-hervorrufende Streptokokken und Pneumokokken, Gonokokken, der Durchfallerreger *Yersinia enterocolitica*, der Keuchhustenerreger *Bordetella pertussis* oder Rückfallfieberborrelien sowie der Erreger der Lyme-Borreliose *B. burgdorferi* s.l. aber auch Pilze wie *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, Viren wie das HI-Virus oder Parasiten wie *Ecchinococcus* spp. bedienen sich dieser Strategie, um die Komplementaktivierung direkt auf ihrer Oberfläche zu unterbinden (China et al. 1993; Thern et al. 1995; Stoiber et al. 1996; Diaz et al. 1997; Berggard et al. 2001a; Berggard et al. 2001b; Kraiczy et al. 2001c; Blom 2002; Meri et al. 2002; McDowell et al. 2003; Hovis et al. 2004; Jarva et al. 2004; Hallstrom et al. 2008). Die Bindung der wirtseigenen Regulatorproteine erfolgt meist über erregerspezifische, auf der Zelloberfläche lokalisierte Bindeproteine. Aber auch Pili wie bei den Gonokokken oder eine mit Sialinsäuren bedeckte Bakterienoberfläche durch etwa Lipopolysaccharide bei *Neisseria meningitidis* oder der Polysaccharidkapsel bei den Gruppe B-Streptokokken und Pneumokokken sind als interagierende Strukturen beschrieben (Blom et al. 2001; Schneider et al. 2006). Nicht jeder Erreger besitzt die Möglichkeit alle Mechanismen zu nutzen und nicht für jeden Erreger ist jeder Mechanismus sinnvoll. Dennoch gibt es Pathogene, die verschiedene Strategien kombinieren, um sich wirkungsvoll vor dem Komplementsystem zu schützen.

5. 1 Komplementevasionsstrategien von *B. burgdorferi* s.l.

Über den aktiven Saugakt der Zecke gelangen Borrelien in die Blutbahn des Wirts und werden dort sofort mit den Komponenten des Komplementsystems konfrontiert. Spirochäten verweilen nur für eine kurze Zeit im Blut des infizierten Wirts bis sie in benachbartes Gewebe eindringen und sich so dem Immunsystem entziehen. Allerdings ist die Eigenschaft „Komplementresistenz“ für das Überleben des Bakteriums während der initialen Phase der Infektion des Wirtes sowie für die Dissemination als auch für den Bestand im Reservoirwirt unabdingbar.

B. burgdorferi s.l. umfasst unterschiedliche humanpathogene Spezies, deren Isolate ein unterschiedliches Verhalten in Anwesenheit von humanen Komplement aufweisen. Sie werden als komplementresistent, intermediär komplementresistent, und komplementsensitiv bezeichnet (Breitner-Ruddock et al. 1997; van Dam et al. 1997; Kraiczy et al. 2000). In Gegenwart von humanem Serum zeigen die meisten Isolate der Genospezies *B. afzelii*, *B. spielmanii* und *B. bavariensis* einen komplementresistenten Phänotyp. Isolate der Genospezies *B. garinii* weisen dagegen einen komplementsensitiven Phänotyp auf. *B. burgdorferi* s.s.-Isolate überleben meist zu 50% in Anwesenheit von humanen Komplement, so dass von einem intermediär komplementresistenten Phänotyp gesprochen wird.

Die Resistenz von Borrelien gegenüber Komplement ist hauptsächlich auf die Interaktion mit den Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1 zurückzuführen (Abb. 5) (Kraiczy et al., 2001). Die intermediär komplementresistenten und komplementresistenten Isolate von *B. burgdorferi* s.s. und *B. afzelii* weisen bis zu fünf verschiedene interagierende Oberflächenproteine auf, welche als Complement Regulator Acquiring Surface Proteins oder CRASPs bezeichnet werden (Kraiczy et al. 2001a). Diese werden in Abhängigkeit ihrer Bindungseigenschaften in drei Gruppen unterteilt (Hellwage et al. 2001; Kraiczy et al. 2001a; Alitalo et al. 2002; Kraiczy et al. 2002b; Stevenson et al. 2002). Gruppe I umfasst die Proteine, die mit Faktor H und FHL-1 interagieren, wie z.B. BaCRASP-1, BbCRASP-1, BsCRASP-1 sowie BaCRASP-2 und BbCRASP-2. CRASP-1-homologe Proteine kommen in allen komplementresistenten Spezies vor, so dass diesem Protein eine besondere Bedeutung für die Komplementresistenz zugesprochen wird (Wallich et al. 2006). Gruppe II bildet das FHL-1-bindende Protein BaCRASP-3. In Gruppe III gehören die Faktor H- und CFHR-1-bindenden Proteine BbCRASP-3 /ErpP, BbCRASP-4 / ErpC,

BbCRASP-5 / ErpA, BaCRASP-4, BaCRASP-5, BsCRASP-3, BICRASP-3, sowie OspE und p21. (Alitalo et al. 2004; Haupt et al. 2007; Haupt et al. 2008a; Dieterich et al. 2010).

Einen weiteren Schutz vor Komplement bieten zahlreiche, immunomodulatorische und komplementregulative Proteine, welche mit dem Speichel der Zecke beim Saugakt ins Blut injiziert werden (Ribeiro 1987; Embers et al. 2004; Daix et al. 2007; Tyson et al. 2007). Des Weiteren wird diskutiert, ob Borrelien bei Mangelernährung oder während einer Antibiotikatherapie zystische, pleiomorphe Überdauerungsformen bilden, welche ebenfalls vor der komplementvermittelten Lyse geschützt sein könnten (Murgia et al. 2002; Embers et al. 2004; Brorson and Brorson 2006).

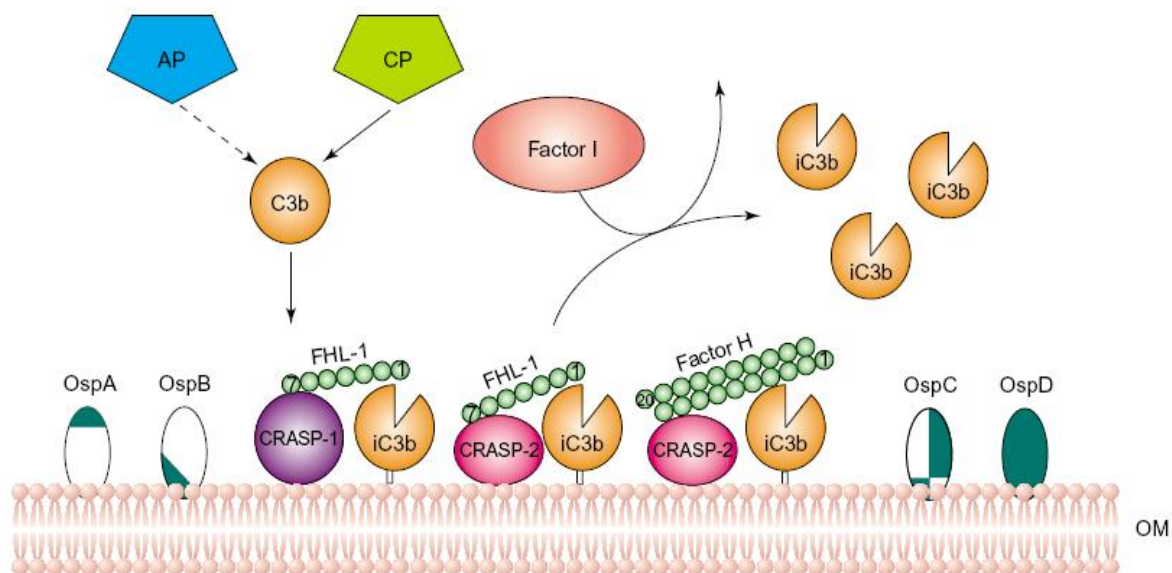


Abb. 5: Schematische Darstellung der Komplementregulation auf der Oberfläche komplementresistenter Borrelien (Kraiczky et al. 2002a; Kurtenbach et al. 2002).

AP: Komplementaktivierung über den alternativen Weg, CP: Komplementaktivierung über den klassischen Weg, C3b: Fragment von C3, iC3b: inaktivierte Form von C3b, CRASP-1: 25,9 KD schweres Oberflächenprotein von *B. burgdorferi* s.s., CRASP-2: 23,2 KD schweres Oberflächenprotein von *B. burgdorferi* s.s., OM: äußere Membran.

5. 2 Eigenschaften von CRASP der humanpathogenen Spezies *B. burgdorferi* s.s.

CRASPs sind membrangebundene Lipoproteine und über ihre Eigenschaft, humane Komplementregulatoren zu binden, charakterisiert (Kraiczky et al. 2003; Hartmann et al. 2006; Brissette et al. 2008). *B. burgdorferi* s.s. besitzt fünf verschiedene CRASP

(Kraiczy et al. 2003; Hartmann et al. 2006). Dabei konnten in allen bisher untersuchten komplementresistenten und intermediär komplementresistenten Isolaten wenigstens zwei verschiedene CRASP nachgewiesen werden.

Das CRASP-1-kodierende *cspA*-Gen befindet sich auf dem linearen Plasmid Ip54 und gehört zur paralogen Genfamilie PFam54 (Kraiczy et al. 2003; Wywiał et al. 2009). CRASP-1 ist 25,9 KD schwer und auf der Zelloberfläche von *B. burgdorferi* s.s. lokalisiert (Kraiczy et al. 2001a). Die Dimerstruktur des Proteins wird als biologisch relevant diskutiert, da Mutagenesestudien zeigten, dass der Verlust dieser Struktur mit dem Verlust der Faktor H- und FHL-1-Bindung einhergeht (Cordes et al. 2004; Cordes et al. 2005; Cordes et al. 2006; Kraiczy et al. 2009). Die Bindung der Komplementregulatoren erfolgt über Interaktionen mit der C-terminalen Helix des Proteins (Kraiczy et al. 2009). Faktor H und FHL-1 binden über SCR5 bis 7 sowie SCR20 an CRASP-1 (Kraiczy et al. 2001a; Kraiczy et al. 2003). CRASP-1 wurde bislang in allen komplementresistenten und intermediär komplementresistenten Isolaten von *B. burgdorferi* s.s. nachgewiesen. Durch Komplementationsstudien mit *cspA*-Deletionsmutanten konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass CRASP-1 Resistenz gegenüber Komplement verleiht (Brooks et al. 2005; Kenedy et al. 2009). Dieses Protein wird daher als wichtiger Pathogenitätsfaktor in Bezug auf die Komplementresistenz von *B. burgdorferi* s.s. diskutiert (Wallich et al. 2006).

Das CRASP-2-kodierende *cspZ*-Gen ist auf dem linearen Plasmid Ip28-3 lokalisiert und ist innerhalb der Spezies *B. burgdorferi* s.s. stark konserviert (Wallich et al. 2006; Rogers and Marconi 2007; Kraiczy et al. 2008b). CRASP-2 ist ein in der äußeren Membran lokalisiertes Lipoprotein mit einer molaren Masse von 23,2 KD (Kraiczy et al. 2001a; Hartmann et al. 2006). Die Interaktion mit Faktor H und FHL-1 erfolgt über verschiedene Regionen wobei dem C-Terminus eine besondere Rolle zugesprochen wird. Die Bindung basiert auf elektrostatischen, ionischen und hydrophoben Wechselwirkungen (Hartmann et al. 2006; Kraiczy et al. 2008a; Siegel et al. 2008). Die Bindungsdomänen von Faktor H und FHL-1 befinden sich in SCR6 und SCR7 (Kraiczy et al. 2001a; Hartmann et al. 2006). CRASP-2 lässt sich während einer manifestierten Infektion im Mausmodell auf der Borrelienoberfläche nachweisen und bewirkt im Menschen als auch in der Maus eine Antikörperantwort (Hartmann et al. 2006; Bykowski et al. 2007; Coleman et al. 2008; Kraiczy et al. 2008b).

Das CRASP-3-kodierende *erpP*-Gen und die CRASP-5-kodierenden *erpA*, *erpl* und *erpN* Gene sind auf den zirkulären cp23 Plasmiden lokalisiert und liegen in mehreren Kopien im Genom vor (Brissette et al. 2008). Sie sind in polycistronischen Operons organisiert und werden auf transkriptionaler Ebene mittels DNA-Bindeproteinen reguliert (Stevenson et al. 1998; El-Hage and Stevenson 2002; Babb et al. 2004; Brissette et al. 2008). Die zur Erp-Proteinfamilie gehörenden Proteine CRASP-3 (19,8 KD) und CRASP-5 (17,7 KD) binden Faktor H und CFHR-1 (Kraiczky et al. 2001a; Alitalo et al. 2004; Haupt et al. 2007; Haupt et al. 2008a). Die Bindung erfolgt über das Bindemotiv LE(x)LKKNLK im C-terminalen Teil von CRASP-3 und CRASP-5, wobei der positiv geladenen Aminosäure Lysin eine wichtige Rolle für die Interaktion zugesprochen wird (Kraiczky et al. 2003; Metts et al. 2003; Alitalo et al. 2004). Die Bindungsregion des Faktor H-Moleküls für CRASP-3 und CRASP-5 befindet sich in den C-terminalen SCR-Domänen 19 und 20 (Kraiczky et al. 2003; Alitalo et al. 2004). Auf Grund der hohen Ähnlichkeit der SCRs 3-5 von CFHR-1 zu den SCRs 18-20 von Faktor H wird eine Bindung von CFHR-1 über den C-Terminus angenommen (Alitalo et al. 2004; Haupt et al. 2007; Haupt et al. 2008a). Neben Faktor H und CFHR-1 binden CRASP-3 und CRASP-5 ebenfalls Plasminogen, welches auf der Oberfläche der Borrelien zu Plasmin aktiviert werden kann (Brissette et al. 2008). Eine Antikörperantwort auf CRASP-5 wurde in der Maus als auch im Menschen gefunden (Stevenson et al. 1998; Miller et al. 2000).

CRASP-4 (18,5 KD) wird durch das *erpC*-Gen kodiert, welches auf dem zirkulären Plasmid cp23-3 lokalisiert ist und gehört wie CRASP-3 und CRASP-5 zur Erp-Proteinfamilie (Brissette et al. 2008). Da dieses Protein im Vergleich zu CRASP-3 und CRASP-5 nur eine schwache Affinität zu Faktor H besitzt, wird CRASP-4 eine eher untergeordnete Rolle für die Komplementresistenz von *B. burgdorferi* s.s. zugeschrieben (Kraiczky et al. 2001a; Haupt et al. 2007). Als weitere Bindungspartner sind CFHR-1 und Plasminogen bekannt (Haupt et al. 2007; Brissette et al. 2009).

Tab. 2: Übersicht über die Faktor H-, FHL-1- und CFHR-1-Bindung von CRASP der Genospezies *B. burgdorferi* s.s.

	Faktor H	FHL-1	CFHR-1
CRASP-1	++	++	-
CRASP-2	+	++	-
CRASP-3	+	-	++
CRASP-4	+	-	+
CRASP-5	+	-	++

++ : starke Bindung, + : schwache Bindung, - : keine Bindung

6 Fragestellung und Zielsetzung

Die Interaktion von CRASP mit den beiden Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1 stellt den wesentlichen Mechanismus der Komplementresistenz bei *B. burgdorferi* s.s. dar. Insbesondere während der initialen Phase der Infektion scheint der Schutz gegenüber der komplementvermittelten Lyse essentiell für das Überleben der Spirochäten zu sein. Die CRASP-kodierenden Gene lassen sich in unterschiedlichen Kombinationen in verschiedenen *B. burgdorferi* s.s.-Isolaten nachweisen, wobei keines der bisher analysierten Borrelienisolate nur ein einzelnes CRASP-kodierendes Gen aufwies. Inwieweit jedoch einzelne CRASP-Moleküle für die Komplementresistenz von *B. burgdorferi* s.s. entscheidend sind, ist bislang nur unzureichend geklärt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, welche Relevanz einzelne CRASP-Moleküle für die Komplementresistenz von *B. burgdorferi* s.s. besitzen. Dabei lag das Interesse bevorzugt auf den Faktor H / FHL-1-bindenden Proteinen CRASP-1 und CRASP-2 sowie den Faktor H- und CFHR-1-bindenden Proteinen CRASP-3 und CRASP-5. Sowohl die Charakterisierung der Bindungseigenschaften dieser Oberflächenproteine als auch die Bedeutung der Bindung von Faktor H, FHL-1 und CFHR-1 für das Überleben der Borrelien in Gegenwart von Komplement standen im Mittelpunkt der funktionellen Analyse. Des Weiteren sollten Faktor H- und FHL-1-bindungsrelevante Aminosäuren des CRASP-1- und des CRASP-2-Proteins identifiziert und die Auswirkungen entsprechender Aminosäuresubstitutionen im Protein auf die Eigenschaft „Komplementresistenz“ der Zelle untersucht werden.

Um die Fragestellung nach der Relevanz einzelner CRASP für die Resistenz gegenüber Komplement beantworten zu können, wurde ein CRASP-negatives, serumsensitives *B. garinii*-Isolat als Modellorganismus ausgewählt, welches mit verschiedenen Vektoren transformiert wurde. Die generierten Transformanten sollten nur ein einzelnes Faktor H / FHL-1- bzw. Faktor H / CFHR-1-bindendes Protein produzieren und auf ihrer Oberfläche tragen.

II. Material und Methoden

1 Organismen, Vektoren, Oligonukleotide, Antikörper

1.1 Organismen

Die in dieser Arbeit verwendeten Organismen sind in Tabelle 3 und 4 zusammengefasst.

Tab. 3: *B. burgdorferi* s.l.-Isolate

Isolat	Genospezies	Biologische Herkunft	Geografische Herkunft	Referenz
G1	<i>Borrelia garinii</i>	Liquor	Deutschland	Kraiczy et al. (2000)
LW2	<i>Borrelia burgdorferi</i> s.s.	Haut	Deutschland	Kraiczy et al. (2000)

Tab. 4: *Escherichia coli* -Stämme

Stamm	Genospezies	Verwendung	Referenz
DH5 α TM -T1 ^R	<i>Escherichia coli</i>	F- Φ 80 <i>lacZ</i> _M15(<i>lacZYAargF</i>)U169 <i>recA1EndA1 hsdR17</i> (<i>r_{k-}</i> , <i>m_{k+}</i>) <i>phoA</i> <i>supE44 thi-1gyrA96 relA1 tonA</i>	Hanahan (1983)

1.2 Vektoren

Die zur Transformation von *B. garinii* G1 verwendeten Vektoren sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Der Basisvektor pKFSS1 diente zur Herstellung der Vektorkonstrukte pCRASP-1, pCRASP-2, pCRASP-3 und pCRASP-5. Die Vektorkonstrukte mit punktmutierten CRASP-kodierenden Genen wurden mittels in vitro-Mutagenese hergestellt. Als Ausgangsvektor diente hier das entsprechende Vektorkonstrukt.

Die zur Überexpression in *E. coli* genutzten Vektoren sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tab. 5: Basisvektor und Vektorkonstrukte zur Transformation von *B. garinii* G1

Vektor	Antibiotikum-resistenz	kodiertes Protein	Ursprungs-isolat	Referenz
pKFSS1	Streptomycin	-	-	Frank et al. (2003; 2005)
pCRASP-1	Streptomycin	CRASP-1	<i>B. burgdorferi</i> LW2	zur Verfügung gestellt von Prof. Kraiczy
pCRASP-1 L146H*	Streptomycin	CRASP-1 L146H	-	diese Arbeit
pCRASP-1 E147K*	Streptomycin	CRASP-1 E147K	-	diese Arbeit
pCRASP-1 Y240A*	Streptomycin	CRASP-1 Y240A	-	diese Arbeit
pCRASP-1 L246D*	Streptomycin	CRASP-1 L246D	-	diese Arbeit
pCRASP-2	Streptomycin	CRASP-2	<i>B. burgdorferi</i> B31	Hartmann et al. (2006)
pCRASP-2 F81A	Streptomycin	CRASP-2 F81A	-	Siegel et al. (2008)
pCRASP-2 R139A	Streptomycin	CRASP-2 R139A	-	Siegel et al. (2008)
pCRASP-2 Y207A	Streptomycin	CRASP-2 Y207A	-	Siegel et al. (2008)
pCRASP-2 Y211A	Streptomycin	CRASP-2 Y211A	-	Siegel et al. (2008)
pCRASP-2 R139A-Y207A	Streptomycin	CRASP-2 R139A-Y207A	-	Siegel et al. (2008)
pCRASP-2 R139A-Y211A	Streptomycin	CRASP-2 R139A-Y211A	-	Siegel et al. (2008)
pCRASP-2 Y207A-Y211A	Streptomycin	CRASP-2 Y207A-Y211A	-	Siegel et al. (2008)
pCRASP-3	Streptomycin	CRASP-3	<i>B. burgdorferi</i> LW2	zur Verfügung gestellt von Prof. Kraiczy
pCRASP-5	Streptomycin	CRASP-5	<i>B. burgdorferi</i> LW2	zur Verfügung gestellt von Prof. Kraiczy

*die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Vektoren

Tab. 6: Verwendeter Basisvektor und Vektorkonstrukte zur Produktion von Proteinen in *E. coli* DH5 α .

Vektor	Antibiotikum-resistenz	kodiertes Protein	Ursprungs-isolat	Referenz
pQE-30 Xa	Ampicillin	-	-	Qiagen
pQE CspA	Ampicillin	His-CRASP-1	<i>B. burgdorferi</i> ZS7	zur Verfügung gestellt von Dr. Rossmann
pQE CspA Y240A	Ampicillin	His-CRASP-1 Y240A	-	zur Verfügung gestellt von Prof. Kraiczy
pQE CspZ	Ampicillin	His-CRASP-2	<i>B. burgdorferi</i> B31	zur Verfügung gestellt von Prof. Kraiczy
pBLS538	Ampicillin	His-CRASP-3 (His-ErpP)	<i>B. burgdorferi</i> B31	Stevenson et al. (1998) El-Hage et al. (2001)
pBLS527	Ampicillin	His-CRASP-5 (His-ErpA)	<i>B. burgdorferi</i> B31	Stevenson et al. (1998) El-Hage et al. (2001)

1.3 Starteroligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Starteroligonukleotide sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Tab. 7: Verwendete Starteroligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
CRASP1 57n (+)	CTT TAA TTT GCA CCT CAT GCG CAC CTT TTA GCA AAA TC	PCR Southernblot
CRASP1 234 (-)	C TTT GTA ATA TTT ATT AAA GTG TGC TGC CAG TAT TTT CTC ATT ATC	
cspZ-1	GTA GCA ATA TAC TTG TGC TAG	PCR Southernblot
cspZ-2	TCT CTT TTG ATA AAT TGG CTT A	
CRASP-3 79 (+)	GAT GAG CAA AGT AGT GGT GAG ATA AAC C	PCR
CRASP-3 520 (-)	CTA TTT TAA ATT TTT TTT GGA TCC TTA TTA TGG TAT TGC ATA	
CRASP-5 79 (+)	GAT GAG CAA AGC AAT GGA GAG GTA AAG GTC	PCR
ErpA 3nc (-)	GTT TTT TTA TTC ATA TAC GGG CCC TCC TAT ATT TCT AAC	

aadA F+NdeI	CAT ATG AGG GAA GCG GTG ATC	PCR
aadA R+AatII	GAC GTC ATT ATT TGC CGA CTA	Southernblot
Fla6	AAC ACA CCA GCA TCA CTT TCA GGG TCT	PCR
Fla7	TAT AGA TTC AAG TCT ATT TTG GAA AGC ACC TA	
Osp A1	GGG AAT AGG TCT AAT ATT AGC C	Southernblot
Osp A2	CTA GTG TTT TGC CAT CTT CTT TGA	
M13 universal	GTA AAA CGA CGG CCA GT	Sequenzierung
M13 reverse	CAG GAA ACA GCT ATG AC	
CRASP-1 L146H (+)	GAA AAA TTA AAA GAA ATT CAT GAA ATA CTT AAA AAA AAT TCC G	in vitro- Mutagenese
CRASP-1 L146H (-)	C GGA ATT TTT TTT AAG TAT TTC ATG AAT TTC TTT TAA TTT TTC	
CRASP-1 E147K (+)	GAA AAA TTA AAA GAA ATT CTT AAA ATA CTT AAA AAA AAT TCC GAA C	in vitro- Mutagenese
CRASP-1 E147K (-)	G TTC GGA ATT TTT TTT AAG TAT TTT AAG AAT TTC TTT TAA TTT TTC	
CRASP-1 Y240A (+)	GCA GAA CAC TTT AAT AAA TAT GCC AAA GAT TTT GAT ACT TTA AAA C	in vitro- Mutagenese
CRASP-1 Y240A (-)	G TTT TAA AGT ATC AAA ATC TTT GGC ATA TTT ATT AAA GTG TTC TGC	
CRASP-1 L246D (+)	AC AAA GAT TTT GAT ACT GAT AAA CCT GCC TTT TAC TAA TAG AAA G	in vitro- Mutagenese
CRASP-1 L246D (-)	C TTT CTA TTA GTA AAA GGC AGG TTT ATC AGT ATC AAA ATC TTT GT	

2 Antikörper, rekombinante Proteine, Humanserum

2.1 Antikörper

Tab. 8: Antikörper für die Westernblot- und Ligandenaffinitätsblot-Analyse

Antikörper	Antigen	Eigenschaft	Verdünnung	Referenz
L41 1C11	Flagellin	polyklonal	1:500	Hauser et al. (1991)
anti-ZS7A68	CRASP-1	polyklonal	1:1000	Wallich et al. (2003)
anti-BBH06	CRASP-2	monoklonal	1:1000	Hartmann et al. (2006)
anti-ErpP	CRASP-3 (ErpP)	polyklonal	1:500	El-Hage et al. (2002)
anti-ErpA	CRASP-5 (ErpA)	polyklonal	1:500	El-Hage et al. (2002)
VIG8	Faktor H, CFHR-1, CFHR-2	monoklonal, Kulturüberstand	-	Prodinger et al. (1998)
anti-SCR1-4	FHL-1, Faktor H	polyklonal	1:1000	Kühn et al. (1995)
anti-Faktor H	Faktor H, FHL-1, CFHR-1, CFHR-2, CFHR-5	polyklonal	1:1000	Calbiochem
JHD 7.10	CFHR-1, CFHR-2, CFHR-5	monoklonal, Kulturüberstand	unverdünnt	Heinen et al. (2009)
anti-CFHR-1	Faktor H, CFHR-1, CFHR-2, CFHR-5	polyklonal	1:1000	Heinen et al. (2009)
anti-C3	C3, Spaltprodukte von C3	polyklonal	1:1000	Calbiochem
anti-Apolipoprotein A-I	Apolipoprotein A-I	monoklonal	1:1000	Calbiochem

Tab. 9: Antikörper für den Immunfluoreszenztest

Antikörper	Antigen	Eigenschaft	Verdünnung	Referenz
anti-ZS7A68	CRASP-1	polyklonal	1:50	Wallich et al. (2003)
anti-BBH06	CRASP-2	polyklonal	1:50	Hartmann et al. (2006)
anti-ErpP	CRASP-3 (ErpP)	polyklonal	1:50	El-Hage et al. (2002)
B11 (anti-ErpAIN und ErpC)	CRASP-5 (ErpA)	monoklonal	1:20	Mbow et al. (2002)
anti-C3	C3b	polyklonal	1:1000	Calbiochem
anti-C6	C6	polyklonal	1:200	Calbiochem
anti-C5b-9	TCC	monoklonal	1:50	Quidel

Sekundäre Antikörper

anti-Kaninchen IgG (HRP konjugiert), Dako Cytomation

anti-Maus IgG (HRP konjugiert), Dako Cytomation

anti-Ziege IgG (HRP konjugiert), Dako Cytomation

Alexa Fluor 488 Ziege anti-Maus IgG, INVITROGEN

Alexa Fluor 488 Ziege anti-Kaninchen IgG, INVITROGEN

Alexa Fluor 488 F(ab)2 Fragment Kaninchen anti-Ziege IgG, INVITROGEN

2.2 Rekombinante Proteine

An rekombinant hergestellten Proteinen wurden in dieser Arbeit FHL-1, CFHR-1 und CFHR-2 verwendet, die von Herrn Prof. Dr. P. F. Zipfel (Abteilung für Infektionsbiologie, Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie, Jena) zur Verfügung gestellt wurden.

2.3 Humanserum

Humanserum (NHS) wurde als Quelle für Faktor H, FHL-1, CFHR-1, CFHR-2 und CFHR-5 und als Quelle für aktives Komplement verwendet. Es entstammt einem Kollektiv von 10 Seren gesunder Blutspender, welche nachweislich keine borrelienspezifischen Antikörper oder kreuzreagierenden Antikörper enthielten.

Zur Gewinnung von NHS wurde das Blut der Probanden mit Heparinröhrchen (S-MONOVETTE[®], Sarstedt) abgenommen und zur Gerinnung 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurden die Röhrchen zentrifugiert (2000 xg, 20 min, 4 °C) und der Blutkuchen verworfen. Die Spenderseren wurden mittels kommerziell erhältlichen ELISA (Enzygnost[®] Borreliosis VlsE/IgG, Siemens; Enzygnost[®] Borreliosis IgM, Siemens) und Immunoblot (recomLine Borrelia IgG, Mikrogen; recomLine Borrelia IgM, Mikrogen) auf borrelienspezifische IgG- und IgM-Antikörper sowie kreuzreagierende Antikörper getestet. Des Weiteren wurden die Seren mittels kommerziell erhältlichen Test (MICROVUE complement CH50Eq, Quidel) auf Komplementaktivität getestet. Alle Seren, welche negativ für borrelienspezifische Antikörper und kreuzreagierende Antikörper getestet wurden und eine Komplementaktivität von wenigstens 70 (U Eq)/ml aufwiesen, wurden vereinigt und in Aliquots von 1 ml bis 2 ml bei –70 °C oder –20 °C gelagert.

3 Kulturmedien

3.1 Kulturmedium für *B. burgdorferi s.l.*

Zur Anzucht von Borrelien wurde modifiziertes BSK (Barbour-Stoenner-Kelly) - Flüssigmedium (im fortlaufenden Text als BSK-Medium bezeichnet) verwendet (Barbour 1984).

Grundmedium

HEPES	6,0 g
Neopepton	5,0 g
Natriumcitrat	0,7 g
Glukose	5,0 g
Natriumbicarbonat	2,2 g
Natriumpyruvat	0,8 g
Natriumacetylglucosamin	0,4 g
10x CMRL-Medium (Invitrogen)	100 ml
H ₂ O _{demin}	ad 1 l
pH 7,6	

Das Grundmedium wurde mittels 0,22 µm-Filter sterilfiltriert und konnte für 3 bis 4 Monate bei –20 °C gelagert werden.

Kulturmedium

Grundmedium	1000 ml
7 % Gelatine (autoklaviert: 121 °C, 20 min)	200 ml
Kaninchenserum (hitzeinaktiviert: 56 °C, 30 min; Sigma-Aldrich)	72 ml
35 %ige Lösung von Rinderserumalbumin (Sigma-Aldrich)	70 ml

Die Lagerung des Kulturmediums erfolgte für 2 bis 4 Wochen bei 4 °C.

3.2 Kulturmedium für *E. coli*

Das 2x YT (Yeast-Trypton)-Medium wurde zur Anzucht von *E. coli* in Flüssigkultur verwendet. Zur Anzucht auf Festmedium wurden LB (Luria-Bertani)-Agarplatten verwendet.

2x YT-Medium

Natriumchlorid	10 g
Hefe-Extrakt	10 g
Bacto-Trypton	16 g
H ₂ O _{demin}	ad 1 l
pH 7,5	

Das 2x YT-Medium wurde bei 121 °C für 20 min autoklaviert und konnte danach für mehrere Monate bei Raumtemperatur gelagert werden.

LB-Agar

Natriumchlorid	10,0 g
Hefe-Extrakt	5,0 g
Bacto-Trypton	10,0 g
Agar	1,8 % (w/v)
H ₂ O _{demin}	ad 1 l

pH 7,5

Der LB-Agar wurde bei 121 °C für 20 min autoklaviert und anschließend in Petrischalen gegossen. Die fertigen Agarplatten wurden für mehrere Wochen bei 4 °C gelagert.

Zur Herstellung von Selektivagarplatten wurde der LB-Agar nach dem Autoklavieren auf etwa 55 °C abgekühlt und vor dem Gießen mit dem betreffenden Antibiotikum supplementiert. Ampicillin als auch Streptomycin wurde in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugegeben. Die Selektivagarplatten wurden für 2 Wochen bei 4 °C gelagert.

4 Kultivierung von Bakterien

4.1 Kultivierung von *B. burgdorferi s.l.*

Zur kontinuierlichen Kultivierung wurden Borrelien als 10 ml Flüssigkulturen im modifizierten BSK-Medium angezüchtet. Dazu wurde 1 ml Bakterienkultur in 10 ml BSK-Medium gegeben und für 3 bis 4 Tage bei 33 °C unter mikroaerophilen Bedingungen inkubiert. Um Vitalität und Mobilität der Spirochäten zu garantieren und Kontaminationen auszuschließen, wurden die Kulturen wöchentlich mittels Dunkelfeldmikroskopie kontrolliert.

Zur Anzucht größerer Mengen an Borrelien wurden 30 ml bzw. 50 ml Schraubröhrchen (Sarstedt bzw. Greiner) verwendet. Zur Anzucht einer 30 ml Borrelienkultur wurden zu 20 ml BSK-Medium 10 ml Borrelienkultur gegeben und bei 33 °C für 2 bis 3 Tage inkubiert. Zur Anzucht einer 50 ml Borrelienkultur wurden in 30 ml BSK-Medium 20 ml Borrelienkultur hinzupipettiert. Da nur Reinkulturen für Experimente verwendet wurden, musste eine Kontrolle auf Kontaminationen mittels Dunkelfeldmikroskopie aller zum Versuch verwendeter Kulturen stattfinden.

Zur Langzeitlagerung von *B. burgdorferi s.l.*-Isolaten und der hergestellten Transformanten wurden die entsprechenden Kulturen in der spätlogarithmischen Phase in Aliquots von 1,8 ml bei -70 °C eingefroren. Für die Neuanzucht wurden die bei -70 °C eingefrorenen Kulturen bei Raumtemperatur aufgetaut, auf 33 °C erwärmt, anschließend in 10 ml BSK-Medium gegeben und bei 33 °C inkubiert, bis vitale Spirochäten beobachtet werden konnten.

4.2 Bestimmung der Zellkonzentration von *B. burgdorferi* s.l.

Zur Bestimmung der Zellkonzentration von *B. burgdorferi* s.l. erfolgte eine Verdünnung der Bakteriensuspension (Kap. 7.2, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5) in PBS (10 mM Na₂HPO₄; 1 mM NaH₂PO₄; 150 mM NaCl) in den Verdünnungsstufen 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:2000 in Reagenzglasröhrchen. Anschließend wurden 10 µl der entsprechenden Verdünnungsstufe in eine Zählkammer (KOVA[®] GLASSTIC[®] SLIDE 10 with GRIDS, HYCOR BIOMEDICAL INC.) pipettiert und mittels Dunkelfeldmikroskop (Zeiss Standard 25, Jena) 9 Felder ausgezählt. Dann wurde der Mittelwert der ausgezählten Felder gebildet und die Zellkonzentration mit folgender Gleichung berechnet.

$$\text{Mittelwert} \times \text{Verdünnung} \times 90 \text{ (Kammerfaktor)} = \text{Zellkonzentration [Zellen/}\mu\text{l]}$$

4.3 Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* in 2x YT-Medium erfolgte bei 37 °C und 200 rpm im Inkubator (Novotron, Infors) über Nacht. Dazu wurden 5 ml Medium mit einer Kolonie oder 10 µl Bakterienkultur versetzt. Eine 5 ml Kultur diente jeweils zur Herstellung größerer Kulturmengen.

Das Ausplattieren von *E. coli* auf Selektivagarplatten erfolgte nach der Transformation. Die beimpften Agarplatten wurden schließlich bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Zur Langzeitlagerung wurden Flüssigkulturen von *E. coli* in der spätlogarithmischen Phase mit final 25 % (v/v) Glycerin versetzt und bei -70 °C eingefroren.

4.4 Bestimmung der Zelldichte von *E. coli*

Die Dichte einer *E. coli*-Kultur wurde mittels UV-Spektralphotometer (UV/Visible-Spektrophotometer, Ultrospec 3100 pro, Amersham Bioscience) bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt.

5 Molekularbiologische Methoden

5.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *B. burgdorferi s.l.*

Die Plasmidisolierung aus *B. burgdorferi s.l.* erfolgte nach dem Protokoll von A.G. Barbour (1988).

Dazu wurde eine 30 ml Flüssigkultur zentrifugiert (5000 xg, 30 min, 4 °C) und anschließend einmal in 500 µl TES-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM EDTA, pH 8,0; 15 % (w/v) Saccharose) gewaschen (16000 xg, 10 min, 4 °C). Die Zellen wurden in 240 µl TES-Puffer resuspendiert und mit Lysozym in einer Endkonzentration von 0,5 µg/µl versetzt und für 15 min auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von 300 µl 1 %igem SDS und 7 µl DEPC mit anschließender Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur im Thermomixer (Thermomixer comfort, Eppendorf) bei 1400 rpm wurde das Lysozym inhibiert. Eine Fällung der Proteine erfolgte durch Zugabe von 250 µl 7,5 M Ammoniumacetat. Nach der Zentrifugation bei 12.000 xg für 10 min bei Raumtemperatur wurde der Überstand abgenommen und die DNA mit 850 µl eiskaltem Isopropanol präzipitiert und für 30 min bei -20°C aufbewahrt. Die ausgefallene DNA wurde sedimentiert (16000 xg, 30 min, 4 °C), einmal mit 500 µl 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen (16000 xg, 30 min, 4 °C), im Konzentrator (Concentrator 5301, Eppendorf) getrocknet und schließlich in 300 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0) gelöst. Durch Zugabe von RNase A (Endkonzentration 0,1 µg/µl) und einer Inkubation bei 37°C für 30 min und 300 rpm im Thermomixer (Thermomixer comfort, Eppendorf) wurde die vorhandene RNA degradiert. Eine Inhibition der RNase A erfolgte anschließend durch Zugabe von 2 µl DEPC und einer Inkubation für 5 min bei 1400 rpm im Thermomixer (Thermomixer comfort, Eppendorf). Durch Zugabe von 150 µl 7,5 M Ammoniumacetat wurden die Proteine gefällt. Nach Zentrifugation (11000 xg, 5 min, Raumtemperatur) wurde der Überstand abgenommen und mit 1,3 ml eiskaltem 100 %igem Ethanol versetzt. Die Fällung der DNA erfolgte bei -20 °C für 20 min. Anschließend wurde die DNA bei 16000 xg und 4 °C für 30 min sedimentiert, mit 200 µl 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen (16000 xg, 10 min, 4 °C) und im Konzentrator getrocknet. Die DNA wurde in 50 µl TE-Puffer resuspendiert.

Die isolierte Borrelien-DNA wurde für die Analyse mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese (Kap. 5.7.2) eingesetzt oder bei -20°C aufbewahrt.

5.2 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Plasmide aus *E. coli* wurden mit kommerziell erhältlichen Kits isoliert. Eingesetzt wurden für eine Plasmidpräparation im kleinen Maßstab (5 ml Übernachtskultur) der Wizard® Plus SV Minipreps (Promega). Für eine Plasmidisolierung im mittleren Maßstab (150 ml Übernachtskultur) wurde das Midi-Präparation Pure Yield™ Plasmid Midiprep System (Promega) verwendet.

5.3 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

Zur DNA-Konzentrationsbestimmung wurde eine 1:10 Verdünnung der isolierten DNA in H₂O (Aqua ad injectabilia, Braun) in UV-Küvetten (PLASTIBRAND® UV-Küvette mikro, BRAND) hergestellt. Im UV-Spektralphotometer (UV/Visible-Spektrophotometer Ultrospec 3100 pro, Amersham Bioscience) wurde schließlich die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen und die DNA-Konzentration berechnet.

5.4 Aufkonzentration von Plasmid-DNA

Insgesamt 10 µg oder 15 µg Plasmid-DNA wurden 1:10 mit 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5-fach eiskaltem 100 %igem Ethanol versetzt und durch mehrfaches Invertieren gemischt. Nach der Fällung der DNA bei –20°C über Nacht wurde die DNA sedimentiert (16.000 xg, 30 min, 4 °C), einmal mit 100 µl 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen (16.000 xg, 30 min, 4 °C) und das Sediment getrocknet. Schließlich wurde das Sediment in 5 µl H₂O (Aqua ad injectabilia, Braun) gelöst. Die konzentrierte DNA wurde zur Elektroporation von *B. garinii* G1 (Kap. 5.10.1) eingesetzt oder bei –20 °C aufbewahrt.

5.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Vervielfältigung von DNA-Fragmenten mittels Polymerasekettenreaktion erfolgte in 100 µl Ansätzen. Für einen Reaktionsansatz wurden Substanzen in folgenden Konzentrationen zusammengegeben:

Matrizen-DNA	100 ng
10x Taq-DNA Polymerase Puffer	10 μ l
Magnesiumchlorid	5 μ l
dNTPs (Roth)	200 nmol
je Starteroligonukleotid	100 pmol
Taq-DNA-Polymerase (Invitrogen)	250 U
H ₂ O (Aqua ad injectabilia, Braun)	ad 100 μ l

Die Amplifikation der DNA wurde nach folgenden Schema im Thermocycler (Techne, Progene; T-Professional basic Thermocycler, Biometra; GeneAmp PCR System 2400, PERKIN ELMER) durchgeführt:

Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	
Denaturierung	95 °C	1 min	30 Zyklen
Anlagerung	55 °C	1 min	
Amplifikation	72 °C	1 min	
Amplifikation	72 °C	7 min	

Die Lagerung der Amplifikate erfolgte bei 4°C.

5.6 PCR aus einer Bakterienflüssigkultur

Zum Nachweis von vektorkodierten und im Borreliengenom vorhandenen Genen wurden 500 μ l bis 1 ml Borrelienkultur sedimentiert (16.000 xg, 10 min, 4 °C), das Sediment einmal mit 100 μ l PBS (10 mM Na₂HPO₄; 1 mM NaH₂PO₄; 150 mM NaCl) gewaschen und anschließend in 30 μ l bis 50 μ l H₂O (Aqua ad injectabilia, Braun) gelöst.

Zur Amplifikation der gewünschten DNA-Fragmente wurde der unter Kapitel 5.5 aufgeführte Reaktionsansatz gewählt. Statt der 100 ng Matrizen-DNA wurden 10 μ l präparierte Borrelienkultur eingesetzt. Die PCR-Parameter wurden ebenfalls wie unter Kapitel 5.5 beschrieben gewählt.

5.7 Gelelektrophorese

5.7.1 Agarose-Gelelektrophorese

Je nach Größe der aufzutrennenden DNA wurden 1 %ige, 1,5 %ige oder 2 %ige Agarosegele (1 %, 1,5 % oder 2 % (w/v) Agarose in 0,5x TBE-Puffer, 100 ml Volumen) verwendet. Ein Aliquot von 12 µl PCR-Produkt wurde mit 3 µl Bromphenolblau-Puffer versetzt und auf das Agarosegel aufgetragen. Als Marker diente der 123 bp DNA Ladder (Invitrogen). Die Auftrennung erfolgte in 0,5x TBE-Puffer (45 mM Tris, 45 mM Borat, 1 mM EDTA, pH 8,0) bei 180 V in waagerechten Gelelektrophoresekammern (Horizon 11.14, GIBCO-BRL) für 30 min bis 60 min. Anschließend wurden die Agarosegele in 0,0001% (v/v) Ethidiumbromid (Ethidiumbromid 1%, Applichem) für 30 min gefärbt, kurz in Wasser geschwenkt und anschließend die DNA mittels UV-Licht im Geldokumentationssystem (PEQLAB) visualisiert.

Bromphenolblau-Puffer

Bromphenolblau	0,25 g
Saccharose	40 g
H ₂ O _{demin}	ad 100 ml

5.7.2 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

200 ng Plasmid-DNA aus *B. burgdorferi s.l.* wurden mit H₂O (Aqua ad injectabilia, Braun) auf 10 µl aufgefüllt, mit 3 µl Bromphenolblau-Puffer versetzt und im 1 %igem Agarosegel (1 % (v/w) Agarose, 100 ml 0,5x TBE-Puffer) und 0,5x TBE-Puffer (45 mM Tris, 45 mM Borat, 1 mM EDTA, pH 8,0) über 22 h (elektrische Feldstärke 6 V/cm², eingeschlossener Winkel 120°, Temperatur 14 °C, Pulswechselzeit 0,5 s linear aufsteigend bis 2,5 s) im gepulsten Agarosegel aufgetrennt. Als Größenstandards dienten der LowRange PFG Marker (BioLabs) und der MidRange PFG Marker (BioLabs).

Das Agarosegel wurde anschließend für 30 min in 0,0001% (v/v) Ethidiumbromid (Ethidiumbromid 1%, Applichem) gefärbt, kurz im Wasserbad geschwenkt und die DNA mittels UV-Licht im Geldokumentationssystem (PEQLAB) visualisiert.

5.8 Aufreinigung von PCR-Fragmenten

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten wurde der QIAquick[®] PCR Purification Kit (Qiagen) verwendet. Die Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben.

5.9 In vitro-Mutagenese

Die in vitro-Mutagenese wurde in 50 µl-Reaktionsansätzen durchgeführt. Ein Reaktionsansatz bestand aus folgenden Bestandteilen:

Plasmid-DNA	100 ng
10x Pfu-DNA Polymerase-Puffer	5 µl
dNTPs (Roth)	10 nmol
je Starteroligonukleotid	125 pmol
Pfu-DNA Polymerase (Stratagene)	125 U
H ₂ O (Aqua ad injectabilia, Braun)	ad 50 µl

Die PCR wurde nach folgendem Reaktionsschema im Thermocycler (Techne, Progene) durchgeführt.

Denaturierung	95 °C	30 s	18 Zyklen
Denaturierung	95 °C	30 s	
Anlagerung	55 °C	1 min	
Amplifikation	68 °C	18 min	

Die methylierte Matrizen-DNA aus dem in vitro-Mutageneseansatz wurde anschließend durch eine Inkubation für 1 h bei 37 °C mit 0,4 U/µl DpnI (BioLabs) degradiert.

Die Lagerung des Reaktionsansatzes erfolgte bei 4 °C über Nacht oder bei –20 °C.

5.10 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

5.10.1 Elektroporation von *B. garinii* G1

270 ml einer Borrelien-Flüssigkultur in der logarithmischen Phase wurde sedimentiert (5000 xg, 30 min, 4 °C) und, um kompetente Zellen zu erhalten, zweimal mit 25 ml und anschließend zweimal mit 10 ml kaltem EPS-Puffer gewaschen (5000 xg, 25 min, 4 °C). Das Zellsediment wurde in 400 µl bis 500 µl kaltem EPS-Puffer resuspendiert, zu je 60 µl in sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße (Sarstedt) aliquotiert und auf Eis aufbewahrt. Zu den kompetenten Borrelienzellen wurden 5 µl konzentrierte Plasmid-DNA (10 µg oder 15 µg) (Kap. 5.4) gegeben, kurz gemischt und 30 s auf Eis inkubiert. Die Elektroporation wurde in einer eiskalten Küvette (Gene Pulser[®] Cuvette, 0,2 cm; BIO-RAD) bei 2,5 kV, 25 µF, 200 Ω für 3 s in einem Elektroporationsgerät (PULSE CONTROLLER PLUS, BIO-RAD; GENE PULSER[®] II, BIO-RAD) durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml 33 °C warmes BSK-Medium überführt und für zunächst 2 Tage bei 33 °C inkubiert. Schließlich wurde die Kultur mit 90 ml Streptomycin-haltigem (50 µg/ml) BSK-Medium versetzt das gesamte Volumen zu je 200 µl auf Mikrotiterplatten (Cell Culture Plate Non-Pyrogenic, Corning Incorporated costar[®]) verteilt und die Platten für 3 bis 6 Wochen bei 33°C inkubiert. Transformanten wurden anhand des Farbumschlags des Mediums von rot nach gelb als auch mikroskopisch nachgewiesen. Diese wurden nun in 1 ml und anschließend in 10 ml Streptomycin-haltiges BSK-Medium (50 µg/ml Streptomycin) transferiert und bis zum Farbumschlag des Mediums bei 33 °C für 3 bis 10 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Transformanten charakterisiert.

EPS-Puffer

Saccharose 9,3 % (w/v)

Glycerin 15 % (v/v)

sterilfiltriert (0,22 µm)

5.10.2 Transformation von *E. coli* DH5 α -Zellen mittels CaCl₂-Hitzeschock

5.10.2.1 Herstellung kompetenter *E. coli* DH5 α -Zellen

100 ml 2xYT-Medium wurden mit 1 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* DH5 α versetzt und bei 37 °C und 200 rpm im Inkubator (Novotron, Infors) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 bis 0,8 inkubiert. Die Sedimentation der Zellen erfolgte anschließend bei 4 °C und 5000 xg für 10 min. Nun wurde das Zellsediment einmal mit 10 ml eiskaltem CaCl₂ (50 mM) gewaschen (5000 xg, 10 min, 4 °C), in 10 ml eiskaltem CaCl₂ (50 mM) resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Wiederum erfolgte die Zentrifugation der Zellsuspension bei 4 °C und 5000 xg für 10 min. Das Sediment wurde schließlich in 3 ml CaCl₂/Glycerin resuspendiert und die Zellsuspension zu je 200 μ l in eiskalte 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert. Kompetente *E. coli* DH5 α -Zellen wurden bei –70 °C aufbewahrt.

CaCl₂/Glycerin

CaCl ₂	50 mM
Glycerin	20 %

5.10.2.2 CaCl₂-Hitzeschock-Methode

Auf Eis aufgetaute kompetente *E. coli* DH5 α -Zellen wurden mit Plasmid-DNA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Zur Transformation wurden 10 μ l bis 15 μ l des in vitro-Mutagenese-Ansatzes eingesetzt. Anschließend erfolgte der Hitzeschock bei 43 °C für 3 min im Thermomixer. Zur DNA-Aufnahme wurden die Zellen wiederum 30 min auf Eis inkubiert. Zur Regeneration der transformierten *E. coli*-Zellen wurde 1 ml 2xYT-Medium zugegeben und es folgte eine 1 h - 3 h Inkubation bei 37 °C. Die Selektion von plasmidtragenden Zellen erfolgte auf Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten bei 37 °C über Nacht.

5.11 Southernblot-Analyse

5.11.1 DNA-Transfer auf Nylonmembranen mittels Vakuum

Die aus Borrelien isolierte (Kap. 5.1) und mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese (Kap. 5.7.2) aufgetrennte Plasmid-DNA im Agarosegel wurde im Ethidiumbromidbad (0,0001 % Ethidiumbromid) angefärbt. Um die Signale im visualisierten Agarosegel denen der Hybridisierung zuordnen zu können, wurde ein Lineal neben dem Gel mit fotografiert.

Um möglichst viel Ethidiumbromid aus dem Agarosegel zu entfernen, wurde das Gel über Nacht im Wasserbad gelagert. Die Depurinierung der DNA erfolgte durch eine 10 minütige Inkubation des Agarosegels in 0,15 M HCl. Nach einer 5 minütigen Inkubation in H₂O wurde das Gel für 30 min in Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) inkubiert. Schließlich folgte nach einer weiteren 5 minütigen Inkubation in H₂O, eine 60 minütige Lagerung des Gels in Neutralisierungslösung (0,5 M Tris, 3 M NaCl). Der Transfer der DNA auf eine positiv geladene Nylonmembran (Amersham Hybond™-N⁺, GE Healthcare) erfolgte in einem Vakuumblotgerät (Appligene). Dazu wurden sechs Blotpapiere (chromatography paper, Whatman) und die positiv geladene Nylonmembran mit 20x SSC (0,3 M Natriumcitrat, 3 M NaCl) befeuchtet und auf dem Blotgerät positioniert. Die Maske wurde aufgebracht, das Agarosegel auf der Nylonmembran positioniert und dieses mit 20x SSC überschichtet. Die Übertragung der DNA vom Gel auf die Nylonmembran fand unter Anlegen eines Unterdrucks von 45 mbar für 60 min bis 120 min statt. Anschließend wurde die Position der Geldaschen auf der Nylonmembran gekennzeichnet und das Gel für mindestens 1 h in 0,0001 % (v/v) Ethidiumbromid (Ethidiumbromid 1%, Applichem) gefärbt, kurz in H₂O gespült und anschließend mittels Geldokumentationssystem (PEQLAB) die nicht transferierte DNA im Pulsfeldgel dokumentiert. Die Nylonmembran wurde kurz in 2x SSC (0,03 M Natriumcitrat, 0,3 M NaCl) geschwenkt und anschließend die DNA mittels UV-Licht bei 0,12 J/cm³ für 120 s auf der Nylonmembran fixiert. Die Membran wurde getrocknet und bei Raumtemperatur gelagert.

5.11.2 Hybridisierung immobilisierter DNA mit HRP-markierten Gensonden

Die Herstellung der Gensonden erfolgte nach Herstellerangaben mit dem Amersham™ ECL™ Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System (GE Healthcare). Grundlage boten die mittels PCR (Kap. 5.5 und Kap. 5.6) hergestellten und gereinigten DNA-Fragmente (Kap. 5.8) des *ospA*-Gens aus *B. garinii* G1, des *cspA*-Gens aus pCRASP-1, des *cspZ*-Gens aus pCRASP-2 und des *aadA*-Gens aus pKFSS1. Zur Hybridisierung wurde ein Rollinkubationsofen (Hybaid, MWG) genutzt. Die Hybridisierung als auch die Waschschriffe mit dem ersten Waschpuffer (6 M Harnstoff, 0,4 % SDS, 0,5x SSC) fanden bei 42 °C statt. Die anschließende Inkubation in 2x SSC (0,03 M Natriumcitrat, 0,3 M NaCl) fand bei Raumtemperatur statt. Nach Zugabe der im Kit enthaltenen Detektionslösung wurde die Membran in eine Röntgenkassette (Hypercassette™, Amersham Bioscience) positioniert und der Röntgenfilm (Amersham™ Hyperfilm™ ECL, GE Healthcare) aufgelegt. Die Belichtungszeiten entsprachen 1 min, 5 min und über Nacht. Die Entwicklung der Filme umfasste eine 5 minütige Inkubation in 16,6 % Dokumol (TETENAL) mit anschließender 5 minütiger Fixierung des Films in 12,5 % Superfix (TETENAL). Die Geltaschen wurden anschließend von der Nylonmembran auf den Film übertragen. Schließlich wurden die Filme getrocknet.

Die Nylonmembran wurde über Nacht mit Detektionslösung überschichtet und anschließend wie oben bereits beschrieben detektiert. Nur eine Nylonmembran, die kein Signal auf dem ECL-Film hinterließ wurde zur erneuten Hybridisierung mit einer weiteren Sonde eingesetzt.

5.12 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung der Vektorkonstrukte erfolgte durch einen kommerziellen Anbieter (GATC Biotech AG, Konstanz).

6 Proteinbiochemische Methoden

6.1 Herstellung von Zellextrakten von *B. burgdorferi* s.l.

Zur Herstellung eines Zellextraktes von *B. burgdorferi* s.l. wurde eine 10 ml Flüssigkultur zentrifugiert (5000 xg, 30 min, 4 °C), das Sediment viermal mit 500 µl PBS-MgCl₂ gewaschen (16000 xg, 10 min, 4 °C), in 80 µl des gleichen Puffers aufgenommen und anschließend fünfmal für 30 s bei 4 °C mit Hilfe eines Ultraschallgerätes und eines gekühlten Becherresonators (Sonifier B13, Branson/Heinemann; Fryka Multistar, Fryka) aufgeschlossen.

Die Zellextrakte wurden bei -20 °C eingefroren oder mittels Tris Tricin-SDS-Gelelektrophorese (Kap. 6.2.1) aufgetrennt.

PBS

Na ₂ HPO ₄	10 mM
NaH ₂ PO ₄	1 mM
NaCl	150 mM

PBS-MgCl₂

PBS	10 ml
2 M MgCl ₂	250 µl

6.2 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

6.2.1 Separation von Proteinen in der Tris Tricin-SDS-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Zellextrakten wurden 10 %ige Tris Tricin-SDS-Polyacrylamidgele nach Schagger et al. (1987) verwendet.

Die Zellextrakte wurden mit H₂O_{demin} auf 20 µl aufgefüllt, mit 6,8 µl 4x Inkubationspuffer (30 % (w/v) Glycerol; 12 % (w/v) SDS; 150 mM Tris-HCl, pH 7; 0,03 % (w/v) Servablau G; 6 % (w/v) Mercaptoethanol) versetzt und anschließend für 30 min bei 40°C inkubiert. Als Größenstandard diente der Precision Plus Protein™ Standards Dual Color (Bio-Rad). Die Auftrennung erfolgte für 30 min bei 40 V und anschließend bei 75 V über Nacht.

Nach erfolgter Separation wurden die Gele gefärbt oder für die Westernblot- oder Ligandenaffinitätsblot-Analyse vorbereitet.

6.2.2 Separation von Proteinen nach Laemmli

Für die Auftrennung von Serumproteinen wurden Polyacrylamidgele nach Laemmli (Laemmli 1970) verwendet.

Die aufzutrennenden Proteine wurden mit 5x Laemmli-Inkubationspuffer (60 mM Tris-HCl, pH 6,8; 10 % (w/v) Glycerol; 2 % (w/v) SDS; 0,025 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt und bei 95 °C für 5 min erhitzt. Als Größenstandard dienten 10 µl des Precision Plus Protein™ Standards Dual Color (Bio-Rad). Die Auftrennung erfolgte für 30 min bei 40 V und anschließend bei 75 V über Nacht.

Nach der Elektrophorese wurden die Gele gefärbt oder für die Westernblot-Analyse vorbereitet.

6.3 Westernblot- und Ligandenaffinitätsblot-Analyse

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurde für den Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran (PROTRAN®, Whatman) das Verfahren des „Semi-dry-Blottings“ verwendet. Die Membran wurde nach erfolgtem Transfer (1 mA/m², 2 h bei Raumtemperatur) mit dem Reversible Protein Detection Kit (Sigma) nach Herstellerangaben angefärbt und anschließend in 0,05 M EDTA-Lösung wieder entfärbt. Die Membran wurde dann für 1 h in 5 % Milchpulverlösung (5 % (v/w) Milchpulver (Naturaflor® Magermilchpulver, Töpfer), TBS 0,1 % (v/v) Tween20) bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich erfolgte ein viermaliges Waschen der Membran für je 8 min mit TBS 0,1 % (v/v) Tween20.

Für eine Westernblot-Analyse wurde die Membran mit dem betreffenden Primärantikörper, welcher in 1x recomBlot Waschpuffer (Mikrogen) verdünnt wurde, für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach wiederholten viermaligen Waschen der Membran mit TBS 0,2 % (v/v) Tween20 für je 8 min wurde die Membran mit dem betreffenden sekundären Antikörper in entsprechender Verdünnung in 1x recomBlot Waschpuffer für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Zuletzt wurde die Membran viermal mit TBS 0,2 % (v/v) Tween20 für je 8 min gewaschen und die

Antigen-Antikörper-Komplexe mittels TMB-Substratlösung (Mikrogen) visualisiert. Die Reaktion wurde durch mehrfaches Waschen der Membran mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$ gestoppt. Für die Ligandenaffinitätsblot-Analyse wurde die Membran nach dem Waschen mit TBS 0,1 % (v/v) Tween20 mit dem betreffenden Liganden in entsprechender Verdünnung in 1x recomBlot Waschpuffer inkubiert. NHS als auch der Zellkulturüberstand mit FHL-1 oder CFHR-1 wurde dabei unverdünnt verwendet, gereinigtes Faktor H, rekombinant hergestelltes CFHR1 und rekombinant hergestelltes CFHR-2 wurde jeweils in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eingesetzt. Nach einer Inkubation von 1 h bei Raumtemperatur erfolgte ein viermaliges Waschen der Membran mit TBS 0,2 % (v/v) Tween20 für je 8 min. Nun folgte eine Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper in entsprechender Verdünnung in 1x recomBlot Waschpuffer für 1 h bei Raumtemperatur. Schließlich erfolgte nach viermaligem Waschen der Membran mit TBS 0,2 % (v/v) Tween20 für je 8 min die Inkubation mit dem Sekundärantikörper in entsprechender Verdünnung in 1x recomBlot Waschpuffer für 1 h bei Raumtemperatur. Zuletzt wurde die Membran viermal mit TBS 0,2 % (v/v) Tween20 für je 8 min gewaschen und die Proteinkomplexe durch Zugabe der TMB-Substratlösung (Mikrogen) visualisiert. Die Reaktion wurde durch mehrfaches Waschen der Membran mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$ gestoppt.

TBS

Tris 50 mM

NaCl 200 mM

pH 7,5

6.4 Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Zur Silberfärbung wurden die SDS-Polyacrylamidgele für 30 min in Fixierlösung (10 % Essigsäure, 40 % EtOH) inkubiert. Anschließend erfolgte eine 30 minütige Inkubation des SDS-Polyacrylamidgels in Inkubationslösung. Nach dreimaligem Waschen des Gels für je 5 min in $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$ wurde das Gel für 20 min in Silberlösung inkubiert. Schließlich wurden die Proteine nach zweimaligem Waschen des Gels in $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$ durch Zugabe des Entwicklers visualisiert und die Reaktion nach dem Erscheinen der Signale mit Stopplösung beendet.

Inkubationslösung

Na ₂ S ₂ O ₃ x 5H ₂ O	0,5 g
Na(CH ₃ COO)	17 g
Glutaraldehyd 25%	1,25 ml
Ethanol	75 ml
H ₂ O _{demin}	ad 250 ml

Silberlösung

Silbernitrat	625 mg
Formaldehyd 37 %	350 µl
H ₂ O _{demin}	ad 250 ml

Entwickler

Na ₂ CO ₃	6,25 g
Formaldehyd 37 %	150 µl
H ₂ O _{demin}	ad 250 ml

Stopplösung

EDTA	29,2 g
H ₂ O _{demin}	ad 2 l

6.5 Kolloidale Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Zur Identifizierung von Serumproteinen wurde eine SDS-Gelelektrophorese mit anschließender kolloidaler Coomassie-Färbung durchgeführt. Dazu wurden zunächst 35 µl der Eluat- und der Waschfraktion der Serumadsorption mit magnetischen Partikeln (Kap. 8.1) mit je 10 µl 5x Laemmli-Inkubationspuffer versetzt und in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgel nach Laemmli aufgetrennt (Kap. 6.2.2). Das Polyacrylamidgel wurde anschließend 1 h in Fixierlösung (50 % Methanol, 10 % Essigsäure) belassen und die Proteine schließlich über Nacht in kolloidaler Färbelösung (17 % (NH₄)₂SO₄, 34 % Methanol, 0,5 % Essigsäure, 0,1 % Servablau) angefärbt. Nach 2 bis 3 h Inkubation in H₂O wurden die relevanten Proteine mit

einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mittels Massenspektrometrie (Kap. 6.6) analysiert.

Alle Gegenstände, die zum Färben des Gels und zum Ausschneiden der Proteine aus dem Gel verwendet wurden, wurden vorher in Alconox (1:100 in Wasser verdünnt, BIO-RAD) über Nacht inkubiert und anschließend mit Wasser (Aqua ad injectabilia, Braun) gespült.

6.6 Massenspektrometrie

Die aus dem SDS-Polyacrylamidgel ausgeschnittenen, mit Coomassie gefärbten Proteine wurden durch MALDI-MS identifiziert. Die massenspektrometrische Analyse wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Beckhaus (Arbeitsgruppe Prof. M. Karas, Institut für Pharmazeutische Chemie, Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Frankfurt) durchgeführt.

6.7 Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli*

Zur Herstellung rekombinanter His-gekoppelter CRASP in *E. coli* wurde eine 10 ml Vorkultur der betreffenden *E. coli*-Klone verwendet um 250 ml 2x YT / Ampicillin-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,2 einzustellen. Diese Kultur wurde anschließend bei 37 °C und 80 rpm im Inkubator (Novotron, Infors) bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Anschließend erfolgte die Induktion des gewünschten Gens durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 10 mM. Die Produktion des rekombinanten Proteins in *E. coli* fand bei 21 °C, 80 rpm für 4 h statt. Schließlich wurde die Kultur zentrifugiert (10 min, 4 °C, 5000 xg) und das Zellsediment bei -70 °C über Nacht eingefroren. Am nächsten Tag wurde es auf Eis aufgetaut, in 12 ml Lysis-Puffer (50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol; 1 mg/ml Lysozym, pH 8,0) resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall unter Verwendung eines gekühlten Becherresonators (Branson B12, Heinemann) sechsmal für 30 s bei 4 °C. Die Zellreste wurden anschließend sedimentiert (5000 xg, 10 min, 4 °C) und der Überstand für die Affinitätschromatographische Aufreinigung oder für die Kopplung an magnetische Partikel eingesetzt oder bei -20 °C eingefroren.

6.8 Affinitätschromatographische Aufreinigung rekombinanter Proteine

Zur Aufreinigung der rekombinant hergestellten His-CRASP wurden 2 ml Ni-NTA Agarose (Qiagen) mit 8 ml Überstand der aufgearbeiteten Überexpression (Kap. 6.7) für 1 h bei 4°C auf einer Wippe (Rocky, LTF) inkubiert.

Das Gemisch wurde anschließend sedimentiert (200 xg, 1 min, 4 °C) und das Sediment einmal mit 8 ml kaltem Waschpuffer (20 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol, pH 8,0) gewaschen (200 xg, 1 min, 4 °C). Anschließend wurde das Sediment in wiederum 8 ml kaltem Waschpuffer gelöst, die Proteinlösung auf eine Säule (Poly-Prep[®] Chromatography Columns, Bio-Rad) appliziert und bei 4 °C inkubiert bis die Lösung vollständig abgelaufen war. Nun erfolgte ein zweimaliges Waschen der Sepharose mit je 4 ml kaltem Waschpuffer. Schließlich wurde die Sepharose zweimal mit je 4 ml 50 mM Imidazolpuffer (50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 50 mM Imidazol, pH 8,0) gewaschen. Die fraktionierte Elution der Proteine erfolgte mit je 4 ml Elutionspuffer mit steigenden Konzentrationen an Imidazol (75 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM).

Je 1 µl der erhaltenen Fraktionen wurde mittels Tris Tricin-SDS-Gelelektrophorese (Kap. 6.2.1) aufgetrennt und mittels Silberfärbung (Kap. 6.4) auf Reinheit geprüft. Die Eluatfraktionen mit dem höchsten Reinheitsgrad wurden vereinigt und mit Vivaspin 20-Konzentratoren (Sartorius) aufkonzentriert. Eine Umpufferung fand schließlich mit 0,05 M Tris (pH 8,0) ebenfalls unter Verwendung von Vivaspin 20-Konzentratoren statt.

Die gereinigten Proteine wurden bei –20 °C gelagert.

Imidazol-Elutionspuffer

NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	75 mM / 100 mM / 150 mM / 200 mM / 250 mM
pH 8,0	

6.9 Konzentrationsbestimmung rekombinanter Proteine

Die Konzentrationsbestimmung affinitätschromatographisch aufgereinigter Proteine erfolgte mit dem BCA Protein Assay Kit (Pierce) laut Herstellerangaben in Mikrotiterplatten (Greiner Bio-one). Als Proteinstandard diente BSA (Pierce).

7 Immunologische Methoden

7.1 Hämolytischer Assay

Um die Interaktion gereinigter CRASP mit Komponenten des Komplementsystems zu untersuchen, wurde ein hämolytischer Assay durchgeführt.

Das Waschen und Verdünnen der verwendeten Erythrozytenpräparationen (BioTrend Chemikalien GmbH), der rekombinanten CRASP, des NHS und der Komplementkomponenten erfolgte in Mg-EGTA-Puffer (20 mM HEPES, 144 mM NaCl, 7 mM MgCl₂, and 10 mM EGTA, pH 7.4).

Zunächst wurden 2,5 µg CRASP-1_{Y240A} in 7,5 %igem NHS in einem Gesamtvolumen von 100 µl für 30 min bei 37 °C inkubiert. Schließlich erfolgte die Zugabe von 5x10⁶ Kannederythrozyten (BioTrend Chemikalien GmbH). Nach einer weiteren Inkubation für 30 min bei 37 °C wurden die Erythrozyten sedimentiert (2000 xg, 5 min, Raumtemperatur) und die Absorption des Überstands in einer Mikrotiterplatte (F96 Maxisorb, Nunc-Immuno Module) bei einer Wellenlänge von 414 nm bestimmt. Die vollständige Lyse der Erythrozyten in einem Ansatz ohne CRASP diente als Negativkontrolle. Als Positivkontrolle wurde ein Ansatz mit 2,5 µg CRASP-1, welches die Erythrozyten vor komplementvermittelter Lyse schützt (Prof. P. Zipfel, persönliche Mitteilung), verwendet.

Um die direkte Interaktion von veränderten, gereinigten CRASP mit den Komponenten des terminalen Komplementweg zu untersuchen, wurden 2x10⁸ Schaffserythrozyten (BioTrend Chemikalien GmbH) in einem Gesamtvolumen von 30 µl Mg-EGTA-Puffer resuspendiert, mit final 1,5 µg/ml C5b-6 (CompTech) versetzt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Parallel dazu wurden in einem zweiten Reaktionsansatz 2,5 µg gereinigtes CRASP-1_{Y240A}, 1 µg/ml C7 (CompTech), 0,2 µg/ml C8 (CompTech) und 1 µg/ml C9 (CompTech) in einem Endvolumen von 30 µl in Mg-EGTA-Puffer resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Schließlich wurden beide Reaktionsansätze vereinigt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die verbleibenden Erythrozyten sedimentiert (2000 xg, 5 min, RT) und die Absorption des Überstands in einer Mikrotiterplatte bei einer Wellenlänge von 414 nm bestimmt. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne Zugabe von gereinigtem CRASP. Als Positivkontrolle diente ein Ansatz mit 2,5 µg CRASP-1.

7.2 Immunfluoreszenzmikroskopie

Eine 10 ml Flüssigkultur von Borrelien wurde sedimentiert (5000 xg, 4 °C, 30 min) und anschließend einmal mit 500 µl VBS gewaschen. Das Sediment wurde in 500 µl VBS gelöst und die Zellkonzentration ermittelt (Kap. 4.2).

Zum Nachweis der Ablagerung aktivierter Komplementkomponenten auf der Zelloberfläche wurden 6×10^6 Borrelienzellen in 25 % NHS bzw. 25 % hitzeinaktiviertem NHS [hiNHS, die Inaktivierung erfolgte für 30 min bei 56 °C in einem Thermomixer (Eppendorf)] für 30 min bei 37 °C inkubiert. Zum Nachweis der Inhibition des terminalen Komplementkomplexes durch CRASP wurde NHS mit 20 µg gereinigtem CRASP versetzt, auf 25% NHS mit PBS verdünnt, für 30 min bei 37°C vorinkubiert, zu 6×10^6 Zellen des komplementsensitiven Isolates *B. garinii* G1 gegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Hier diente als Kontrolle ein Ansatz mit 25% NHS, welcher ebenfalls für 30 min bei 37°C inkubiert wurde. Anschließend wurden die Zellen sedimentiert (16.000 xg, 10 min, 4 °C), zweimal mit 100 µl PBS/0,2 % BSA gewaschen (16.000 xg, 10 min, 4 °C) und das Sediment in 100 µl PBS/0,2 % BSA resuspendiert. Die Zellsuspension wurde danach 1:10, 1:50, oder 1:100 in PBS/0,2% BSA verdünnt und 10 µl der entsprechenden Verdünnung auf Objektträger pipettiert, die über Nacht an der Luft getrocknet wurden. Die Fixierung der Zellen auf dem Objektträger erfolgte nun für 10 min in Methanol. Nach 1 h wurde der Objektträger mit dem Primärantikörper gegen die Komplementkomponenten C3b, C6 oder den terminalen Komplementkomplex (C5b-9) für 1h in einer feuchten Kammer bei 33 °C inkubiert. Nach anschließendem vierfachem Waschen mit PBS folgte die Inkubation der Objektträger mit dem sekundären Alexa Fluor488-markierten Antikörper (1:500 in PBS/0,2 % BSA) für 1 h bei 33 °C in einer feuchten, dunklen Kammer. Nach weiterem vierfachem Waschen mit PBS wurden

die Objektträger mit ProLong Gold antifade reagent DAPI überschichtet und mit einem Deckgläschen versiegelt. Die fixierten Borrelienzellen wurden anschließend am Fluoreszenzmikroskop (CX-40, OLYMPUS) analysiert und fotografiert (DS-5Mc Digitalkamera, Nikon).

Zum Nachweis von Proteinen auf der äußeren Zellmembran von Borrelien wurden 6×10^6 Zellen mit den primären Antikörpern anti-ZS7 A68 zum Nachweis von CRASP-1, anti-CspZ zum Nachweis von CRASP-2, anti-ErpP zum Nachweis von CRASP-3 (jeweils 1:50 in PBS/0,2 % BSA verdünnt) oder mit B11 zum Nachweis von CRASP-5 (1:20 in PBS/0,2 % BSA verdünnt) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach anschließendem dreifachen Waschen mit jeweils 100 μ l PBS/0,2 % BSA wurden die Zellen in 1 ml PBS/0,2 % BSA resuspendiert, 10 μ l dieser Suspension auf Objektträger pipettiert und die Objektträger über Nacht an der Luft getrocknet. Die Fixierung erfolgte für 10 min in Methanol. Nach wiederholtem Trocknen für 1 h wurden die entsprechenden sekundären Alexa Fluor488-markierten Antikörper 1:500 in PBS/0,2 % BSA verdünnt und 10 μ l auf den Objektträger pipettiert. Die Inkubation erfolgte anschließend bei 33 °C in einer feuchten, dunklen Kammer für 1 h. Nach vierfachem Waschen mit PBS wurden die Objektträger mit ProLong Gold antifade reagent DAPI überschichtet und mit einem Deckgläschen versiegelt. Das Mikroskopieren und Fotografieren erfolgte am Fluoreszenzmikroskop bei einer 1000fachen Vergrößerung wie oben beschrieben.

8 Spezielle Methoden

8.1 Serumadsorption mittels magnetischer Partikel

Zur Identifizierung von Liganden der CRASP-Moleküle wurde die Methode zur Aufreinigung rekombinant hergestellter Proteine mittels magnetischer Partikel (Dynabeads® TALON®; DYNA®; Invitrogen) in modifizierter Form angewandt.

Die sich nach Ultraschallbehandlung (Kap. 6.7) im Zellüberstand befindenden His-CRASP wurden nach Herstellerangaben an die magnetischen Partikel gekoppelt und der Komplex viermal mit je 700 μ l Waschpuffer (50 mM Na_3PO_4 , 300 mM NaCl, 0,01 % Tween20, pH 8,0) gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation der CRASP-gekoppelten magnetischen Partikel mit 500 μ l Humanserum für 1 h auf Eis. Nach dreimaligen Waschen mit je 700 μ l Waschpuffer und anschließendem

Waschen mit 70 μ l Waschpuffer, erfolgte die Elution der gebundenen Proteinkomplexe mit 70 μ l 0,1 M Glycin-HCl (pH 2,0) für 15 min auf Eis. Die magnetischen Partikel wurden mittels Magneten vom Eluat getrennt. Zur Neutralisation des Eluats wurden anschließend 6 μ l 1 M Tris-HCl hinzugegeben. Um sicherzustellen, dass die Aufreinigung mittels magnetischer Partikel zur Isolierung von His-CRASP geeignet ist, wurde diese nach Herstellerangaben durchgeführt. Als weitere Kontrolle wurden nicht-gekoppelte, magnetische Partikel mit Humanserum inkubiert.

Die Analyse der vierten Waschfraktion, der Eluatfraktion und der Kontrollen erfolgte in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgel nach Laemmli. Die Identifizierung der mit CRASP interagierenden Serumproteine erfolgte mittels Silberfärbung (Kap. 6.4), Westernblot-Analyse (Kap. 6.3) und kolloidaler Comassiefärbung (Kap. 6.5) mit anschließender massenspektrometrischer Analyse (Kap. 6.6).

Zur Lagerung wurden die Proben bei -20 °C eingefroren.

8.2 Serumadsorption

Die an der Oberfläche von vitalen Borrelien gebundenen Serumproteine wurden anhand eines sogenannten Serumadsorptionsversuchs identifiziert.

Dazu wurde eine 270 ml Flüssigkultur von Borrelien sedimentiert (30 min, 5000 xg, 4 °C), zweimal mit VBS gewaschen (16.000 xg, 10 min, 4 °C) und anschließend in 1 ml VBS resuspendiert. Die Bestimmung der Zellkonzentration erfolgte mit einer Zählkammer (Material und Methoden, Kap. 4.2). 1×10^9 Zellen wurden sedimentiert (16.000 xg, 10 min, 4 °C) und in 750 μ l NHS-EDTA (725 μ l NHS, 25 μ l 1 M EDTA pH 8,3, Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur) resuspendiert. Der Zusatz von EDTA dient zur Inaktivierung der Komplementkaskade durch Entzug von zweiwertigen Ionen. Nach einer Inkubation für 1 h bei 37 °C erfolgte ein dreimaliges Waschen der Zellen (16.000 xg, 10 min, 4 °C) mit 1 ml PBSA-Tween20 (150 mM NaCl; 30 mM Phosphatpuffer, pH 7,2; 0,02% Natriumazid; 0,05 % Tween20). Anschließend wurden die Zellen mit 30 μ l PBSA-Tween20 gewaschen (16.000 xg, 10 min, 4 °C) und der Überstand als „Waschfraktion“ aufbewahrt. Die Elution der an die Borrelienzellen gebundenen Proteine erfolgte durch Zugabe von 30 μ l 0,1 M Glycin (pH 2,0) und einer Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur. Die Zellen

wurden anschließend sedimentiert (16.000 xg, 10 min, 4 °C), der Überstand mit 2,4 µl 1 M Tris-Puffer (pH 9,0) neutralisiert, wiederholt zentrifugiert (16.000 xg, 10 min, 4 °C) und der Überstand als Eluatfraktion aufgehoben. Sowohl die Waschfraktion als auch die Eluatfraktion wurden mit 30 µl reduzierenden Inkubationspuffer für Laemmli-SDS-Polyacrylamidgele versetzt und für die Separation im Laemmli SDS-Gel vorbereitet (Kap. 6.2.2).

Für die Elution zelloberflächengebundener Proteine durch steigende NaCl-Konzentrationen wurden die Zellen nach der Inkubation mit Humanserum und dem viermaligen Waschen mit PBSA-Tween20 aufeinanderfolgend für jeweils 15 min mit 10 µl Puffer mit 0,45 M NaCl (450 mM NaCl; 30 mM Phosphatpuffer, pH 7,2; 0,02% Natriumazid; 0,05 % Tween20), 0,75 M NaCl (750 mM NaCl; 30 mM Phosphatpuffer, pH 7,2; 0,02% Natriumazid; 0,05 % Tween20), 1,05 M NaCl (1,05 M NaCl; 30 mM Phosphatpuffer, pH 7,2; 0,02% Natriumazid; 0,05 % Tween20) und 1,35 M NaCl (1,35 M NaCl; 30 mM Phosphatpuffer, pH 7,2; 0,02% Natriumazid; 0,05 % Tween20) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach jedem Inkubationsschritt wurden die Zellen zentrifugiert (16.000 xg, 10 min, 4 °C) und der jeweilige Überstand aufbewahrt. Die Elution der restlichen, an die Borrelienzellen gebundenen Proteine erfolgte final mit 30 µl 0,1 M Glycin (pH 2,0) für 15 min bei Raumtemperatur. Zuletzt wurden die Zellen (16.000 xg, 10 min, 4 °C) sedimentiert, der Überstand mit 2,4 µl Tris-HCl neutralisiert, wiederholt zentrifugiert (16.000 xg, 10 min, 4 °C) und der Überstand als Eluatfraktion behalten. Die einzelnen Überstände als auch die Eluatfraktion wurden mit je 10 µl Inkubationspuffer für Laemmli SDS-Polyacrylamidgele versetzt und für die Separation in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel vorbereitet. Der Nachweis der Proteine erfolgte mittels Westernblot-Analyse und des polyklonalen anti-CFHR-1-Antikörpers (Kap. 6.3).

VBS-Stammlösung

NaCl	41,5 g
Na-5,5-diethylbarbiturat	5,095 g
1 N HCl	17,8 ml
pH 7,3	

VBS-Puffer

VBS-Stammlösung 20 ml
Gelatine 0,1 g
0,3 M CaCl₂ 100 µl
2 M MgCl₂ 100 µl
sterilfiltriert

10x Phosphatpuffer (nach Sørensen) 0,1 M (pH 7,2)

0,2 M NaH₂PO₄ 14 ml
0,2 M Na₂HPO₄ 1 ml
H₂O ad 100 ml
sterilfiltriert

8.3 Kofaktor-Assay

Der Kofaktor-Assay dient dem Nachweis der regulatorischen Aktivität von Faktor H und FHL-1, welches an die Zelloberfläche vitale Borrelien gebunden hat.

Eine 30 ml Flüssigkultur von Borrelien wurde zentrifugiert (30 min, 5000 xg, 4 °C), das Zellsediment zweimal mit je 500 µl PBS (10 mM Na₂HPO₄, 1 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl) gewaschen und anschließend in 500 µl PBS aufgenommen. Die Bestimmung der Zellkonzentration erfolgte mittels Zählkammer (Kap. 4.2). 4×10^7 Zellen wurden in insgesamt 40 µl PBS resuspendiert und mit 30 ng gereinigtem Faktor H oder mit 30 ng rekombinantem FHL-1 versetzt. Nach 60 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen sedimentiert (16.000 xg, 10 min, 4 °C) und viermal mit je 1 ml PBS gewaschen, um ungebundenes Faktor H bzw. FHL-1 vollständig zu entfernen. Das Zellsediment wurde anschließend in 30 µl PBS resuspendiert. Anschließend erfolgte eine 60 minütige Inkubation der Zellen mit 0,02 µg/µl Faktor I (Calbiochem) und 0,01 µg/µl C3b (Calbiochem) bei 37 °C. Zuletzt wurden die Zellen sedimentiert und der Überstand mit 10 µl Probenpuffer für Laemmli-SDS-Polyacrylamidgele (60 mM Tris/HCl pH 6,8, 10 % (w/v) Glycerol, 2 % w/v SDS, 0,025 % (w/v) Bromphenolblau) und 2,5 µl Mercaptoethanol versetzt. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die weder mit Faktor H noch mit FHL-1 inkubiert wurden, sowie ein Reaktionsansatz (30 µl) der nur gereinigtes Faktor I und C3b

enthielt. Zum Sicherstellen der komplementregulatorischen Aktivität von Faktor H und FHL-1 diente ein Ansatz (30 μl) der 30 ng Faktor H bzw. FHL-1, 0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Faktor I und 0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ C3b enthielt. Jeweils 15 μl der Überstände sowie die Kontrollansätze wurden in einem 12,5 %igem SDS-Polyacrylamidgele nach Laemmli aufgetrennt und die C3b-Spaltprodukte mittels Westernblot-Analyse und dem anti-C3-Antikörper (Kap. 6.3) nachgewiesen.

Die Aufbewahrung aller mit Probenpuffer versetzten Überstände und Kontrollen erfolgte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

8.4 Wachstums-Inhibitions-Assay

Der Wachstums-Inhibitions-Assay zeigt, welche Borrelienisolate und Transformanten in der Lage sind, in Gegenwart von aktivem Komplement zu überleben.

13 ml Flüssigkultur einer sich in der mid-logarithmischen Phase befindenden Borrelienkultur wurden sedimentiert und in 500 μl BSK-Medium resuspendiert. Die Zellkonzentration wurde mittels Zählkammer im Dunkelfeldmikroskop ermittelt (Material und Methoden, Kap. 4.2). $1,25 \times 10^6$ Zellen in 50 μl BSK-Medium wurden mit 50 μl BSK-Phenolrot und 100 μl NHS oder hitzeinaktiviertem NHS (hiNHS) (30 min, $56\text{ }^{\circ}\text{C}$) versetzt. Zur Inhibition des terminalen Komplementkomplexes wurden 100 μl NHS mit 20 μg affinitätschromatographisch gereinigtem und sterilfiltriertem CRASP versetzt, für 30 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ vorinkubiert und anschließend zu $1,25 \times 10^6$ Zellen in 50 μl BSK-Medium und 50 μl BSK-Phenolrot hinzugegeben. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit 100 μl NHS, welcher für 30 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert wurde. Für diese Versuche wurden 96er Mikrotiterplatten (Cell Culture Plate Non-Pyrogenic, Fa. Corning) verwendet. Als Wachstumskontrolle dienten Ansätze von Borrelien, die in 200 μl BSK-Medium resuspendiert wurden. Um mikroaerophile Bedingungen zu garantieren und ein Austrocknen zu verhindern wurde die Mikrotiterplatte seitlich mit Parafilm (Parafilm „M“[®], Pechiney Plastic Packing) versehen. Die Inkubation erfolgte für 9 Tage bei $33\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Das Wachstum der Borrelien wurde durch den Farbumschlag von rot nach gelb indiziert und die Extinktionswerte mit einem ELISA-Reader (PowerWave 200, BIO-TEK Instruments) bei 562 nm / 630 nm gemessen und mittels der Software Microwin Version 3.0 (Microtek) dokumentiert. Die erste Messung erfolgte 3 h nachdem die

Ansätze pipettiert wurden. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte aller 24 h gemessen.

Stammlösung Phenolrot

20 ml BSK-Medium

24 mg Phenolrot

sterilfiltriert

BSK-Phenolrot

Phenolrot (Stammlösung) wurde zum BSK-Medium hinzugegeben bis ein Extinktionswert von 1,8 bei einer Wellenlänge von 562 nm / 630 nm vorlag.

8.5 Protease-Assay

Der Protease-Assay dient dem Nachweis der Lokalisation von membranständigen Proteinen intakter Borrelienzellen.

180 ml Zellkultur wurden bei 5000 xg für 30 min und 4 °C zentrifugiert, das Sediment einmal mit 400 µl PBS (10 mM Na₂HPO₄, 1 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl) gewaschen (16.000 xg, 10 min, 4 °C) und anschließend in 500 µl PBS resuspendiert. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Zählkammer und einem Dunkelfeldmikroskop bestimmt (Material und Methoden, Kap. 4.2). Je 4x10⁸ intakte Zellen wurden in Abwesenheit von Proteinase K oder Trypsin oder in Gegenwart von 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml oder 20 µg/ml Proteinase K oder 20 µg/ml Trypsin für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inhibition beider Proteasen erfolgte anschließend mit AEBSF (Endkonzentration: 1 µg/µl) und PMSF (Endkonzentration: 0,5 µg/µl). Zusätzlich wurde zu den Ansätzen mit Trypsin der Proteaseinhibitor Pefablock (Endkonzentration: 1x) hinzugegeben. Die Zellen wurden anschließend sedimentiert (16.000 xg, 10 min, 4 °C) und zweimal mit 500 µl PBS-MgCl₂ gewaschen (16.000 xg, 10 min, 4 °C). Das Sediment wurde in 20 µl PBS/MgCl₂ resuspendiert und die Zellen mit Hilfe von Ultraschall lysiert (Kap. 6.1.1).

Je 2 µl Zellextrakt wurden mit 8 µl H₂O_{demin} und 3,5 µl Inkubationspuffer für Tris Tricin-SDS-Polyacrylamidgele versetzt und für 30 min bei 40 °C inkubiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 10 %igem Tris Tricin-SDS-Polyacrylamid-

gel. Die Detektion der CRASP erfolgte mittels Westernblot- oder Ligandenaffinitätsblot-Analyse (Kap. 6.3).

Die restlichen Zellextrakte wurden bei -20 °C aufbewahrt.

PBS

Na_2HPO_4	10 mM
NaH_2PO_4	1 mM
NaCl	150 mM

PBS-MgCl₂

PBS	10 ml
2 M MgCl_2	250 μl

9 Chemikalien

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich, Roth, Calbiochem, Applichem und Merck im höchsten Reinheitsgrad bezogen. Ausnahmen werden im Text erwähnt.

III. Ergebnisse

1 Transformation von *B. garinii* G1

B. burgdorferi s.s. besitzt bis zu fünf verschiedene, auf der Zelloberfläche lokalisierte CRASP-Moleküle, welche Komplementregulatoren des alternativen Weges binden und so die Zellen vor komplementvermittelter Bakteriolyse schützen. Diese Proteine werden von Genen kodiert, die verteilt auf linearen (lp54 und lp28-3) und zirkulären Plasmiden (cp32-1, cp32-2 und cp32-9) lokalisiert sind. Verschiedene Borrelienisolate verfügen über ein unterschiedliches Repertoire an diesen Plasmiden, so dass einzelne Borrelienisolate eine Kombination an verschiedenen CRASP auf der Zelloberfläche tragen (Kraiczky et al. 2001a). Unter den bisher untersuchten Isolaten befand sich jedoch keines, bei dem nur ein einzelnes CRASP-Protein nachgewiesen werden konnte. Aus diesem Grund stellt sich die Frage nach der Relevanz einzelner CRASP für die Komplementresistenz von *B. burgdorferi* s.s..

Um fundierte Erkenntnisse zu diesem unzureichend geklärten Sachverhalt zu erhalten, wurde das komplementsensitive, CRASP-negative Isolat *B. garinii* G1 gewählt, in welches die einzelnen CRASP-kodierenden Gene des komplementresistenten Isolates *B. burgdorferi* LW2 durch Elektroporation eingebracht wurden. Die dazu verwendeten Vektoren pCRASP-1, pCRASP-2, pCRASP-3 und pCRASP-5 besitzen neben dem jeweiligen CRASP-kodierenden Gen die entsprechend dazugehörigen regulativen Sequenzen (Material und Methoden, Kap. 1.2). CRASP-4 von *B. burgdorferi* LW2 wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht, da sich dieses Protein in seiner Eigenschaft, Faktor H zu binden, nicht von CRASP-3 und CRASP-5 unterscheidet.

An der Interaktion der beiden Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1 mit CRASP-1 und CRASP-2 scheinen einzelne Aminosäuren beteiligt zu sein, da gerichtete Aminosäuresubstitutionen im Protein zum vollständigen Verlust der Faktor H / FHL-1-Bindung führen (Siegel et al. 2008; Kraiczky et al. 2009). Um die Auswirkung der veränderten CRASP-Moleküle auf die Komplementresistenz der Borrelienzelle zu zeigen, wurden gerichtete Punktmutationen im CRASP-1-kodierenden *cspA*-Gen bzw. im CRASP-2-kodierenden *cspZ*-Gen eingeführt und die generierten Vektoren per Elektroporation in *B. garinii* G1

eingbracht. Die Transformanten wurden anschließend charakterisiert und hinsichtlich ihrer Komplementresistenz untersucht. Die Vektoren, welche das mutierte CRASP-1-kodierende *cspA*-Gen enthielten, wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt (Kap. 1.1). Die veränderten Vektoren pCRASP-2 F81A, pCRASP-2 R139A, pCRASP-2 Y207A, pCRASP-2 Y211A, pCRASP-2 R139A-Y207A, pCRASP-2 R139A-Y211A und pCRASP-2 Y207A-Y211A wurden von Herrn Prof. Kraiczy zur Verfügung gestellt.

1.1 Herstellung von Vektorkonstrukten mit mutagenisierten *cspA*-Genen

Um die Relevanz verschiedener Aminosäuren für die Bindung von Faktor H und FHL-1 an CRASP-1 auf der Borrelienoberfläche zu untersuchen, wurde zunächst eine *in vitro*-Mutagenese mit dem Basisvektor pCRASP-1 und spezifischen Starteroligonukleotiden durchgeführt (Material und Methoden, Kap. 5.9).

Für CRASP-1 wurden vier Aminosäuren an den Positionen 146, 147, 240 und 246 beschrieben, welche an der Bindung von Faktor H und FHL-1 beteiligt sein sollen (Kraiczy et al. 2009). Ausgehend von diesen Daten wurde die Sequenz des CRASP-1-kodierenden *cspA*-Gens in der Weise verändert, dass im translatierten Protein Leucin an Position 146 durch Histidin, Glutaminsäure an Position 147 durch Lysin, Tyrosin an Position 240 durch Alanin oder Leucin an Position 246 durch Asparaginsäure substituiert wurde (Tab. 8).

Tab. 8: Übersicht der veränderten Nukleotide im mutierten *cspA*-Gen und der getauschten Aminosäuren im veränderten CRASP-1-Molekül

Ursprüngliches Triplet	Verändertes Triplet	Position des Triplets im <i>cspA</i> -Gen	Ursprüngliche Aminosäure	Veränderte Aminosäure	Position der Aminosäure im Protein
CTT	CAT	436 - 438	Leucin	Histidin	146
GAA	AAA	439 - 441	Glutaminsäure	Lysin	147
TAC	GCC	718 - 720	Tyrosin	Alanin	240
TTA	GAT	736 - 738	Leucin	Asparaginsäure	246

Nach erfolgter *in vitro*-Mutagenese mittels PCR und einer sich anschließenden Hydrolyse mit der Restriktionsendonuklease DpnI (Material und Methoden, Kap. 5.9), wurden die Reaktionsansätze für eine Transformation von kompetenten *E. coli* DH5 α verwendet. Plasmide einzelner Klone wurden isoliert und die eingeführten Mutationen mittels Sequenzierung überprüft. Die durch *in vitro*-Mutagenese entstandenen Vektoren wurden im Folgenden als pCRASP-1 L146H, pCRASP-1 E147K, pCRASP-1 Y240A und pCRASP-1 L246D bezeichnet und anschließend für die Transformation von *B. garinii* G1 eingesetzt.

1.2 Charakterisierung der verschiedenen CRASP-produzierenden Transformanten von *B. garinii* G1

Nach Elektroporation des serumsensitiven Isolates *B. garinii* G1 mit den verschiedenen Vektorkonstrukten (Material und Methoden, Kap. 5.10.1) und anschließender mehrwöchiger Inkubation konnten folgende Klone selektioniert werden: G1/pKFSS1, G1/pCRASP-1, G1/pCRASP-1 E147K, G1/pCRASP-1 Y240A, G1/pCRASP-2, G1/pCRASP-2 F81A, G1/pCRASP-2 R139A, G1/pCRASP-2 Y207A, G1/pCRASP-2 Y211A, G1/pCRASP-2 R139A-Y207A, G1/pCRASP-2 R139A-Y211A, G1/pCRASP-2 Y207A-Y211A, G1/pCRASP-3 und G1/pCRASP-5. Trotz mehrfacher Versuche ließen sich keine lebensfähigen Borrelien, welche die Vektorkonstrukte pCRASP-1 L146H und pCRASP-1 L246D enthielten, isolieren.

Alle Borrelienkclone wurden zunächst auf das Vorhandensein des jeweiligen Vektors überprüft. Dazu wurden Teilsequenzen des *aadA*-Gens, welches für die Streptomycinresistenz kodiert, des für alle Borrelien charakteristischen Flagellin-kodierenden *flaB*-Gens und des jeweiligen CRASP-kodierenden Gens mittels PCR amplifiziert. Die Reaktionsansätze wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und die Größe der Amplifikate ermittelt. Als Kontrollen dienten jeweils das *B. burgdorferi* s.s. Isolat LW2, das *B. garinii* Isolat G1 und die entsprechenden Vektorkonstrukte.

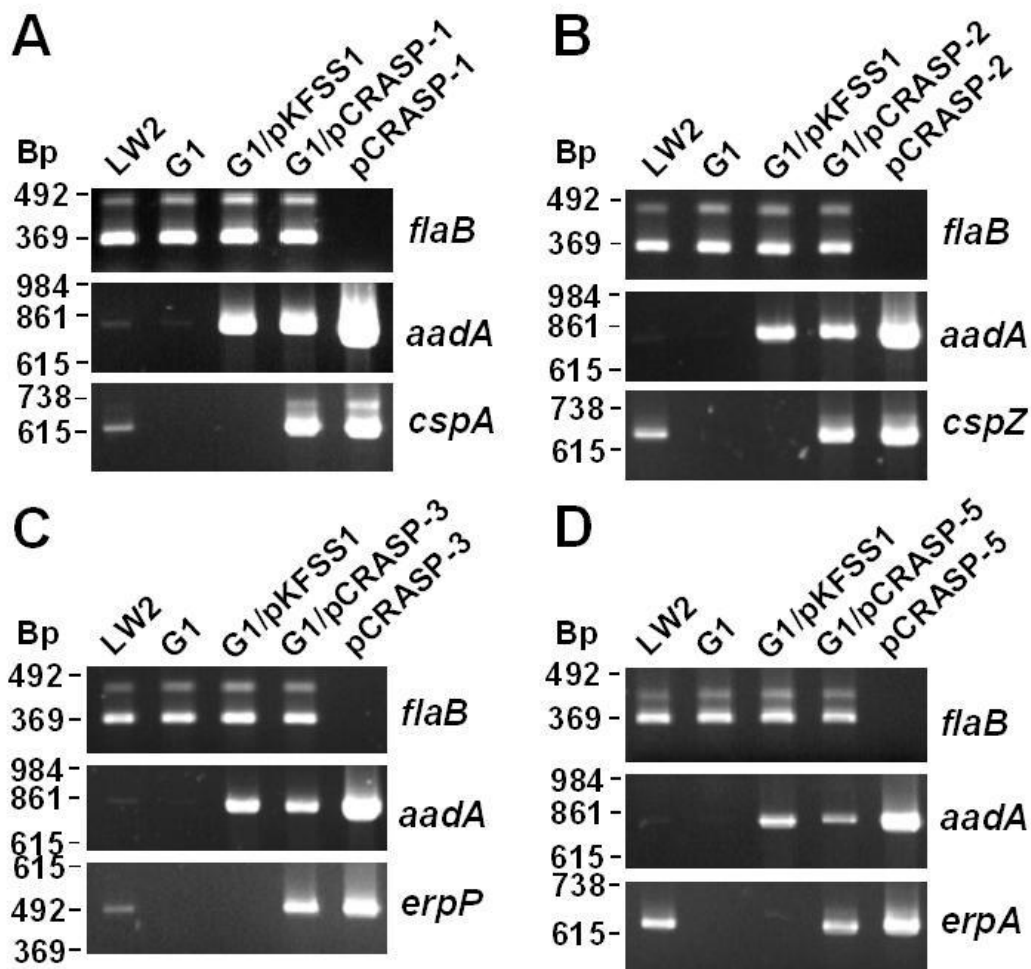


Abb. 7: Charakterisierung verschiedener Borrelientransformanten.

Der Nachweis des CRASP-kodierenden *cspA*-Gens der Transformante G1/pCRASP-1 (A), des *cspZ*-Gens der Transformante G1/pCRASP-2 (B), des *erpP*-Gens der Transformante G1/pCRASP-3 (C) sowie des *erpA*-Gens der Transformante G1/pCRASP-5 (D) als auch des für die Streptomycinresistenz kodierenden *aadA*-Gens und des Flagellin-kodierenden *flaB*-Gens erfolgte mittels PCR. Für die PCR wurde DNA von Borrelienzellen, die einmal mit PBS gewaschen und anschließend in H₂O lysiert wurden, oder gereinigte Plasmid-DNA eingesetzt. Insgesamt 13 µl von insgesamt 100 µl des PCR-Ansatzes wurden im 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt, das Gel anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt und die Signale schließlich mittels UV-Licht visualisiert. Links angegeben ist der Größenstandard 123bp Marker (Biolabs).

Wie zu erwarten, waren alle Borrelien in Bezug auf das *flaB*-Gen (360 Bp PCR-Produkt) positiv. Der Nachweis blieb, wie erwartet, für die PCR-Ansätze mit gereinigten Plasmiden, negativ. Die PCR mittels *aadA*-Starteroligonukleotiden ergab für alle Transformanten als auch für die eingesetzten Vektoren pCRASP-1, pCRASP-2, pCRASP-3 und pCRASP-5 ein Amplifikat von etwa 850 Bp. *B. burgdorferi* LW2 und *B. garinii* G1 zeigten kein bzw. ein extrem schwaches Signal eines etwa 850 Bp großen PCR-Produktes. Das CRASP-1-kodierende *cspA*-Gen konnte anhand des etwa 650 Bp großen Amplifikates in *B. burgdorferi* LW2 als auch

in den Transformanten G1/pCRASP-1, G1/pCRASP-1 E147K, G1/pCRASP-1 Y240A und dem Vektor pCRASP-1 nachgewiesen werden (Abb. 7A und 8A). Das CRASP-2-kodierende *cspZ*-Gen wurde anhand des 700 Bp großen PCR-Produktes in *B. burgdorferi* LW2 und den Transformanten G1/pCRASP-2, G1/pCRASP-2 F81A, G1/pCRASP-2 R139A, G1/pCRASP-2 Y207A, G1/pCRASP-2 Y211A, G1/pCRASP-2 R139A-Y207A, G1/pCRASP-2 R139A-Y211A, G1/pCRASP-2 Y207A-Y211A und dem Vektor pCRASP-2 nachgewiesen (Abb. 7B und 8B). Das CRASP-3 kodierende *erpP*-Gen wurde durch das ca. 490 Bp große Amplifikat in *B. burgdorferi* LW2, der Transformante G1/pCRASP-3 und dem Vektor pCRASP-3 identifiziert (Abb. 7C). Ebenfalls konnte das CRASP-5 kodierende *erpA*-Gen durch das 670 Bp große Amplifikat in *B. burgdorferi* LW2, der Transformante G1/pCRASP-5 und dem Vektor pCRASP-5 nachgewiesen werden (Abb. 7D). Für *B. garinii* G1 und die Transformante G1/pKFSS1 ließen sich die CRASP-1-, CRASP-2-, CRASP-3- und CRASP-5- kodierenden *cspA*-, *cspZ*-, *erpP*- und *erpA*-Gene mit den entsprechenden Starteroligonukleotiden nicht nachweisen. Mit dem fehlenden Nachweis der CRASP-kodierenden Gene bei *B. garinii* G1 und G1/pKFSS1 konnte sichergestellt werden, dass der resultierende Phänotyp der Transformanten tatsächlich auf das Vorhandensein des jeweiligen CRASP-Moleküls zurückzuführen ist. Die Transformanten wurden für die weiteren Untersuchungen eingesetzt. Das Isolat *B. garinii* G1, welches keine CRASP-kodierenden Gene besitzt, stellt die Negativkontrolle und das *B. burgdorferi* s.s. Isolat LW2, das alle CRASP-kodierenden Gene besitzt, die Positivkontrolle dar.

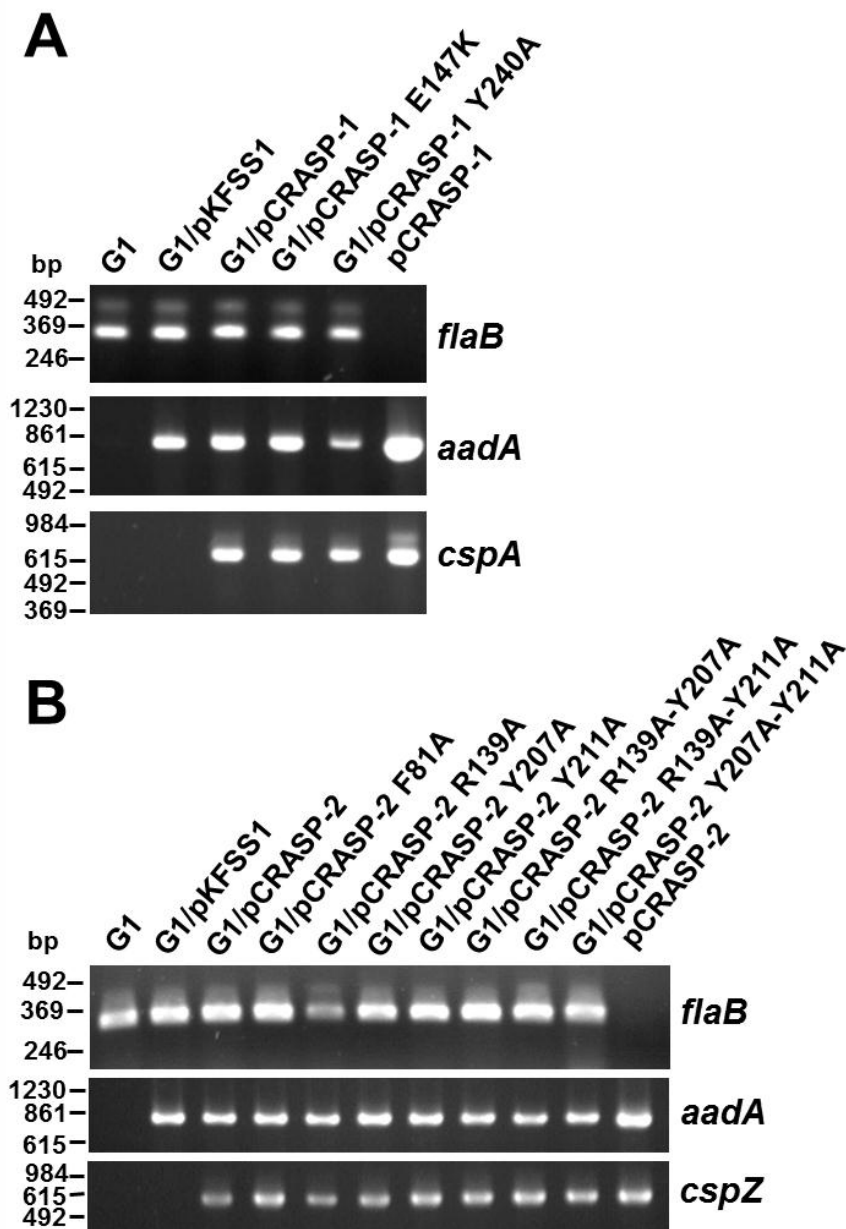


Abb. 8: Charakterisierung der Borrelientransformanten mit den mutierten CRASP-1-kodierenden *cspA*-Genen und den mutierten CRASP-2-kodierenden *cspZ*-Genen.

Der Nachweis des *cspA*-Gens (**A**), des *cspZ*-Gens (**B**), des Streptomycinresistenz-kodierenden *aadA*-Gens sowie des Flagellin-kodierenden *flaB*-Gens erfolgte mit spezifischen Starteroligonukleotiden. Für die PCR wurde DNA von Borrelienzellen, die einmal mit PBS gewaschen und anschließend in H₂O lysiert wurden, oder der gereinigte Vektor eingesetzt. Insgesamt 13 µl von 100 µl der jeweiligen PCR-Ansätze wurden im 1,5%igem Agarosegel aufgetrennt, die Gele anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt und die PCR-Amplifikate schließlich mittels UV-Licht visualisiert. Links angegeben ist der Größenstandard 123bp Marker (Biolabs).

1.3 Charakterisierung der Transformanten hinsichtlich ihres Plasmidprofils und genetische Lokalisation der CRASP-kodierenden Gene

Borrelien besitzen neben einem linearen Chromosom bis zu 24 lineare und zirkuläre extrachromosomale Elemente, welche eine Größe von 5 kBp bis 56 kBp aufweisen (Fraser et al. 1997; Casjens 2000; Palmer et al. 2000; Glockner et al. 2004). Durch Elektroporation lassen sich Borrelien mit spezifischen Vektoren transformieren. Allerdings kann bei diesem Prozess genetische Information verloren gehen. Die elektrophoretische Auftrennung der Plasmide verschiedenster Borrelienisolat mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese zeigt für fast jedes Isolat ein einzigartiges Plasmidprofil mit dessen Hilfe sich die Genospezies und teilweise sogar einzelne Isolate voneinander unterscheiden lassen (Kraiczky 2004; Morgenstern 2008). Zudem bietet diese Methode die Möglichkeit, Transformanten hinsichtlich ihres Plasmidprofils gegenüber dem Ausgangsisolat zu charakterisieren.

Deutlich ist das Plasmidmuster von *B. burgdorferi* LW2 vom Plasmidmuster von *B. garinii* G1 anhand der unterschiedlichen Anzahl an Plasmiden als auch an der Größe der Plasmide zu unterscheiden (Abb. 9A). Dagegen zeigen sich bei *B. garinii* G1 alle Plasmide, welche auch bei den Transformanten vorhanden sind. Abweichungen gibt es lediglich bei dem ca. 49 kBp großen Plasmid, welches bei den Transformanten, aber nicht bei *B. garinii* G1 zu erkennen ist. Dennoch ist bekannt, dass *B. garinii* G1 dieses Plasmid besitzt, es sich jedoch nicht immer visualisieren lässt (Morgenstern 2008). Wie zu erwarten unterschieden sich die Transformanten vom Ausgangsisolat *B. garinii* G1 zusätzlich durch den jeweils eingebrachten Vektor, der im Pulsfeldgel nicht oder nur durch ein sehr schwaches Signal nachgewiesen werden konnte. Der Nachweis der entsprechenden Vektoren erfolgte über das vektorspezifische *aadA*-Gen und einer entsprechenden Gensonde mittels Southernblot-Analyse (Abb. 9B). Erwartungsgemäß konnte keine Hybridisierung der *aadA*-Gensonde in den Borrelienisolaten *B. garinii* G1 und *B. burgdorferi* LW2 festgestellt werden. Die Isolate besitzen also weder das *aadA*-Gen noch eine diesem Gen homologe DNA-Sequenz. Dagegen lassen sich bei allen Transformanten mit Ausnahme von G1/pCRASP-3 wenigstens zwei hybridisierende Signale, bei G1/pKFSS1 sogar drei verschiedene Signale nachweisen. Die Signale zwischen 6,1 kBp und 15 kBp und die Signale zwischen 23 kBp und 35 kBp entsprechen den

eingebrachten Vektoren (Abb. 9B, mit Pfeilen markiert sind die erwarteten Signale). Deutlich wird, dass keiner der Vektoren mit Ausnahme des Grundvektors pKFSS1 seine tatsächliche Größe im Pulsfeldgel aufweist. Die Vektoren pCRASP-1 und pCRASP-2 mit einer tatsächlichen Größe von etwa 7,5 kBp zeigen im Agarosegel ein Signal bei 13 kBp bzw. 12 kBp und bei etwa 35 kBp bzw. 34 kBp. Der Vektor pCRASP-5 (etwa 7 kBp) weist Signale der Größe 9 kBp und 30 kBp auf. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass insbesondere zirkuläre Plasmide in der Pulsfeld-Gelelektrophorese ein ihrem Molekulargewicht nicht entsprechendes Laufverhalten zeigen (persönliche Mitteilung Prof. Stevenson, Universität Kentucky).

Warum bei der Transformante G1/pCRASP-3 kein Signal für das Plasmid pCRASP-3 detektiert werden konnte, lässt sich nicht erklären. Die PCR-Ergebnisse belegen eindeutig, dass das *aadA*-Gen als auch das CRASP-3-kodierende *erpP*-Gen in dieser Transformante vorhanden ist.

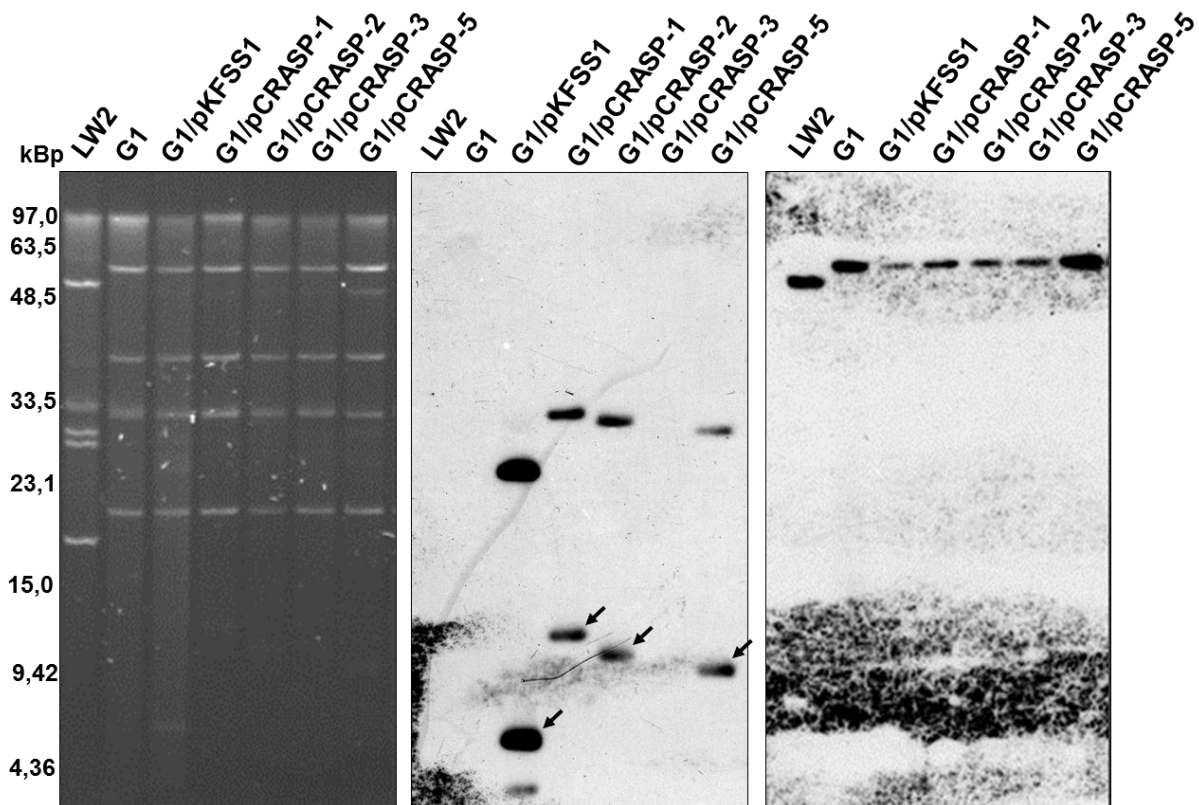


Abb. 9: Vergleichende Plasmid-Analyse und Nachweis des *aadA*-Gens und des *ospA*-Gens der Isolate *B. burgdorferi* LW2, *B. garinii* G1 sowie der verschiedenen Transformanten mittels Southernblot-Analyse.

In einem 1%igen Agarosegel wurden je 200 ng Plasmid-DNA der Transformanten G1/pKFSS1, G1/pCRASP-1, G1/pCRASP-2, G1/pCRASP-3, G1/pCRASP-5 und der Isolate *B. burgdorferi* LW2 und *B. garinii* G1 im gepulsten Feld über 22 h aufgetrennt und anschließend mit Ethidumbromid gefärbt (A). Die DNA wurde auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mittels HRP-markierter Gensonden gegen das *aadA*-Gen (B) und das *ospA*-Gen (C) hybridisiert. Der Nachweis hybridisierender DNA erfolgte durch das Chemilumineszenz-Verfahren (Material und Methoden, Kap. 5.11.2). Die Pfeile kennzeichnen die erwarteten Signale der verschiedenen, transformierten Vektorkonstrukte. Links angegeben ist der Größenstandard Low Range PFG Marker (Biolabs).

In gleicher Weise wurde das Plasmidmuster der anderen Borrelientransformanten und deren Vektorkonstrukte mit den mutierten CRASP-1- bzw. CRASP-2-kodierenden *cspA*- und *cspZ*-Genen nachgewiesen (Anhang, Abb. I und II). Wie die Southernblot-Analyse mittels *aadA*-Gensonde zeigte, enthielten alle Borrelientransformanten den entsprechend mutierten Vektor, der sich in der Position des Signals im Gel nicht von dem der Ausgangsvektoren unterschied. Zusätzlich wurde eine Southernblot-Analyse mit der *cspA*-Gensonde zur Überprüfung der Transformanten mit dem veränderten *cspA*-Gen als auch der *cspZ*-Gensonde zur Überprüfung der Transformanten mit dem veränderten *cspZ*-Gen durchgeführt. Deutlich wird, dass das CRASP-1-kodierende *cspA*-Gen als auch das CRASP-2-

kodierende *cspZ*-Gen mit dem Streptomycinresistenz-kodierenden *aadA*-Gen kolokalisiert auf dem jeweiligen Vektor vorhanden war (Anhang Abb. I B und C; II B und C).

Die Detektion des borrelienspezifischen *ospA*-Gens, welches sich bei *B. garinii* als auch bei *B. burgdorferi* s.s. auf dem linearem Plasmid mit einer Größe von ca. 54 Kbp befindet (Ip54), erfolgte mit einer spezifischen *ospA*-Gensonde und zeigte, dass es sich tatsächlich um Plasmide von *B. burgdorferi* s.l. handelte (Samuels et al. 1993; Glockner et al. 2004).

Diese Analyse zeigte außerdem, dass die hergestellten Transformanten und das Isolat *B. garinii* G1 in ihrem Plasmidmuster identisch waren. Gleichzeitig enthielten die Transformanten durch den Vektor die genetische Information des jeweiligen CRASP-kodierenden Gens oder des gezielt mutierten CRASP-kodierenden Gens.

Nachfolgend werden neben den Ergebnissen, die mit dem Isolat *B. garinii* G1 erzielt wurden, ebenfalls die Ergebnisse mit der Transformante G1/pKFSS1 als weitere CRASP-negative Kontrolle dargestellt.

1.4 Nachweis der CRASP-Produktion verschiedener Transformanten von *B. garinii* G1

Neben der molekulargenetischen Charakterisierung der Transformanten ist der Nachweis der Expression der CRASP-kodierenden Gene nach der Transformation in eine andere Borrelienspezies relevant, um sie für die weiteren Untersuchungen einzusetzen. Zum Nachweis wurden zunächst Zellextrakte aller Transformanten hergestellt, mittels Tris Tricin-SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt, die separierten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und anhand des Westernblot-Verfahrens auf das Vorhandensein der jeweiligen CRASP untersucht. Um zu verdeutlichen, dass vergleichbare Proteinmengen der verschiedenen Zellextrakte auf das Gel aufgebracht worden sind, wurde als „Markerprotein“ die Flagellinuntereinheit FlaB, welche durch das konstitutiv exprimierte *flaB*-Gen kodiert wird, nachgewiesen (Abb. 10).

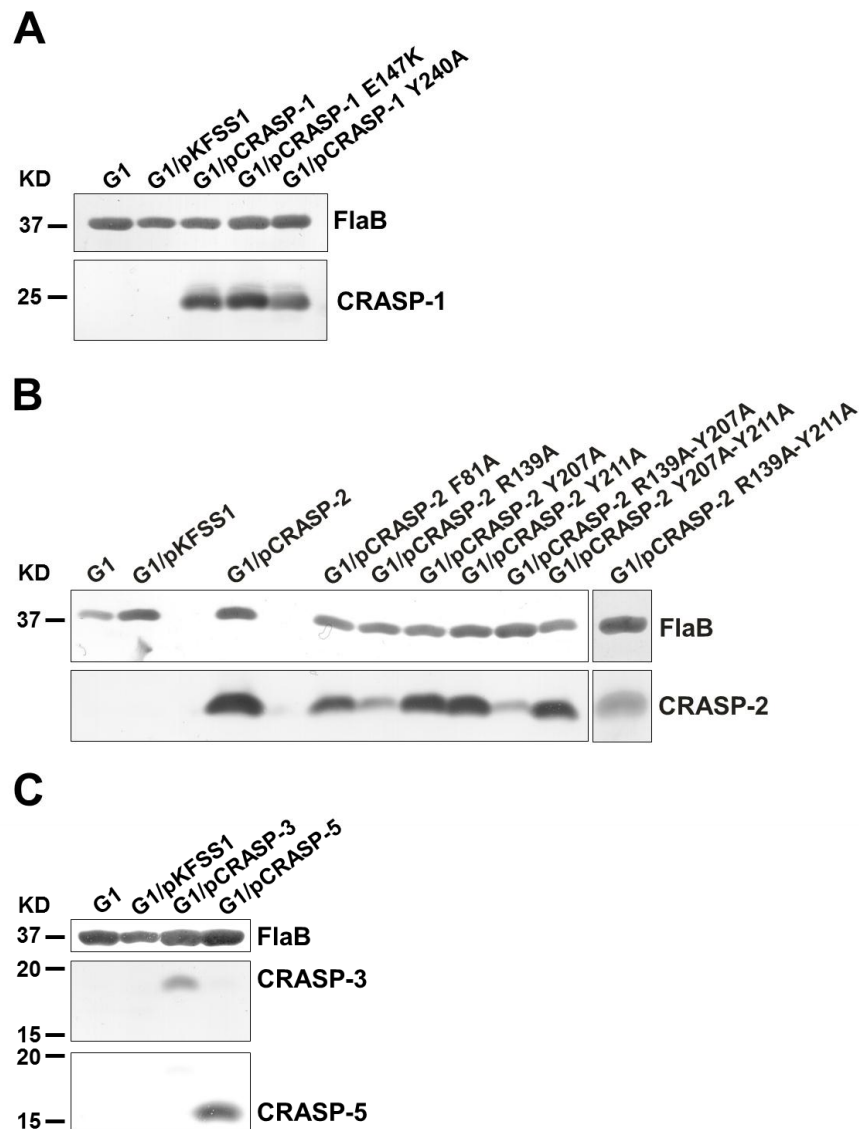


Abb. 10: Nachweis von CRASP bei den transformierten *B. garinii* G1-Zellen.

Zellextrakte des Isolates *B. garinii* G1, der Transformanten G1/pKFSS1, G1/pCRASP-1, G1/pCRASP-2, G1/pCRASP-3, G1/pCRASP-5, als auch G1/pCRASP-1 E147K, G1/pCRASP-1 Y240A, G1/pCRASP-2 F81A, G1/pCRASP-2 R139A, G1/pCRASP-2 Y207A, G1/pCRASP-2 Y211A, G1/pCRASP-2 R139A-Y207A, G1/pCRASP-2 R139A-Y211A und G1/pCRASP-2 Y207A-Y211A wurden im 10%igen Tris Tricin-SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Detektion von Flagellin erfolgte mit dem spezifischen Antikörper L41 1C11 gegen die Flagellinuntereinheit FlaB. Der Nachweis von CRASP-1, CRASP-1 E147K und CRASP-1 Y240A erfolgte mit dem CRASP-1-spezifischen polyklonalen Antikörper ZS7A68 **(A)**. Der Nachweis von CRASP-2, CRASP-2 F81A, CRASP-2 R139A, CRASP-2 Y207A, CRASP-2 Y211A, CRASP-2 R139A-Y207A, CRASP-2 R139A-Y211A und CRASP-2 Y207A-Y211A erfolgte durch den monoklonalen Antikörper anti-BBH06 **(B)**. CRASP-3 wurde durch den CRASP-3-spezifischen polyklonalen Antikörper anti-ErpP und CRASP-5 mit dem CRASP-5-spezifischen polyklonalen Antikörper anti-ErpA nachgewiesen **(C)**. Links angegeben ist der Größenstandard Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad).

CRASP-1, CRASP-2, CRASP-3 und CRASP-5 konnten mittels spezifischer Antikörper in den Zellextrakten der jeweiligen Transformante G1/pCRASP-1, G1/pCRASP-2, G1/pCRASP-3 und G1/pCRASP-5 nachgewiesen werden [Abb. 10 A

(Spur 3), B (Spur 3), C (Spur 3 und 4)]. Bei allen Zellextrakten der CRASP-1-produzierenden Transformanten konnte das entsprechende Signal für CRASP-1 detektiert werden (Abb. 10 A). Die Zellextrakte der CRASP-2-produzierenden Borrelien wiesen CRASP-2 oder das veränderte CRASP-2 auf (Abb. 10 B). Wie erwartet, konnten bei G1/pKFSS1 und *B. garinii* G1 keine Produktion von CRASP nachgewiesen werden.

1.5 Nachweis der Oberflächenständigkeit heterolog produzierter CRASP in Borrelientransformanten

Die Untersuchungen der transformierten Borrelien beinhalten Experimente zur Interaktion von CRASP mit verschiedenen Serumproteinen. Daher musste zunächst geklärt werden, ob alle in *B. garinii* G1 heterolog produzierten CRASP-Moleküle, entsprechend der CRASP des Isolates *B. burgdorferi* LW2 auf der Oberfläche der transformierten Borrelienzellen exponiert sind.

Das Vorhandensein der CRASP auf der Oberfläche der Borrelienzellen wurde durch den proteolytischen Verdau aller oberflächenständigen Proteine durch Proteasen nachgewiesen. Dazu wurden intakte Zellen mit 100 µg/ml Proteinase K und in einem Parallelansatz mit 100 µg/ml Trypsin für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation mit den Proteaseinhibitoren und anschließendem intensivem Waschen wurden Zellextrakte hergestellt und mittels SDS-PAGE und Westernblot- bzw. Ligandenaffinitätsblot-Analyse in Bezug auf CRASP untersucht (Material und Methoden, Kap. 6.2.1, 6.3 und 8.5). Als Kontrollprotein diente Flagellin, welches auf Grund der Lokalisation im periplasmatischen Raum bei einer intakten Borrelienzelle durch die verwendeten Proteasen nicht degradiert werden kann (Bunikis and Barbour 1999).

Gleichbleibend intensive Signale des Flagellins trotz zunehmender Konzentration an Proteasen bewiesen, dass die Borrelienzellen während der Inkubation intakt blieben. Alle proteolytisch abgebauten Proteine mussten daher oberflächenständig sein. Wie in Abbildung 11 dargestellt, wurde keines der CRASP durch Trypsin degradiert, welches eine spezifische Protease darstellt und für den Abbau von CRASP nicht geeignet erscheint. Im Gegensatz dazu wurden CRASP-1, CRASP-3 und CRASP-5 durch Proteinase K vollständig degradiert, was darauf schließen lässt, dass diese

drei Moleküle auf der Oberfläche der transformierten Borrelienzellen lokalisiert sind (Abb. 11A, C, D). Als Kontrolle wurden ebenfalls Zellen des Isolates *B. burgdorferi* LW2 unter gleichen Bedingungen mit beiden Proteasen behandelt. Wie erwartet, erfolgte die Degradation von CRASP-1, CRASP-3 und CRASP-5 durch Proteinase K, aber nicht durch Trypsin (Abb. 11E).

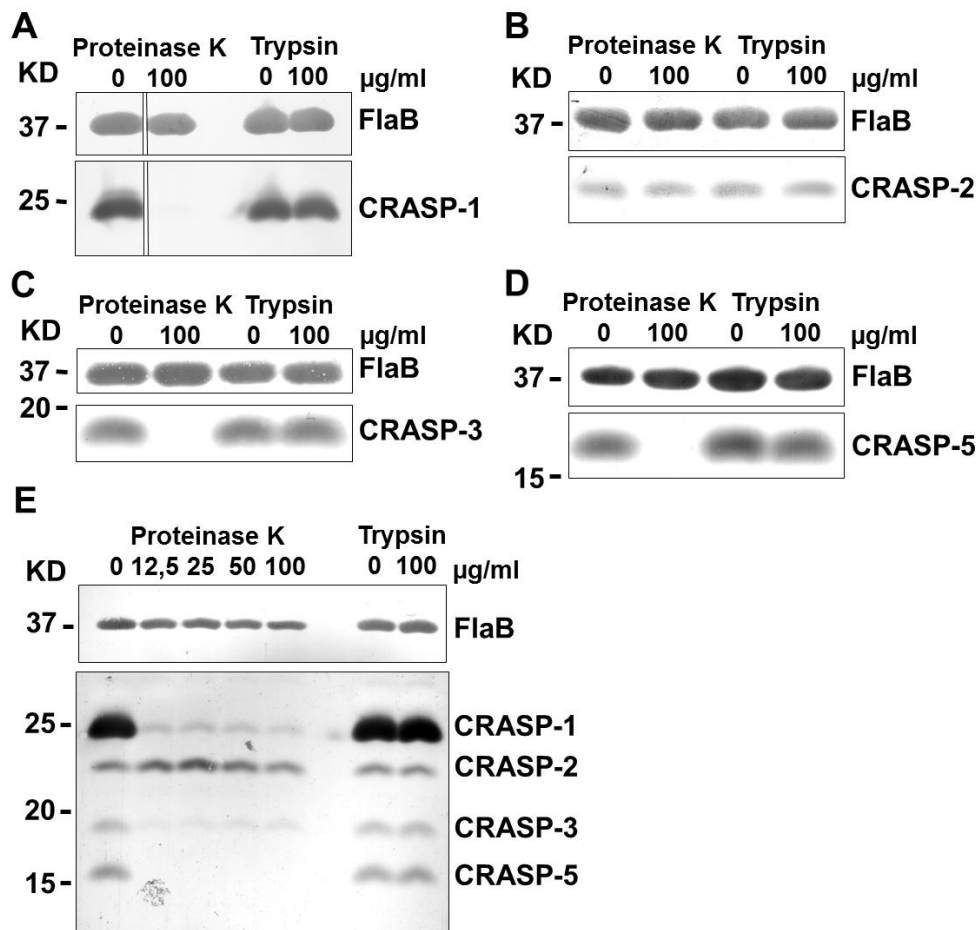


Abb. 11: Lokalisation der CRASP auf der Zelloberfläche von transformierten Borrelien.

Nach der Inkubation des Isolates *B. burgdorferi* LW2 mit 0 µg/ml, 12,5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml oder 100 µg/ml Proteinase K oder 0 µg/ml oder 100 µg/ml Trypsin als auch nach der Inkubation der Transformanten mit 0 µg/ml oder 100 µg/ml Proteinase K oder Trypsin wurden die Zellen lysiert und die Zellextrakte auf einem 10%igen Tris Tricin-SDS-Gel separiert. Die Proteine wurden anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. CRASP-1 (**A**), CRASP-2 (**B**), CRASP-3 (**C**) und CRASP-5 (**D**) der jeweiligen Transformante wurden im Westernblot mit dem CRASP-1-spezifischen Antikörper anti-ZS7A68, dem CRASP-2-spezifischen Antikörper anti-BBH06, dem CRASP-3-spezifischen Antikörper anti-ErpP und dem CRASP-5-spezifischen Antikörper anti-ErpA nachgewiesen. Die CRASP-Moleküle des Isolates *B. burgdorferi* LW2 wurden mittels Ligandenaffinitätsblot-Analyse mit NHS und dem Faktor H-spezifischen Antikörper VIG8 detektiert (**E**). Der Nachweis des Flagellins erfolgte durch den gegen die Flagellinuntereinheit FlaB gerichteten Antikörper L41 1C11. Links angegeben ist der Größenstandard Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad).

Das Degradationsmuster der Transformanten G1/pCRASP-1 E147K und G1/pCRASP-1 Y240A, welche die veränderten CRASP-1-Moleküle produzierten, zeigte im Vergleich zum Degradationsmuster der Transformante G1/pCRASP-1 keine Unterschiede (Abb. 12).

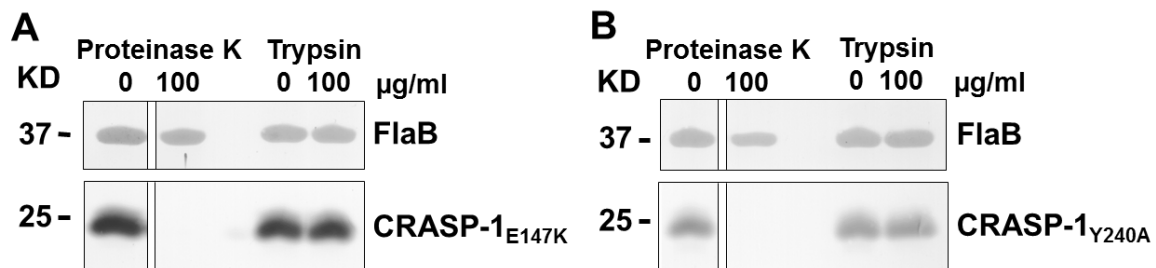


Abb. 12: Lokalisation der veränderten CRASP-1 auf der Zelloberfläche der Transformanten G1/pCRASP-1 E147K (A) und G1/pCRASP-1 Y240A (B).

Nach Inkubation intakter Zellen der Transformanten G1/pCRASP-1 E147K und G1/pCRASP-1 Y240A mit 0 µg/ml oder 100 µg/ml Proteinase K oder Trypsin wurden die Zellen lysiert und die Zellextrakte auf einem 10%igen Tris-Tricin SDS-Gel separiert. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und die veränderten CRASP-1 mit dem CRASP-1-spezifischen Antikörper anti-ZS7 A68 nachgewiesen. Der Nachweis des Flagellins erfolgte durch den gegen die Flagellinuntereinheit FlaB gerichteten Antikörper L41 1C11. Links angegeben ist der Größenstandard Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad).

Eine proteolytische Degradation des CRASP-2-Proteins durch Proteinase K ließ sich weder für *B. burgdorferi* LW2 noch für die Transformante G1/pCRASP-2 nachweisen (Abb. 11B und E). Hier lässt sich keine Aussage über die Oberflächenständigkeit des Proteins treffen, da CRASP-2 gegenüber Trypsin und Proteinase K scheinbar resistent ist (Hartmann et al. 2006). Daher wurde die Immunfluoreszenzmikroskopie (Material und Methoden, Kap. 7.2) als weitere Methode zum Nachweis der Lokalisation von CRASP-2 und der veränderten CRASP-2 auf der Zelloberfläche hinzugezogen. Durch diese Methode konnte CRASP-2 als Oberflächenprotein nachgewiesen werden (Abb. 13). Das Isolat *B. garinii* G1 wies keine Fluoreszenz auf.

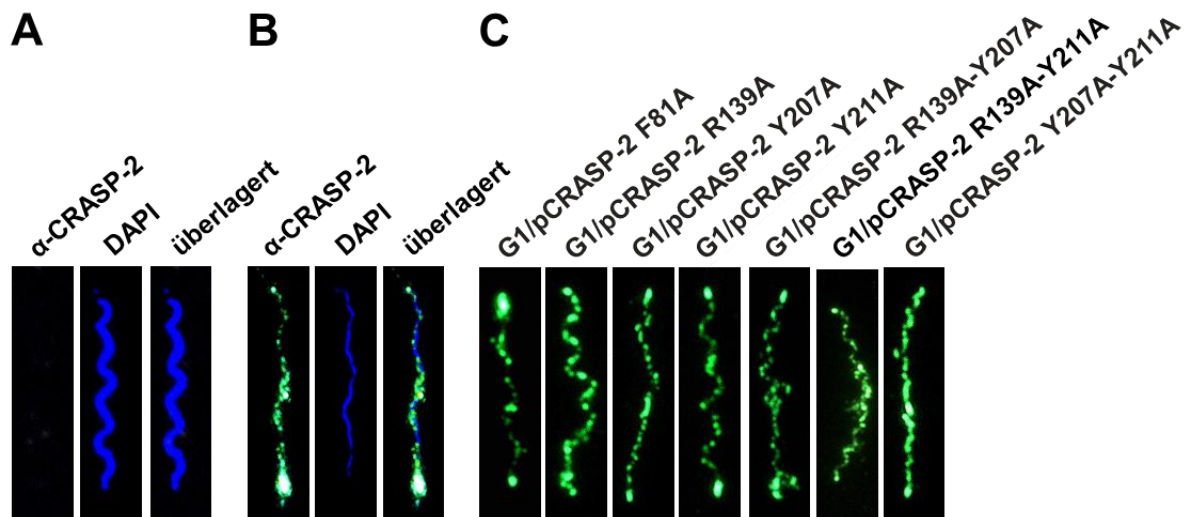


Abb. 13: Nachweis der Exposition von CRASP-2 und der veränderten CRASP-2 auf der Zelloberfläche der Transformanten.

Intakte Zellen des Isolates *B. garinii* G1 (A), der Transformante G1/pCRASP-2 (B) sowie der Transformanten G1/pCRASP-2 F81A, G1/pCRASP-2 R139A, G1/pCRASP-2 Y207A, G1/pCRASP-2 Y211A, G1/pCRASP-2 R139A-Y207A, G1/pCRASP-2 R139A-Y211A und G1/pCRASP-2 Y207A-Y211A (C) wurden mit dem CRASP-2-spezifischen Antikörper anti-BBH06 (in der Abbildung als α -CRASP-2 bezeichnet) in einer Verdünnung von 1:50 inkubiert, anschließend 10 μ l der Suspension auf Glasobjektträger pipettiert und die Zellen mit Methanol fixiert. Nach Inkubation der Objektträger mit dem sekundären Antikörper Alexa Fluor 488 Ziege anti-Maus IgG erfolgte die Visualisierung mittels Fluoreszenzmikroskopie (grün). Eine Färbung aller Zellen erfolgte durch den DNA-Farbstoff DAPI (blau). Die hier dargestellten Bilder wurden an einem CX-40 Olympus Fluoreszenzmikroskop mit einer Nikon DS-5MC Digitalkamera bei einer 1000fachen Vergrößerung aufgenommen.

Mit dieser Methode konnte ebenfalls die Oberflächenlokalisierung von CRASP-1, CRASP-2, CRASP-3 und CRASP-5 bei der jeweiligen Transformante bestätigt werden (Anhang, Abb. III, IV, V) Für *B. burgdorferi* LW2 ließ sich mit der Immunfluoreszenzmikroskopie CRASP-1 und CRASP-5 auf der Oberfläche detektieren, aber nicht CRASP-2 und CRASP-3 (Anhang, Abb. III; IV und V).

2 Bedeutung von CRASP-1 und CRASP-2 für die Komplementresistenz von *Borrelia burgdorferi* s.l.

2.1 Auswirkung der Interaktionspartner von CRASP-1 und CRASP-2 auf die Komplementresistenz von *B. garinii* G1

CRASP stellen Moleküle dar, welche über ihre Eigenschaft, Komplementregulatoren zu binden, definiert sind. CRASP-1 und CRASP-2 binden die Komplement-

regulatoren des alternativen Komplementweges Faktor H und FHL-1 (Kraiczy et al. 2001a; Kraiczy et al. 2004b). Die Bindung von Faktor H oder FHL-1 an die Zelloberfläche der Borrelienzellen via CRASP bewirkt den Schutz der Zellen vor komplementvermittelter Lyse. Dabei besitzen Borrelien CRASP-1, CRASP-2 und noch drei weitere CRASP-Moleküle, die möglicherweise gemeinsam oder auch einzeln die Komplementresistenz determinieren können, so dass die Bedeutung einzelner CRASP für die Komplementresistenz der Zellen bislang nur unzureichend geklärt werden konnte.

2.1.1 Identifizierung der Interaktionspartner von CRASP-1 und CRASP-2 aus Humanserum

CRASP interagieren mit verschiedenen Mitgliedern der Faktor H-Proteinfamilie (Kraiczy et al. 2001a; McRae et al. 2001; Metts et al. 2003; Alitalo et al. 2004; Kraiczy et al. 2004b; Hartmann et al. 2006; Haupt et al. 2008a; Haupt et al. 2008b; Józsi and Zipfel 2008; Skerka and Zipfel 2008; Rogers et al. 2009a). Da eine Unterscheidung der Mitglieder dieser Proteinfamilie auf Grund der hohen Ähnlichkeit zueinander mittels spezifischer Antikörper bislang nicht möglich ist, wurden vorwiegend Interaktionsstudien mit gereinigten oder rekombinant hergestellten Serumproteinen zum Nachweis der Bindung an CRASP durchgeführt.

In dieser Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Bindung der Komplementregulatoren durch andere Serumproteine beeinflusst wird. Zur Identifizierung dieser Serumproteine wurden rekombinant hergestelltes CRASP-1 und CRASP-2 an magnetische Partikel gekoppelt und diese mit Humanserum inkubiert. Sich daran anschließende Versuche wurden mit transformierten, CRASP-1- bzw. CRASP-2-produzierenden *B. garinii* G1-Zellen durchgeführt. So konnte der Einfluss aller im Serum enthaltenen Komponenten auf die Bindungseigenschaften von CRASP-1 und CRASP-2 an der intakten Borrelienzelle und deren Auswirkung auf die Komplementresistenz dargestellt werden.

2.1.1.1 Identifizierung von CRASP-1- und CRASP-2-interagierenden Serumproteinen mittels magnetischer Partikel

Rekombinant hergestelltes His-CRASP-1 und His-CRASP-2 wurde mit magnetischen Partikeln, welche mit Ni^{2+} komplexiert vorlagen, zur Bindung des entsprechenden CRASPs inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Partikel-gekoppelten CRASP-Moleküle mit Humanserum. Nach mehrmaligen Waschen, wobei der Überstand des letzten Waschschriffs als Waschfraktion aufgehoben wurde, wurden sämtliche Proteine mit 0,1 M Glycin pH 2,0 von den Partikeln eluiert. Die Eluatfraktion und die Waschfraktion wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel einer Silberfärbung unterzogen. Als Kontrollen dienten eine Aufreinigung der rekombinant hergestellten CRASP mittels magnetischer Partikel und eine Inkubation von nicht-gekoppelten magnetischen Partikeln mit Humanserum, um unspezifisch gebundene Proteine nachzuweisen und diese von spezifisch gebundenen Serumproteinen zu unterscheiden.

Ein Vergleich der Eluatfraktion mit der Waschfraktion und den Kontrollen zeigte für His-CRASP-1 und His-CRASP-2 ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 150 KD, welches durch eine Westernblotanalyse als Faktor H identifiziert wurde (Abb. 14A, Westernblot nicht gezeigt). In der Eluatfraktion von CRASP-1 befanden sich vier weitere definierbare Proteine, drei distinkte Moleküle mit einem Molekulargewicht von ca. 70 - 90 KD und ein Protein mit einem molekularen Gewicht von ca. 50 KD, welche in weiteren Studien untersucht werden sollen. Außerdem ließen sich His-CRASP-1 und His-CRASP-2 in der jeweiligen Fraktion nachweisen. FHL-1 konnte im silbergefärbten SDS-Gel für keines der beiden CRASP nachgewiesen werden.

Mittels dieser Methode konnte demnach für rekombinant hergestelltes CRASP-1 und CRASP-2 lediglich Faktor H als Bindungspartner bestätigt werden.

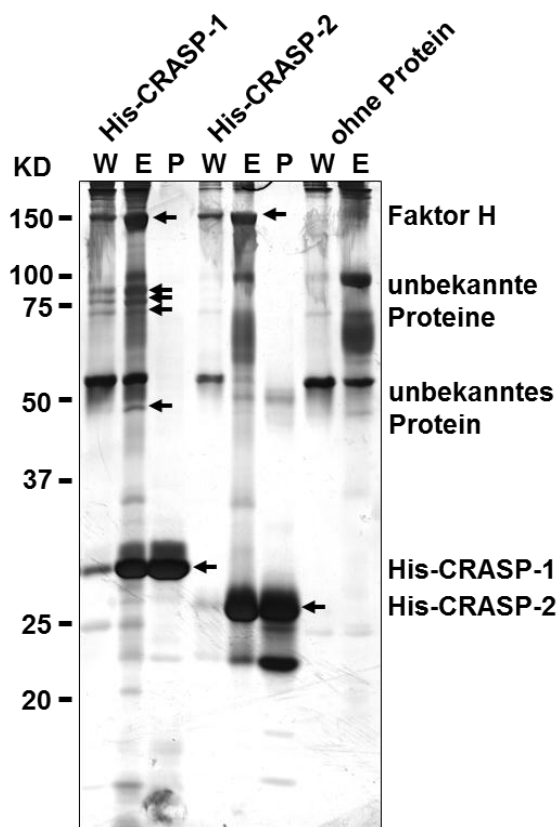


Abb. 14: Identifizierung von Bindungspartnern für CRASP-1 und CRASP-2 aus NHS mittels magnetischer Partikel.

Die magnetischen, Ni^{2+} -komplexierten Partikel wurden zunächst mit Zellüberstand, in welchem die rekombinanten His-CRASP vorhanden waren, und anschließend mit NHS inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen, wobei die letzte Waschfraktion (W) aufbewahrt wurde, erfolgte die Elution aller an die magnetischen Partikel gebundenen Proteine. Als Kontrolle dienten ein Ansatz ohne NHS-Inkubation (P) und ein Ansatz ohne rekombinantes CRASP (ohne Protein). Die Waschfraktion (W), das Eluat (E) und die Kontrollfraktionen wurden in einem 12,5%igen Laemmli SDS-Gel aufgetrennt und das Gel anschließend einer Silberfärbung unterzogen. Die Bindungspartner von CRASP-1 und CRASP-2 als auch die CRASP sind mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet. Links angegeben ist der Größenstandard Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad).

2.1.1.2 Identifizierung der mit CRASP-1 und CRASP-2 interagierenden Proteine mittels Serumadsorption

Rekombinant hergestellte Proteine können unter Umständen andere Eigenschaften und Interaktionen aufweisen als die nativen Proteine auf der Zelloberfläche. Um Abweichungen des Bindungsmusters von rekombinanten CRASP-1 und CRASP-2 mit ihrem nativen Pondon, welche sich auf der Oberfläche von Borrelien befinden, auszuschließen, wurden die CRASP-produzierenden Transformanten G1/pCRASP-1 und G1/pCRASP-2, die CRASP-negative Transformante G1/pKFSS1 sowie die Isolate *B. burgdorferi* LW2 und *B. garinii* G1 mit NHS-EDTA für 30 min inkubiert (Material und Methoden, Kap. 8.2). Der Zusatz von EDTA ist essentiell um die

Aktivierung der Komplementkaskade durch Entzug von zweiwertigen Ionen zu inhibieren und so eine vorzeitige Zellyse von komplementsensitiven Zellen zu verhindern. Nach mehrmaligen Waschen wurde der letzte Waschpuffer als Waschfraktion aufgehoben und die an der Zelloberfläche gebundenen Proteine mittels 0,1 M Glycin-Lösung (pH 2,0) von den intakten Zellen gelöst. Das Eluat und die letzte Waschfraktion wurden auf einem Laemmli SDS-Gel unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und mittels Westernblot-Analyse mit unterschiedlich spezifischen Antikörpern gegen Faktor H, FHL-1, CFHR-1, CFHR-2 und CFHR-5 untersucht. Dazu wurden drei polyklonale Antikörper und zwei monoklonale Antikörper verwendet. Die verschiedenen Antikörper wurden genutzt, um die durch Kreuzreaktionen zustande kommenden Signale der polyklonalen Antikörper durch Signale der monoklonalen Antikörper abzusichern.

Die Bindung von Faktor H aus Humanserum an *B. burgdorferi* LW2 und an die Transformanten G1/pCRASP-1 und G1/pCRASP-2 konnte anhand dieser Analyse eindeutig bestätigt werden (Abb. 15 und 16; Anhang, Abb. V). Sowohl durch die polyklonalen Antikörper, welche gegen Faktor H, CFHR-1 und die N-terminalen SCRs 1-4 von Faktor H gerichtet sind, als auch durch den monoklonalen Antikörper VIG8, welcher spezifisch an die C-terminale Domäne SCR20 von Faktor H bindet, wurde dieses Glykoprotein sowohl bei *B. burgdorferi* LW2 als auch bei G1/pCRASP-1 und G1/pCRASP-2 nachgewiesen. Gleichzeitig konnte die Bindung von FHL-1 an *B. burgdorferi* LW2 und an die beiden Transformanten G1/pCRASP-1 und G1/pCRASP-2 mit dem polyklonalen Antikörper anti-SCR1-4 und dem polyklonalen Antikörper anti-Faktor H gezeigt werden (Abb. 15B; Anhang, Abb. V). Der Nachweis von Faktor H mittels des monoklonalen Antikörpers VIG8 für G1/pCRASP-1 als auch der Nachweis von FHL-1 durch den polyklonalen Antikörper anti-SCR1-4 für G1/pCRASP-2 ergaben jeweils ein zusätzliches Signal eines ca. 25 KD Proteins. Da Kreuzreaktionen der Antikörper mit borrelienspezifischen Proteinen ausgeschlossen werden konnten [Abb. 15 (jeweils Spur 4 und 6)] wurde davon ausgegangen, dass es sich hierbei um das entsprechende CRASP handelte, welche mit Faktor H bzw. FHL-1, welche sich möglicherweise durch das häufige Waschen von der Nitrozellulosemembran gelöst hat, interagierten. Eine Bindung von CFHR-1, CFHR-2 oder CFHR-5 an G1/pCRASP-1 und G1/pCRASP-2 ließ sich nicht

nachweisen. Dagegen wies das Ausgangsisolat *B. burgdorferi* LW2 eine Bindung von CFHR-1 und CFHR-2 auf [Abb. 16 (Spur 2) und Abb. 36].

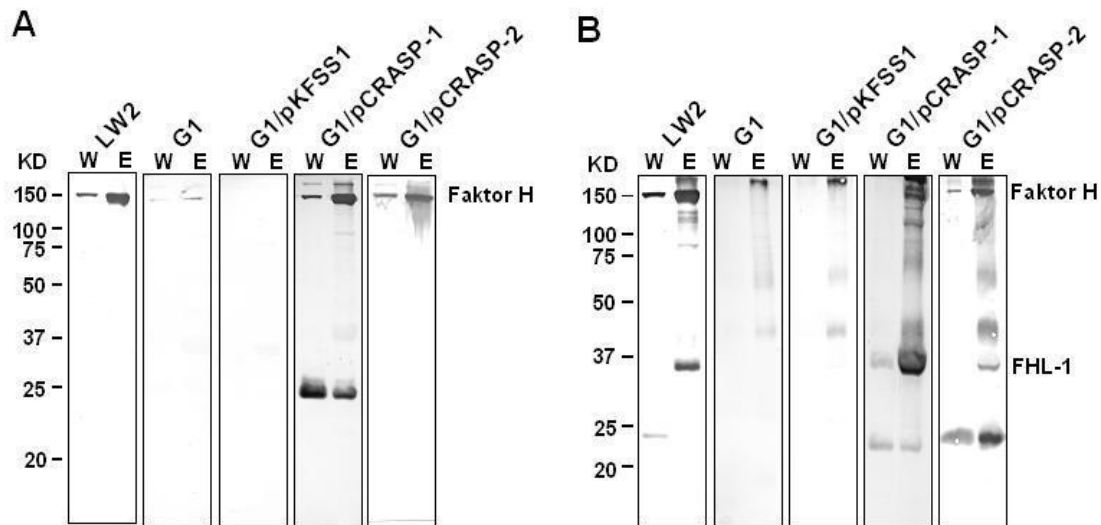


Abb. 15: Nachweis von interagierenden Serumproteinen mit CRASP der Isolate *B. burgdorferi* LW2, *B. garinii* G1 und der Transformanten G1/pKFSS1, G1/pCRASP-1 und G1/pCRASP-2.

Nach Inkubation der intakten Borrelienzellen der Isolate *B. burgdorferi* LW2, *B. garinii* G1 und der Transformanten G1/pKFSS1, G1/pCRASP-1 und G1/pCRASP-2 mit NHS-EDTA wurde die letzte Waschfraktion (W) aufgehoben und die an die Zelloberfläche gebundenen Proteine eluiert. Die Waschfraktion und das Eluat (E) wurden im 12,5%igen Laemmli SDS-Gel separiert und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Nachweis von Faktor H erfolgte im Westernblot mittels des monoklonalen, gegen SCR20 gerichteten Antikörpers VIG8 (A). FHL-1 wurde mit dem polyklonalen Antikörper anti-SCR1-4 nachgewiesen (B). Links angegeben ist der Größenstandard Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad).

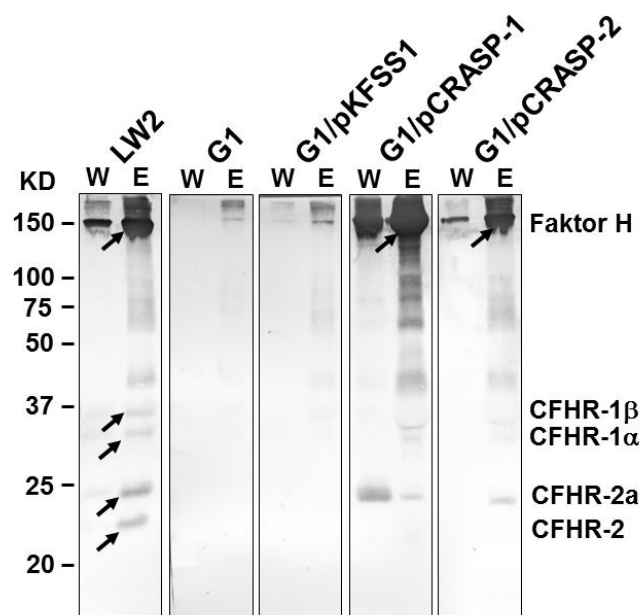


Abb. 16: Nachweis von interagierenden Serumproteinen mit CRASP der Isolate *B. burgdorferi* LW2, *B. garinii* G1 und der Transformanten G1/pKFSS1, G1/pCRASP-1 und G1/pCRASP-2.

Nach Inkubation intakter Borrelienzellen von *B. burgdorferi* LW2, *B. garinii* G1 und der Transformanten G1/pKFSS1, G1/pCRASP-1 und G1/pCRASP-2 mit NHS-EDTA wurde die letzte Waschfraktion (W) aufgehoben und die an der Zelloberfläche gebundenen Proteine eluiert. Die Waschfraktion und das Eluat (E) wurden im 12,5%igen Laemmli SDS-Gel separiert und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Nachweis von Faktor H, CFHR-1 und CFHR-2 erfolgte im Westernblot mittels des polyklonalen, gegen SCR20 gerichteten Antikörpers anti-CFHR-1. Die mit Pfeilen markierten Signale entsprechen den jeweils an der rechten Seite des Blots angegebenen Proteinen. Links angegeben ist der Größenstandard Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad).

2.1.1.3 Untersuchungen zum Bindungsverhalten von Proteinen der Faktor H-Proteinfamilie an einzelne CRASP von *B. burgdorferi* s.s. mittels Ligandenaffinitätsblot-Analyse

Das charakteristische Bindungsverhalten von CRASP-Molekülen wurde außerdem mit Hilfe einer Ligandenaffinitätsblot-Analyse bestätigt.

Dazu wurden Zellextrakte der generierten Transformanten und der Isolate *B. burgdorferi* LW2 und *B. garinii* G1 mittels Tris Tricin-SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Mittels Ligandenaffinitätsblot-Analyse konnten anschließend die Interaktionen der verschiedenen CRASP mit den humanen Serumproteinen getestet werden. Um zu gewährleisten, dass gleiche Mengen an Zellextrakt der verschiedenen Transformanten auf das Gel appliziert wurden, wurde ebenfalls die Flagellinuntereinheit FlaB als Markerprotein mittels Westernblot nachgewiesen.

Nach Inkubation mit Humanserum konnten Interaktionen von CRASP-1 und CRASP-2 der jeweiligen Transformante G1/pCRASP-1 oder G1/pCRASP-2 und der CRASP-Moleküle von *B. burgdorferi* LW2 mit Proteinen der Faktor H-Proteinfamilie nachgewiesen werden (Abb. 17A). Als primärer Antikörper wurde VIG8 verwendet, welcher an die C-terminale Domäne SCR20 von Faktor H bindet und ebenfalls mit CFHR-1 und CFHR-2 kreuzreagiert (Tab. 8). Die Bindung von CFHR-1 und CFHR-2 an CRASP-1 und CRASP-2 wurde durch Bindungsversuche mit rekombinant hergestellten CRASP-Molekülen (Kap. 2.1.1) und durch die Serumadsorption (Kap. 2.1.2) ausgeschlossen. So ließ sich für CRASP-1 und CRASP-2 eindeutig eine Faktor H-Bindung zeigen.

Des Weiteren wurde die Bindung von gereinigtem Faktor H, von rekombinant hergestellten FHL-1 als auch von rekombinant hergestellten CFHR-1 und CFHR-2 untersucht. CRASP-1 und CRASP-2 zeigten eine eindeutige Bindung von gereinigtem Faktor H und rekombinanten FHL-1 (Abb. 17B und C). Dabei wies CRASP-2 im Vergleich zu CRASP-1 nach Inkubation mit gereinigtem Faktor H sogar ein stärkeres Signal auf als nach Inkubation mit Humanserum. Dies kann dadurch erklärt werden, dass Faktor H und FHL-1 simultan um die gleiche Bindungsstelle an CRASP-2 konkurrieren. Da mit dem Antikörper VIG8 jedoch nur die Bindung von Faktor H detektiert wurde, nicht jedoch die Bindung von FHL-1, ist das Signal schwächer als wenn Faktor H allein als Bindungspartner zur Verfügung steht (Abb. 17B). Eine Bindung von CFHR-1 und CFHR-2 konnte ausgeschlossen werden.

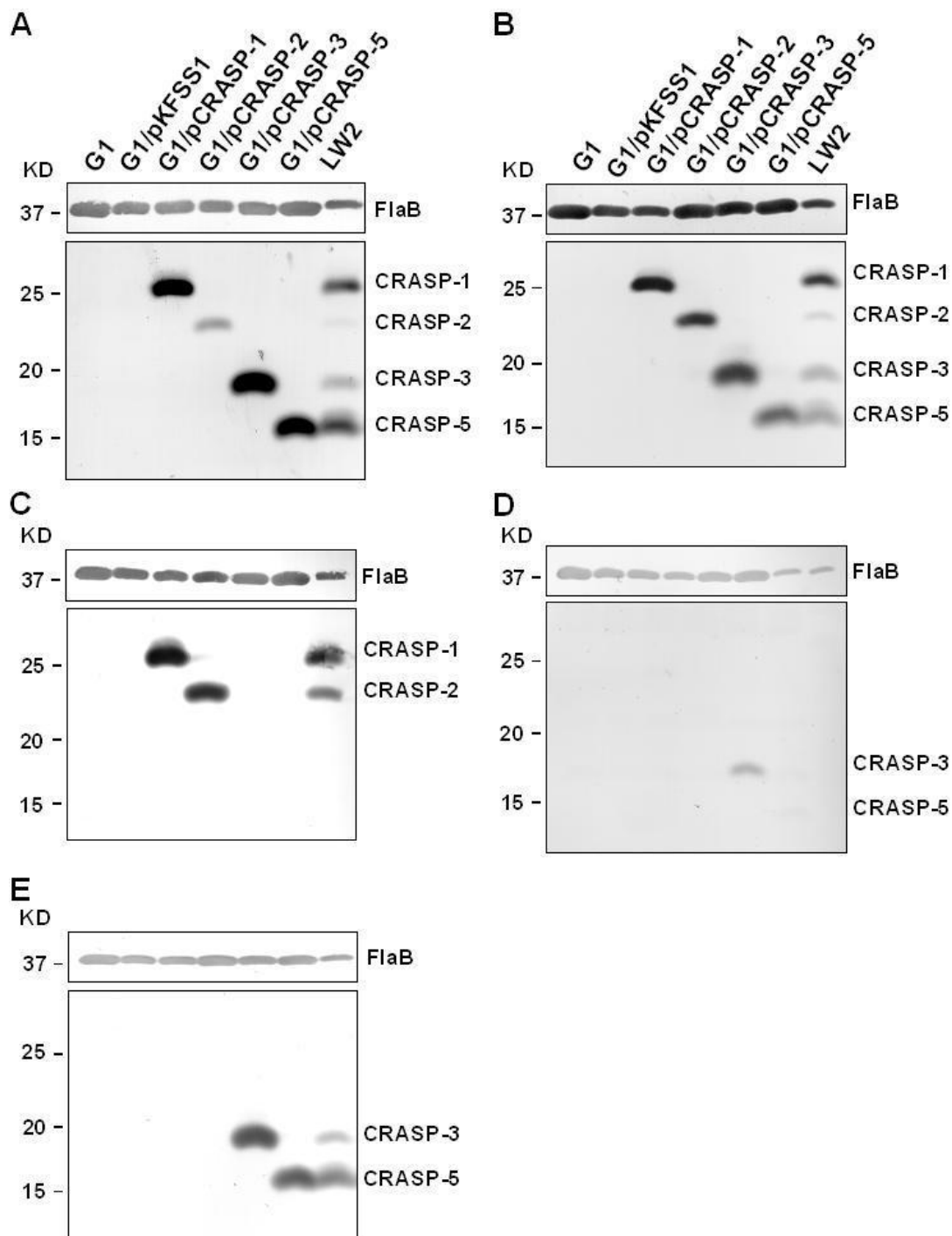


Abb. 17: Nachweis der Interaktion von CRASP-1, CRASP-2, CRASP-3 und CRASP-5 mit Faktor H, FHL-1, CFHR-1 und CFHR-2 mittels Ligandenaffinitätsblot.

Zellextrakte der Isolate *B. garinii* G1 und *B. burgdorferi* LW2 als auch der Transformanten G1/pKFSS1, G1/pCRASP-1, G1/pCRASP-2, G1/pCRASP-3 und G1/pCRASP-5 wurden mehrfach im 10%igen Tris Tricin-SDS-Gel aufgetrennt und jeweils auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Eine Membran wurde mit NHS inkubiert und die Proteine anschließend mit dem monoklonalen Antikörper VIG8 visualisiert (A). Des Weiteren wurden Membranen entweder mit gereinigtem Faktor H und dem monoklonalen Antikörper VIG8 (B), mit rekombinatem FHL-1 und dem polyklonalen anti-SCR1-4-Antikörper (C) oder mit rekombinatem CFHR-1 (D) bzw. rekombinatem CFHR-2 (E) und danach mit dem monoklonalen Antikörper JHD 7.10 inkubiert. Flagellin wurde im Westernblot durch den FlaB-spezifischen Antikörper L41 1C11 nachgewiesen. Links angegeben ist der Größenstandard Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad).

Für CRASP-3 und CRASP-5 wurde nach Inkubation der Membran mit Humanserum und anschließender Detektion mit dem Antikörper VIG8 ein deutliches Signal erhalten (Abb. 17A). Auf Grund der Kreuzreaktivität des verwendeten Antikörpers, der neben Faktor H auch CFHR-1 und CFHR-2 erkennt, ließ sich allerdings nicht eindeutig klären, ob eine Bindung von Faktor H, CFHR-1 und / oder CFHR-2 vorlag. Um die Bindungspartner von CRASP-3 und CRASP-5 zu spezifizieren, erfolgten weitere Untersuchungen mit gereinigtem Faktor H, rekombinantem CFHR-1 und CFHR-2. Dabei zeigten CRASP-3 und CRASP-5 eine Bindung von gereinigtem Faktor H (Abb. 17B). Für CFHR-1 zeigte sich eine schwache Bindung an CRASP-3 und ein kaum sichtbares Signal und damit eine sehr schwache Bindung bei CRASP-5 (Abb. 17D). Im Gegensatz dazu ließ sich bei beiden CRASP eine starke Bindung von rekombinant hergestellten CFHR-2 nachweisen (Abb. 17E). Da zum Zeitpunkt der durchgeführten Experimente noch kein gereinigtes CFHR-5 zur Verfügung stand, konnte die Bindung von CFHR-5 an CRASP-3 und CRASP-5 nicht analysiert werden.

2.1.2 Nachweis der funktionellen Aktivität von Faktor H und FHL-1 nach Bindung an CRASP und deren Auswirkung auf die Komplementresistenz von transformierten *B. garinii* G1

Faktor H und FHL-1 stellen effiziente Regulatoren des alternativen Weges des Komplementsystems dar, weil sie in der flüssigen Phase als auch gebunden an humane Zellen in Gegenwart von Faktor I die Spaltung von C3b zu iC3b bewirken und dadurch den Zerfall der bereits auf der Zelloberfläche gebildeten C3-Konvertase beschleunigen. Eine weitere Aktivierung der Komplementkaskade über die Stufe C3 hinaus wird dadurch frühzeitig unterbrochen.

2.1.2.1 Etablierung eines in vitro-Testsystems zum Nachweis der regulatorischen Aktivität von zellgebundenem Faktor H

Die Komplementkomponente C3b besteht aus einer α -Kette (~110 KD) und einer β -Kette (~75 KD). Faktor I spaltet mit Hilfe von Faktor H oder FHL-1 die α -Kette zunächst in die Fragmente iC3b (~107 KD) und C3f (~3 KD), anschließend iC3b in C3c (~68 KD) und C3dg (~37 KD) und im dritten Schritt C3dg in C3d (~32 KD) und

C3g (~5 KD) (Gros et al. 2008). Diese Reaktion führt zur Inaktivierung von C3b. In einem in vitro-Testsystem (Kofaktor-Assay) mit anschließendem Westernblot können folgende, zum Teil unvollständig degradierte Fragmente von C3b detektiert werden, die jedoch unter reduzierenden Bedingungen ein leicht verändertes Laufverhalten im SDS-Gel aufweisen: die α -Kette (~110 KD), die β -Kette (~75 KD), C3c (~63 KD), C3dg (~46 KD) und C3d (~43 KD) (Breitner-Ruddock et al. 1997; Herzberger et al. 2007; Gros et al. 2008; Wu et al. 2009).

Für die Evaluierung des Kofaktor-Assays wurden Zellen des serumsensitiven Isolates *B. garinii* G1 und des serumresistenten Isolates *B. burgdorferi* LW2 ohne, mit 5 ng, 10 ng, 20 ng oder 30 ng gereinigten Faktor H inkubiert. Nach intensivem Waschen der Zellen wurden gereinigtes C3b und gereinigter Faktor I hinzugegeben. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit 5 ng bzw. 30 ng Faktor H, Faktor I und C3b. Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen sedimentiert und die Überstände mit Probenpuffer versetzt, unter reduzierenden Bedingungen auf einem 12,5 %igem Laemmli SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (Material und Methoden, Kap. 8.3). Die verschiedenen Spaltprodukte von C3b konnten mit einem polyklonalen anti-C3-Antikörper mittels Westernblot detektiert werden.

Für das serumsensitive Isolat *B. garinii* G1 konnte bei den unterschiedlichen Faktor H-Konzentrationen erwartungsgemäß jeweils die intakte α - und β -Kette nachgewiesen werden. Für *B. burgdorferi* LW2 zeigten sich bereits bei einer Konzentration von 5 ng Faktor H die typischen Spaltprodukte von C3b, nämlich C3c, C3dg und C3d (Abb. 18). Die Intensität des Signals der Spaltprodukte nahm mit steigender Konzentration an Faktor H deutlich zu, wobei bei den höchsten verwendeten Konzentrationen von 20 ng und 30 ng Faktor H kein Unterschied mehr zu erkennen war. Die Kontrollansätze wiesen ebenfalls die charakteristischen Spaltprodukte und eine Abnahme des Signals für die α -Kette von C3b auf. Dies verdeutlicht, dass intakte Komponenten eingesetzt wurden.

Für alle weiteren Versuche wurden jeweils 30 ng Faktor H eingesetzt. Für FHL-1 wurde diese Konzentration übernommen.

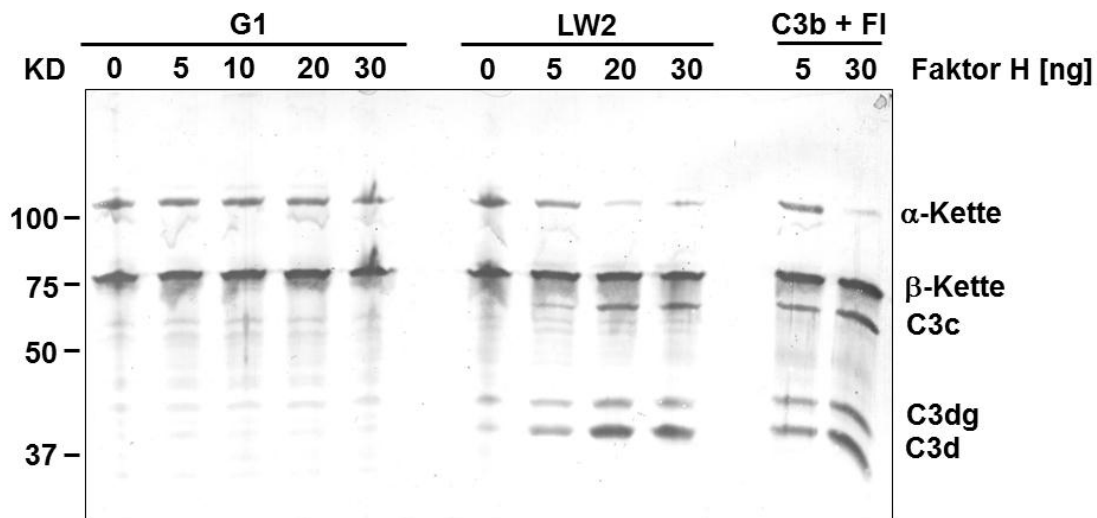


Abb. 18: Analyse der C3b-Inaktivierung durch Faktor I und an Borrelienzellen gebundenes Faktor H.

Intakte Borrelienzellen der Isolate *B. garinii* G1 und *B. burgdorferi* LW2 wurden mit steigenden Konzentrationen an gereinigtem Faktor H vorinkubiert. Nach mehrmaligem Waschen erfolgte die Zugabe von 0,02 µg/µl Faktor I und 0,01 µg/µl C3b. Die Zellüberstände wurden im 12,5 %igem Laemmli SDS-Gel unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Nachweis der C3b Spaltprodukte C3c (63 KD), C3dg (46 KD) und C3d (43 KD) sowie der intakten α- (110 KD) und β-Kette (75 KD) erfolgte mittels polyklonalem anti-C3-Antikörper. Als Kontrolle dienten Reaktionsansätze mit 5 ng bzw. 30 ng Faktor H, C3b und Faktor I. Links angegeben ist der Größenstandard Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad).

2.1.2.2 Nachweis der komplementregulatorischen Aktivität von Faktor H und FHL-1 nach Bindung an CRASP-1- oder CRASP-2-produzierende Transformanten

Um die komplementregulatorische Aktivität von Faktor H und FHL-1, gebunden an transformierte Borrelienzellen, nachzuweisen, wurde der Kofaktor-Assay mit den Transformanten G1/pKFSS1, G1/pCRASP-1 und G1/pCRASP-2 als auch mit den Isolaten *B. burgdorferi* LW2 und *B. garinii* G1 durchgeführt (Material und Methoden, Kap. 8.3). Als Kontrollen dienten jeweils Ansätze ohne Zugabe von Faktor H und FHL-1.

Deutlich wird, dass sowohl die getesteten Transformanten als auch die Isolate *B. garinii* G1 und *B. burgdorferi* LW2 ohne Zugabe der Komplementregulatoren keine Spaltung von C3b bewirken [Abb. 19 A (Spur 2, 4, 6, 8, 10), B (Spur 2, 4, 6, 8, 10)]. Es kann also ausgeschlossen werden, dass CRASP-1, CRASP-2 oder ein anderes borrelienspezifisches Protein proteolytische Aktivität besitzen. Die Spaltung von C3b ist somit allein auf die Interaktion der einzelnen CRASP mit Faktor H oder FHL-1 und deren funktioneller Aktivität zurückzuführen.

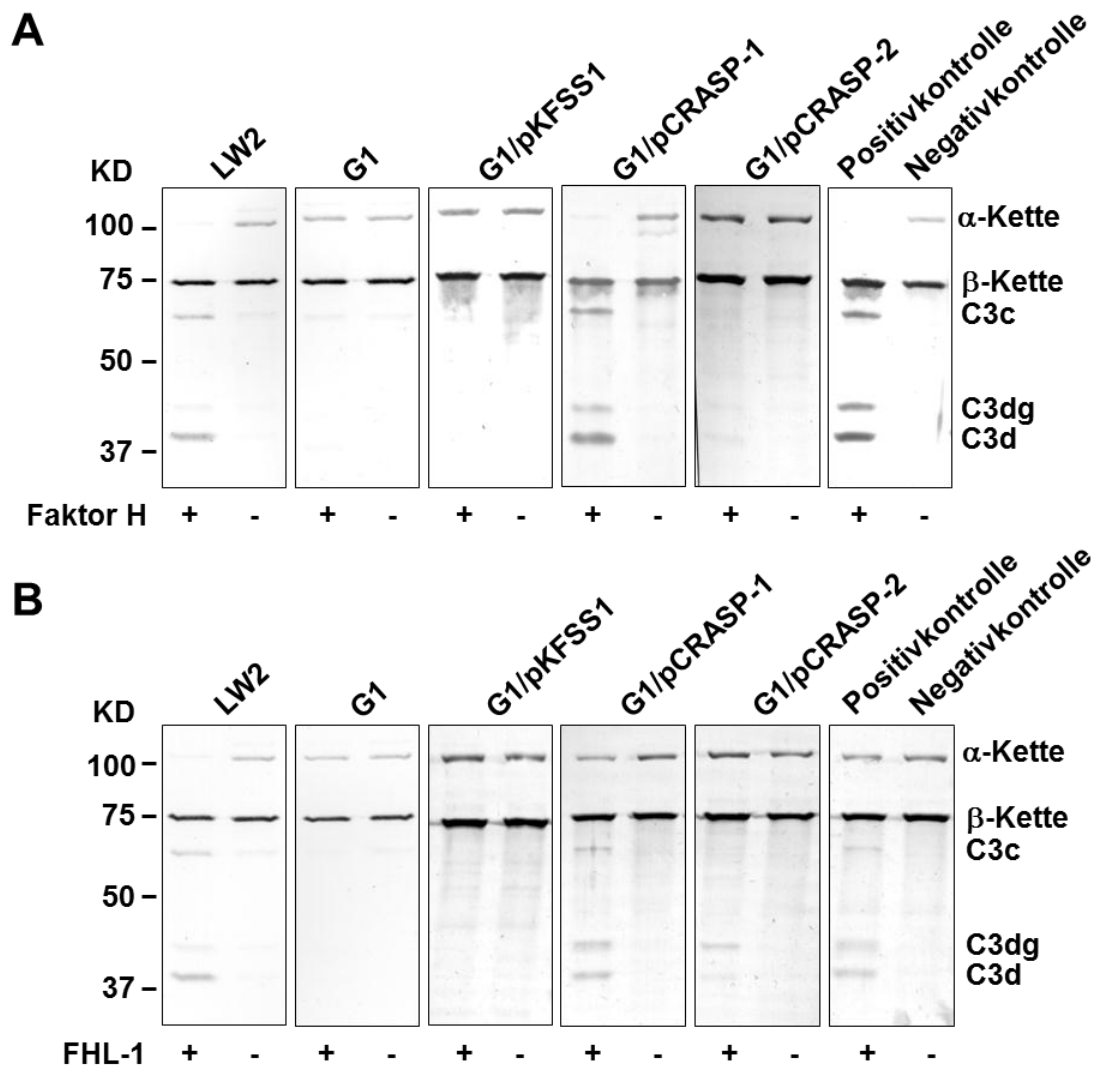


Abb. 19: Funktionelle Aktivität der Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1 nach Bindung an CRASP-produzierende Borrelienzellen.

Nach Inkubation intakter Borrelienzellen der Transformanten G1/pKFSS1, G1/pCRASP-1, G1/pCRASP-2 und der Isolate *B. burgdorferi* LW2 und *B. garinii* G1 mit gereinigtem Faktor H (**A**) und rekombinanten FHL-1 (**B**) wurde 0,01 µg/µl C3b und 0,02 µg/µl Faktor I zu den Zellen hinzugegeben. Nach erfolgter Inkubation wurden die jeweiligen Zellüberstände auf einem 12,5 %igen Laemmli SDS-Gel unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Nachweis der C3b-Spaltprodukte C3c, C3dg und C3d erfolgte mittels Westernblot und einem polyklonalen anti-C3-Antikörper. Als Positivkontrolle diente ein Ansatz von Faktor H oder FHL-1 mit C3b und Faktor I. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz von C3b und Faktor I. Links angegeben ist der Größenstandard Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad).

Wie in Abbildung 19A und 19B zu erkennen ist, wurden die charakteristischen Spaltprodukte der α -Kette von C3b bei Isolat *B. burgdorferi* LW2 als auch bei der Transformante G1/pCRASP-1 nach Bindung von gereinigtem Faktor H und rekombinanten FHL-1 nachgewiesen. Ein etwas schwächeres Signal zeigt sich für beide Komplementregulatoren bei der Transformante G1/pCRASP-2. Für die

CRASP-negative Transformante G1/pKFSS1 sowie dem Isolat *B. garinii* G1 konnten erwartungsgemäß keine Signale der charakteristischen C3b-Spaltprodukte detektiert werden.

2.1.3 Nachweis aktivierter Komplementkomponenten auf der Zelloberfläche von G1/pCRASP-1 und G1/pCRASP-2

Durch die Bindung von Faktor H und FHL-1 an die Oberfläche der Borrelienzellen und der daraus resultierenden Spaltung von C3b wird die Komplementkaskade bereits frühzeitig, nämlich während der Aktivierung über den alternativen Weg, unterbrochen (Lambris et al. 2008). Die Anlagerung weiterer Komplementkomponenten und die Ausbildung des terminalen Komplementkomplexes können nicht erfolgen. Die Zellen sind daher vor komplementvermittelter Lyse geschützt.

Um Ablagerungen von aktiviertem Komplement auf der Zelloberfläche nachzuweisen, wurden die Zellen für 30 min mit 25 % Humanserum versetzt und nach intensivem Waschen auf Glasobjektträger appliziert. Nach dem Trocknen der Glasobjektträger wurden die Zellen fixiert und die Komplementkomponenten C3b, C6 und der terminale Komplementkomplex mit spezifischen Antikörpern detektiert. Gleichzeitig wurde eine Gegenfärbung mit dem in die DNA interkalierenden Farbstoff DAPI durchgeführt, um alle im Gesichtsfeld vorhandenen Zellen nachzuweisen. Um unspezifische Anlagerungen der Antikörper an die Zellen auszuschließen erfolgte zusätzlich eine Inkubation der Zellen in 25 % hitzeinaktiviertem Humanserum (Inaktivierung: 30 min, 56 °C) mit anschließender Detektion der abgelagerten Komplementkomponenten. Eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Zellen konnte so ausgeschlossen werden (Anhang, Abb. VI).

Deutlich erkennbar war die nur schwache Fluoreszenz und damit nur geringe Ablagerung von C3 auf der Zelloberfläche des Isolates *B. burgdorferi* LW2 als auch der Transformanten G1/pCRASP-1 und G1/pCRASP-2 (Abb. 20). Gleichfalls wiesen die Zellen keine Fluoreszenz und damit keine Ablagerungen von C6 oder dem terminalen Komplementkomplex auf (Abb. 20). Dagegen zeigte die CRASP-negative Transformante G1/pKFSS1 als auch das Isolat *B. garinii* G1 eine starke Fluoreszenz und damit eine starke Akkumulation aller nachgewiesenen Komplementkomponenten

einschließlich des terminalen Komplementkomplexes auf der Zelloberfläche (Abb. 43).

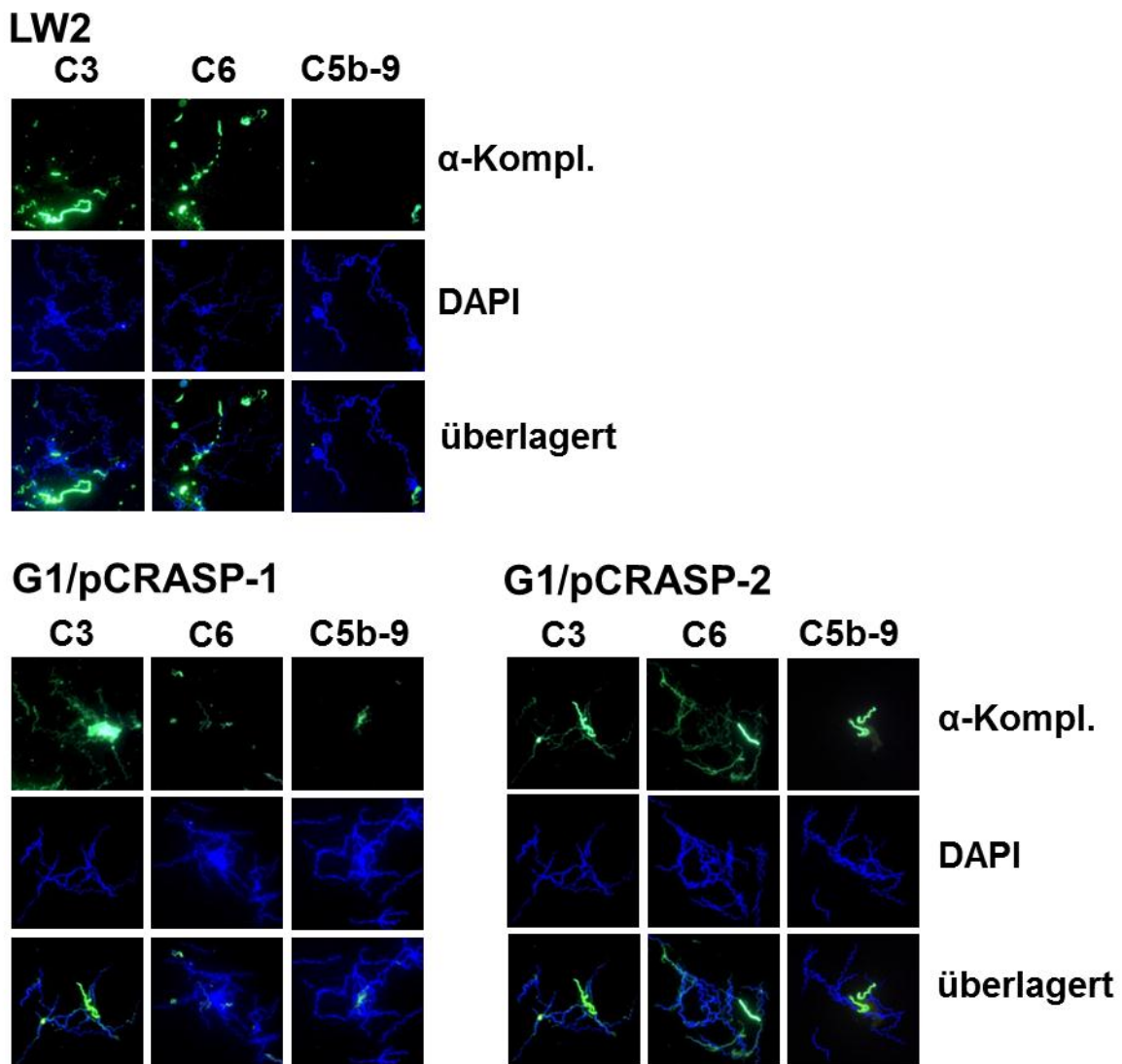


Abb. 20: Nachweis der Ablagerung der Komplementkomponenten C3b, C6 und C5b-9 auf der Zelloberfläche des Isolates *B. burgdorferi* LW2 und der Transformanten G1/pCRASP-1 und G1/pCRASP-2 nach Inkubation mit NHS.

Nach Inkubation intakter Zellen des Isolates *B. burgdorferi* LW2 und der Transformanten G1/pCRASP-1 und G1/pCRASP-2 mit 25 % NHS wurden die Zellen auf Glasobjektträger appliziert und mit Methanol fixiert. Die Detektion der Komplementkomponenten C3b und C6 auf der Zelloberfläche erfolgte mit den spezifischen polyklonalen Antikörpern anti-C3 und anti-C6 (grün). Der Nachweis des terminalen Komplementkomplexes (C5b-9) erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper anti-C5b-9 (grün). Alle vorhandenen Zellen wurden mit dem DNA-Farbstoff DAPI angefärbt (blau). Die hier dargestellten Bilder wurden an einem CX-40 Olympus Fluoreszenzmikroskop mit einer Nikon DS-5MC Digitalkamera bei einer 1000fachen Vergrößerung aufgenommen.

2.1.4 Vergleichende Untersuchungen zum Wachstumsverhalten von CRASP-1- und CRASP-2-produzierenden Transformanten in Gegenwart von Komplement

Um das Überleben der Isolate und der Transformanten in Gegenwart von Humanserum zu überprüfen, wurden *B. burgdorferi* LW2 und *B. garinii* G1 als auch G1/pKFSS1, G1/pCRASP-1 und G1/pCRASP-2 in 50 % Humanserum über einen Zeitraum von 9 Tagen bei 33°C inkubiert (Breitner-Ruddock et al. 1997). Borrelien produzieren auf Grund des eingeschränkten Metabolismus als Stoffwechselendprodukt Säuren, insbesondere Laktat (Johnson et al. 1984a). Das kontinuierliche Wachstum einer Borrelienkultur lässt sich daher anhand der Abnahme des pH-Wertes durch den im Medium enthaltenen Indikator Phenolrot und den daraus resultierenden Farbumschlag von rot zu gelb photometrisch ermitteln (Ma and Coughlin 1993; Breitner-Ruddock et al. 1997; Hunfeld et al. 2000).

Das Wachstumsverhalten der verschiedenen Borrelientransformanten konnte eindeutig in zwei Gruppen eingeteilt werden. Wie das Isolat *B. burgdorferi* LW2 überlebten die Transformanten, welche CRASP-1 oder CRASP-2 produzierten, in 50 % Humanserum und wiesen ein kontinuierliches Wachstum auf (Abb. 21). Dagegen zeigte die CRASP-negative Transformante G1/pKFSS1 und das Isolat *B. garinii* G1 kein Wachstum in Humanserum.

Durch diese vergleichenden Untersuchungen konnte eindeutig gezeigt werden, dass Borrelienzellen, die entweder CRASP-1 oder CRASP-2 produzieren, vor komplementvermittelter Lyse geschützt sind.

Das heißt, dass die Borrelienzellen allein auf Grund des Vorhandenseins von CRASP-1 oder CRASP-2 vor Bakteriolyse durch Komplement geschützt sind.

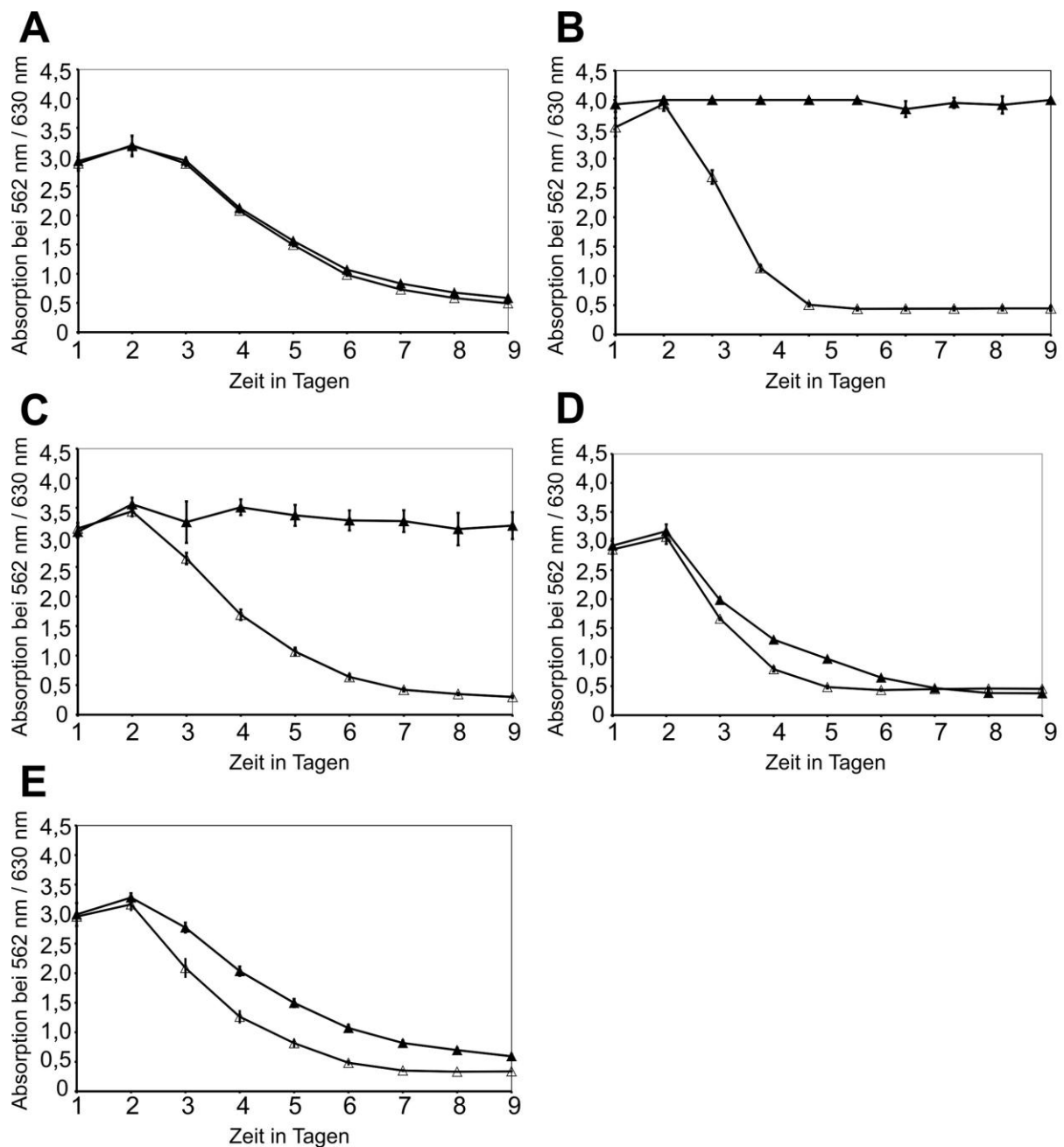


Abb. 21: Wachstumsverhalten verschiedener Transformanten in NHS.

B. burgdorferi LW2 (A), *B. garinii* G1 (B), G1/pKFSS1 (C), G1/pCRASP-1 (D) und G1/pCRASP-2 (E) wurden über 9 Tage in 50% NHS (▲) oder in 50% hiNHS (Δ) bei 33°C inkubiert. Das Wachstum der Zellpopulationen wurde anhand des Farbumschlags des Mediums von rot nach gelb täglich durch die Messung der Absorption bei 562nm / 630 nm bestimmt. Dargestellt ist ein Ansatz von drei, an verschiedenen Tagen durchgeführten, unabhängigen Versuchen. Die Standardabweichung wurde aus jeweils drei Parallelansätzen ermittelt.

2.2 Untersuchungen zur molekularen Interaktion von Faktor H und FHL-1 mit veränderten CRASP-1-Molekülen und deren Auswirkung auf die Komplementresistenz von transformierten Borrelienzellen

Die Aktivität und die Bindungseigenschaft von Proteinen werden neben der nativen Faltung ebenfalls von der Primärstruktur des Proteins determiniert. Für CRASP-1 konnten drei Regionen, welche mit Faktor H und FHL-1 interagieren, lokalisiert werden (Kraiczy et al. 2004b). Darüber hinaus wurden in Bindungsregion 1 die Aminosäure Leucin an Position 146 und in Bindungsregion 3 die Aminosäuren Tyrosin an Position 240 und Leucin an Position 246 durch in vitro-Mutagenese-Studien als relevant für die Bindung beider Komplementregulatoren identifiziert (Kraiczy et al. 2009) (Abb. 22). Hinweise, dass Glutaminsäure an Position 147 an der Interaktion mit Faktor H und FHL-1 beteiligt ist, ergaben sich schließlich durch „protein-modeling“ der CRASP-1-Kristallstruktur (Kraiczy et al. 2009).

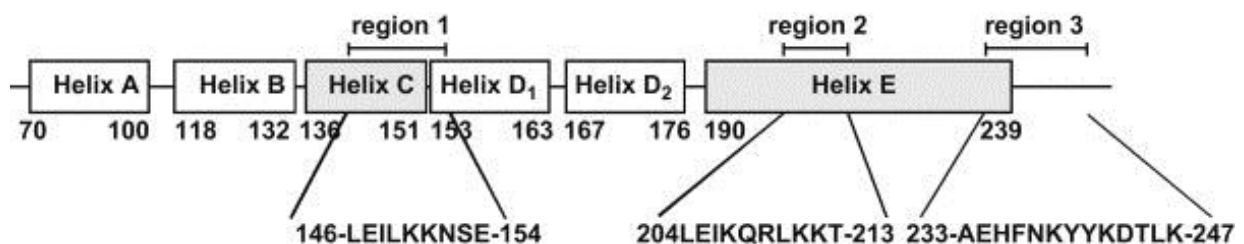


Abb. 22: Schematische Übersicht über die Faktor H- und FHL-1-Bindungsregionen 1, 2 und 3 und deren Aminosäuresequenzen im CRASP-1-Molekül (entnommen aus Kraiczy et al. 2009).

Bislang wurden die Auswirkungen einzelner Aminosäuresubstitutionen, hervorgerufen durch Mutationen im *cspA*-Gen, auf die Bindungseigenschaften ausschließlich am rekombinanten CRASP-1-Molekül untersucht. Der Einfluss einzelner Aminosäuresubstitutionen innerhalb des CRASP-1-Moleküls auf die Komplementresistenz der Zellen ließ sich nur vermuten. Im Rahmen dieser Arbeit sollte dieser Frage nachgegangen werden. Es wurde daher durch in vitro-Mutagenese das auf dem pCRASP-1-Vektor lokalisierte *cspA*-Gen mutiert, so dass der gewünschte Aminosäureaustausch im Protein hervorgerufen wurde (Kap. 1.1). Die auf diese Weise hergestellten Vektoren wurden anschließend zur Elektroporation von *B. garinii* G1 eingesetzt (Kap. 1.2). Trotz mehrfacher Versuche,

wurden lediglich die Transformanten G1/pCRASP-1 E147K und G1/pCRASP-1 Y240A erhalten. Beide Transformanten wurden anschließend auf ihre Eigenschaft, Faktor H und FHL-1 zu binden und schließlich deren Relevanz für die Komplementresistenz untersucht. Als Kontrollen wurden die Transformanten G1/pCRASP-1 und G1/pKFSS1 in die Versuche mit einbezogen.

2.2.1 Vergleichende Untersuchungen der veränderten CRASP-1-Moleküle auf die Bindung von Faktor H und FHL-1

Um den Einfluss zielgerichteter Aminosäuresubstitutionen im nativen CRASP-1 auf die Bindung von Faktor H und FHL-1 auf der Zelloberfläche von Borrelien zu zeigen, wurden die Transformanten G1/pCRASP-1 E147K und G1/pCRASP-1 Y240A als auch G1/pCRASP-1 und G1/pKFSS1 mit NHS-EDTA inkubiert (Material und Methoden, Kap. 8.2). Nach mehrmaligen Waschen wurde der Überstand des letzten Waschschrilles als Waschfraktion separat aufgehoben und die auf der Borrelienoberfläche gebundenen Proteine mit 0,1 M Glycin (pH 2,0) abgelöst. Nach erfolgter Sedimentation der Zellen wurden die Überstände (Eluate) und die jeweilige Waschfraktion in einem 12,5 %igen SDS-Laemmigel aufgetrennt, und die separierten Proteine auf eine Nitrozellulose-membran übertragen. Faktor H bzw. FHL-1 im Eluat wurde anhand einer Westernblot-Analyse nachgewiesen.

In Abbildung 23 ist deutlich zu erkennen, dass Faktor H als auch FHL-1 im Eluat der Transformanten G1/pCRASP-1 und G1/pCRASP-1 E147K nachgewiesen werden konnten. Gleichzeitig trat bei beiden Transformanten ein weiteres Signal auf, welches ein etwa 25 KD Protein kennzeichnet [Abb. 23 A (Spur 3, 4, 5 und 6)]. Vermutlich handelt es sich hier um CRASP-1 (25,9 KD), welches durch die Interaktion mit Faktor H ebenfalls visualisiert wurde. Da kein Faktor H zur Inkubation der Membran zugegeben wurde, könnte es sich um von der Membran gelösten Faktor H handeln. Die in Abbildung 23B Spur 4 und 6 aufgetretenen Signale beruhen sehr wahrscheinlich auf unspezifischen Bindungen des zum Nachweis genutzten, polyklonalen Antikörpers anti-SCR1-4. Die Mutante G1/pCRASP-1 Y240A zeigte im Vergleich zu den anderen Transformanten keine Bindung von Faktor H und nur eine äußerst schwache Bindung von FHL-1 (Abb. 23). G1/pKFSS1 wies keine Bindung von Faktor H und FHL-1 auf.

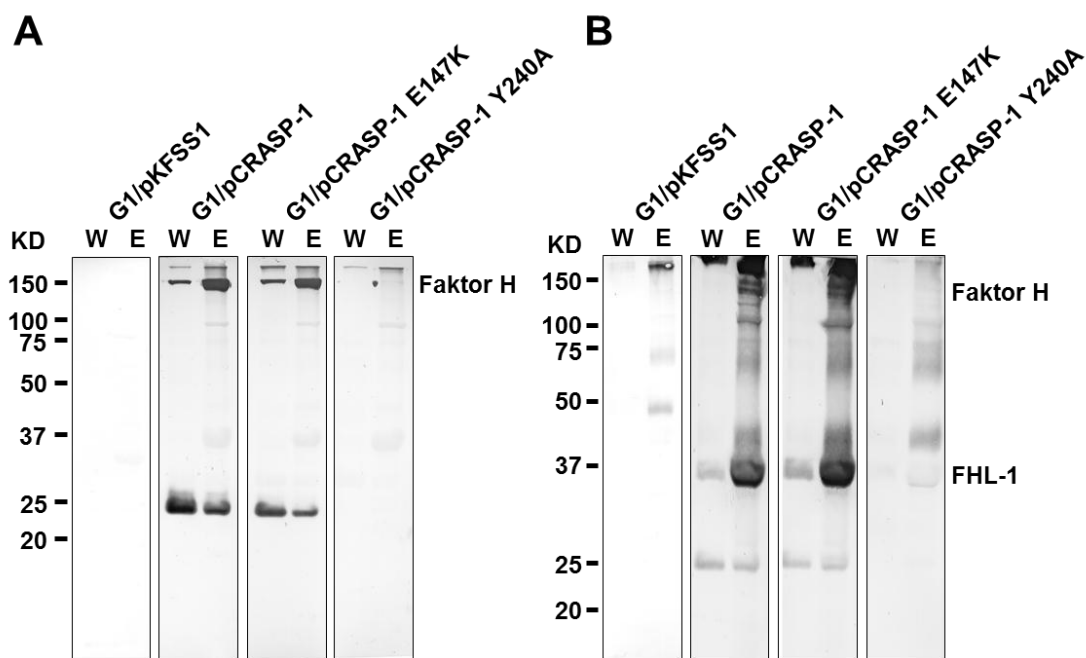


Abb. 23: Interaktion von Faktor H und FHL-1 mit nativen, veränderten CRASP-1-Molekülen.

Nach Inkubation von intakten Borrelienzellen der Transformanten G1/pKFSS1, G1/pCRASP-1, G1/pCRASP-1 E147K sowie G1/pCRASP-1 Y240A mit NHS-EDTA erfolgte nach mehrfachem Waschen, wobei die letzte Waschfraktion (W) aufbewahrt wurde, die Elution der an die Zelloberfläche gebundenen Proteine. Der Überstand der letzten Waschfraktion (W) und das Eluat (E) wurden im 12,5%igem SDS-Laemmigel aufgetrennt und die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Nachweis von Faktor H und FHL-1 erfolgte im Westernblot mittels des monoklonalen Antikörpers VIG8 **(A)** und des polyklonalen Antikörpers anti-SCR1-4 **(B)**. Links angegeben ist der Größenstandard Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad).

Zusätzlich wurden Zelllysate der einzelnen Borrelientransformanten hergestellt (Material und Methoden, Kap. 6.1) und auf einem 10%igen Tris Tricin-SDS-Gel aufgetrennt (Material und Methoden, Kap. 6.2.1). Anschließend wurde die Bindung von Faktor H und FHL-1 an die unterschiedlichen CRASP mittels Ligandenaffinitätsblot-Analyse untersucht. Wie in Abbildung 24 dargestellt, konnte das Ergebnis der Serumadsorption bestätigt werden. Für CRASP-1 und CRASP-1_{E147K} wurde eine Bindung beider Komplementregulatoren nachgewiesen. Dagegen ergab sich für CRASP-1_{Y240A} keine Bindung von Faktor H und nur eine sehr schwache Bindung von FHL-1.

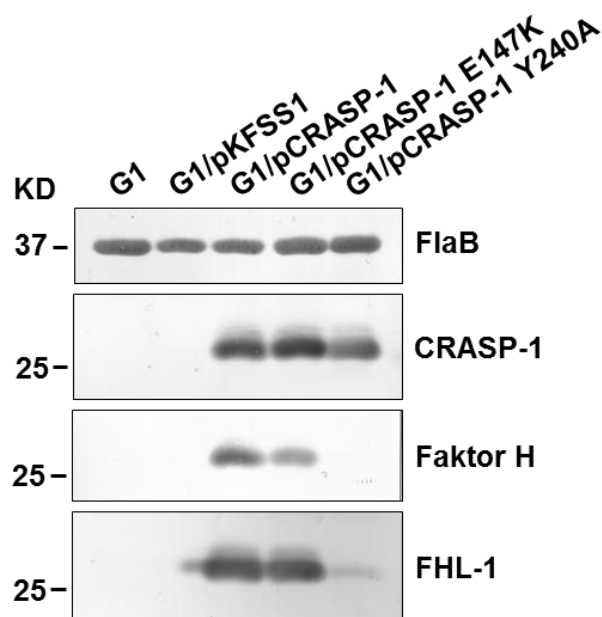


Abb. 24: Nachweis der Bindung von Faktor H und FHL-1 an CRASP-1_{E147K} und an CRASP-1_{Y240A} mittels Ligandenaffinitätsblot-Analyse.

Zelllysate des Isolates *B. garinii* G1 und der Transformanten G1/pKFSS1, G1/pCRASP-1, G1/pCRASP-1 E147K und G1/pCRASP-1 Y240A wurden im 10%igen Tris Tricin-SDS-Gel aufgetrennt und die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Membranen wurden entweder mit gereinigtem Faktor H oder mit Zellkulturüberstand, welcher rekombinantes FHL-1 enthielt, inkubiert. Faktor H wurde mittels des monoklonalen Antikörpers VIG8 und FHL-1 wurde mit dem polyklonalem Antikörper anti-SCR1-4 nachgewiesen. CRASP-1 und die veränderten CRASP-1 wurden mit dem CRASP-1-spezifischen Antikörper anti-ZS7A68 visualisiert. Die Flagellinuntereinheit FlaB wurde im Westernblot durch den Flagellin-spezifischen Antikörper L41 1C11 nachgewiesen. Links angegeben ist der Größenstandard Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad).

2.2.2 Auswirkungen veränderter CRASP-1-Moleküle auf die Komplementresistenz der verschiedenen Transformanten

Wie unter Kapitel 2.2.1 beschrieben, bewirkt die Substitution eines Tyrosins durch Alanin an Position 240 im CRASP-1 eine drastische Veränderung der Faktor H- und FHL-1-Bindung. Dagegen zeigt eine Veränderung des Proteins an Position 147 kaum Einfluss auf die Bindung der Komplementregulatoren an CRASP-1. Ob die komplementregulatorische Aktivität durch die Bindung von Faktor H und FHL-1 an die veränderten CRASP-1-Moleküle CRASP-1_{E147K} und CRASP-1_{Y240A} ausreichend ist, um die Zellen vor Bakteriolyse durch Komplement zu schützen, sollte durch den Kofaktor-Assay und die Inkubation der Zellen in Humanserum geklärt werden.

2.2.2.1 Nachweis der Kofaktoraktivität von Faktor H und FHL-1 nach Bindung an Borrelienzellen mit verändertem CRASP-1

Die Bindung der Komplementregulatoren an die veränderten CRASP-1-Moleküle und die Aufrechterhaltung ihrer funktionellen Aktivität ist von essentieller Bedeutung, da ansonsten der Schutz der Borrelien vor komplementvermittelter Lyse nicht mehr gegeben ist. Dieser Aspekt sollte in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

Um die funktionelle Aktivität der gebundenen Komplementregulatoren darzustellen, wurde die Spaltung der α -Kette der Komplementkomponente C3b mittels Faktor H oder FHL-1 und Faktor I analysiert. Dazu wurden die Transformanten mit gereinigtem Faktor H oder rekombinant hergestellten FHL-1 inkubiert, mehrfach gewaschen und anschließend mit Faktor I und C3b versetzt. Die Überstände wurden anschließend auf einem 12,5 %igen SDS-Laemmigel unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt, die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und die Spaltprodukte von C3b mittels Westernblot visualisiert.

Für die Transformante G1/pCRASP-1 E147K konnten die charakteristischen Spaltprodukte von 68 KD, 46 KD und 43 KD sowohl nach Inkubation mit Faktor H als auch nach Inkubation mit FHL-1 gezeigt werden [Abb. 25 (jeweils Spur 5)]. Zu erkennen ist ebenfalls die Abnahme des Signals für die 110 KD schwere α -Kette von C3b. Die an CRASP-1_{E147K} gebundenen Komplementregulatoren behielten ihre komplementregulatorische Aktivität. Dagegen konnte für die Transformante G1/pCRASP-1 Y240A weder nach Inkubation mit Faktor H noch nach Inkubation mit FHL-1 eine Spaltung der α -Kette von C3b nachgewiesen werden [Abb. 25 (jeweils Spur 7)]. Da bereits gezeigt wurde, dass die Komplementregulatoren nicht oder nur sehr schwach an CRASP-1_{Y240A} binden, wird hier als Folge der Verlust der Kofaktoraktivität für die CRASP-1_{Y240A}-produzierenden Zellen deutlich.

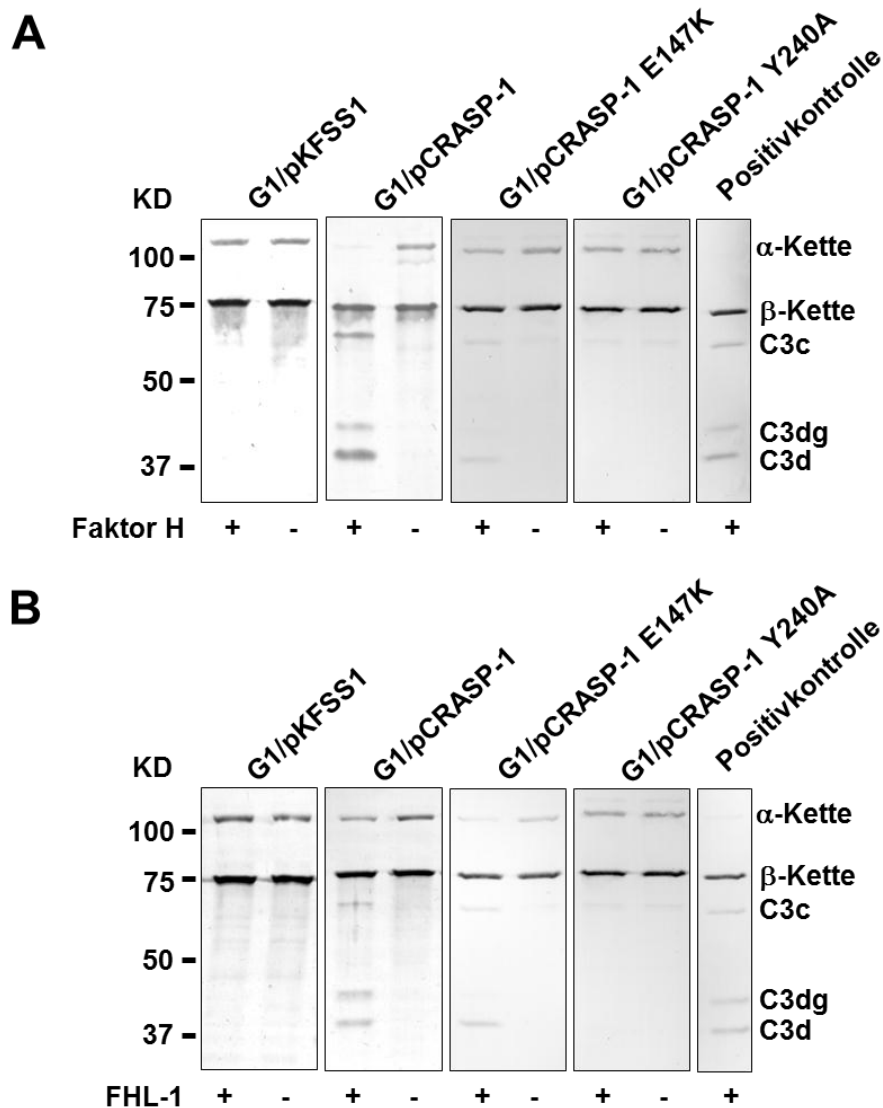


Abb. 25: Funktionelle Aktivität der Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1 nach Bindung an veränderte CRASP-1 der Transformanten G1/pCRASP-1 E147K und G1/pCRASP-1 Y240A.

Nach Inkubation intakter Borrelienzellen der Transformanten G1/pKFSS1, G1/pCRASP-1, G1/pCRASP-1 E147K und G1/pCRASP-1 Y240A mit Faktor H (A) oder FHL-1 (B) und der Zugabe von C3b und Faktor I wurde der Zellüberstand auf einem 12,5%igen SDS-Laemmigel unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Nachweis der α - und β -Kette und der C3b-Spaltprodukte C3c, C3dg und C3d erfolgte im Westernblot mittels polyklonalem anti-C3-Antikörper. Als Positivkontrolle diente ein Reaktionsansatz von Faktor H oder FHL-1 mit C3b und Faktor I. Links angegeben ist der Größenstandard Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad).

2.2.2.2 Untersuchungen zum Wachstumsverhalten von Borrelienzellen mit verändertem CRASP-1 in Gegenwart von Komplement

Um eine Aussage über die Bedeutung der einzelnen Aminosäuresubstitutionen im CRASP-1-Molekül für die Empfindlichkeit der Transformanten G1/pCRASP-1 E147K und G1/pCRASP-1 Y240A gegenüber Komplement zu treffen, wurden die Zellen in

50% Humanserum über 9 Tage inkubiert und das Wachstum der Borrelien durch die tägliche Messung der Extinktion ermittelt (Material und Methoden, Kap. 8.4).

Sowohl die Transformante G1/pCRASP-1 als auch die Transformante G1/pCRASP-1 E147K zeigten deutliches Wachstum, was sich durch die kontinuierliche Abnahme der Absorption darstellte (Abb. 26B und C). Überraschenderweise konnte auch für G1/pCRASP-1 Y240A, welche keine Bindung von Faktor H und nur eine schwache Bindung von FHL-1 aufwies als auch keine Kofaktoraktivität des gebundenen FHL-1 zeigte, Wachstum nachgewiesen werden (Abb. 26D). Bei dieser Transformante müssen die serumresistenten Zellen durch einen anderen molekularen Mechanismus als dem der Interaktion mit Faktor H und FHL-1 vor Komplement geschützt sein. Es wurde daher angenommen, dass CRASP-1_{Y240A} direkt mit Komponenten des Komplementsystems interagiert und dadurch die Komplementaktivierung inhibiert wird.

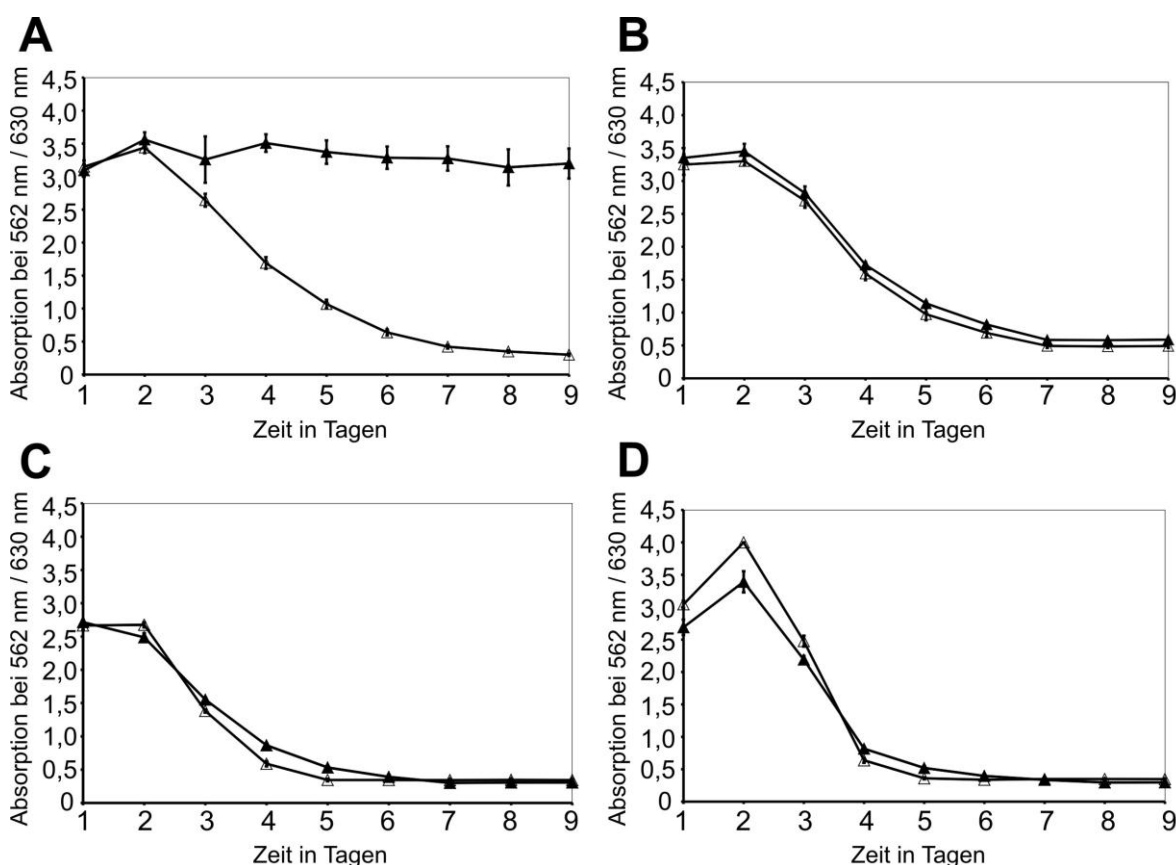


Abb. 26: Wachstumskinetiken verschiedener CRASP-1 produzierender Transformanten in NHS. Die Transformanten G1/pKFSS1 (A), G1/pCRASP-1 (B), G1/pCRASP-1 E147K (C) und G1/pCRASP-1 Y240A (D) wurden über 9 Tage in 50% NHS (▲) und in 50% hiNHS (Δ) bei 33°C inkubiert. Das Wachstum der Spirochäten wurde anhand des Farbumschlages des Mediums von rot nach gelb täglich durch die Messung der Absorption bei 562nm / 630nm bestimmt. Dargestellt ist einer von drei, an verschiedenen Tagen durchgeführten, Versuchen. Die Standardabweichung wurde aus jeweils drei Parallelansätzen ermittelt.

2.2.2.3 Nachweis der Ablagerung von Komplementkomponenten auf der Zelloberfläche der CRASP-1-produzierenden Transformanten

Die Zerstörung der Zellen durch Komplement beruht auf der kovalenten Bindung von C3b und C5b auf der Borrelienoberfläche und der anschließenden sequentiellen Anlagerung der Komplementkomponenten C6, C7, C8 und C9, welche schließlich den terminalen Komplementkomplex bilden. Um nachzuweisen, auf welcher Stufe die Kaskade zum Erliegen kommt, wurden die verschiedenen Stufen der Komplementaktivierung untersucht. Dazu wurden die entsprechenden Transformanten mit 25 % Humanserum inkubiert, die Zellen gewaschen und anschließend die Ablagerung der Komplementkomponenten C3b, C6 und die des terminalen Komplementkomplexes C5b-9 auf der Zelloberfläche der Borrelien mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen (Material und Methoden, Kap. 7.2).

Die Transformanten G1/pCRASP-1 und G1/pCRASP-1 E147K zeigten eine schwache Fluoreszenz für C3b und keine Fluoreszenz für C6 und den terminalen Komplementkomplex (Abb. 27). Die Zellen wiesen keine morphologische Veränderung, insbesondere sogenannte „Blebs“ auf, wie in der Gegenfärbung mit DAPI deutlich zu erkennen war. Im Direktpräparat zeigten sich die Zellen sehr beweglich und wirkten vital (Daten nicht gezeigt).

Im Gegensatz dazu konnten bei einer Vielzahl der Zellen der Transformante G1/pCRASP-1 Y240A Ablagerungen der Komplementkomponente C3b, erkennbar durch die homogene Fluoreszenz der Bakterienzellen, nachgewiesen werden (Abb. 27). Ebenfalls ließ sich die Ablagerung der Komponente C6 und die des lytischen Komplementkomplexes auf der Zelloberfläche demonstrieren. Im Vergleich zur serumsensitiven Transformante G1/pKFSS1 allerdings schien wesentlich weniger C6 und TCC auf der Borrelienoberfläche abgelagert zu sein (Abb. 27). Ebenfalls lag die DNA nur weniger Zellen kondensiert in „Blebs“ vor. Im Direktpräparat zeigte sich ein Großteil der Zellen von G1/pCRASP-1 Y240A beweglich und ohne erkennbare morphologische Veränderungen (Daten nicht gezeigt). Trotz des fast vollständigen Verlustes der Bindungskapazität von Faktor H und FHL-1 und Ablagerungen der verschiedenen Komplementkomponenten scheint bei diesem Teil der Population keine Komplementaktivierung stattzufinden.

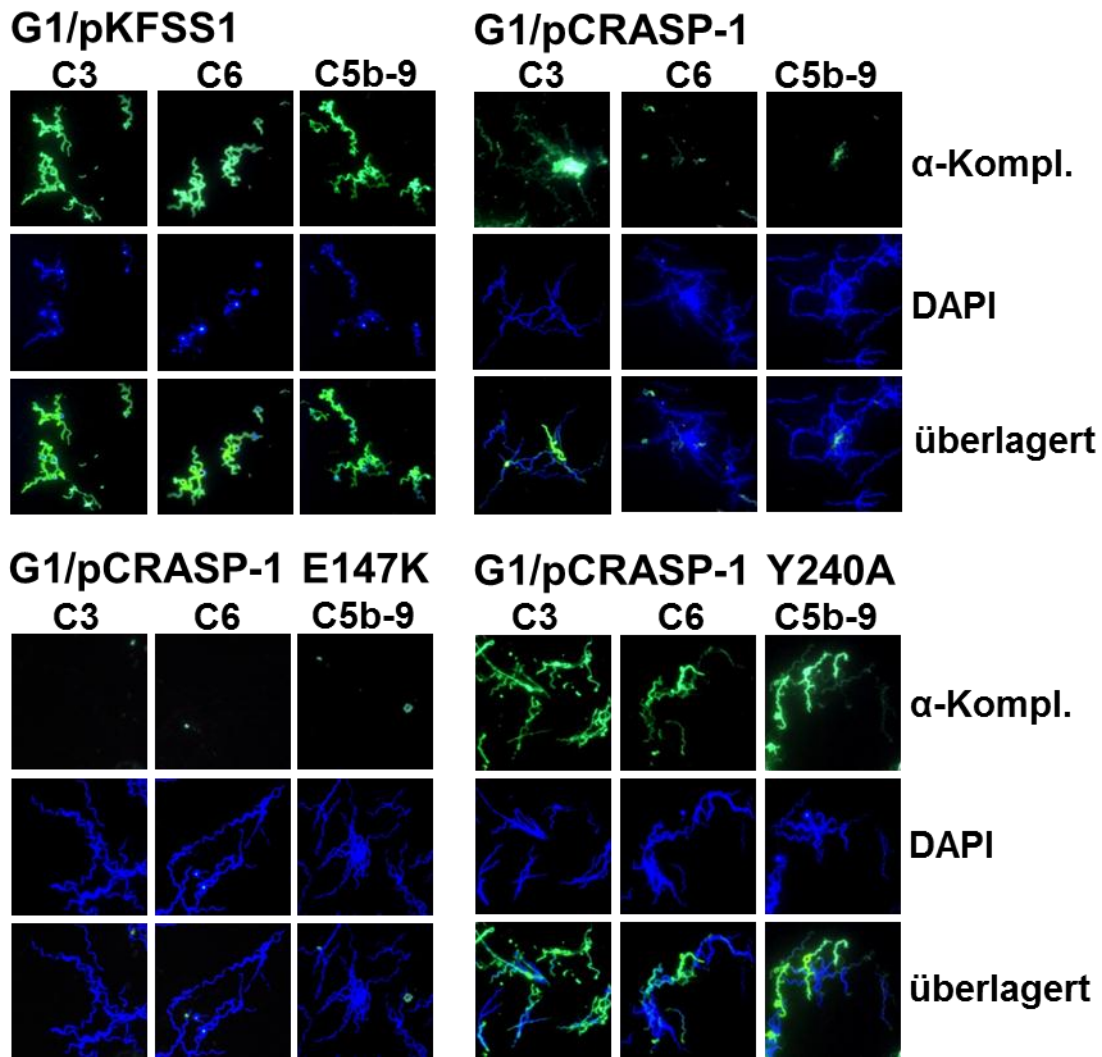


Abb. 27: Nachweis der Ablagerung von C3b, C6 und dem TCC auf der Zelloberfläche verschiedener Transformanten nach Inkubation in NHS.

Nach Inkubation von intakten Zellen der Transformanten G1/pKFSS1, G1/pCRASP-1, G1/pCRASP-1 E147K und G1/pCRASP-1 Y240A in NHS wurden die Zellen auf Objektträger appliziert und mit Methanol fixiert. Die Komplementkomponenten C3 und C6 wurden mit den spezifischen, polyklonalen Antikörpern anti-C3 und anti-C6 auf der Zelloberfläche der Borrelien detektiert. Der terminale Komplementkomplex C5b-9 wurde mit dem monoklonalen Antikörper anti-C5b-9 auf der Zelloberfläche nachgewiesen. Die hier dargestellten Bilder wurden an einem CX-40 Olympus Fluoreszenzmikroskop mit einer Nikon DS-5MC Digitalkamera bei einer 1000fachen Vergrößerung aufgenommen.

2.2.3 CRASP-1 als Komplementregulator

2.2.3.1 CRASP-1 ist ein Inhibitor des terminalen Komplementkomplexes

CRASP-1 bindet die Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1, wodurch ein Abbruch der Komplementkaskade auf der Aktivierungsstufe von C3 bewirkt wird. In weiterführenden Versuchen mit rekombinantem CRASP-1 zeigte sich, dass dieses

Molekül auch ohne Interaktion mit Faktor H und FHL-1 eine komplementregulatorische Funktion besitzt, durch die die Assemblierung des terminalen Komplementkomplexes inhibiert wird (persönliche Mitteilung Prof. Zipfel). Inwieweit das veränderte CRASP1_{Y240A} ebenfalls diese komplementregulatorische Wirkung besitzt, sollte im weiteren Verlauf der Arbeit analysiert werden. Dazu wurde ein hämolytischer Assay durchgeführt, in dem die Inhibition des terminalen Komplementkomplexes durch CRASP-1_{Y240A} untersucht werden sollte. Die funktionelle Aktivität des rekombinanten CRASP-1_{Y240A} wurde durch einen Ansatz zur Regulierung des alternativen Komplementweges kontrolliert.

Zum Nachweis der Inhibierung des alternativen Aktivierungsweges durch CRASP-1_{Y240A} wurde rekombinantes CRASP-1_{Y240A} oder als Kontrolle, rekombinantes CRASP-1 zum Humanserum gegeben. Nach einer 30 minütigen Inkubation wurden Kaninchenerythrozyten zugegeben und die Zelllyse dieser nach 30 min bestimmt. Wie erwartet, wurden die Erythrozyten durch die Zugabe von Humanserum vollständig lysiert. Durch Inkubation mit CRASP-1 oder CRASP-1_{Y240A} blieben die Zellen jedoch vor der Lyse durch Komplement geschützt (Abb. 28A). Sowohl CRASP-1 als auch CRASP-1_{Y240A} können also den alternativen Komplementweg regulieren. Bei CRASP-1 könnte diese Regulation über die Bindung von Faktor H und FHL-1 erfolgen. Bei CRASP-1_{Y240A} dagegen muss die Komplementregulation über einen anderen Mechanismus erfolgen.

Um eine Inhibition von CRASP-1_{Y240A} auf den terminalen Komplementkomplex nachzuweisen, wurden in einem zweiten Ansatz die gereinigte Komplementkomponente C5b-6 zu den Erythrozyten hinzugegeben. Anschließend wurde zu diesem Versuchsansatz ein Ansatz von rekombinanten CRASP-1_{Y240A} bzw. CRASP-1 und der gereinigten Komplementkomponenten C7, C8 und C9 hinzugefügt. Eine Regulation auf der Ebene von C3 durch Faktor H oder FHL-1 ist durch den Einsatz der gereinigten Komponenten ohne C3 und ohne die Komplementregulatoren ausgeschlossen.

In Abwesenheit der gereinigten CRASP-1-Moleküle führte die Zusammenlagerung der Komponenten C5b-6, C7, C8 und C9 zur Assemblierung des terminalen Komplementkomplexes auf der Erythrozytenmembran und zu einer starken Lyse der Zellen (Abb. 28B). Wiederum bewirkte die Zugabe von CRASP-1_{Y240A} als auch von CRASP-1 den Schutz der Erythrozyten vor Lyse. Durch die direkte Interaktion von

CRASP-1_{Y240A} mit den Komponenten der terminalen Sequenz der Komplementkaskade ließ sich demnach eine Inhibition erzielen.

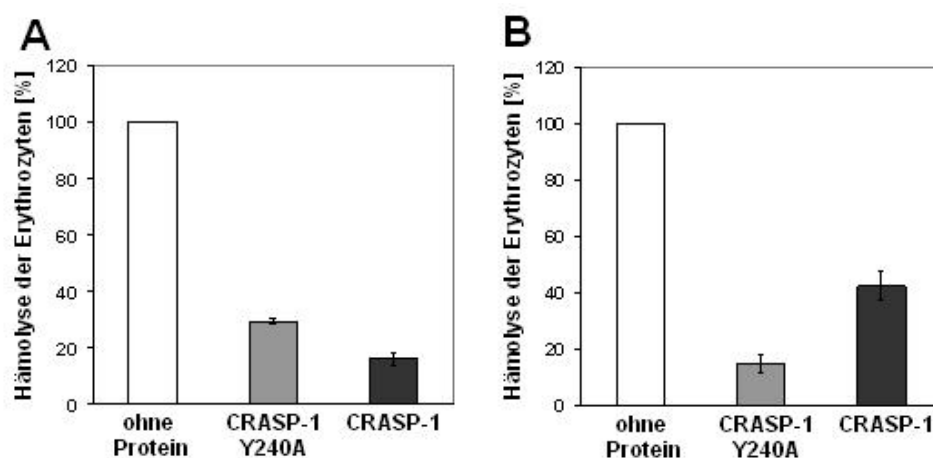


Abb. 28: Nachweis des inhibierenden Effektes von CRASP-1_{Y240A} auf die Komplementaktivierung mittels Hämolyse-Assay.

NHS (7,5%) wurden ohne oder mit 2,5 µg rekombinatem CRASP-1_{Y240A} vorinkubiert **(A)**, 5×10^6 Kannederythrozyten hinzugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Lyse der Erythrozyten durch Messung der Absorption bei 414 nm des Zellüberstandes bestimmt. Zum Nachweis der Inhibition des terminalen Komplementkomplexes **(B)** wurden 2×10^8 Schaferythrozyten zunächst mit dem C5b-6 Komplex (1,5 µg/ml) vorinkubiert. Gleichzeitig wurden 1 µg/ml C7, 0,2 µg/ml C8 und 1 µg/ml C9 ohne oder mit 2,5 µg rekombinatem CRASP-1_{Y240A} inkubiert. Beide Ansätze wurden schließlich vereinigt und nach einer 30 minütigen Inkubation bei 37°C wurde die Lyse der Erythrozyten mittels Messung der Absorption bei 414 nm des Zellüberstandes bestimmt. Als positive Kontrolle diente jeweils ein Ansatz mit 2,5 µg rekombinatem CRASP-1. Als 100% Hämolyse der Erythrozyten wurde jeweils der Ansatz ohne CRASP-1_{Y240A} definiert. Die Standardabweichung wurde aus jeweils drei Parallelansätzen ermittelt.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgern, dass die komplementregulatorische Funktion von CRASP-1_{Y240A} auf der Inhibition des terminalen Komplementkomplexes basiert. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Faktor H und FHL-1 an CRASP-1 in keinem Zusammenhang mit der inhibitorischen Aktivität des Proteins steht. Für beide Prozesse sind vermutlich unterschiedliche Regionen im CRASP-1-Molekül verantwortlich. Beide komplementregulatorischen Aktivitäten können interessanterweise gleichzeitig wirksam werden. Weiterhin wird deutlich, dass die inhibitorische Funktion des CRASP-1-Moleküls nicht von der als funktionell aktiv bezeichneten Form des CRASP-1-Dimers abhängt. CRASP-1_{Y240A} liegt lediglich als Monomer vor, besitzt aber eine etwa gleichstarke inhibitorische Aktivität wie das unveränderte CRASP-1-Molekül (Kraiczky et al. 2009).

2.2.3.2 Einfluss von rekombinantem CRASP-1 auf die Komplementresistenz des serumsensitiven Isolates *B. garinii* G1

CRASP-1 bindet wahrscheinlich als homodimeres Molekül Faktor H und FHL-1 und bewirkt dadurch die Komplementresistenz bei Borrelien. Wie unter Kapitel 2.2.3.1 beschrieben, interagiert CRASP-1_{Y240A} und CRASP-1 direkt mit den Komponenten des Komplementsystems und übt somit eine inhibierende Funktion auf die Komplementaktivierung, insbesondere auf die Zusammenlagerung des terminalen Komplementkomplexes, aus.

In weiteren Versuchen wurde deshalb untersucht, ob rekombinantes CRASP-1_{Y240A} und rekombinantes CRASP-1 in der Lage sind, serumsensitive Borrelienzellen vor Komplement zu schützen. Dazu wurden Zellen des serumsensitiven Isolates *B. garinii* G1 mit Humanserum versetzt, welches mit rekombinant hergestelltem CRASP-1 oder CRASP-1_{Y240A} vorinkubiert wurde. Anschließend wurde die Ablagerung der Komplementkomponente C6 und die des terminalen Komplementkomplexes auf der Zelloberfläche des serumsensitiven Isolates mittels Immunfluoreszenzmikroskopie überprüft (Material und Methoden, Kap. 7.2). Ebenfalls wurde das Wachstum der Zellen in Humanserum, welches mit gereinigtem CRASP-1 oder CRASP-1_{Y240A} versetzt wurde, über einen Zeitraum von 9 Tagen in einem Wachstums-Inhibitions-Assay nachgewiesen (Material und Methoden, Kap. 8.4).

Während in Abwesenheit von CRASP-1 und CRASP-1_{Y240A} nahezu alle vorhandenen Zellen eine starke Fluoreszenz aufwiesen, was auf eine massive Komplementablagerung hindeutet (Abb. 29A), konnten in Gegenwart von CRASP-1 und CRASP-1_{Y240A} vermehrt intakte Zellen ohne Komplementablagerungen beobachtet werden (Abb. 29B und C). Ebenfalls war deutlich zu erkennen, dass die Borrelienzellen in mit CRASP-1_{Y240A}- oder CRASP-1-vorbehandeltem Humanserum weniger morphologische Veränderungen aufwiesen, als die Zellen, welche mit unbehandeltem Humanserum inkubiert wurden.

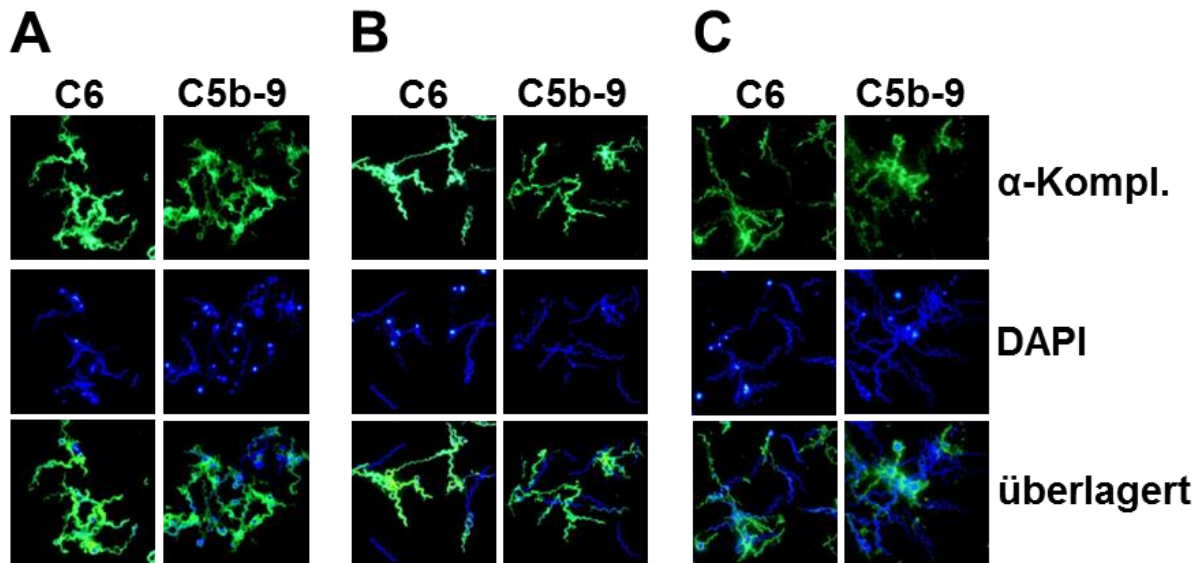


Abb. 29: Ablagerung der Komplementkomponenten C6 und C5b-9 auf der Oberfläche von *B. garinii* G1 nach Inkubation mit CRASP-1-vorbehandelten NHS.

NHS (50 μ l) wurde für 30 min ohne CRASP-1 (**A**), mit 10 μ g rekombinanten CRASP-1 (**B**) oder mit 10 μ g rekombinanten CRASP-1_{Y240A} (**C**) bei 37°C inkubiert und anschließend auf 25% NHS verdünnt. Anschließend erfolgte die Zugabe von Zellen des serumsensitiven Isolates *B. garinii* G1. Nach 30 minütiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen auf Objektträger aufgebracht und mit Methanol fixiert. Die auf der Zelloberfläche abgelagerten Komplementkomponenten C6 und C5b-9 wurden mittels der spezifischen Antikörper anti-C6 und anti-C5b-9 nachgewiesen. Die hier dargestellten Bilder wurden an einem CX-40 Olympus Fluoreszenzmikroskop mit einer Nikon DS-5MC Digitalkamera bei einer 1000fachen Vergrößerung aufgenommen.

Mit Hilfe des Wachstums-Inhibitions-Assays konnte ebenfalls ein Wachstum der Spirochäten des serumsensitiven Isolates *B. garinii* G1 bei Zugabe von mit CRASP-1- oder CRASP-1_{Y240A}-versetztem Humanserum festgestellt werden (Abb. 30). Dabei scheint es, dass CRASP-1 *B. garinii* G1 besser zu schützen vermag als CRASP-1_{Y240A}.

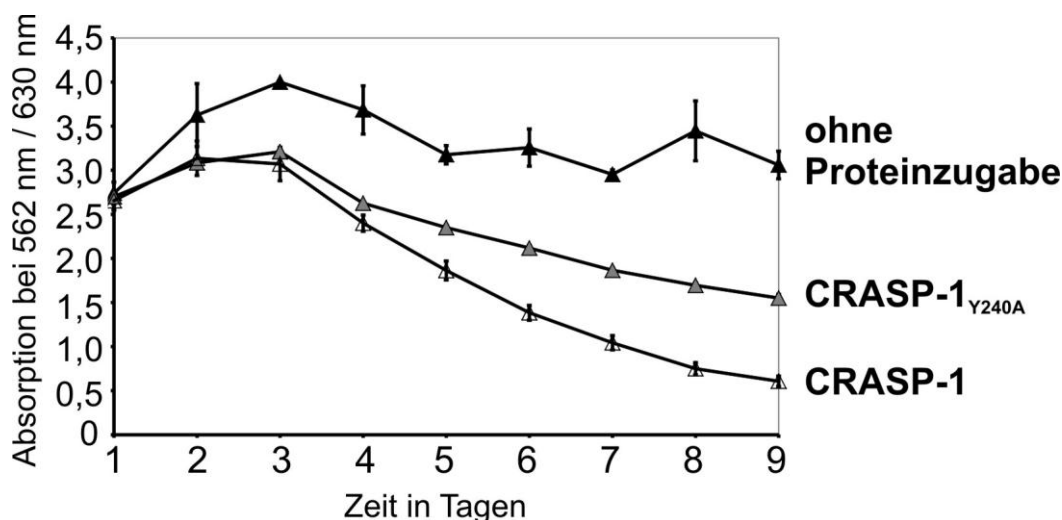


Abb. 30: Wachstumsverhalten von *B. garinii* G1 in Gegenwart von mit CRASP-1 vorbehandelten NHS.

NHS (100 µl) wurde für 30 min ohne CRASP-1 (▲), mit 20 µg rekombinatem CRASP-1 (△) oder mit 20 µg rekombinatem CRASP-1_{Y240A} (grau ausgefüllte Dreiecke) bei 37°C vorinkubiert. *B. garinii* G1 wurde in 50 % des vorinkubierten NHS bei 33°C über 9 Tage inkubiert. Das Wachstum wurde anhand des Farbumschlages des Mediums von rot nach gelb täglich durch die Messung der Absorption bei 562nm / 630nm photometrisch bestimmt. Dargestellt ist exemplarisch ein Ansatz von drei an unterschiedlichen Tagen durchgeführten, unabhängigen Versuchen. Die Standardabweichung wurde aus jeweils drei Parallelansätzen ermittelt.

Ausgehend von den Ergebnissen des Wachstums-Inhibitions-Assays lässt sich vermuten, dass eine Inhibition des Komplementsystems durch CRASP-1 stattgefunden hat. Die serumsensitiven Zellen überleben in Gegenwart von Humanserum. Da CRASP-1_{Y240A}, nicht oder nur sehr schwach mit Faktor H oder FHL-1 interagiert, jedoch einen ähnlich starken Schutz wie natives CRASP-1 bewirkt, muss dieser Mechanismus unabhängig von der Interaktion mit Komplementregulatoren erfolgen. Durch die komplementregulative Bifunktionalität des CRASP-1-Moleküls ist für die Borrelienzelle ein ausreichender Schutz geboten, selbst, wenn eine der beiden Mechanismen zum Erliegen kommt (z.B. durch Punktmutationen im *cspA*-Gen).

2.3 Relevanz einzelner Aminosäuren von CRASP-2 für die Bindung der Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1 und dessen Auswirkung auf die Komplementresistenz

Die Bindung der Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1 an CRASP-2 bedingt nicht nur einer nativen Konformation des Moleküls, sondern ist auch von einzelnen, mit beiden Komplementregulatoren interagierenden Aminosäuren abhängig (Siegel

et al. 2008). Nachdem an rekombinant hergestelltem Protein gezeigt werden konnte, dass bereits einzelne Substitutionen ausreichen, um die Bindung von Faktor H und FHL-1 an CRASP-2 zu beeinträchtigen oder komplett zu unterbinden, sollte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass einzelne Substitutionen im nativen CRASP-2 die Bindung der Komplementregulatoren und die Komplementresistenz von Borrelien beeinflussen.

2.3.1 Relevanz einzelner Aminosäuren von CRASP-2 für die Bindung von Faktor H und FHL-1

Für rekombinantes CRASP-2 konnte bereits die Relevanz einzelner Aminosäuren für die Faktor H und FHL-1 Bindung gezeigt werden (Siegel et al. 2008). Demnach sind Phenylalanin an Position 81, Arginin an Position 139 und die Tyrosine an den Positionen 207 und 211 besonders wichtig für die Interaktion mit beiden Komplementregulatoren.

Die Vektorkonstrukte pCRASP-2 F81A, pCRASP-2 R139A, pCRASP-2 Y207A, pCRASP-2 Y211A, pCRASP-2 R139A-Y207A, pCRASP-2 R139A-Y211A und pCRASP-2 Y207A-Y211A, welche das entsprechend mutierte CRASP-2-kodierende *cspZ*-Gen enthielten, wurden in *B. garinii* G1 mittels Elektroporation transformiert (Ergebnisse, Kap. 1.2) und die Bindungseigenschaften der nativen, veränderten CRASP-2-Moleküle auf der Zelloberfläche der Borrelien untersucht. Neben den CRASP-2-Molekülen mit einem Aminosäureaustausch wurden ebenfalls Proteine erzeugt, die zwei Substitutionen enthielten: R139A und Y207A, R139A und Y211A sowie Y207A und Y211A. In den folgenden Versuchen dienten die Transformanten G1/pKFSS1 und G1/pCRASP-2 als Kontrollen.

In den ersten Versuchsansätzen wurden zunächst intakte Zellen der verschiedenen Transformanten mit NHS-EDTA inkubiert und anschließend die an der Zelloberfläche gebundenen Proteine mittels Glycin von der Zelle gelöst (Material und Methoden, Kap. 8.2). Die Eluate als auch die Überstände der letzten Waschfraktionen wurden in einem 12,5%igen Laemmli SDS-Gel separiert und die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Durch die nachfolgende Westernblot-Analyse wurde für die Transformanten G1/pCRASP-2 F81A, G1/pCRASP-2 Y207A und G1/pCRASP-2 Y211A eine Faktor H-Bindung nachgewiesen [Abb. 31A (Spur 6, 10 und 12)]. Eine Bindung von FHL-1 ließ sich für die Transformanten

G1/pCRASP-2 F81A, G1/pCRASP-2 R139A und G1/pCRASP-2 Y207A demonstrieren [Abb. 31B (Spur 6, 8, 10)]. Die Transformanten mit jeweils zwei veränderten Aminosäuren im CRASP-2 interagierten weder mit Faktor H noch mit FHL-1.

Mittels gelelektrophoretischer Auftrennung von Zelllysaten der verschiedenen Transformanten und der sich anschließenden Ligandenaffinitätsblot-Analyse konnten die Bindungseigenschaften der veränderten CRASP-2-Moleküle bestätigt werden. Die Transformante G1/pCRASP-2 Y211A als auch die Transformanten mit zwei Aminosäuresubstitutionen im CRASP-2-Protein G1/pCRASP-2 R139A-Y207A, G1/pCRASP-2 R139A-Y211A und G1/pCRASP-2 Y207A-Y211A zeigten keine Bindung von Faktor H und FHL-1 (Abb. 32). Für die veränderten CRASP-2 der Transformanten G1/pCRASP-2 F81A und G1/pCRASP-2 Y207A konnten keine Unterschiede im Bindungsverhalten der Komplementregulatoren zum unveränderten CRASP-2 nachgewiesen werden. Die Transformante G1/pCRASP-2 R139A zeigte in der Ligandenaffinitätsblot-Analyse eine Bindung von Faktor H aber nicht von FHL-1.

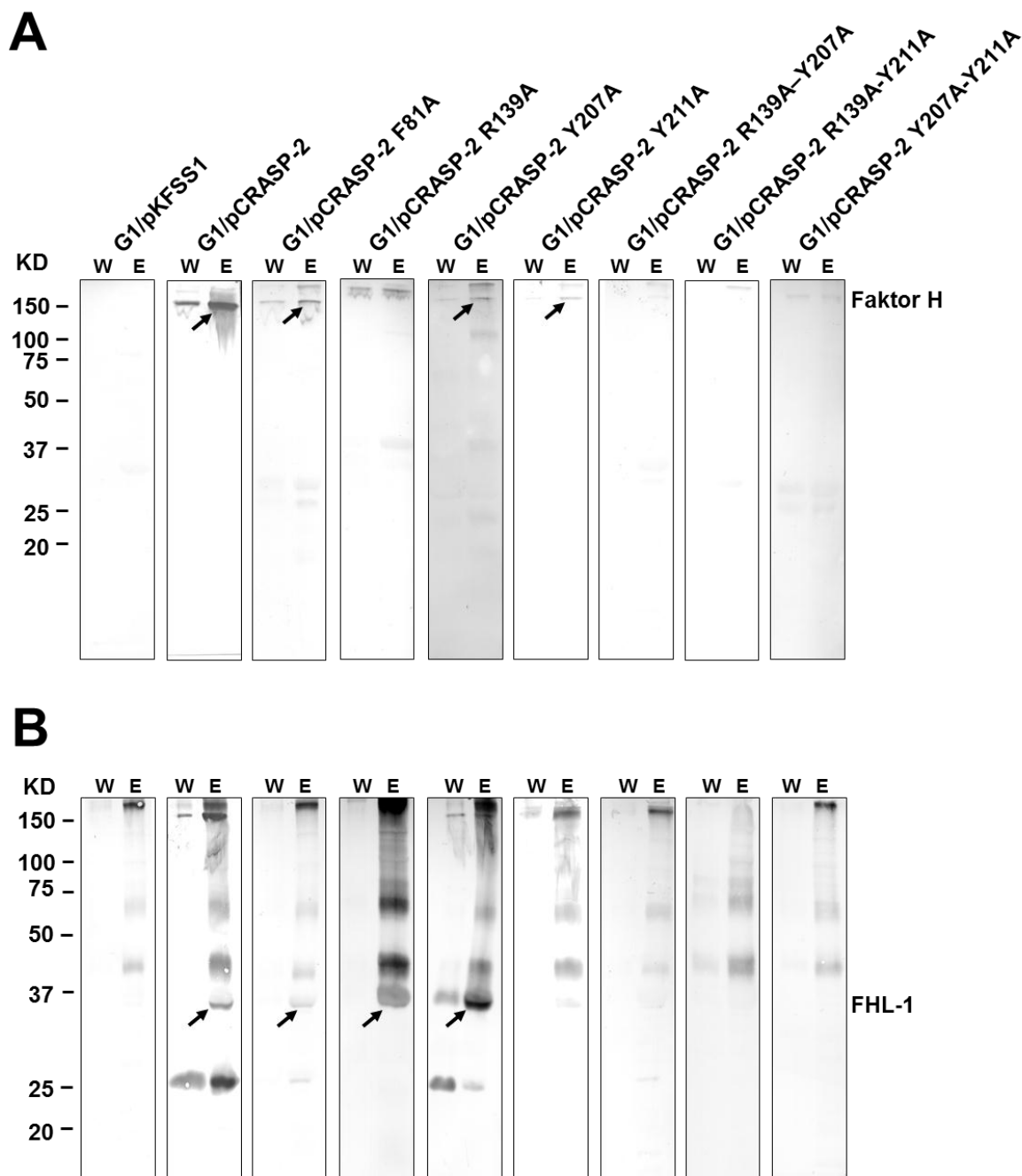


Abb. 31: Interaktion von Faktor H und FHL-1 mit nativen, veränderten CRASP-2.

Intakte Borrelienzellen der Transformanten G1/pKFSS1, G1/pCRASP-2 und der Transformanten mit den mutierten *cspZ*-Genen G1/pCRASP-2 F81A, G1/pCRASP-2 R139A, G1/pCRASP-2 Y207A, G1/pCRASP-2 Y211A, G1/pCRASP-2 R139A-Y207A, G1/pCRASP-2 R139A-Y207A und G1/pCRASP-2 Y207A-Y211A wurden mit NHS-EDTA inkubiert. Nach mehrfachem Waschen der Zellen wurde die letzte Waschfraktion (W) aufgehoben und die an die Zelloberfläche gebundenen Proteine mit 0,1 M Glycin (pH 2,0) eluiert. Die Eluate (E) und die dazugehörigen Waschfraktionen wurden im 12,5%igen Laemmli-SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Nachweis von Faktor H und FHL-1 erfolgte im Westernblot mittels des monoklonalen Antikörpers VIG8 (**A**) und des polyklonalen Antikörpers anti-SCR1-4 (**B**). Die mit Pfeilen markierten Signale entsprechen den rechts vom Blot angegebenen Proteinen. Links angegeben ist der Größenstandard Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad).

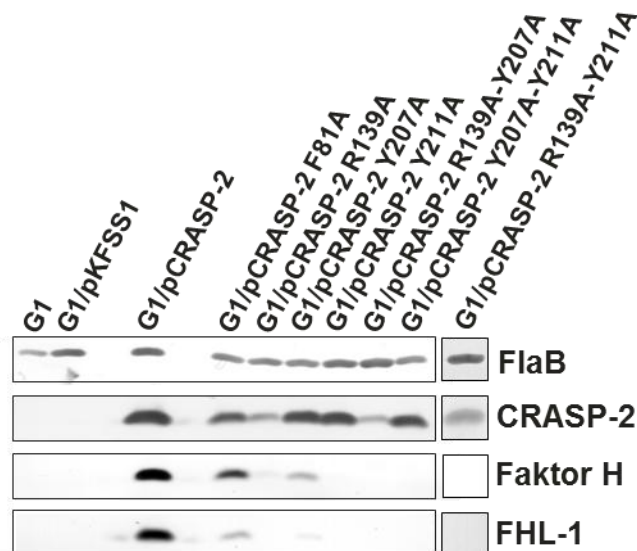


Abb. 32: Interaktion von Faktor H und FHL-1 mit den veränderten CRASP-2 der verschiedenen Transformanten im Ligandenaffinitätsblot.

Zelllysate des Isolates *B. garinii* G1 und der Transformanten G1/pKFSS1, G1/pCRASP-2, G1/pCRASP-2 F81A, G1/pCRASP-2 R139A, G1/pCRASP-2 Y207A, G1/pCRASP-2 Y211A, G1/pCRASP-2 R139A-Y207A, G1/pCRASP-2 R139A-Y211A und G1/pCRASP-2 Y207A-Y211A wurden in einem 10%igen Tris Tricin-SDS-Gel separiert und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Flagellin wurde im Westernblot durch den gegen die Flagellinuntereinheit FlaB gerichteten monoklonalen Antikörper L41 1C11 nachgewiesen und alle veränderten und unveränderten CRASP-2 wurden mit dem CRASP-2-spezifischen, monoklonalen Antikörper anti-BBH06 detektiert. Zusätzliche Membranen wurden entweder mit gereinigtem Faktor H oder mit Zellkulturüberstand, welcher rekombinantes FHL-1 enthielt, inkubiert. Faktor H wurde mittels des monoklonalen Antikörpers VIG8 und FHL-1 wurde mit dem polyklonalem Antikörper anti-SCR1-4 nachgewiesen.

2.3.2 Auswirkungen veränderter CRASP-2 auf die Komplementresistenz transformierter Borrelienzellen

Auch eine reduzierte oder schwache Bindung von Faktor H und FHL-1 kann sich unter Umständen auf die Komplementresistenz von Borrelien auswirken. Zuletzt ist das Überleben der Zelle im Humanserum das wichtigste Kriterium, um Komplementresistenz nachzuweisen. Daher sollte untersucht werden, ob eine reduzierte Bindung von Faktor H und FHL-1 auf der Zelloberfläche durch ein verändertes CRASP-2-Molekül Borrelien vor komplementvermittelter Lyse schützen kann.

Die Ergebnisse der Ligandenaffinitätsblot-Analyse (Kap. 2.3.1) zeigten bereits, dass die Transformanten mit dem zweifachen Aminosäureaustausch im CRASP-2-Protein keine Komplementregulatoren binden. Daraus kann geschlossen werden, dass hier kein Schutz der Zellen vor Bakteriolyse durch Faktor H und FHL-1 stattfinden kann. Durch das Einbeziehen dieser Transformanten in die nachfolgenden Experimente

sollte bestätigt werden, dass die Bindung von Faktor H und FHL-1 essentiell für die Komplementresistenz der Zellen ist.

2.3.2.1 Nachweis abgelagerter Komplementkomponenten auf der Zelloberfläche der CRASP-2-Transformanten

Intakte, nicht-fixierte Borrelienzellen der einzelnen Transformanten wurden in Humanserum inkubiert und die Zellen anschließend auf Ablagerung von C3b, C6 und den terminalen Komplementkomplex C5b-9 hin untersucht (Material und Methoden, Kap. 7.2).

Ablagerungen von C3b, C6 und C5b-9 auf der Zelloberfläche der Transformanten G1/pCRASP-2 F81A, G1/pCRASP-2 R139A und G1/pCRASP-2 Y207A konnten nur auf vereinzelt Zellen detektiert werden und zeigten im Vergleich zur Transformante G1/pCRASP-2 keine Unterschiede (Abb. 33). Die wenigen Zellen mit Komplementablagerungen fielen durch ihre starke Fluoreszenz auf. Es kann daher angenommen werden, dass die Bindung der Komplementregulatoren an CRASP-2_{F81A}, CRASP-2_{R139A} und CRASP-2_{Y207A} ausreicht, um die Zelle vor komplementvermittelter Lyse zu schützen. Die Zellen der Transformante G1/pCRASP-2 Y211A, für die nur eine sehr schwache Faktor H- und keine FHL-1-Bindung nachgewiesen werden konnte (Kap. 2.3.1), zeigte im Vergleich zur Transformante G1/pCRASP-2 deutlich mehr Zellen, welche mit C3b, C6 und dem terminalen Komplementkomplex beladen waren (Abb. 33). In der Gegenfärbung mit DAPI konnte bei dieser Transformante eine vermehrte Bildung von „Blebs“ beobachtet werden, in denen die DNA konzentriert vorlag. Die übrigen Zellen waren durch eine deutlich geringere bzw. keine Ablagerung von C3b, C6 und C5b-9 charakterisiert und wirkten morphologisch intakt. Alle untersuchten Transformanten, die ein CRASP-2-Molekül produzierten, welches zwei Aminosäuresubstitutionen besaßen (G1/pCRASP-2 R139A-Y207A, G1/pCRASP-2 R139A-Y211A, G1/pCRASP-2 Y207A-Y211A), fluoreszierten deutlich, was auf eine starke Ablagerung von C3b, C6 und den terminalen Komplementkomplex auf der Zelloberfläche schließen ließ. Darüber hinaus konnte bei den meisten Zellen dieser Transformanten eine Konzentration der DNA in „Blebs“ beobachtet werden.

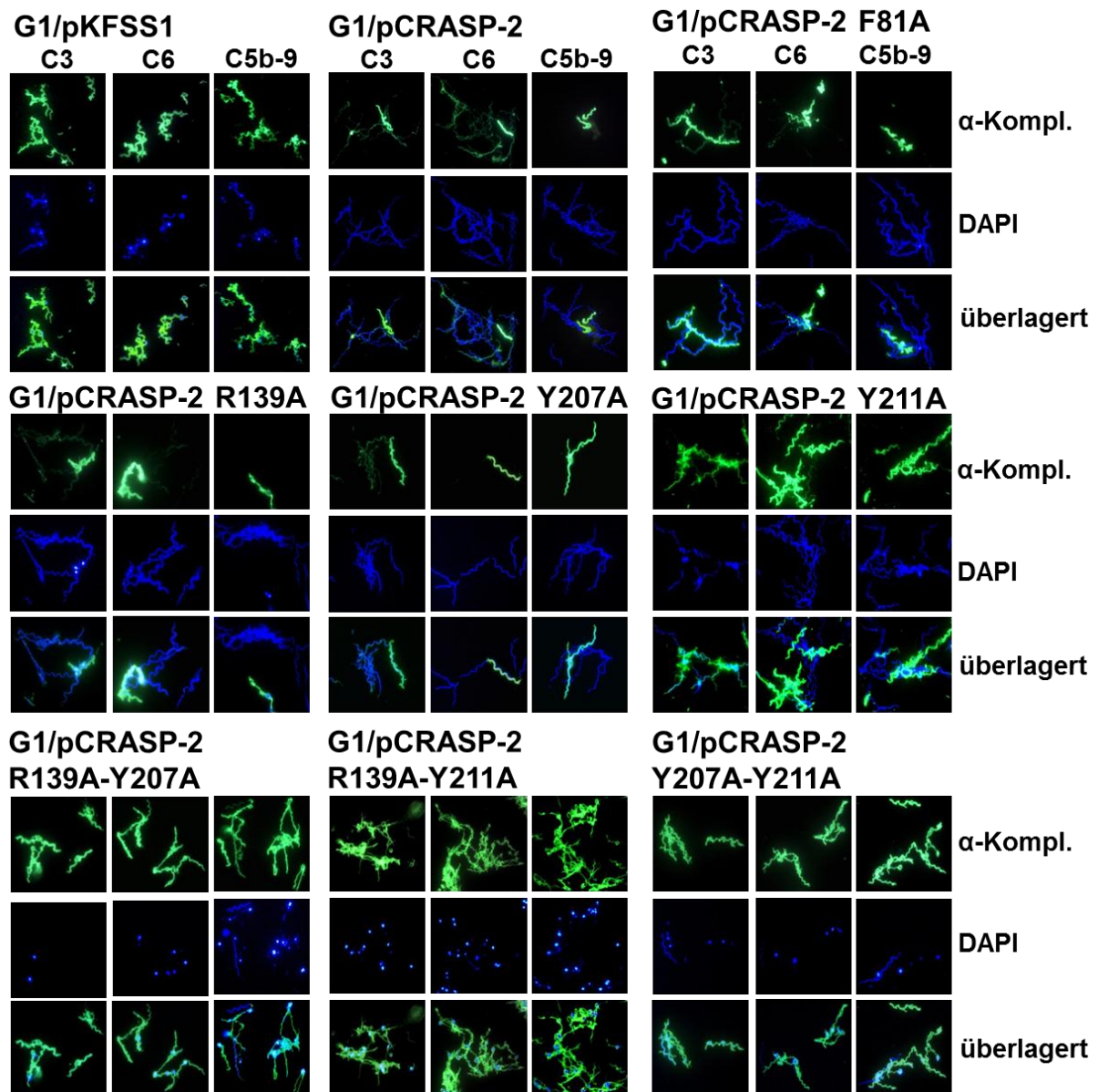


Abb. 33: Ablagerung der Komplementkomponenten C3b, C6 und C5b-9 auf der Zelloberfläche der verschiedenen CRASP-2-produzierenden Transformanten.

Nach Inkubation der intakten Borrelienzellen der Transformanten G1/pKFSS1, G1/pCRASP-2, G1/pCRASP-2 F81A, G1/pCRASP-2 R139A, G1/pCRASP-2 Y207A, G1/pCRASP-2 Y211A, G1/pCRASP-2 R139A-Y207A, G1/pCRASP-2 R139A-Y211A sowie G1/pCRASP-2 Y207A-Y211A in 25% igem NHS wurden die Zellen auf Glasobjektträger appliziert und anschließend fixiert. Die Komplementkomponenten C3b und C6 wurden mit den spezifischen, polyklonalen Antikörpern anti-C3 und anti-C6 auf der Zelloberfläche der Borrelien detektiert. Der terminale Komplementkomplex C5b-9 wurde mit dem monoklonalen Antikörper anti-C5b-9 auf der Zelloberfläche nachgewiesen. Die hier dargestellten Bilder wurden an einem CX-40 Olympus Fluoreszenzmikroskop mit einer Nikon DS-5MC Digitalkamera bei einer 1000fachen Vergrößerung aufgenommen.

2.3.2.2 Vergleichende Untersuchungen zur Komplementempfindlichkeit der CRASP-2-produzierenden Transformanten

In vorangegangenen Versuchen wurde gezeigt, dass die gezielten Veränderungen im CRASP-2-Molekül das Bindungsverhalten von Faktor H und FHL-1 beeinflussen. Der Verlust der Bindung beider Komplementregulatoren geht mit verstärkten Ablagerungen von Komplementkomponenten auf der Zelloberfläche einher, was vermuten lässt, dass einige Transformanten durch Komplement lysiert werden. Um zu klären, ob die Komplementresistenz der Zellen tatsächlich durch die Veränderungen im CRASP-2-Molekül beeinflusst wird, wurde ein Wachstums-Inhibitions-Assay durchgeführt (Material und Methoden, Kap. 8.4).

Ein kontinuierliches Wachstum über 9 Tage in Gegenwart von 50% Humanserum ließ sich für die Transformanten G1/pCRASP-2 F81A, G1/pCRASP-2 R139A und G1/pCRASP-2 Y207A als auch für die Kontrolle G1/pCRASP-2 nachweisen (Abb. 34). Einzelne Aminosäuresubstitutionen, wie z.B. F81A, R139A und Y207A, die nicht zum Bindungsverlust der Komplementregulatoren führten, zeigten, wie vermutet, keinen Einfluss auf die Eigenschaft „Komplementresistenz“. Selbst die Bindung nur eines Komplementregulators, wie FHL-1 bei der Transformante G1/pCRASP-2 R139A, führte zu keinem drastischen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Borrelienzellen. Im Gegensatz dazu wies die Transformante G1/pCRASP-2 Y211A ein inhibiertes Wachstumsverhalten in Gegenwart von Komplement auf, welches mit der nur schwachen Bindung von Faktor H und FHL-1 in Einklang gebracht werden könnte (Abb. 34). Das Wachstum solcher Transformanten, deren CRASP-2-Protein zwei Aminosäuresubstitutionen enthielten, wurde in Gegenwart von Komplement vollkommen inhibiert (Abb. 34). Der Schutz der Zellen scheint folglich allein auf der Interaktion von CRASP-2 mit Faktor H und FHL-1 zu beruhen. Aus den o.g. Ergebnissen lässt sich außerdem folgern, dass, im Gegensatz zu CRASP-1, CRASP-2 selbst keine komplementregulatorische Funktion besitzt.

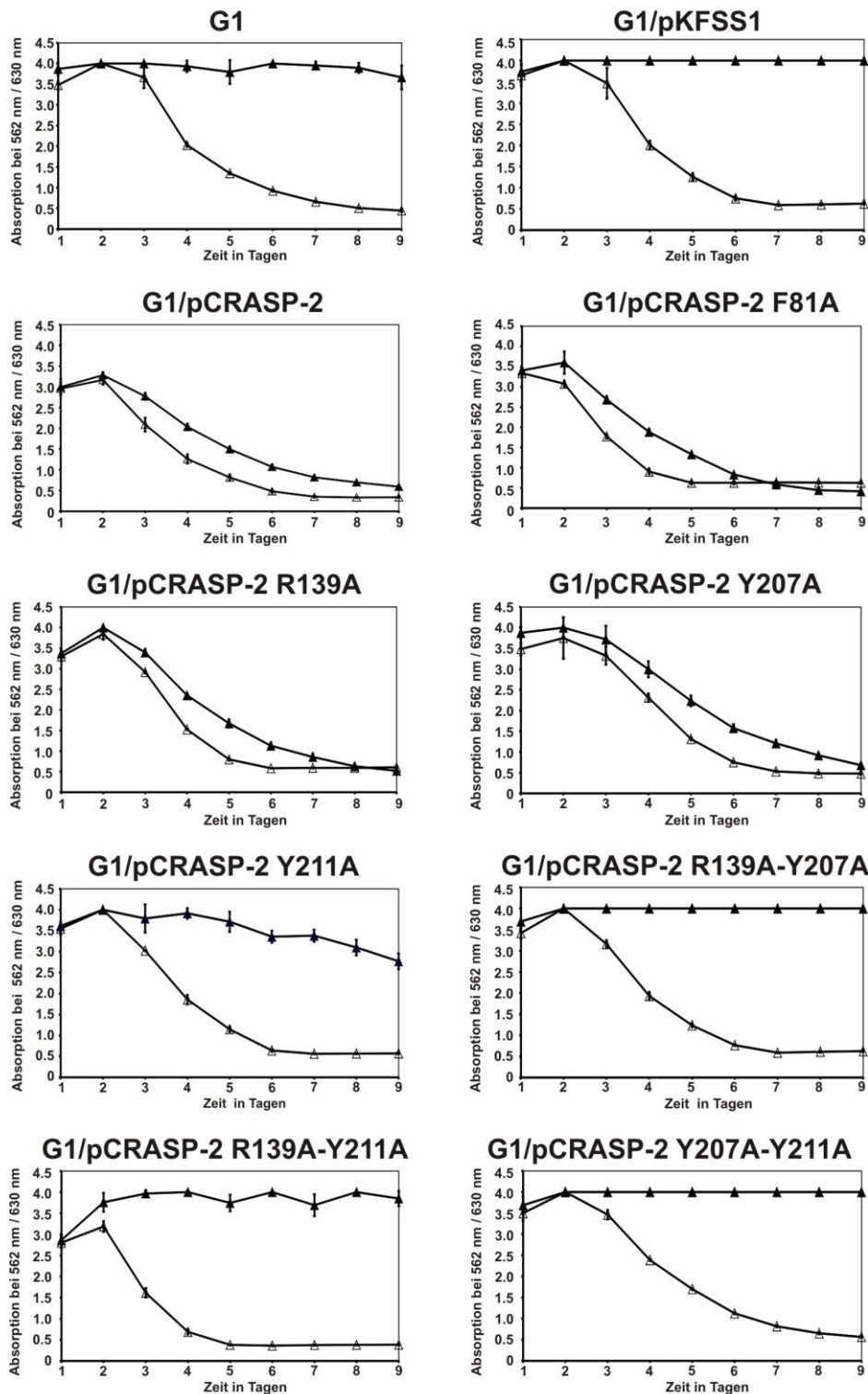


Abb. 34: Wachstumsverhalten der CRASP-2-produzierenden Transformanten in NHS und hiNHS.

B. garinii G1 und die Transformanten G1/pKFSS1, G1/pCRASP-2, G1/pCRASP-2 F81A, G1/pCRASP-2 R139A, G1/pCRASP-2 Y207A, G1/pCRASP-2 Y211A, G1/pCRASP-2 R139A-Y207A, G1/pCRASP-2 R139A-Y211A und G1/pCRASP-2 Y207A-Y211A wurden über 9 Tage in 50% NHS (▲) und in 50% hiNHS (Δ) bei 33°C inkubiert. Das Wachstum wurde anhand des Farbumschlages des Mediums von rot nach gelb täglich durch die Messung der Absorption bei 562nm / 630 nm photometrisch gemessen. Dargestellt ist einer von drei, an unterschiedlichen Tagen durchgeführten, unabhängigen Versuchen. Die Standardabweichung wurde aus den Werten von jeweils drei Parallelansätzen ermittelt.

3 Bedeutung von CRASP-3 und CRASP-5 für die Komplementresistenz von *Borrelia burgdorferi* s.l.

3.1 Identifizierung der mit CRASP-3 und CRASP-5 interagierenden Serumproteinen

CRASP-3 und CRASP-5 sind in der Lage, mit verschiedenen Mitgliedern der Faktor H-Proteinfamilie zu interagieren (Kraiczky et al. 2001a; McRae et al. 2001; Metts et al. 2003; Alitalo et al. 2004; Kraiczky et al. 2004b; Hartmann et al. 2006; Haupt et al. 2008a; Haupt et al. 2008b; Józsi and Zipfel 2008; Skerka and Zipfel 2008; Rogers et al. 2009a). Zum einen binden sie den Komplementregulator Faktor H. Zum anderen interagieren beide Moleküle mit dem Faktor H verwandten Protein CFHR-1.

Für CFHR-1 und Faktor H konnte bereits gezeigt werden, dass sie um die gleiche Bindungsstelle an rekombinantes CRASP-3 und CRASP-5 konkurrieren (Haupt et al. 2008a). In diesem Teil der vorliegenden Arbeit soll der Frage nachgegangen werden, ob die Bindung von Faktor H auf der Borrelienoberfläche durch CFHR-1 oder andere Serumproteine beeinflusst wird und ob es durch die Konkurrenzsituation zu einer Beeinträchtigung der Komplementresistenz kommt.

3.1.1 Identifizierung interagierender Serumproteine durch CRASP-3 und CRASP-5-gekoppelte magnetische Partikel

Rekombinant hergestelltes His-CRASP-3 und His-CRASP-5 wurde zunächst an magnetische Partikel gekoppelt und diese mit Humanserum inkubiert (Material und Methoden, Kap. 8.1). Die jeweiligen Eluate und Waschfraktionen wurden in einem 12,5 %igen Laemmli SDS-Gel aufgetrennt und die Proteine mittels Silberfärbung visualisiert (Material und Methoden, Kap. 6.2.2 und 6.4). Gleichfalls wurde ein weiteres Polyacrylamidgel mit Coomassie gefärbt (Material und Methoden, Kap. 6.5) und die im Vergleich zur Waschfraktion zusätzlich nachgewiesenen Proteine ausgeschnitten und mittels Massenspektrometrie (Material und Methoden, Kap. 6.6) identifiziert.

Ein Vergleich der jeweiligen Eluatfraktion von His-CRASP-3 und His-CRASP-5 mit der dazugehörigen Waschfraktion und den Kontrollen ergab, dass 8 bzw. 7 verschiedene Proteine nachgewiesen werden konnten (Abb. 35). Von diesen 15 Proben konnten alle Proteine mittels Laserdesorptions-Massenspektrometrie eindeutig identifiziert werden. Bei dem Protein mit einer Molmasse von ca. 150 KD handelte es sich um Faktor H. Das Protein von etwa 62 KD stimmte mit dem Faktor H-verwandten Protein CFHR-5 überein. Die Proteine mit einer Molmasse von etwa 43 KD und 37 KD entsprachen dem Faktor H-verwandten Protein CFHR-1 α und CFHR-1 β . CFHR-1 wird in zwei unterschiedlich glykosylierten Formen in der Leber synthetisiert, was das unterschiedliche Laufverhalten im Polyacrylamidgel erklärt. Als CFHR-2 konnten die Proteine mit einer Molmasse von 28 KD und 24 KD identifiziert werden. Die unterschiedliche Molmasse dieses Glykoproteins beruht auf einer nicht-glykosylierten (CFHR-2) und einer glykosylierten Form (CFHR-2a), welche natürlicherweise in Humanserum vorkommen. His-CRASP-3 und His-CRASP-5 ließen sich ebenfalls in der jeweiligen Fraktion nachweisen. His-CRASP-3 wurde als ein Protein mit einer Molmasse von 20 KD und ungewöhnlicherweise ebenfalls als 25 KD Protein identifiziert.

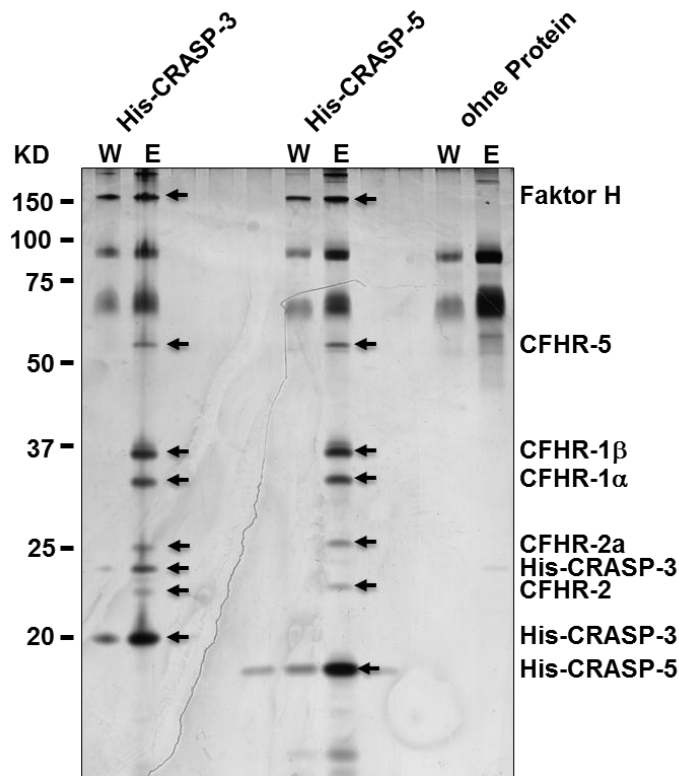


Abb. 35: Identifizierung der an CRASP-3 und CRASP-5 gebundenen Serumproteine mittels magnetischer Partikel und SDS-Gelelektrophorese.

Zellüberstand mit rekombinant hergestellten His-CRASP wurde mit magnetischen, Ni^{2+} -komplexierten Partikeln inkubiert. Die CRASP-gekoppelten magnetischen Partikel wurden anschließend mit NHS inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen, wobei die letzte Waschfraktion (W) aufbewahrt wurde, erfolgte die Elution aller an die magnetischen Partikel gebundenen Proteine. Als Kontrollen dienten ein Ansatz ohne NHS-Inkubation (P) und ein Ansatz ohne Inkubation der magnetischen Partikel mit CRASP (ohne Protein). Waschfraktion und Eluat (E) wurden in einem 12,5 %igen Laemmli SDS-Gel aufgetrennt und das Gel anschließend einer Silberfärbung unterzogen. Die Bindungspartner von CRASP-3 und CRASP-5 als auch die CRASP sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Links angegeben ist der Größenstandard Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad).

3.1.2 Identifizierung der mit CRASP-3 und CRASP-5 interagierenden Proteine mittels Serumadsorption

Um die Bindung der mittels magnetischer Partikel identifizierten Serumproteine Faktor H, CFHR-1, CFHR-2 und CFHR-5 (Kap. 3.1.1) an vitale Spirochäten nachzuweisen, wurden die transformierten Borrelienzellen G1/pCRASP-3 und G1/pCRASP-5 als auch G1/pKFSS1 und die Isolate *B. garinii* G1 und *B. burgdorferi* LW2 mit NHS-EDTA inkubiert (Material und Methoden, Kap. 8.2) und die Eluat- und Waschfraktionen auf einem Laemmli SDS-Polyacrylamidgel separiert (Material und Methoden, Kap. 6.2.2). Mittels Westernblot-Analyse mit vier

unterschiedlichen Antikörpern konnten schließlich Faktor H, CFHR-1, CFHR-2 und CFHR-5 detektiert werden.

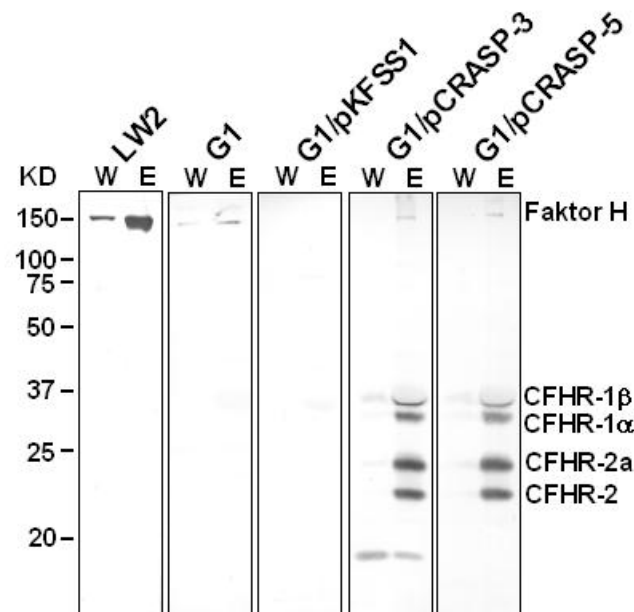


Abb. 36: Nachweis der mit CRASP-3 und CRASP-5 interagierenden Serumproteine mit einem SCR20-spezifischen Antikörper.

Nach Inkubation der intakten Borrelienzellen der Isolate *B. burgdorferi* LW2, *B. garinii* G1 und der Transformanten G1/pKFSS1, G1/pCRASP-3 und G1/pCRASP-5 mit NHS-EDTA wurde die letzte Waschfraktion (W) aufgehoben und die an die Zelloberfläche gebundenen Proteine eluiert. Die Waschfraktionen und die Eluate (E) wurden im 12,5%igen Laemmli SDS-Gel separiert und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Nachweis von Faktor H und der Faktor H-verwandten Proteine erfolgte im Westernblot mittels des monoklonalen, gegen SCR20 gerichteten Antikörpers VIG8. Links angegeben ist der Größenstandard Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad).

Für CRASP-3 und CRASP-5 konnte die Bindung von CFHR-1 und CFHR-2 an vitale Borrelienzellen mittels der monoklonalen Antikörper VIG8 und JHD 7.10 und mittels der polyklonalen Antikörper anti-CFHR-1 und anti-Faktor H in der entsprechenden Eluatfraktion bestätigt werden [Abb. 36 (Spur 8 und 10), 37A (Spur 8 und 10); 37B (Spur 8 und 10), Anhang Abb. V]. Die Bindung von CFHR-1 und CFHR-2 an *B. burgdorferi* LW2 konnte lediglich durch den monoklonalen Antikörper JHD 7.10 und durch den polyklonalen anti-CFHR-1 Antikörper gezeigt werden [Abb. 37 (jeweils Spur 2)]. Die Bindung von CFHR-5 konnte bei G1/pCRASP-3 und G1/pCRASP-5, aber nicht beim Isolat *B. burgdorferi* LW2 nachgewiesen werden (Abb. 37, Anhang Abb. V). Gegen alle Erwartungen, ließ sich in der Eluatfraktion von G1/pCRASP-3 und G1/pCRASP-5 kein Faktor H detektieren (Abb. 36, 37A, Anhang Abb. V). Für das CRASP-negative Isolat *B. garinii* G1 und die Transformante G1/pKFSS1 konnte

mit den in dieser Arbeit verwendeten Antikörpern keine Bindung von Serumproteinen gezeigt werden.

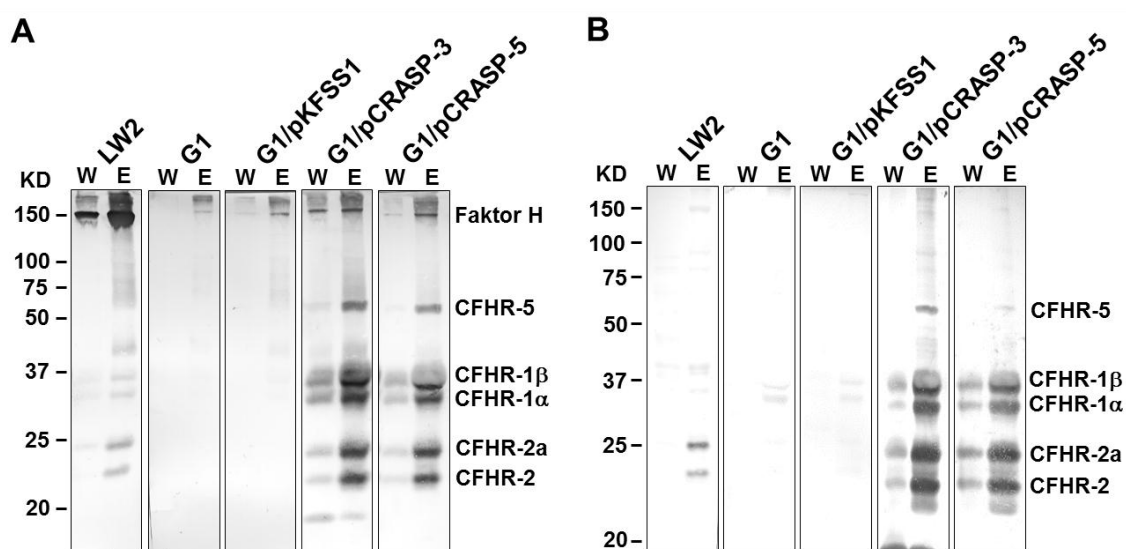


Abb. 37: Nachweis der mit CRASP-3 und CRASP-5 interagierenden Serumproteine mit verschiedenen, gegen CFHR-1 gerichteten Antikörpern.

Nach Inkubation intakter Borrelienzellen von *B. burgdorferi* LW2, *B. garinii* G1 und der Transformanten G1/pKFSS1, G1/pCRASP-3 und G1/pCRASP-5 mit NHS-EDTA wurde jeweils die letzte Waschfraktion (W) aufgehoben und die an der Zelloberfläche gebundenen Proteine eluiert. Die Waschfraktionen und die Eluate (E) wurden im 12,5 %igen Laemmli SDS-Gel separiert und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Nachweis von Faktor H und der Faktor H-verwandten Proteine CFHR-1, CFHR-2 und CFHR-5 erfolgte im Westernblot mittels des polyklonalen, gegen die C-terminale Domäne von CFHR-1 gerichteten Antikörpers anti-CFHR-1 (A) und des monoklonalen anti-CFHR-1 Antikörpers JHD 7.10 (B). Links angegeben ist der Größenstandard Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad).

Zum direkten Vergleich der an CRASP gebundenen Serumproteine wurden die Eluate, welche nach Seruminkubation der intakten Borrelienzellen erhalten wurden, und die Eluate, welche nach Inkubation mit magnetischen Partikeln gewonnen wurden, in einem 12,5 %igen Laemmli SDS-Gel aufgetrennt. Dieses Gel wurde anschließend einer Silberfärbung unterzogen. Zusätzlich wurden Eluate von *B. garinii* G1 und G1/pKFSS1 als auch die mittels magnetischer Partikel aufgereinigten His-CRASP-3- und His-CRASP-5-Proteine und ein Eluat von nicht gekoppelten, magnetischen Partikeln nach Inkubation mit Humanserum mit in die Analyse einbezogen. Zwischen *B. garinii* G1 und den Transformanten G1/pKFSS1, G1/pCRASP-3 und G1/pCRASP-5 ließ sich kein Unterschied im Proteinmuster erkennen [Abb. 38 (Spur 1, 2, 3, 6)]. Des Weiteren konnten die mittels Westernblot identifizierten CFHRs, insbesondere CFHR-1 α , CFHR-2 und CFHR-5 durch Anfärben des Gels nicht visualisiert werden. CFHR-1 β und CFHR-2 scheinen durch

andere borrelienspezifische Proteine überlagert. Deutlich wird dies durch den Vergleich der Proteinmuster von G1/pCRASP-3 und G1/pCRASP-5 mit den Proteinmustern der an Partikel gekoppelten CRASP, in denen die Serumproteine deutlich zu erkennen sind [Abb. 38 (Spur 3, 4, 6 und 7)]. Unbekannte Liganden können also mittels Serumadsorption intakter Zellen und SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung des Gels nicht identifiziert werden.

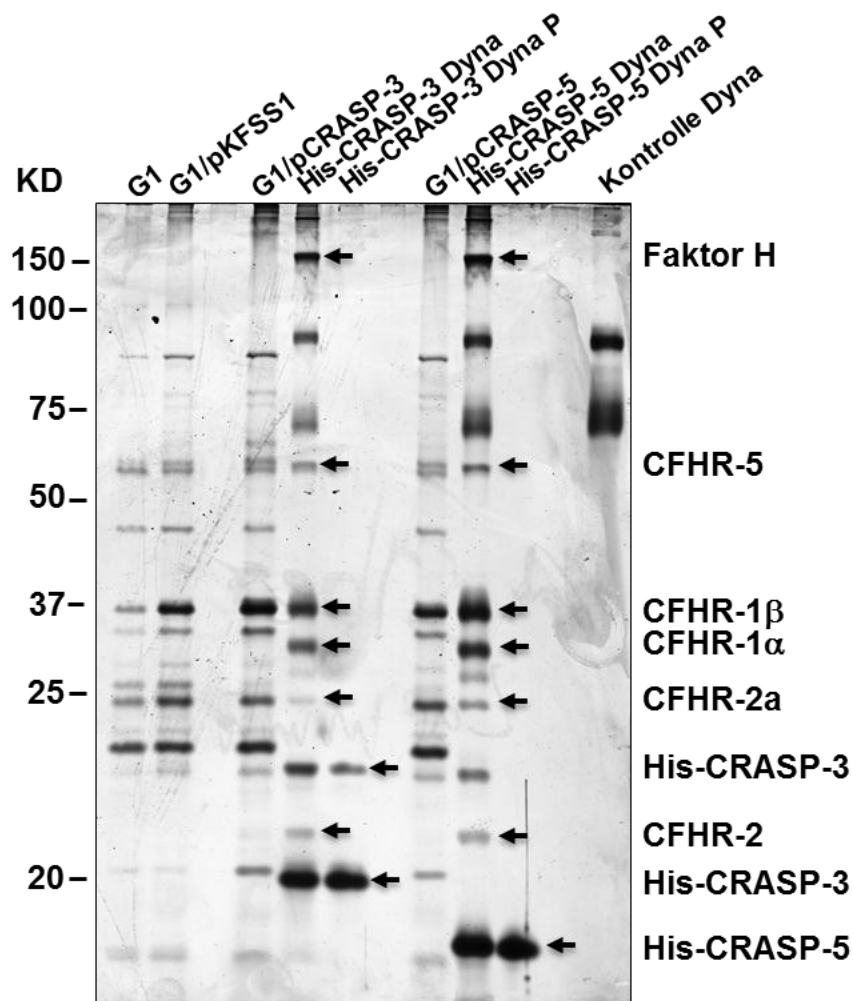


Abb. 38: Vergleich der Proteinsignaturen nach Serumadsorption mit intakten Borrelienzellen und nach Serumadsorption mit an magnetische Partikel gekoppelten CRASP.

Die Eluatfraktionen aus dem Serumadsorptionsversuch mit *B. garinii* G1 (Spur 1), G1/pKFSS1 (Spur 2), G1/pCRASP-3 (Spur 3) und G1/pCRASP-5 (Spur 6) als auch die Eluatfraktionen aus den Versuchen mit den an magnetische Partikel gekoppelten CRASP-3 (Spur 4) und CRASP-5 (Spur 7) und die mittels magnetischer Partikel aufgereinigten Proteine His-CRASP-3 (Spur 5) und His-CRASP-5 (Spur 8) wurden im 12,5 %igen Laemmli SDS-Gel separiert und die Proteine mittels Silberfärbung visualisiert. In Spur 9 ist das Eluat von nicht-gekoppelten, magnetischen Partikeln, die mit NHS inkubiert wurden, (Kontrolle Dyna) aufgetragen. Links angegeben ist der Größenstandard Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad).

Die Detektion einzelner Mitglieder der Faktor H-Proteinfamilie durch einen spezifischen polyklonalen oder monoklonalen Antikörper ist durch die ausgeprägte Homologie einzelner Familienmitglieder zueinander, welche in einzelnen SCRs bis zu 100 % betragen kann, schwierig (Zipfel et al. 1999; Józsi and Zipfel 2008; Skerka and Zipfel 2008) (Abb. 47). Durch den Versuch der Serumadsorption wurden die starken Kreuzreaktionen der verwendeten, gegen Faktor H oder CFHR-1 gerichteten Antikörper deutlich und sind in Tab. 9 zusammengefasst. Keiner der hier verwendeten Antikörper detektiert nur das eine gewünschte Protein. Mittels des kommerziell erwerblichen, polyklonalen Antikörpers anti-Faktor H konnten sogar alle weiteren, hier untersuchten Serumproteine, nämlich FHL-1, CFHR-1, CFHR-2 und CFHR-5 identifiziert werden. Ohne zusätzliche Informationen des detektierten Proteins, wie z.B. deren Größe kann unter Umständen keine klare Aussage darüber getroffen werden, um welches Protein es sich tatsächlich handelt. So reicht der gängige Nachweis der Faktor H-Interaktion mit borrelieneigenen Proteinen durch den Ligandenaffinitätsblot, bei dem eine Nitrozellulosemembran mit separierten Borrelienzelllysaten mit Humanserum inkubiert wird und anschließend mit einem „spezifischen“ Antikörper gegen Faktor H detektiert wird, allein nicht aus, um die Interaktion des borrelieneigenen Proteins mit Faktor H zu beweisen, da durch Kreuzreaktionen unter Umständen alle Mitglieder der Faktor H-Proteinfamilie detektiert werden können. Zusätzliche Versuche, die das erhaltene Ergebnis absichern, sind unabdinglich.

Tab. 9: Kreuzreaktionen der verwendeten Antikörper zur Detektion von Faktor H, FHL-1 und CFHR-Proteinen

Antikörper	Faktor H	FHL-1	CFHR-1	CFHR-2	CFHR-5
anti-Faktor H	+	+	+	+	+
anti-CFHR-1	+	-	+	+	+
anti-SCR1-4	+	+	n.d.*	n.d.*	n.d.*
VIG8	+	-	+	+	-
JHD 7.10	+	-	+	+	+

*n.d., nicht durchgeführt, + positive Reaktion, - keine Reaktion, fett dargestellt sind die erwarteten Spezifitäten der Antikörper

3.1.3 Vergleichende Analysen zum Nachweis der Bindung von Faktor H an CRASP-3 und CRASP-5

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass gereinigtes CRASP-3 und CRASP-5 mit Faktor H interagiert (Kraiczy et al. 2003; Alitalo et al. 2004). Dies ließ vermuten, dass über die Interaktion mit den beiden CRASP-Molekülen, in Analogie zu CRASP-1 und CRASP-2, die Borrelien vor Komplement geschützt sind. Die Bindung von Faktor H aus Humanserum an intakte, ausschließlich CRASP-3- bzw. CRASP-5-produzierende Borrelienzellen konnte trotz der nachweislichen Bindung von Faktor H an rekombinantes CRASP-3 und CRASP-5 (Kap. 3.1.1) und positiver Ligandenaffinitätsblot-Analyse von Zellextrakten der Transformanten G1/pCRASP-3 und G1/pCRASP-5 (Kap. 2.1.1.3) nicht bestätigt werden (Kap. 3.1.3). Ob gereinigtes Faktor H an die Transformanten G1/pCRASP-3 und G1/pCRASP-5 bindet und damit möglicherweise eine Verdrängung von Faktor H durch Serumproteine stattfindet, sollte im folgenden Versuch analysiert werden. Dabei interessierte insbesondere die Konkurrenzsituation von Faktor H zu CFHR-1 und CFHR-2, da die hohe Identität der C-terminalen Domänen der Moleküle zueinander (Abb. 47) eine Bindung von Faktor H, CFHR-1 und CFHR-2 an CRASP-3 und CRASP-5 über den gleichen molekularen Mechanismus vermuten lässt (Zipfel et al. 1999).

Um eine kompetitive Hemmung von Faktor H durch CFHR-1 oder CFHR-2 auf der Zelloberfläche auszuschließen, wurden die Transformanten G1/pCRASP-3 und G1/pCRASP-5 mit gereinigtem Faktor H inkubiert und nach mehrfachem Waschen der Zellen die gebundenen Proteine mit 0,1 M Glycin (pH 2,0) von der Zelloberfläche eluiert. Anschließend wurde die Eluatfraktion aus diesem Versuch, das Eluat der Serumadsorption mit Humanserum als auch die entsprechenden Waschfraktionen gelelektrophoretisch aufgetrennt, die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und mittels Westernblot-Analyse untersucht. Das Ergebnis dieser Analyse zeigte deutlich, dass trotz Abwesenheit von CFHR-1 und CFHR-2 keine Bindung von Faktor H an CRASP-3 oder CRASP-5 stattfand (Abb. 39). Anders als für rekombinantes CRASP-3 und CRASP-5 (Haupt et al. 2008a) konnten keine Hinweise auf eine Kompetition von Faktor H durch CFHR-1 auf intakte Borrelienzellen gefunden werden.

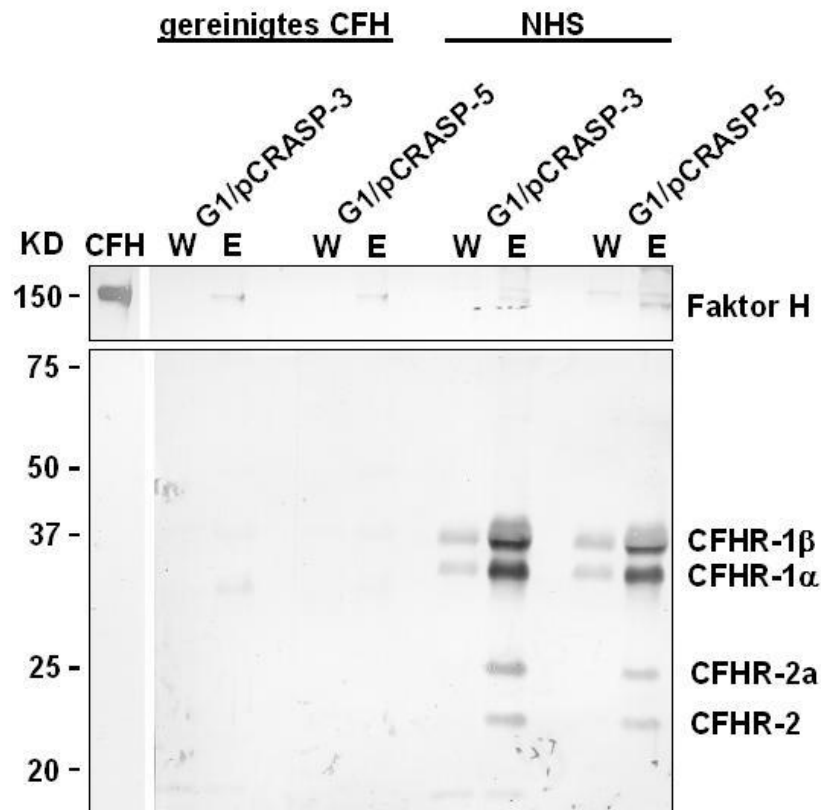


Abb. 39: Nachweis der Bindung von gereinigtem Faktor H und Faktor H aus Humanserum an die Zelloberfläche von G1/pCRASP-3 und G1/pCRASP-5.

Nach Inkubation der intakten Borrelienzellen von G1/pCRASP-3 und G1/pCRASP-5 mit gereinigtem Faktor H (CFH) oder mit NHS) wurde die jeweils letzte Waschfraktion (W) aufgehoben und die an der Zelloberfläche gebundenen Proteine eluiert. Die Waschfraktionen und die Eluatfraktionen (E) als auch gereinigtes Faktor H (CFH) wurden im 12,5 %igen Laemmli SDS-Gel aufgetrennt und die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Nachweis von Faktor H, CFHR-1 und CFHR-2 erfolgte im Westernblot durch Verwendung des monoklonalen Antikörpers VIG8. Links angegeben ist der Größenstandard Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad).

3.1.4 Untersuchungen zur Bindung von CFHR-1 und CFHR-2 an CRASP-3 und CRASP-5

Ausgehend von den Ergebnissen des Ligandenaffinitätsblots mit rekombinant hergestellten CFHR-1 (Kap. 3.1.3) scheint die Bindung dieses Moleküls an CRASP-3 und CRASP-5 scheinbar nur durch die Interaktion mehrerer Serumproteine erzielt zu werden, wie es bereits für die Interaktion von Faktor H mit dem Sbi Protein von *Staphylococcus aureus* beschrieben wurde (Haupt et al. 2008b). Hierbei kommt es durch Anlagerung der Komplementkomponenten C3, C3b oder C3d zu einer deutlich verstärkten Bindung von Faktor H an Sbi. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob

weitere Serumproteine an der Bindung von CFHR-1 an die Zelloberfläche von Borrelienzellen beteiligt sind.

Wie bereits in Kapitel 3.1.2 beschrieben, konnten durch die Serumadsorptionsversuche mit intakten Borrelienzellen keine zusätzlichen Liganden identifiziert werden. Eine Differenzierung durch die Vielzahl an Proteinen war nicht möglich. Daher wurde zur Minimierung der nachweisbaren Proteine und zur Identifizierung zusätzlicher Liganden eine schrittweise Elution gebundener Serumproteine von intakten Zellen mittels Salzgradienten durchgeführt. Dazu wurden die CRASP-negativen Kontrollen *B. garinii* G1 und G1/pKFSS1 als auch G1/pCRASP-5 mit Humanserum inkubiert und nach intensivem Waschen die gebundenen Serumproteine mittels steigender Konzentrationen an NaCl von 0,45 M bis 1,35 M und schließlich mit 0,1 M Glycin (pH 2,0) von der Zelloberfläche abgelöst. Als Kontrolle diente ein Reaktionsansatz, bei dem *B. garinii* G1 nicht mit Humanserum inkubiert wurde. Die Eluate wurden unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und das Gel anschließend mit Silber gefärbt. Ein unter gleichen Bedingungen und mit identischen Proben präpariertes Gel wurde für eine Westernblot-Analyse verwendet. Ein Vergleich der Fraktionen von *B. garinii* G1 mit und ohne vorherige Seruminkubation ergab ein identisches Proteinmuster (Anhang, Abb. VIII). Bei den von der Zelloberfläche eluierten Proteinen handelte es sich ausschließlich um Proteine von *B. garinii* G1. Das identische Proteinmuster zeigte sich bei G1/pKFSS1 als auch bei G1/pCRASP-5, welche mit Humanserum inkubiert wurden (Abb. 40A). Für G1/pCRASP-5 konnten so also weder bekannte noch zusätzliche Liganden identifiziert werden. Mittels Westernblot-Analyse ließ sich jedoch eine Bindung von CFHR-1 und CFHR-2 an G1/pCRASP-5 bestätigen (Abb. 40B). Deutlich zu erkennen war, dass Faktor H bereits durch 0,45 M NaCl von der Zelloberfläche der Transformante abgelöst werden konnte. CFHR-1 konnte in allen NaCl-Fractionen, jedoch am stärksten in der Eluatfraktion, welche mit Glycin gewonnen wurde, detektiert werden. CFHR-2 ließ sich ausschließlich in der Glycin-Fraktion identifizieren. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass CFHR-2 eine wesentlich stärkere Bindung an CRASP-5 aufweist als CFHR-1. Eine Bindung von CFHR-5 konnte in diesem Experiment nicht nachgewiesen werden.

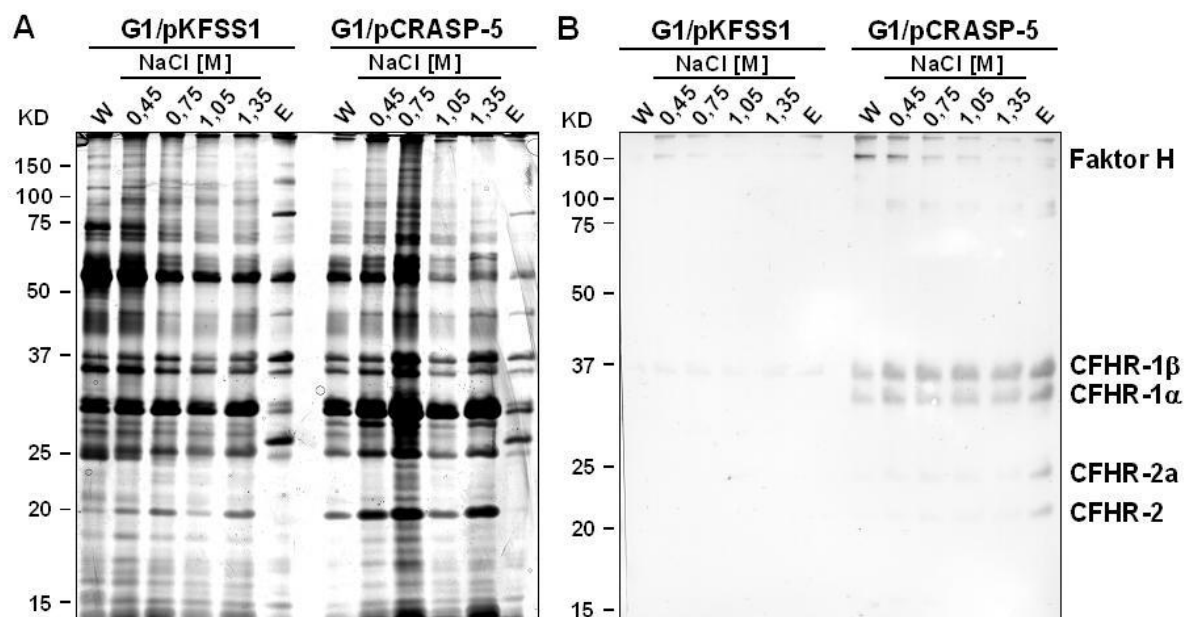


Abb. 40: Nachweis gebundener Serumproteine mittels steigender Salzkonzentrationen nach Inkubation von G1/pKFSS1 und G1/pCRASP-5 mit Humanserum.

Intakte Borrelienzellen der Transformanten G1/pKFSS1 und G1/pCRASP-5 wurden mit NHS-EDTA inkubiert und anschließend dreimal mit PBSA-Tween20 gewaschen, wobei die letzte Waschfraktion behalten wurde. Die Proteine wurden mit 0,45 M, 0,75 M, 1,05 M, 1,35 M NaCl und schließlich mit 0,1 M Glycin pH 2,0 von der bakteriellen Oberfläche abgelöst. Nachdem die Waschfraktion (W) und die Eluatfraktionen (0,45, 0,75, 1,05, 1,35, E) auf einem 12,5 %igem Laemmli SDS-Gel separiert wurden, erfolgte eine Silberfärbung des Gels (A). Von einem identisch präparierten Gel wurden die separierten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mittels des polyklonalen Antikörpers anti-FHR-1 die Proteine CFHR-1 und CFHR-2 detektiert (B). Links angegeben ist der Größenstandard Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad).

Obwohl der Nachweis zusätzlicher Liganden zur Bindung von CFHR-1 und CFHR-2 durch Inkubation rekombinanter CRASP und intakter Transformanten mit Humanserum erfolglos blieb, sollte dieser Frage weiterhin durch das Einbeziehen bereits bekannter Interaktionspartner von CFHR-1 und CFHR-2 und dessen Bedeutung für die Bindung an CRASP-3 und CRASP-5 nachgegangen werden.

Es gibt Hinweise, dass CFHR-1 und CFHR-2 in Humanserum teilweise oder vollständig in Komplexen mit Apolipoprotein A-I und Phospholipiden, den sogenannten FHRP-assoziierten Lipoprotein Partikeln (FALP), vorliegt (Park and Wright 1996). Um zu untersuchen, ob CFHR-1 oder CFHR-2 möglicherweise in diesem Proteinkomplex an die Zelloberfläche von Borrelien bindet, wurden die Eluatfraktionen von G1/pCRASP-3 und G1/pCRASP-5 auf einem Bestandteil der FALP, dem Apolipoprotein A-I, hin untersucht. Wie in Abbildung 41 zu erkennen ist, konnte kein Apolipoprotein A-I mittels Westernblot-Analyse gefunden werden.

CFHR-1 und CFHR-2 scheinen also als freie Proteine und nicht mit FALP assoziiert an CRASP-3 und CRASP-5 zu binden.

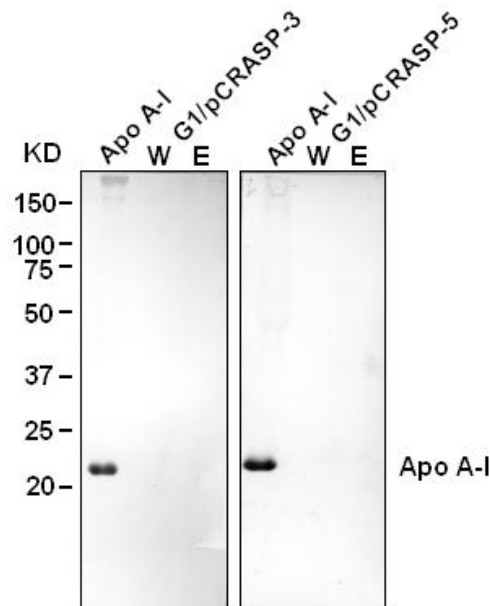


Abb. 41: Nachweis der Bindung von in FALP assoziierten CFHR-1 und CFHR-2 an die Transformanten G1/pCRASP-3 und G1/pCRASP-5.

Nach Inkubation der intakten Borrelienzellen der Transformanten G1/pCRASP-3 und G1/pCRASP-5 mit NHS-EDTA wurde die letzte Waschfraktion (W) aufgehoben und die an der Zelloberfläche gebundenen Proteine eluiert. Die Waschfraktion, das Eluat (E) sowie gereinigtes Apolipoprotein A-I (Apo A-I) wurden im 12,5 %igen Laemmli SDS-Gel separiert und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Nachweis der FALP erfolgte durch die Detektion des in diesen Partikeln vorkommenden Apolipoproteins A-I mittels des monoklonalen Antikörpers anti-Apolipoprotein A-I. Links angegeben ist der Größenstandard Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad).

3.2 Vergleichende Untersuchungen zur Auswirkung der Interaktion von CRASP-3 und CRASP-5 mit verschiedenen Komplementregulatoren auf die Komplementresistenz transformierter Borrelienzellen

3.2.1 Nachweis der komplementregulatorischen Aktivität von CRASP-3- und CRASP-5-produzierenden Transformanten

Wie in Kapitel 3.1 gezeigt wurde, binden die Proteine CRASP-3 und CRASP-5 kein Faktor H. Dennoch wurden die Transformanten G1/pCRASP-3 und G1/pCRASP-5 in den Versuch des Kofaktor-Assays (Kap. 2.1.2.2) mit einbezogen, um eine intrinsische komplementregulatorische Aktivität von CRASP-3 und CRASP-5 auszuschließen.

Deutlich zu erkennen ist, dass sich für G1/pCRASP-3 als auch für G1/pCRASP-5 ohne Zugabe von Faktor H keine Signale für Spaltprodukte von C3b ergaben [Abb. 42 (Spur 8 und 10)]. Demnach kann ausgeschlossen werden, dass CRASP-3, CRASP-5 oder ein vektorkodiertes Protein proteolytische Aktivitäten besitzen. Ebenfalls keine C3b-Spaltprodukte zeigten sich für beide Transformanten bei Zugabe von gereinigtem Faktor H [Abb. 42 (Spur 7 und 9)]. Erwartungsgemäß konnte eine Regulation der Komplementkaskade auf C3-Ebene ausgeschlossen werden.

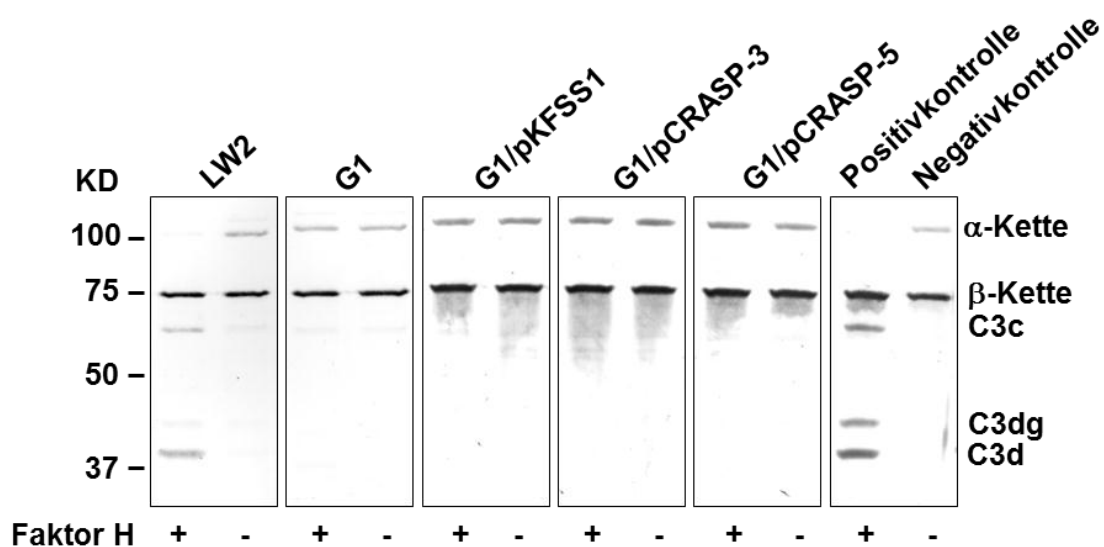


Abb. 42: Ausschluss einer intrinsischen, proteolytischen Aktivität von CRASP-3 und CRASP-5. Nach Inkubation intakter Borrelienzellen der Isolate *B. burgdorferi* LW2, *B. garinii* G1 und der Transformanten G1/pKFSS1, G1/pCRASP-3 und G1/pCRASP-5 mit Faktor H, wurden C3b und Faktor I hinzugegeben. Die jeweiligen Zellüberstände wurden anschließend auf einem 12,5 %igen Laemmli SDS-Gel unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Nachweis der C3b-Spaltprodukte C3c, C3dg und C3d erfolgte mittels Westernblot-Analyse und einem polyklonalen anti-C3-Antikörper. Als Positivkontrolle diente ein Ansatz von Faktor H, C3b und Faktor I. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz von C3b und Faktor I. Links angegeben ist der Größenstandard Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad).

3.2.2 Nachweis aktivierter Komplementkomponenten auf der Zelloberfläche transformierter Borrelienzellen

Der Nachweis verschiedener Komplementkomponenten auf der Zelloberfläche gibt einen wichtigen Hinweis darauf, ob die Zellen in der Lage sind Komplement zu aktivieren und ab welcher Aktivierungsstufe in der Komplementkaskade eine Inhibition oder ein Abbruch selbiger stattfindet.

Um die Komplementablagerungen auf den Transformanten G1/pCRASP-3 und G1/pCRASP-5 als auch G1/pKFSS1 und der Isolate *B. garinii* G1 und *B. burgdorferi* LW2 zu veranschaulichen, erfolgte eine Inkubation der Zellen mit 25 % Humanserum. Anschließend wurde mit den Zellen verfahren wie bereits in Kapitel 2.1.3 beschrieben. Eine unspezifische Bindung der eingesetzten Antikörper an die Zellen konnte durch vorherige Kontrollversuche ausgeschlossen werden (Anhang, Abb. VII).

Die Zellen der Transformanten G1/pCRASP-3 und G1/pCRASP-5 als auch der CRASP-negativen Transformante G1/pKFSS1 und des Isolates *B. garinii* G1 wiesen eine gleichmäßige, intensive Fluoreszenz auf, was auf eine homogene, starke Ablagerung der Komplementkomponenten C3b, C6 und des terminalen Komplementkomplexes auf der Zelloberfläche hindeutet (Abb. 43). Es ließ sich weiterhin beobachten, dass die DNA nicht über die gesamte Borrelienzelle verteilt war, sondern konzentriert in „Blebs“ vorlag. Dieses Erscheinungsbild kennzeichnet vor allem solche Zellen, welche schlechten Umweltbedingungen ausgesetzt sind (Murgia et al. 2002; Embers et al. 2004). Bei den Transformanten G1/pCRASP-3 und G1/pCRASP-5 konnten wenige, nicht-fluoreszierende Zellen beobachtet werden, welche keine kondensierte DNA enthielten. Diese Zellen überlebten in 25 % Humanserum. Im Vergleich dazu wurden auf der Zelloberfläche des komplementresistenten Isolates *B. burgdorferi* LW2 kaum oder keine Ablagerungen der Komplementkomponenten C3b, C6 und des terminalen Komplementkomplexes nachgewiesen (Abb. 20).

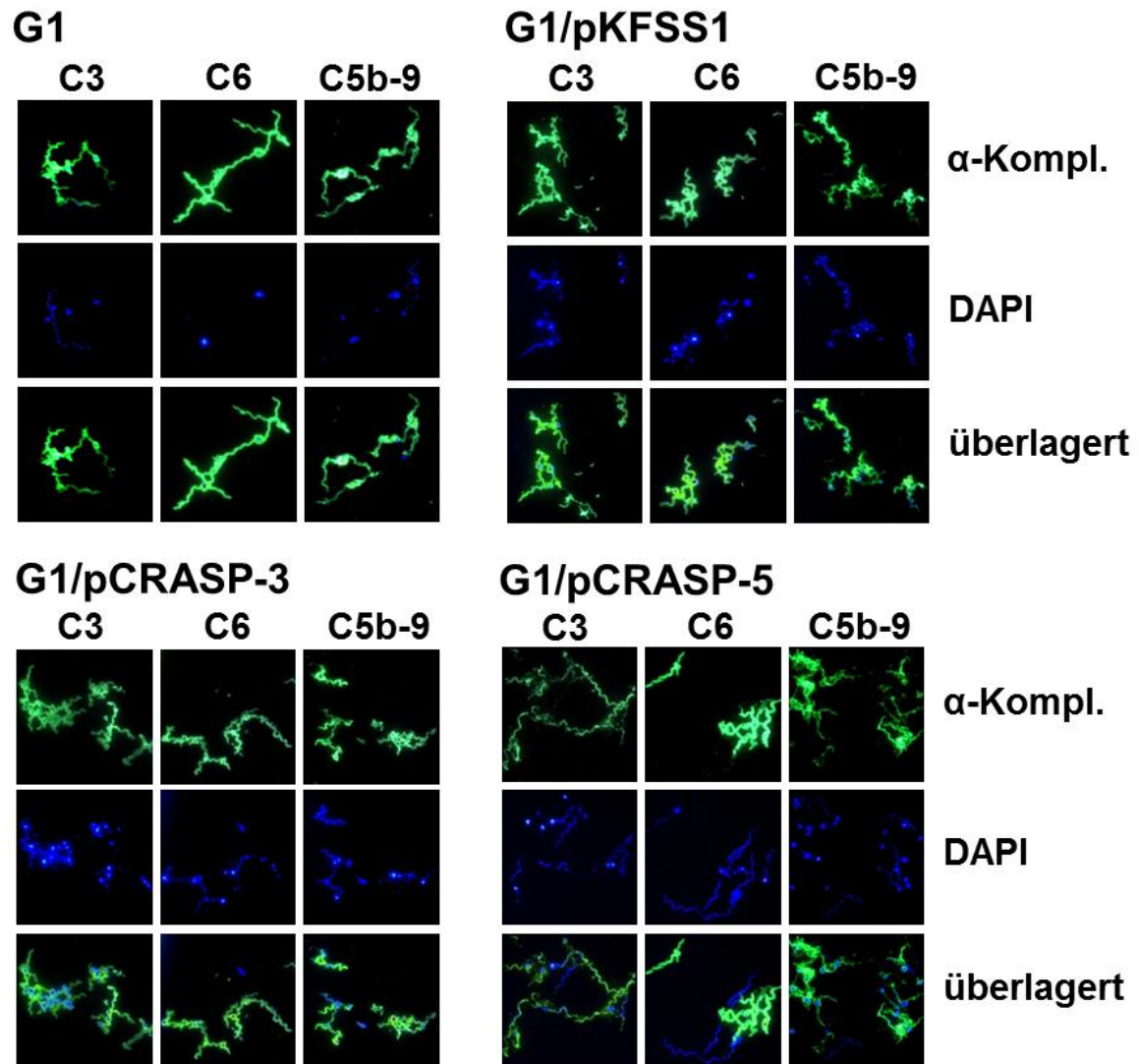


Abb. 43: Nachweis von Ablagerungen der Komplementkomponenten C3b, C6 und C5b-9 auf der Zelloberfläche verschiedener Borrelienzellen nach Inkubation mit Humanserum.

Nach Inkubation intakter Zellen des *B. garinii* Isolates G1 und der Transformanten G1/pKFSS1, G1/pCRASP-3 und G1/pCRASP-5 mit 25 % NHS wurden die Zellen auf Objektträger appliziert und mit Methanol fixiert. Die Detektion von C3b und C6 auf der Zelloberfläche erfolgte mit den spezifischen polyklonalen Antikörpern anti-C3 und anti-C6. Der Nachweis des terminalen Komplementkomplexes C5b-9 erfolgte mit dem monoklonalem Antikörper anti-C5b-9. Die hier dargestellten Bilder wurden an einem CX-40 Olympus Fluoreszenzmikroskop mit einer Nikon DS-5MC Digitalkamera bei einer 1000fachen Vergrößerung aufgenommen.

3.2.3 Vergleichende Untersuchungen mit verschiedenen Serumkonzentrationen und deren Auswirkung auf das Überleben von G1/pCRASP-5

Im Gegensatz zu CFHR-2 ist die Funktion von CFHR-1, nämlich die Inhibition der C5-Konvertase und des terminalen Komplementkomplexes, bekannt (Heinen et al. 2009). Es wird jedoch vermutet, dass auch CFHR-2 auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit zu Faktor H und CFHR-1 eine komplementregulative Funktion besitzt und dadurch Zellen vor Bakteriolyse schützen kann. Wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, besitzt ein Großteil der in Humanserum inkubierten Zellen von G1/pCRASP-3 und G1/pCRASP-5 auf der Zelloberfläche den terminalen Komplementkomplex, woraus abgeleitet werden kann, dass diese Zellen lysiert werden. Einige wenige Zellen scheinen gegenüber Komplement geschützt zu sein, so dass der Frage nachgegangen wurde, ob möglicherweise CFHR-1 und CFHR-2 diesen Schutz bewirken. Im Vergleich zu Faktor H und FHL-1, den beiden potentesten komplementregulativen Mitgliedern der Faktor H-Proteinfamilie, wurde davon ausgegangen, dass CFHR-1 und CFHR-2 keinen starken Schutz vor komplementvermittelter Lyse bewirken können. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob durch Reduktion der Serumkonzentration Unterschiede in der Komplementempfindlichkeit der CRASP-negativen Transformante G1/pKFSS1 im Vergleich zur CRASP-5-produzierenden Transformante G1/pCRASP-5 beobachtet werden können. G1/pKFSS1 und G1/pCRASP-5 wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen (15 % bis 25 % und 50 %) an Humanserum inkubiert und die Komplementaktivierung durch den Nachweis des abgelagerten terminalen Komplementkomplexes auf der Zelloberfläche mittels Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Ein geringer Unterschied beider Zellpopulationen in Bezug auf Ablagerungen des terminalen Komplementkomplexes ist lediglich bei den Ansätzen zwischen 20 % bis 25 % Humanserum zu erkennen (Abb. 44C) (die Ergebnisse mit 21 % bis 24 % NHS sind nicht dargestellt). Hier zeigte ein geringer Teil der Zellpopulation der Transformante G1/pCRASP-5 weder eine Bildung von Blebs noch Komplementablagerungen auf der Zelloberfläche. Allerdings konnte keine signifikante Zunahme an intakten, komplementnegativen Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl bei gleichzeitiger Verdünnung des Humanserums nachgewiesen

werden. Bei G1/pKFSS1 wiesen nahezu alle Zellen nachweislich den terminalen Komplementkomplex auf. Eine Behandlung der Zellen mit 50 % Humanserum führte zur Lyse aller vorhandenen Zellen bei G1/pKFSS1 und G1/pCRASP-5. Dagegen scheint die Gesamtkomplementaktivität in weniger als 20 % Humanserum zu gering zu sein, um alle Zellen der CRASP-negativen Transformante G1/pKFSS1 effizient abzutöten, so dass für Vergleichsuntersuchungen mindestens 20 % Humanserum verwendet werden muss.

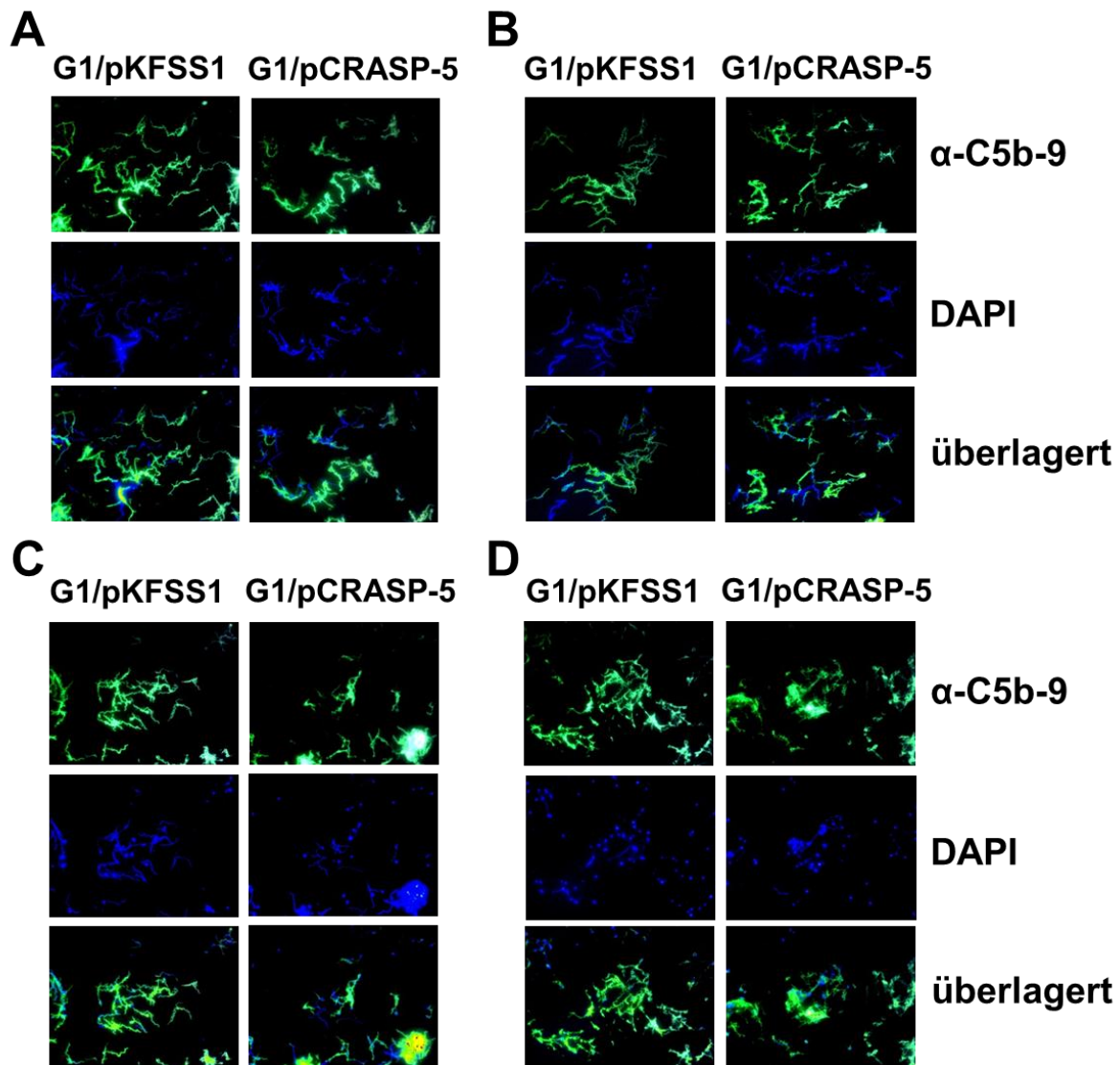


Abb. 44: Nachweis der Ablagerung des terminalen Komplementkomplexes C5b-9 auf der Zelloberfläche von G1/pCRASP-5 nach Inkubation mit verschiedenen Serum-Konzentrationen. Nach Inkubation intakter Zellen der Transformanten G1/pKFSS1 und G1/pCRASP-5 mit 18 % (A), 19 % (B), 20 % (C) und 50 % (D) NHS, wurden die Zellen auf Glasobjektträger aufgebracht und mit Methanol fixiert. Die Detektion von C5b-9 auf der Zelloberfläche erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper anti-C5b-9. Die hier dargestellten Bilder wurden an einem CX-40 Olympus Fluoreszenzmikroskop mit einer Nikon DS-5MC Digitalkamera bei einer 1000fachen Vergrößerung aufgenommen.

3.2.4 Vergleichende Untersuchungen zum Wachstumsverhalten von CRASP-3- und CRASP-5-produzierenden Transformanten in Gegenwart von Komplement

Um zu überprüfen, ob die Transformanten G1/pCRASP-3 und G1/pCRASP-5, als auch G1/pKFSS1 und die Isolate *B. garinii* G1 und *B. burgdorferi* LW2 in Gegenwart von Komplement überleben, wurden Zellen dieser Transformanten und Isolate mit 50% Humanserum über einen Zeitraum von 9 Tagen inkubiert (Breitner-Ruddock et al. 1997) (Material und Methoden, Kap. 8.4).

Das Isolat *B. burgdorferi* LW2, welches neben CRASP-3 und CRASP-5 noch CRASP-1 und CRASP-2 besitzt, weiß ein kontinuierliches Wachstum auf (Abb. 45A). Dagegen zeigten die CRASP-3 bzw. CRASP-5-produzierenden Transformanten sowie die CRASP-negative Transformante G1/pKFSS1 und das Isolat *B. garinii* G1 kein Wachstum in Humanserum (Abb. 45B - E). Dies zeigt, dass Serumresistenz bei Borrelien scheinbar nicht durch CRASP-3 und CRASP-5 hervorgerufen werden kann.

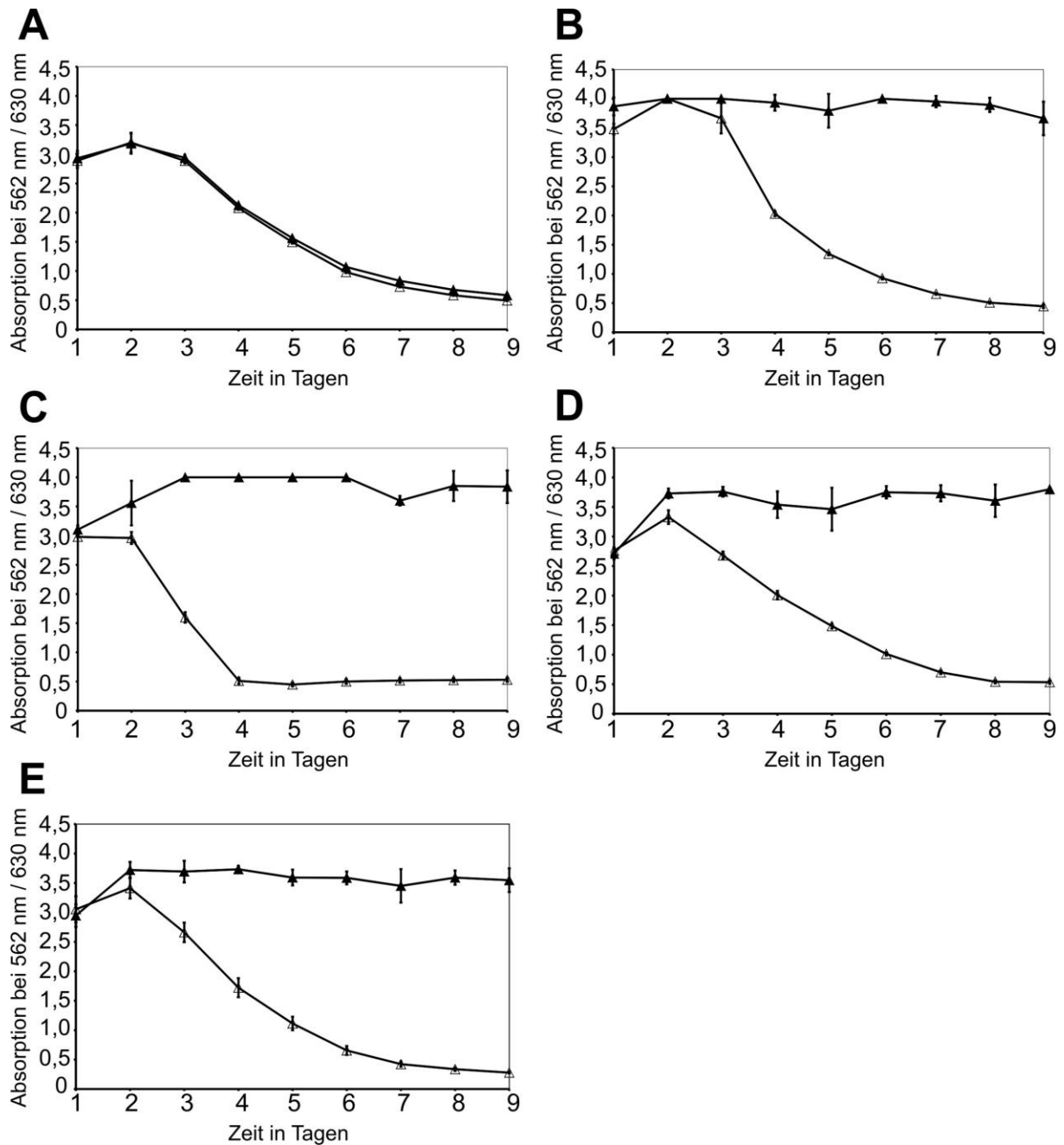


Abb. 45: Wachstumsverhalten von G1/pCRASP-3 und G1/pCRASP-5 in Humanserum. *B. burgdorferi* LW2 (A), *B. garinii* G1 (B), G1/pKFSS1 (C), G1/pCRASP-3 (D) und G1/pCRASP-5 (E) wurden über 9 Tage in 50 % NHS (▲) oder in 50 % hiNHS (△) bei 33°C inkubiert. Das Wachstum der Zellpopulation wurde täglich anhand des Farbumschlages des Mediums von rot nach gelb durch die Messung der Absorption bei 562 nm / 630 nm bestimmt. Dargestellt ist ein Ansatz von drei, an verschiedenen Tagen durchgeführten, unabhängigen Versuchen. Die Standardabweichung wurde aus jeweils drei Parallelansätzen ermittelt.

IV. Diskussion

1 Die Bedeutung der Transformierbarkeit von Borrelien für die Untersuchung von ökologisch und medizinisch relevanten Fragestellungen

Die Möglichkeit, heterologe DNA-Sequenzen durch Transformation in Borrelien des *B. burgdorferi* s.l.-Komplexes einzubringen, stellt ein wichtiges Werkzeug zur Bearbeitung molekularbiologischer, proteinbiochemischer, ökologischer und medizinisch relevanter Fragestellungen dar. So konnte mittels Transformation von heterologer DNA in Borrelien die Bedeutung einzelner Gene und deren Genprodukte für den Organismus verdeutlicht werden (Hartmann et al. 2006; Fingerle et al. 2007; Coleman et al. 2008; Shi et al. 2008; Siegel et al. 2008; Kenedy et al. 2009). Ebenfalls ist die Untersuchung der Genregulation oder anderer regulativer Prozesse unter verschiedenen ökologischen Bedingungen möglich und ein großer Fortschritt für das Verständnis des variablen, von Umweltbedingungen abhängigen Genexpressionsprofils von *Borrelia* spp. (Alverson et al. 2003; Babb et al. 2004; Burtnick et al. 2007; Jewett et al. 2007; Gautam et al. 2008; Rogers et al. 2009b). Des Weiteren können Interaktionen zwischen Borrelien und ihrem Wirt direkt im lebenden Organismus untersucht werden. So konnte anhand pathogener, grünfluoreszierender Spirochäten, welche durch Transformation eines Plasmids mit dem GFP-kodierenden Gen generiert wurden, die Adhäsion und die Penetration der Bakterien an bzw. durch das Endothel des Blutgefäßsystems in der lebenden Maus per Videomikroskopie beobachtet werden (Moriarty et al. 2008).

Die derzeit zur Verfügung stehenden Vektoren zur Elektroporation besitzen die nötige genetische Information zur Replikation in *B. burgdorferi* s.s. und *E. coli* (Stewart et al. 2001; Frank et al. 2003; Stewart et al. 2003). Die regulatorischen Sequenzen des in dieser Arbeit verwendeten Vektors pKFSS1 entstammen dem zirkulären Plasmid cp9 von *B. burgdorferi* B31. Das für die Streptomycinresistenz kodierende *aadA*-Gen des Vektors steht unter der Kontrolle des konstitutiv exprimierten *flaB*-Promotors von *B. burgdorferi* B31. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass trotz spezieffremder regulatorischer Sequenzen eine stabile Replikation des Vektors pKFSS1 in der Genospezies *B. garinii* möglich ist, wie die

Ergebnisse der PCR und der Southernblot-Analyse bestätigen (Abb. 7 - 9). Eine stabile Replikation dieses Vektors in einem anderen *B. garinii*-Isolat, *B. garinii* 50, wurde auch von einer anderen Arbeitsgruppe beschrieben und untermauert die Transformierbarkeit dieser Genospezies (Brooks et al. 2005). Für *B. garinii* als auch für *B. afzelii* konnte gleichfalls die stabile Replikation eines anderen Borrelienvektors, pBSV2, dessen zur Replikation nötigen Gensequenzen ebenfalls aus *B. burgdorferi* B31 stammen, nachgewiesen werden (Alitalo et al. 2005; Fingerle et al. 2007).

Neben der Kompatibilität der von *B. burgdorferi* s.s. stammenden Replikationssequenzen des Vektors pKFSS1 zu *B. garinii*, muss ebenfalls die Expression der CRASP-kodierenden Gene und der Transport und die Verankerung der Proteine in der Membran der Transformanten gewährleistet sein. Die in dieser Arbeit untersuchten CRASP-kodierenden Gene *cspA*, *cspZ*, *erpP* und *erpA*, entstammen ebenfalls der Genospezies *B. burgdorferi* s.s. (Tab. 4). Trotz speziesfremder, regulatorischer und für die Modifikation und dem Proteintransport notwendiger Sequenzen aus *B. burgdorferi* s.s. konnten keine Unterschiede in der Produktion und dem Transport an die Zelloberfläche der hier untersuchten CRASP bei den transformierten *B. garinii*-G1-Zellen beobachtet werden (Abb. 10 - 13). Dies zeigt, dass Gene unter den Spezies innerhalb des *B. burgdorferi* s.l.-Komplexes kompatibel sind und eine Übertragung von einer Spezies auf eine andere möglich ist. Gleichzeitig scheinen Transport- und Sekretionssysteme als auch die Modifikation von Proteinen der verschiedenen Genospezies des *B. burgdorferi* s.l.-Komplexes sehr ähnlich zu sein. Dennoch können Unterschiede zwischen den beiden Genospezies beobachtet werden. So gelang die Expression des CRASP-1-kodierenden *cspA*-Gens des Vektors pLWA 68 im *cspA*-negativen *B. burgdorferi* s.s. Isolat B313, aber nicht im *B. garinii* Isolat G1 (P. Kraiczy, persönliche Mitteilung). Um eine stabile Expression des *cspA*-Gens in *B. garinii* G1 zu erreichen, wurde ein weiterer Vektor, pCRASP-1, konstruiert, bei dem das *cspA*-Gen am 5' Ende eine um ca. 100 Bp verlängerte Sequenz enthielt und sich dadurch vom Vektor pLWA 68 unterschied.

2 Die Bedeutung einzelner CRASP für die Komplementresistenz von *B. burgdorferi* s.s.

Die Fähigkeit der Bindung von Faktor H und FHL-1 an der Zelloberfläche von *B. burgdorferi* s.s. ist essentiell, um Komplementresistenz zu erzeugen. Als spezifisch Faktor H und FHL-1-bindende Moleküle, stellen CRASP daher einen Teil des zum Überleben wichtigen Arsenal an oberflächenlokalisierten Proteinen von *B. burgdorferi* s.s., aber auch von *B. afzelii* und *B. spielmanii* dar. Borrelien, die über keine Faktor H / FHL-1-bindenden Proteine verfügen, weisen einen komplementsensitiven Phänotyp auf. Bislang wurde kein weiterer molekularer Mechanismus zur Abwehr der komplementvermittelten Lyse beschrieben, auch wenn andere Mechanismen eine Rolle spielen könnten. So besteht potentiell die Möglichkeit, dass bei der Wanderung der Borrelien vom Zeckendarm in die Speicheldrüsen komplementregulierende Speichelproteine an die Oberfläche der Spirochäten gebunden werden oder Borrelien nach erfolgter Transmission in den Menschen Dauerformen generieren, welche nicht durch komplementvermittelte Lyse zerstört werden können. Des Weiteren besitzen Borrelien einen sogenannten S-Layer, der den Angriff des Komplementsystems abschwächen soll (Kraiczy et al. 2000).

2.1 Die Bedeutung von CRASP-1 für die Komplementresistenz

2.1.1 Charakteristische Bindungseigenschaften von CRASP-1

Die Bindung der Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1 durch CRASP-1 ist für komplementresistente und intermediär komplementresistente Isolate von *B. burgdorferi* s.s. als auch für rekombinant hergestelltes CRASP-1 beschrieben (Kraiczy et al. 2001a; Kraiczy et al. 2001b; Kraiczy et al. 2004b; Brooks et al. 2005; Haupt et al. 2007; Haupt et al. 2008a). In der vorliegenden Arbeit konnten sowohl Faktor H als auch FHL-1 als Bindungspartner von CRASP-1 bestätigt werden.

Mittels CRASP-1-gekoppelter Partikel konnten Faktor H und vier weitere Serumproteine nicht aber FHL-1 als potentielle Interaktionspartner identifiziert werden (Abb. 14). Um welche Serumproteine es sich dabei handelt, muss in

nachfolgenden Studien geklärt werden. Es lässt sich jedoch vermuten, dass eines der vier unbekannt Proteine Plasminogen darstellt. Dass CRASP-1 mit Plasminogen interagiert, wurde von Hallström et al. (2010) gezeigt. Die Bedeutung von Plasminogen für die Ausbreitung des Erregers sowohl in der Zecke als auch in der Maus wurde ebenfalls beschrieben (Coleman et al. 1997). Plasminogen kann eine Bindung mit Endothelzellen eingehen und, zu Plasmin aktiviert, extrazelluläre Matrixproteine degradieren und damit das Eindringen der Borrelien in benachbartes Gewebe erleichtern. Darüber hinaus könnte Plasmin eine Rolle im Rahmen der Immunevasion besitzen. Das Enzym könnte durch die Spaltung der auf der Bakterienoberfläche abgelagerten Komplementkomponenten einen Beitrag zum Schutz der Zellen vor komplementvermittelter Lyse leisten. Deutlich wird, dass CRASP-1 nicht nur zur Bindung der Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1 fähig ist, sondern mit weiteren Proteinen interagieren kann und somit komplexe Funktionen im Sinne des Immunescape von Borrelien wahrnimmt.

Unklar bleibt nach wie vor, warum FHL-1 nicht mittels CRASP-1-gekoppelter Partikel aus Humanserum isoliert werden konnte.

Für intakte Zellen der CRASP-1-produzierenden *B. garinii*-Transformante G1/pCRASP-1 ließen sich nach Inkubation mit Humanserum beide Komplementregulatoren, also Faktor H und FHL-1, als Bindungspartner nachweisen (Abb. 15). Die Bindungsstudien mit rekombinantem CRASP-1 im Vergleich zu den Untersuchungen mit intakten Borrelienzellen zeigten somit, die FHL1-Bindung betreffend, kontroverse Ergebnisse. Die Gründe können vielseitig sein. Die heterologe Produktion des CRASP-1-Proteins in *E. coli* könnte im Vergleich zur Produktion in *B. garinii* G1 mit unterschiedlichen Proteinmodifikationen und daraus resultierend mit veränderten Bindungseigenschaften einhergehen. Des Weiteren können physikalische und chemische Bedingungen der Umgebung, wie z.B. der pH-Wert, die Temperatur oder die Ionenkonzentration, eine nicht zugängliche Faktor H-Bindungsstelle oder die Anwesenheit weiterer, mit CRASP-1 interagierender Proteine auf der Zelloberfläche die Proteinfaltung als auch die Interaktionseigenschaften mit Faktor H und FHL-1 beeinflussen.

2.1.2 Die Bedeutung von CRASP-1 für die Komplementregulation mittels Faktor H und FHL-1 für *B. burgdorferi* s.s.

CRASP-1 kommt in allen komplementresistenten und intermediär komplementresistenten Isolaten von *B. burgdorferi* s.s. vor. Es wird auf Grund seiner Eigenschaft mit Faktor H und FHL-1 zu interagieren und damit die Komplementregulation auf der Zelloberfläche des Pathogens zu ermöglichen, als das wichtigste komplementregulierende Protein von *B. burgdorferi* s.s. bezeichnet. Es gelang bereits durch Knockout-Mutanten des pathogenen bzw. nicht-pathogenen *B. burgdorferi* s.s. Isolates B31 die Bedeutung von CRASP-1 für die Komplementresistenz zu zeigen (Brooks et al. 2005; Kenedy et al. 2009). Die CRASP-1-knockout-Mutanten wiesen massive Ablagerungen von Komplement auf der Zelloberfläche auf und zeigten einen komplementsensitiven Phänotyp. Der komplementresistente Phänotyp ließ sich durch Komplementation mit dem CRASP-1-kodierenden *cspA*-Gen vollständig wiederherstellen.

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung von CRASP-1 für den Schutz der Borrelienzelle vor komplementvermittelter Lyse durch Verwendung der Transformante G1/pCRASP-1, welche allein CRASP-1 als Faktor H / FHL-1-bindendes Protein besitzt, bestätigt. Der Vorteil dieser Transformante im Vergleich zu einer CRASP-1-knockout-Mutante, welche immer noch weitere CRASP, wie CRASP-3 oder CRASP-5 besitzt, bestand darin, dass die Eigenschaften von CRASP-1 und insbesondere der daraus entstehende Phänotyp unabhängig von anderen CRASP und direkt an der Borrelienzelle analysiert werden konnte.

So wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Bindung der Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1 an CRASP-1 auf der Borrelienoberfläche bei Anwesenheit von Faktor I eine Inaktivierung von C3b bewirkt (Abb. 19). Dabei wird die α -Kette des C3b-Moleküls enzymatisch in drei Fragmente mit jeweils einer Molmasse von 68 KD, 46 KD und 43 KD gespalten. Durch den Nachweis dieser charakteristischen Fragmente von C3b wurde bewiesen, dass an CRASP-1 gebundenes Faktor H und FHL-1 in Gegenwart von Faktor I Kofaktoraktivität ausüben und die Inaktivierung von C3b und damit den Abbruch der Komplementkaskade herbeiführen können. Daraus resultierend ist die Anlagerung weiterer Komplementkomponenten, wie C5b, C6, C7, C8 und C9 auf der Bakterienoberfläche nicht möglich und die Bildung des terminalen

Komplementkomplexes wird verhindert (Abb. 20). Einen weiteren Beweis lieferten die Wachstums-Inhibitions-Assays, die zeigten, dass das Wachstum der Transformante G1/pCRASP-1 im Vergleich zur Transformante G1/pKFSS1 in Gegenwart von Komplement nicht beeinträchtigt wurde (Abb. 21). Außerdem scheint die Bindung von Faktor H und FHL-1 an membranständiges CRASP-1 als auch die funktionelle Aktivität beider Komplementregulatoren durch keine weiteren Serumkomponenten inhibiert zu werden (Abb. 20 und 21).

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass CRASP-1 bevorzugt mit FHL-1 interagiert (Kraiczy et al. 2004b). Dennoch basiert die Regulation vermutlich vorwiegend auf der Bindung von Faktor H und dessen Kofaktor- und zerfallsbeschleunigender Aktivität der C3-Konvertase, da das an CRASP-1 gebundene Faktor H eine sechsfach höhere Aktivität besitzt als FHL-1 (Kraiczy et al. 2003). Man kann spekulieren, dass durch die gleichmäßige Verteilung beider Komplementregulatoren auf der Borrelienzelle die größte Effizienz der C3b-Inaktivierung und damit der größtmögliche Schutz der Zelle hervorgerufen wird. Die Akquisition von Komplementregulatoren, insbesondere von Faktor H, als Strategie der Immunevasion ist aus Sicht des Erregers nicht nur initial nach Transmission in den Wirt effektiv, sondern für eine längerfristige Persistenz sinnvoll. Der menschliche Körper selbst ist auf dieses Regulatorprotein im höchsten Maße angewiesen und kann es durch kein anderes Protein ersetzen. Humanes Gewebe wie die Glomerulimembran der Nieren ist auf die Bindung von Faktor H zum Schutz vor komplementvermittelter Lyse angewiesen (Józsi and Zipfel 2008). Auch die Bedeutung von Faktor H zum Schutz der Erythrozyten wird diskutiert (Ferreira et al. 2006). Ebenfalls reguliert Faktor H die Komplementkaskade im Serum und bewirkt so den Aufbau des zur Spaltung bereitstehenden Arsenal an C3 im Blut. Bereits einzelne Mutationen im Faktor H-kodierenden Gen verursachen schwere Krankheiten des Menschen wie das atypische hämolytischurämische Syndrom (HUS), die membranproliferative Glomerulonephritis (MPGN) oder die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) (Zipfel et al. 2001; Hageman et al. 2005; Zipfel et al. 2006). Der Ausfall von Faktor H als Komplementregulator hätte also schwerwiegende Folgen für den Menschen. Dagegen scheint das Fehlen von FHL-1 möglicherweise auf Grund eines Defektes im splicing-Vorgang der mRNA weniger dramatisch und durch funktionell aktives Faktor H kompensierbar. Bislang wurden keine

Krankheitsbilder beschrieben, die in Einklang mit einem Fehlen von FHL-1 gebracht werden können.

2.1.3 Charakterisierung der Faktor H / FHL-1-Bindungsdomäne von CRASP-1

CRASP-1 stellt das erste Faktor H-bindende Protein dar, dessen Struktur beschrieben ist (Cordes et al. 2004; Cordes et al. 2005; Cordes et al. 2006). Das Molekül besteht aus fünf alpha-Helices (A-F), von denen vier eine Art Kopf bilden und die fünfte, C-terminale Helix als verlängerter Stil herausragt. Diese charakteristische Struktur wurde dementsprechend als „helical lollipop“-Struktur beschrieben. Zwei Monomere bilden ein Dimer, das als biologisch relevant angesehen wird. Dabei interagieren die C-terminalen Helices F beider Monomere miteinander, wodurch eine Stabilisierung des Dimers erzielt wird und sich eine „Grube“ ausbildet, welche als Bindungsstelle für Faktor H und FHL-1 diskutiert wird (Abb. 45).

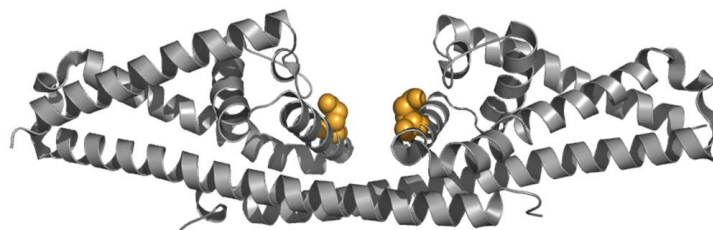


Abb. 45: Darstellung der CRASP-1-Dimerstruktur.

Computergraphische Darstellung des CRASP-1-Dimers (grau) und den an der Interaktion mit Faktor H und FHL-1 beteiligten Aminosäuren (gelb).

Studien mit rekombinanten, C-terminal verkürzten CRASP-1 ließen zunächst vermuten, dass der C-Terminus essentiell für die Bindung von Faktor H und FHL-1 ist (Kraiczky et al. 2004b). Entgegen dieser Vermutung geht man heute davon aus, dass einzelnen Aminosäuresubstitutionen oder Deletionen der C-terminalen Helix zur Destabilisierung des Homodimers und damit indirekt zum Verlust der Faktor H- und FHL-1-Bindung führen (Cordes et al. 2006; Kraiczky et al. 2009). Durch

in vitro-Mutagenese verändertes CRASP-1, welches nicht mehr in der Lage ist ein Dimer zu bilden und keine Bindung der beiden Komplementregulatoren aufweist, wurde bereits beschrieben (Kraiczky et al. 2009). Die Substitutionen betreffen jeweils nur eine Aminosäure an den Positionen 240, 242 und 246. Des Weiteren konnte bewiesen werden, dass neben Aminosäuresubstitutionen innerhalb des C-Terminus auch Veränderungen an den Positionen 94, 97 und 146 zum kompletten Verlust der Faktor H- und FHL-1-Bindung führen (McDowell et al. 2005; Kraiczky et al. 2009). Ob diese Aminosäuren ebenfalls für ein stabiles Dimer notwendig sind oder ob sie direkt in die Bindung der Komplementregulatoren involviert sind, ist unklar.

Der Bindungsverlust der Komplementregulatoren, welcher zunächst ausschließlich an rekombinant hergestellten, veränderten CRASP-1 gezeigt wurde, konnte in der vorliegenden Arbeit an Borrelien, die ein an Position 240 verändertes CRASP-1 produzierten, bestätigt werden. Für das von Borrelien produzierte CRASP-1_{Y240A} ließ sich der Verlust der Faktor H-Bindung und nur eine sehr schwache Bindung von FHL-1 nachweisen (Abb. 23 und 24). Das rekombinant hergestellte CRASP-1_{Y240A} ist nicht in der Lage Dimere zu bilden (Kraiczky et al. 2009). Ob auf der Oberfläche der Borrelienzelle CRASP-1_{Y240A} als Dimer oder Monomer vorliegt, muss noch eingehend analysiert werden.

Die Substitution der negativ geladenen Glutaminsäure durch ein positiv geladenes Lysin an Position 147 von oberflächenständigen CRASP-1 führte bei der Transformante G1/pCRASP-1 E147K zu einer nachweisbar verringerten aber zu keinen Verlust der Faktor H- und FHL-1-Bindung (Abb. 23).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Aminosäuresubstitutionen an einer einzelnen Position im nativen CRASP-1-Molekül zu einem Bindungsverlust der Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1 führen können.

2.1.4 CRASP-1 besitzt eine intrinsische komplementregulatorische Funktion

Bislang ist lediglich die komplementregulatorische Funktion von CRASP-1 durch die Bindung der Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1 bekannt. Die Komplementkaskade wird bereits initial durch Spaltung von oberflächengebundenen C3b unterbrochen. Eine direkte Interaktion von CRASP mit den Komplement-

komponenten der terminalen Aktivierungssequenz, z.B. C5, C6, C7, C8 und C9, unabhängig von gebundenen Regulatorproteinen ist mangels Faktor H / FHL-1-depletierten Humanserums und auf Grund der zeitigen Unterbrechung der Komplementkaskade durch Faktor H und FHL-1 nur schwer zu demonstrieren.

Die Transformante G1/pCRASP-1 Y240A kann kein Faktor H und nur geringfügig FHL-1 auf der Oberfläche binden, so dass eine Komplementregulation nicht mehr gegeben ist (Abb. 23, 24 und 25). Überraschend überlebt dennoch ein Teil der Zellpopulation in Gegenwart von Komplement und weist einen serumresistenten Phänotyp auf (Abb. 26). Die Komplementregulation findet hier nicht, wie bei der Bindung von Faktor H oder FHL-1 auf der Aktivierungsebene von C3 statt, da, wie in Abbildung 27 deutlich zu erkennen, abgelagertes C3b auf der Zelloberfläche nachweisbar war. Vielmehr kann eine Regulation der terminalen Sequenz der Komplementkaskade angenommen werden, da deutlich weniger C6 und TCC auf der Zelloberfläche von G1/pCRASP-1 Y240A detektiert wurde als im serumsensitiven Isolat *B. garinii* G1 (Abb. 26). Die Regulation der terminalen Sequenz könnte durch ein weiteres, mit CRASP-1 interagierendes Protein verursacht werden, zumal vier, bisher unbekannte Proteine aus Humanserum an rekombinantes CRASP-1 binden, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte (Abb. 14). Gleichzeitig besteht die Möglichkeit, dass CRASP-1 eine intrinsische komplementregulatorische Funktion besitzt. Für *Streptococcus pyogenes* wurde bereits ein bakterielles Protein, das Streptococcal inhibitor of complement-Protein (SIC), beschrieben, welches mit C5b67, C5b678 und mit dem terminalen Komplementkomplex interagiert und so die Insertion des TCC in die bakterielle Zellmembran verhindert (Ferne-King et al. 2001). Es gibt mittlerweile experimentelle Hinweise auf eine intrinsische komplementregulative Aktivität von CRASP-1. Mit CRASP-1 vorinkubierte Erythrozyten sind vor Lyse durch den terminalen Komplementkomplex geschützt (P. Zipfel, persönliche Mitteilung). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ebenfalls CRASP-1_{Y240A} diese komplementinhibitorische Aktivität besitzt (Abb. 28). Das beweist, dass die Substitution an Position 240 zwar zur Monomerisierung des Dimers führt und die Bindung von Faktor H und FHL-1 verhindert, sie jedoch keine Auswirkung auf die intrinsische komplementregulatorische Aktivität des Proteins besitzt. Des Weiteren konnte im Wachstums-Inhibitions-Assay nachgewiesen werden, dass durch Vorinkubation von Humanserum mit rekombinant hergestelltem

CRASP-1 oder CRASP-1_{Y240A} die Zellen des serumsensitiven *B. garinii* Isolates G1 vor komplementvermittelter Zellyse geschützt sind (Abb. 30). Diese Zellen weisen eine geringere Ablagerung von C6 und dem terminalen Komplementkomplex auf der Zelloberfläche auf, als Zellen, welche mit unbehandeltem Humanserum inkubiert wurden (Abb. 29). Daraus kann geschlossen werden, dass der Schutz der Zellen durch die inhibitorische Aktivität von CRASP-1 bzw. CRASP-1_{Y240A} bewerkstelligt wird.

Der Schutz von Zellen vor einer komplementvermittelten Zellyse durch nicht membrangebundenes CRASP-1 liefert neue Erkenntnisse zum molekularen Mechanismus und dem Verständnis der Immunevasion bei Borrelien. Es könnte postuliert werden, dass bei einer Infektion mit zwei unterschiedlichen Genospezies sezerniertes CRASP-1 der serumresistenten Borrelienspezies die serumsensitiven Borrelienzellen vor Komplement schützt. Bislang gibt es jedoch keine Hinweise auf eine Sekretion von primär membranständigen Lipoproteinen von Borrelien. Allerdings ist bekannt, dass vesikelartige Strukturen an der äußeren Membran von Borrelien ausgebildet werden können, die membranständige Proteine auf ihrer Außenseite tragen (Kudryashev et al. 2009). Elektronenmikroskopische Untersuchungen lieferten erste Hinweise, dass auf der Oberfläche dieser Vesikel tatsächlich CRASP-1 lokalisiert ist (P. Zipfel, persönliche Mitteilung).

2.2 Die Bedeutung von CRASP-2 für die Komplementresistenz

2.2.1 Charakteristische Bindungseigenschaften von CRASP-2

Die Bindung von Faktor H und FHL-1 an CRASP-2 in Ganzzelllysaten verschiedener *B. burgdorferi* s.s. Isolate als auch an rekombinantes CRASP-2 wurde bereits mehrfach beschrieben (Kraiczky et al. 2001a; Hartmann et al. 2006; Rogers and Marconi 2007; Coleman et al. 2008; Siegel et al. 2008; Rogers et al. 2009a). In dieser Arbeit konnte die Bindung beider Komplementregulatoren aus Humanserum und als gereinigte Proteine an rekombinant hergestelltes als auch an natives CRASP-2 bestätigt werden.

Bei Untersuchungen mit CRASP-2-gekoppelten Partikeln wurde interessanterweise nur Faktor H als Interaktionspartner gefunden (Abb. 14). Eine Bindung von FHL-1 als

auch weiterer Serumproteine aus Humanserum ließ sich nicht nachweisen. Bei der Transformante G1/pCRASP-2 konnte dagegen eine Bindung von beiden Komplementregulatoren nachgewiesen werden (Abb. 15). Unterschiede der Ergebnisse beim Vergleich beider Versuchsansätze wurden auch bei CRASP-1 gefunden und in Kapitel 2.1.1 diskutiert.

Dass FHL-1 im Vergleich zu Faktor H stärker an CRASP-2 bindet, zeigten die mittels Ligandenaffinitätsblot-Analyse durchgeführten Versuche mit Ganzzelllysaten der Transformante G1/pCRASP-2 (Abb. 17) und untermauern frühere Ergebnisse mit rekombinantem CRASP-2 (Hartmann et al. 2006). CRASP-2 von *B. burgdorferi s.s.* ist nicht das einzige Protein, welches bevorzugt mit FHL-1 interagiert. CRASP-1 von *B. afzelii*, eines der wichtigsten Faktor H- und FHL-1-bindenden Proteine dieser Genospezies, weist ähnliche Bindungseigenschaften auf und ist in jedem komplementresistenten Isolat dieser Spezies vorhanden (Kraiczky et al. 2001a; Wallich et al. 2005).

2.2.2 Die Bedeutung von CRASP-2 für die Komplementregulation mittels Faktor H und FHL-1 für *B. burgdorferi s.s.*

Wie bereits erwähnt, stellt die Bindung von Faktor H und FHL-1 eine wirksame Strategie von Borrelien dar, sich vor komplementvermittelter Lyse zu schützen, allerdings nur unter der Voraussetzung, dass durch die Interaktion die funktionellen Aktivitäten der beiden Regulatorproteine bestehen bleiben. Für die an die Transformante G1/pCRASP-2 gebundenen Komplementregulatoren konnte in Gegenwart von Faktor I eine Spaltung der α -Kette von C3b festgestellt werden (Abb. 19). C3b wird zu inaktivierten C3b umgewandelt und der Aufbau der lytischen Pore durch Anlagerung weiterer Komplementkomponenten an C3b verhindert (Abb. 20). Obwohl an CRASP-2 gebundenes Faktor H eine doppelt so hohe Kofaktoraktivität aufweist wie an CRASP-2 gebundenes FHL-1 kann auf Grund der stärkeren FHL-1-Bindung davon ausgegangen werden, dass hier dieser Regulator den Großteil der Komplementregulation auf der Zelloberfläche übernimmt (Hartmann et al. 2006). Eine Komplementregulation, basierend auf einer starken FHL-1-Bindung und einer schwachen Faktor H-Bindung ist möglich und wurde bereits für CRASP-1 von *B. afzelii* beschrieben (Kraiczky et al. 2000; Kraiczky et al. 2001a).

Dass CRASP-2 allein für die Komplementresistenz bei der Transformante G1/pCRASP-2 verantwortlich ist, konnte durch den Wachstums-Inhibitions-Assay mit 50% Humanserum demonstriert werden. Damit stellt CRASP-2 neben CRASP-1 das zweite in *B. burgdorferi* s.s. vorkommende CRASP dar, welches unabhängig von den anderen Faktor H / FHL-1-bindenden Proteinen Komplementresistenz verleiht.

Die Annahme, dass CRASP-2 Borrelienzellen nicht vor komplementvermittelter Lyse schützen kann (Coleman et al. 2008), wurde durch die in dieser Arbeit dargestellten und bereits publizierten Ergebnisse deutlich widerlegt (Abb. 21) (Siegel et al., 2008). Um nachzuweisen, dass CRASP-2 keine Bedeutung für die Komplementresistenz besitzt, wurde von Coleman et al. eine CRASP-1-produzierende CRASP-2-knockout-Mutante verwendet. In ihren Versuchen konnte lediglich gezeigt werden, dass sowohl die CRASP-2-knockout-Mutante als auch das Isolat *B. burgdorferi* A3 gegenüber humanem Komplement resistent sind. Die daraus von Coleman et al. abgeleitete Schlussfolgerung, dass CRASP-2 für die Komplementresistenz der Zelle keine Bedeutung hat, kann allerdings nicht getroffen werden, da CRASP-1, welches von der CRASP-2-knockout-Mutante produziert wird, unabhängig von CRASP-2 Komplementresistenz verleiht. Des Weiteren wurde die CRASP-2-knockout-Mutante im Mausmodell getestet. Da bislang unbekannt ist, ob murines Faktor H an CRASP bindet, kann durch dieses Modell keine Aussage über die Bedeutung von CRASP-2 oder eines anderen CRASP-Proteins für die Komplementresistenz getroffen werden. Die tatsächliche Bedeutung von CRASP-2 wird durch dessen Verbreitung unter verschiedenen *B. burgdorferi* s.s. Isolaten und der funktionellen Konservierung des *cspZ*-Gens deutlich (Rogers and Marconi 2007; Kraiczy et al. 2008b). Auch wenn nicht alle der bislang untersuchten Isolate dieses Gen besitzen, wird *cspZ*-positiven *B. burgdorferi* s.s. Isolaten eine höhere Invasivität zugesprochen (Rogers et al. 2009a). Dabei muss berücksichtigt werden, dass die Pathogenität des Erregers zwar nicht zwingend von diesem Protein determiniert wird, es aber dennoch einen Beitrag zum Überleben dieses Erregers im humanen Wirt leisten könnte.

2.2.3 Die Charakterisierung der Faktor H / FHL-1-Bindungsdomäne von CRASP-2

Die Bindungscharakteristika des CRASP-2-Moleküls werden zurzeit kontrovers diskutiert. Die Struktur dieses Proteins ist bislang nicht bekannt, so dass eine genaue Lokalisation der Faktor H / FHL-1-Bindungsdomäne und die an der Bindung beteiligten Aminosäuren nicht eindeutig zu ermitteln sind. Für Faktor H-bindende Proteine wird häufig eine aus mehreren alpha-Helices bestehende Sekundärstruktur mit coiled-coil-Domänen angenommen (McDowell et al. 2004; McDowell et al. 2005). Es wird vermutet, dass diese Tertiärstruktur zur Bindung der Komplementregulatoren unabdingbar ist. Gleiches wurde auch für CRASP-1 angenommen, aber durch die Kristallisierung des Moleküls widerlegt (Cordes et al. 2005; McDowell et al. 2005; Cordes et al. 2006). Hier handelt es sich um ein Homodimer, welches vermutlich durch eine Dimerisierung die Bindung von Faktor H und FHL-1 zulässt (Kap. 2.1.2). Da CRASP-Moleküle durch die Bindung von Komplementregulatoren eine funktionelle Gruppe von Proteinen bilden, aber keine phylogenetische Verwandtschaft miteinander aufweisen, können strukturell ähnlich aufgebaute Bindungsdomänen zwar vermutet, aber keinesfalls als sicher angenommen werden. Gleichzeitig besteht die Möglichkeit, dass nicht nur konformationelle Bindemotive, sondern auch einzelne Aminosäuren für die Interaktion mit Faktor H und FHL-1 eine wichtige Rolle spielen.

Für die Bindung von Faktor H und FHL-1 scheinen verschiedene Domänen am N- und C-Terminus des CRASP-2-Moleküls relevant zu sein (Hartmann et al. 2006; Rogers and Marconi 2007). Wie bei CRASP-1 geht durch eine Deletion von 16 Aminosäuren am C-Terminus die Fähigkeit der Faktor H / FHL-1-Bindung verloren (Hartmann et al. 2006). Aber nicht nur Deletionen führen zum Verlust der Faktor H- und FHL-1-Bindung. Durch Sequenzvergleiche von *cspZ*-Genen aus natürlich vorkommenden *B. burgdorferi* s.s.-Isolaten, konnte gezeigt werden, dass CRASP-2-homologe Proteine, die eine Insertion des Oligopeptids Isoleucin-Methionin-Threonin-Tyrosin im N-Terminus aufweisen, nicht zur Faktor H- und FHL-1-Bindung befähigt sind (Rogers et al. 2009a). Des Weiteren wurden im rekombinanten CRASP-2 vier lineare Bindungsregionen innerhalb des Moleküls identifiziert, welche die Aminosäuren 34 bis 52 (Region 1), 70 bis 88 (Region 2), 127 bis 145 (Region 3) und 202 bis 226 (Region 4) umfassen (Abb. 46) (Hartmann et al. 2006). In den

Regionen 2, 3 und 4 konnten bereits einzelne bindungsrelevante Aminosäuren identifiziert werden (Siegel et al. 2008; Schreiber 2010). Aminosäuresubstitutionen an den Positionen 204, 206, 207, 210 oder 214 führen zu einer signifikant reduzierten Bindungskapazität beider Komplementregulatoren. Ein Austausch der Aminosäure Tyrosin an Position 211 führt sogar zum kompletten Verlust der Faktor H- und FHL-1-Bindung. Auch die Substitutionen der Aminosäure Phenylalanin an Position 81 in der Bindungsregion 2 und der Aminosäure Arginin an den Positionen 129 oder 139 in der Bindungsregion 3 beeinträchtigen die Bindung von Faktor H und FHL-1.

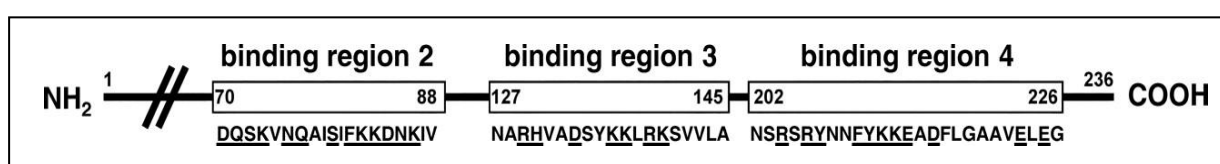


Abb. 46: Putative Faktor H- und FHL-1-Bindungsregionen 2 bis 4 des CRASP-2-Proteins nach Siegel et al. 2008

In der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass insbesondere die Bindungsregionen 2, 3 und 4 im CRASP-2-Molekül Domänen enthalten, welche durch Veränderungen in relevanten Positionen zur Abschwächung oder zum kompletten Verlust der Regulatorproteinbindung führen. Dabei zeigte sich, dass die Transformanten, welche ein CRASP-2-Molekül mit einer Substitution an der Position 81 oder 207 besaßen, nur eine reduzierte Bindungskapazität beider Komplementregulatoren aufwiesen (Abb. 31 und 32). Die Transformanten, welche ein CRASP-2 produzierten, das an der Position 139 oder 211 verändert war, zeigten nur noch die Bindung eines Komplementregulators (Abb. 31 und 32). Trotz allem blieb der Schutz der Zellen vor einem Angriff des humanen Komplementsystems erhalten (Abb. 34). Dabei unterschied sich die Transformante G1/pCRASP-2 Y211A von den anderen Transformanten. Sie wies einen intermediär komplementresistenten Phänotyp auf, welcher durch eine Zellpopulation gekennzeichnet ist, die nur zur Hälfte von Komplement zerstört wird und dadurch verlangsamtes Wachstum in Humanserum zeigte (Abb. 33) und 34). Die Aminosäure Tyrosin an Position 211 von CRASP-2 scheint also eine entscheidende Rolle für die Bindung von Faktor H und FHL-1 und damit für die Komplementresistenz der Zellen zu spielen.

Eine Substitution von zwei relevanten Aminosäuren führt schließlich zum kompletten Verlust der Bindung beider Komplementregulatoren, was bei den Transformanten G1/pCRASP-2 R139A-Y207A, G1/pCRASP-2 R139A-Y211A und G1/pCRASP-2 Y207A-Y211A deutlich zu erkennen war (Abb. 31 und 32). Der Bindungsverlust führte, wie erwartet, zu einem komplementsensitiven Phänotyp und zur Bakteriolyse dieser Zellen (Abb. 33 und 34).

Ob es sich bei den veränderten CRASP-2-Molekülen um konformationelle Veränderungen im Protein handelt, ob lineare Bindungsmotive zerstört werden oder einzelne Aminosäuren einen wichtigen Beitrag zur Interaktion mit den Komplementregulatoren leisten, kann derzeit nur vermutet werden. Dennoch wird die Relevanz der Aminosäuren an den Positionen 81, 139, 207 und insbesondere an Position 211 für die komplementregulierende Funktion des CRASP-2-Moleküls deutlich.

2.3 Die Bedeutung von CRASP-3 und CRASP-5 für die Komplementresistenz

2.3.1 Charakteristische Bindungseigenschaften von CRASP-3 und CRASP-5

CRASP-3, -4 und -5, in der Literatur auch als ErpP, ErpC, ErpA, BBL39 und BBN38 bezeichnet, binden Faktor H und CFHR-1, aber nicht FHL-1. Sie werden zur Gruppe III der Faktor H-bindenden CRASP gezählt (Hellwage et al. 2001; Kraiczy et al. 2001a; Alitalo et al. 2002; Kraiczy et al. 2003; Haupt et al. 2007). Diese zur Erp- (OspE/F-) Proteinfamilie gehörenden, membranständigen Lipoproteine kommen bei Borrelien ubiquitär vor. Die Bindung von Faktor H konnte für alle in diese Gruppe gehörenden Proteine mittels unterschiedlicher methodischer Ansätze (Ligandenaffinitätsblot-Analyse, Surface plasmon Resonanz-Technik, ELISA) mit Ganzzelllysaten oder mit rekombinant hergestellten Proteinen nachgewiesen werden (Kraiczy et al. 2001a; Alitalo et al. 2002; Kraiczy et al. 2003; Haupt et al. 2008a).

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Bindung von Faktor H an zelloberflächenlokalisiertes CRASP-3 und CRASP-5 der jeweiligen Transformante zu

bestätigen und den daraus resultierenden Schutz der Zellen vor komplementvermittelter Lyse zu zeigen.

Durch Interaktionsstudien mit CRASP-3- und CRASP-5-gekoppelten magnetischen Partikeln konnten neben Faktor H drei weitere Serumproteine als Interaktionspartner identifiziert werden. Dabei handelte es sich um die Faktor H-verwandten Proteine CFHR-1, CFHR-2 und CFHR-5 (Abb. 35, Tab. 11). Die Bindung von CFHR-1, aber nicht von CFHR-2 und CFHR-5, aus Humanserum wurde bereits für CRASP-3, CRASP-4 und CRASP-5 als auch für das orthologe OspE-Protein beschrieben (Alitalo et al. 2004; Haupt et al. 2008a).

Eine fast 100%ige Identität der C-terminalen SCRs 4 und 5 von CFHR-1 zu den C-terminalen SCRs 19 und 20 von Faktor H, welche die interagierenden Domänen des Proteins mit CRASP-3 und CRASP-5 darstellen, impliziert eine identische Faktor H / CFHR-1-Bindungsstelle bei diesen Molekülen (Abb. 47) (Zipfel et al. 1999; Haupt et al. 2007). Unterstützt wird diese Hypothese durch die an rekombinatem CRASP-3 und CRASP-5 gezeigte Verdrängung von Faktor H durch CFHR-1 (Haupt et al. 2008a). Inwieweit sich die Bindung von CFHR-1 auf die Komplementaktivierung auswirkt, kann derzeit nur vermutet werden. CFHR-1 als Inhibitor des terminalen Komplementkomplexes könnte gemeinsam mit Faktor H die Borrelienzelle vor komplementvermittelter Lyse schützen, da durch die unterschiedlichen regulatorischen Aktivitäten der Proteine eine noch effizientere Unterbrechung der Komplementkaskade möglich scheint (Haupt et al. 2008a; Józsi and Zipfel 2008; Heinen et al. 2009).

CFHR-2 zeigt eine hohe Identität der zwei C-terminalen SCRs zu SCR 19 und 20 von Faktor H (Abb. 47). Die Identität der C-terminalen SCRs 8 und 9 von CFHR-5 zu SCR 19 und 20 von Faktor H liegt bei 66% und 43% (Abb. 47). Auch bei diesen Molekülen besteht die Möglichkeit, dass sie über die gleiche Bindungsstelle wie Faktor H mit CRASP-3 und CRASP-5 interagieren und somit Faktor H von der Bindungsstelle verdrängen können. CFHR-5 besitzt im Gegensatz zu Faktor H nur eine schwache Kofaktoraktivität als auch eine zerfallsbeschleunigende Aktivität. Ob diese ausreicht, um Zellen vor komplementvermittelter Lyse zu schützen ist unklar, konnte jedoch für Borrelien in dieser Arbeit gezeigt werden (Diskussion, Kap. 2.3.2).

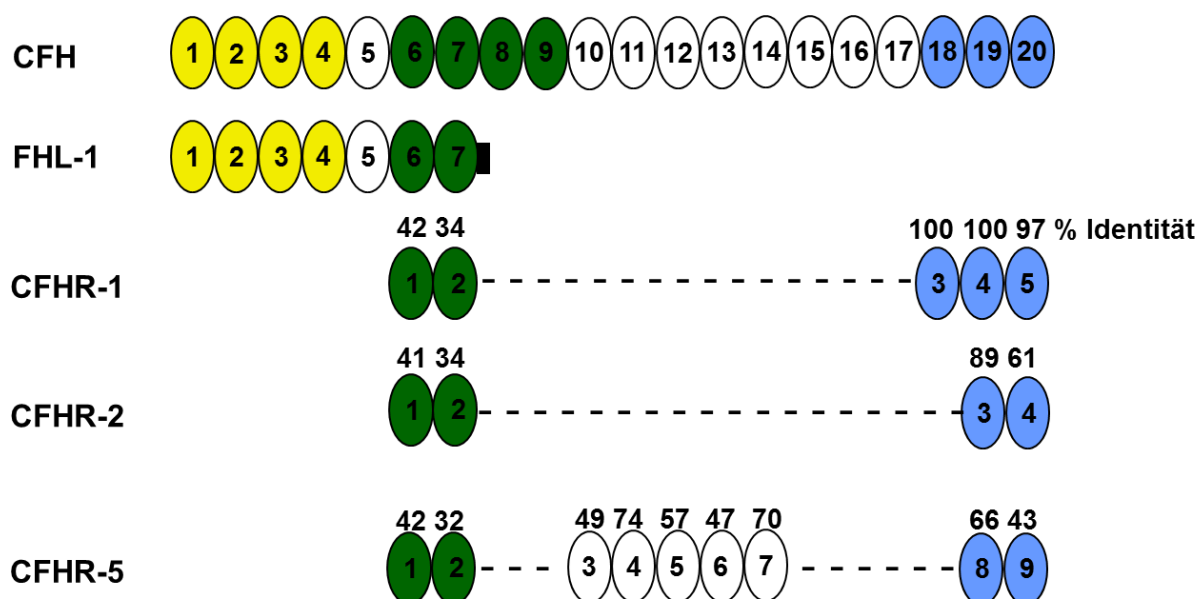


Abb. 47: Schematischer Aufbau von Faktor H, FHL-1, CFHR-1, CFHR-2 und CFHR-5 und die Identität einzelner SCR-Domänen zu der entsprechenden SCR-Domäne von Faktor H (prozentual angegeben) (Józsi and Zipfel 2008)

Mit den, in Analogie zu CRASP-1 und CRASP-2 generierten CRASP-3- bzw. CRASP-5-produzierenden Borrelienzellen wurden die oberflächenlokalisierten CRASP in Hinblick auf ihre natürlichen Interaktionspartner untersucht. Eine Bindung von Faktor H ließ sich zwar mittels Ligandenaffinitätsblot-Analyse von Ganzzelllysaten der Transformanten G1/pCRASP-3 und G1/pCRASP-5 zeigen (Abb. 17), jedoch nicht bei vitalen Borrelienzellen (Abb. 36 und 40) nachweisen. Selbst gereinigtes Faktor H zeigte keine Bindung an intakte Borrelienzellen, so dass eine Verdrängung von Faktor H durch andere Serumproteine ausgeschlossen werden kann (Abb. 39). In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass auf der Oberfläche der Borrelien lokalisiertes CRASP-3 und CRASP-5, entgegen aller bisherigen Erkenntnisse, kein Faktor H bindet. Dies impliziert, dass bei Interaktionsstudien mit rekombinanten Proteinen durchaus kontroverse Ergebnisse erzielt werden können und diese durch Versuche mit vitalen Bakterienzellen überprüft werden müssen. Über die Gründe der veränderten Bindungseigenschaften kann derzeit nur spekuliert werden. Sie lassen sich sowohl durch sterische als auch durch strukturelle Eigenschaften erklären. Einerseits besteht die Möglichkeit, dass CRASP-3 und CRASP-5 in monomerisierter als auch dimerisierter Form im rekombinant hergestellten Protein vorliegt aber nativ als Dimer auf der Zelloberfläche des Erregers lokalisiert ist. Möglicherweise wird die potentielle

Faktor H-Bindungsstelle des Monomers durch eine Konformationsänderung bei der Dimerisierung für Faktor H unzugänglich. Eine weitere Hypothese bezieht die Situation auf der Membranoberfläche mit ein. Faktor H ist ein 150 KD schweres Molekül. Ist die Bindungsstelle für Faktor H im CRASP-3- und CRASP-5-Molekül ungünstig im Inneren oder in der Nähe des Lipidankers im Protein lokalisiert und damit zelloberflächennah gelegen, wird möglicherweise eine Bindung von Faktor H an oberflächenlokalisiertes CRASP auf Grund der Größe von Faktor H sterisch verhindert. Nicht in der äußeren Membran verankertes CRASP-3 oder CRASP-5, wie es im rekombinant hergestellten Protein oder im denaturierten Zustand nach Auftrennung mittels SDS-PAGE vorkommt, könnte dagegen Faktor H binden, da die Bindungsstelle zugänglich ist. Letztendlich kann lediglich die Aussage getroffen werden, dass keine Regulation nach erfolgter Komplementaktivierung erfolgen kann (Abb. 42 und 45). Die Auswirkungen auf die Komplementresistenz werden unter Kapitel 2.3.2 diskutiert.

Die Bindung von CFHR-1 aus Humanserum an oberflächenständiges, natives CRASP-3 und CRASP-5 konnte ebenfalls für beide Transformanten gezeigt werden (Abb. 37). Dennoch ist der genaue Mechanismus der Interaktion von CFHR-1 mit CRASP-3 und CRASP-5 nicht eindeutig geklärt. CFHR-1 bindet aus Humanserum sowohl an rekombinantes als auch oberflächenlokalisiertes CRASP-3 und CRASP-5 (Abb. 35 und 37). Wird rekombinantes CFHR-1 verwendet, zeigt sich eine starke Bindung an rekombinantes CRASP-3 und CRASP-5, aber nur eine sehr schwache Bindung an CRASP-3 bzw. keine Bindung an CRASP-5 der jeweiligen Transformante im Ligandenaffinitätsblot (Abb. 17) (Haupt et al. 2007; Haupt et al. 2008a). Möglicherweise ist für die Bindung von CFHR-1 an CRASP-3 und CRASP-5 die natürliche Konformation dieser CRASP-Moleküle auf der Borrelienoberfläche nötig. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass bei der Bindung von CFHR-1 an CRASP-3 und CRASP-5 ein zusätzliches Serumprotein involviert ist. Sowohl CFHR-1 als auch CFHR-2 liegen im Humanserum gelöst als auch assoziiert mit Apolipoprotein A-I, LPS-Bindungsprotein, Plasminogen und weiteren bislang nicht identifizierten Bestandteilen in sogenannten FHR-assoziierten Lipoproteinpartikeln (FALP) vor (Park and Wright 1996; Park and Wright 2000). Eine Bindung von FALP aus Humanserum an *B. burgdorferi* s.s. über die Interaktion von CRASP-3 und CRASP-5 mit CFHR-2 könnte sowohl die Anwesenheit von CFHR-1 nach Inkubation

intakter Transformanten mit Humanserum, als auch die geringe Bindungsstärke von rekombinanten CFHR-1 an CRASP-3 und CRASP-5 im Ligandenaffinitätsblot erklären. Ebenfalls kann vermutet werden, dass eine mit den FALP assoziierte Komponente die Bindung von CFHR-1 an CRASP-3 oder CRASP-5 unterstützt. Allerdings konnte in den durchgeführten Serumadsorptionsversuchen mit Humanserum kein Apolipoprotein A-I, eine wichtige Komponente der FALP, nachgewiesen werden, so dass eine Bindung von FALP an die Transformanten G1/pCRASP-3 und G1/pCRASP-5 unwahrscheinlich ist (Abb. 41). Ob FALP bei der Bindung von CFHR-1 oder CFHR-2 an CRASP-3 bzw. CRASP-5 zerfallen, oder ob lediglich gelöste Serumproteine gebunden werden, bleibt offen.

Des Weiteren ist bekannt, dass C3b, Faktor H und das Faktor H-bindende Protein Sbi aus *S. aureus* einen stabilen trimeren Komplex bilden, in welchen Faktor H funktionell aktiv ist (Haupt et al. 2008b). Dabei ist die Bindungskapazität von Faktor H an Sbi als auch die Stabilität des Komplexes wesentlich größer als in Abwesenheit von C3b. Ähnliches kann auch für CFHR-1 vermutet werden. Vermutlich beeinflusst hier nicht C3b sondern eine Komplementkomponente des terminalen Komplementweges die Bindung von CFHR-1 an CRASP-3 und CRASP-5, da bereits gezeigt werden konnte, dass CFHR-1 mit dem terminalen Komplementkomplex interagiert und diesen inhibiert. Eine Interaktion von CFHR-1 mit den Komplementkomponenten C6, C7, C8 oder C9 scheint also am wahrscheinlichsten. Genauso besteht die Möglichkeit, dass CFHR-2 die Bindung von CFHR-1 an CRASP-3 und CRASP-5 positiv beeinflusst. Eine genaue Untersuchung ist hier auf Grund der starken Ähnlichkeit beider Proteine allerdings schwierig. Weitere Untersuchungen zum Mechanismus der CFHR-1-Bindung werden ein genaueres Bild geben können. Bewiesen werden konnte jedoch in dieser Arbeit, dass CFHR-1, CFHR-2 als auch CFHR-5 aus Humanserum direkt an natives CRASP-3 und CRASP-5 binden (Abb. 37).

Die Bedeutung von CRASP-3 und CRASP-5 für Borrelien wird durch die Vielzahl an Interaktionspartnern aus Humanserum deutlich. Neben den hier gefundenen Liganden aus der Faktor H-Proteinfamilie konnte für diese Proteine eine Bindung von Plasminogen nachgewiesen werden (Brissette et al. 2009). Auch wenn für einige Liganden wie CFHR-2 die genaue Funktion noch unbekannt ist, können dennoch

durch das komplexe Bindungsspektrum von CRASP-3 und CRASP-5 relevante Funktionen im Immunevasionsmechanismus für *B. burgdorferi* s.s. vermutet werden.

2.3.2 Die Bedeutung von CRASP-3 und CRASP-5 für die Komplementregulation von *B. burgdorferi* s.s.

Auf Grund von Studien mit rekombinatem CRASP-3 und CRASP-5 wurde davon ausgegangen, dass über die Bindung von Faktor H an CRASP-3 und CRASP-5 eine Komplementregulation auf der Zelloberfläche stattfindet (Hellwage et al. 2001; Kraiczy et al. 2001a; Kraiczy et al. 2004a). Bindet, wie in dieser Arbeit erstmals gezeigt, kein Faktor H an die Erregeroberfläche, kann keine Regulation erfolgen (Abb. 43 und 45). Es kommt zur Ablagerung von weiteren Komplementkomponenten, zur Bildung des terminalen Komplementkomplexes und schließlich zur Bakteriolyse der Zelle.

Ein Schutz vor Komplement könnte durch die von CRASP-3 oder CRASP-5 gebundenen Faktor H-verwandten Proteine CFHR-1, CFHR-2 und CFHR-5 erfolgen, da grundsätzlich allen Faktor H-verwandten Proteinen auf Grund ihrer strukturellen Homologie zu Faktor H eine komplementregulative Aktivität zugeschrieben wird. Bislang konnte diese Aktivität für Faktor H, FHL-1, CFHR-1 und CFHR-5 bewiesen werden (Zipfel and Skerka 1994; Gordon et al. 1995; Zipfel and Skerka 1999; McRae et al. 2005; Heinen et al. 2009). So bewirkt CFHR-1 eine Inhibition des terminalen Komplementkomplexes (Heinen et al. 2008; Heinen et al. 2009). CFHR-5 dagegen besitzt wie Faktor H eine Faktor I-abhängige Kofaktoraktivität und beschleunigt den Zerfall der C3-Konvertase (McRae et al. 2005). Die vorliegenden Ergebnisse, die mit den Transformanten G1/pCRASP-3 und G1/pCRASP-5 erzielt wurden, weisen jedoch darauf hin, dass die Bindung von CFHR-1 und CFHR-5 nicht ausreicht, um die Borrelienzellen vor Lyse zu schützen (Abb. 43 und 45). Ob die Aktivität der gebundenen Proteine zu schwach ist, oder ob CFHR-1 und CFHR-5 möglicherweise ihre Aktivität durch die Bindung an CRASP-3 und CRASP-5 verlieren, muss in weiteren Studien geklärt werden.

Nicht allen Proteinen, welche zur Gruppe III der Faktor H-bindenden Proteine gezählt werden, muss zwangsläufig auf Grund der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse die Faktor H-Bindung und die Komplementregulation aberkannt werden. So zeigten

Zellen eines *B. garinii* Isolates, die mit dem OspE-kodierenden Gen von *B. burgdorferi* 297 transformiert wurden, einen komplementresistenten Phänotyp (Alitalo et al. 2005). Ob hier tatsächlich eine Bindung von Faktor H die entscheidende Rolle spielt, oder ob ein anderer Mechanismus der Komplementregulation, möglicherweise durch das Protein selbst, von Bedeutung ist, kann allerdings nicht genau geklärt werden, da weder eine Faktor H-Bindung auf der Zelloberfläche noch die Regulation durch eine C3b-Inaktivierung von diesen Autoren nachgewiesen wurde.

Dennoch scheint der Bindungsverlust von Faktor H an CRASP-3 und CRASP-5 die Serumempfindlichkeit zu begründen. So konnte bei verschiedene Knockout-Stämmen oder bei hoch passagierten Isolaten, welche ausschließlich über CRASP-3 oder CRASP-5 verfügen, aber weder CRASP-1 noch CRASP-2 produzierten, der Verlust der Komplementresistenz festgestellt werden (Brooks et al. 2005; Hartmann et al. 2006; Kenedy et al. 2009).

3 Vergleich des Isolates *B. burgdorferi* LW2 mit den *B. garinii* G1-Transformanten

Das komplementresistente Isolat *B. burgdorferi* LW2 besitzt fünf verschiedene CRASP. Zwei der fünf CRASP, nämlich CRASP-1 und CRASP-2, binden die aktiven Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1 (Tab. 11). CRASP-1 besitzt eine zusätzliche intrinsische komplementregulatorische Funktion, nämlich die Inhibition des terminalen Komplementkomplexes. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, schützen CRASP-1 und CRASP-2 unabhängig voneinander die Zelle vor komplementvermittelter Lyse.

CRASP-3 und CRASP-5 dagegen besitzen keine komplementregulatorischen Funktionen, da sie weder Faktor H noch FHL-1 binden. Dennoch stellt die Theorie, in welcher CRASP-3 und CRASP-5 als „Wegbereiter“ die Bindung von Faktor H an CRASP-1 und CRASP-2 positiv beeinflussen bzw. verstärken, einen interessanten Aspekt der Interaktion von CRASP-3 und CRASP-5 mit CRASP-1 und CRASP-2 dar (Brissette et al. 2008). Sie besagt, dass die Interaktion von CRASP-3 oder CRASP-5 mit SCR19-20 von Faktor H zu einer strukturellen Konformationsänderung des Faktor H-Moleküls führt, wodurch eine Bindung von SCR6-7 von Faktor H an

CRASP-1 und CRASP-2 erleichtert wird. Auch wenn keine direkte Bindung von Faktor H an CRASP-3 und CRASP-5 nachgewiesen werden konnte, kann diese Interaktion nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Auch *B. garinii* besitzt verschiedene zur Erp-Proteinfamilie gehörenden Moleküle sowie zwei CRASP-1-orthologe Proteine, BgCRASP-1 α und BgCRASP-1 β , welche nachweislich schwach Faktor H und/oder FHL-1 binden (Wallich et al. 2005). Damit besteht die Möglichkeit, dass auch in *B. garinii* Proteine existieren, welche zumindest eine verminderte Faktor H/FHL-1 Bindungskapazität aufweisen. Um eine Komplementresistenz zu bewirken, scheint die reduzierte Bindungskapazität jedoch nicht auszureichen. Es besteht also kein zwingender Grund, dass das CRASP-3- oder CRASP-5-kodierende Gen in Kombination mit dem CRASP-1- oder CRASP-2-kodierenden Gen in die Borrelienzelle transformiert und dort produziert werden muss, um die Interaktion von Faktor H an Faktor H-bindende Proteine zu unterstützen.

Des Weiteren konnte für die Transformanten G1/pCRASP-3 und G1/pCRASP-5 eine starke Bindung von CFHR-1, CFHR-2 und CFHR-5 festgestellt werden (Tab. 11). *B. burgdorferi* LW2 dagegen weist nur eine schwache oder keine Bindung dieser Serumproteine auf (Abb. 17 und 37). Augenscheinlich gibt es Unterschiede im Bindungsverhalten dieser beiden CRASP auf der Oberfläche der Transformanten und des humanen Isolates *B. burgdorferi* LW2. Hier scheint die unterschiedlich beschaffene Zelloberfläche eine mögliche Ursache darzustellen. Die beiden Transformanten besitzen nur CRASP-3 oder CRASP-5 auf ihrer Zelloberfläche, aber kein weiteres Faktor H-bindendes Protein. Eine Interaktion von CFHR-1, CFHR-2 und CFHR-5 mit CRASP-3 und CRASP-5 kann daher ungehindert erfolgen. *B. burgdorferi* LW2 verfügt neben CRASP-3 und CRASP-5 über CRASP-4 und die beiden Faktor H- und FHL-1-bindenden Proteine CRASP-1 und CRASP-2. Möglicherweise wird durch die Interaktion von CRASP-1 mit dem 150 KD schweren Faktor H die Bindung von CFHR-1, CFHR-2 und CFHR-5 an CRASP-3 und CRASP-5 behindert, und diese Proteine sind daher nur sehr schwach nachzuweisen. Im murinen Infektionszyklus ist CRASP-1 nur in der initialen Phase der Erregerübertragung auf der Borrelienoberfläche vorhanden, während CRASP-2, CRASP-3 und CRASP-5 im Anschluss während der Ausbreitung des Erregers in der Maus auf der Zelloberfläche der Borrelien zu finden sind (Bykowski et al. 2007;

Bykowski et al. 2008). Wenn davon ausgegangen wird, dass sich die Daten aus den Tierversuchen auf den Menschen übertragen lassen, lässt sich das unterschiedliche Bindungsverhalten von Faktor H, FHL-1 und der CFHRs des Isolates *B. burgdorferi* LW2 und der Transformanten in Einklang bringen. Befindet sich lediglich CRASP-1 auf der Zelloberfläche von *B. burgdorferi* LW2 wird Faktor H und FHL-1 gebunden. Wird CRASP-2 aber kein CRASP-1 produziert, wird verstärkt das kleinere FHL-1 gebunden, wodurch die Bindung weiterer Proteine, wie etwa CFHR-1, CFHR-2 und CFHR-5 an CRASP-3 und CRASP-5 ermöglicht werden könnte.

Tab. 11: Zusammenfassung der mit CRASP interagierenden Serumproteine der Faktor H-Proteinfamilie

	Faktor H	FHL-1	CFHR-1	CFHR-2	CFHR-5
G1/pCRASP-1	++	++	-	-	-
G1/pCRASP-2	++	++	-	-	-
G1/pCRASP-3	-	n.n.*	++	++	+
G1/pCRASP-5	-	n.n.*	++	++	+
LW2	++	++	+	+	-

*nicht nachgewiesen; ++ starke Bindung, + schwache Bindung, - keine Bindung

4 Die Bedeutung der CRASP im Infektionszyklus und Krankheitsverlauf

Verschiedene Proteine mit identischer Funktion scheinen für einen Organismus nicht sinnvoll zu sein. Ein anderes Bild ergibt sich, wenn diese Proteine nicht kontinuierlich auf der Borrelienoberfläche vorhanden sind, sondern in Abhängigkeit von Umwelteinflüssen zu unterschiedlichen Zeitpunkten produziert werden. Interessanterweise werden die CRASP-kodierenden Gene im natürlichen Infektionszyklus nicht gleichzeitig exprimiert (Abb. 48). Während der Häutung der Zecke befinden sich die Borrelien im Mitteldarm der Zecke und besitzen keine oberflächenständigen CRASP-Moleküle (Miller et al. 2003; von Lackum et al. 2005; Bykowski et al. 2007). Das CRASP-1-kodierende *cspA*-Gen wird während der Übertragung auf den humanen Wirt exprimiert und kann auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden (Bykowski et al. 2007). Nach Eintritt der Borrelien in den Wirtsorganismus wird das Gen reprimiert und das Protein ist nach etwa zwei Wochen nicht mehr auf der Erregeroberfläche

nachweisbar. Hier scheinen die Temperatur als auch Faktoren des Blutes, wie der pH-Wert, für die Transkription der DNA und die Translation der mRNA eine wichtige Rolle zu spielen (von Lackum et al. 2005). Das CRASP-2-kodierende *cspZ*-Gen wird erst beim Saugakt der Zecke und der sich daran anschließenden Infektion exprimiert (Bykowski et al. 2007). In der Zecke ist dieses Gen vollständig reprimiert. Die zur Erp-Familie gehörenden Gene *erpP* und *erpA*, welche CRASP-3 und CRASP-5 kodieren, sind ebenfalls in der Wirt-suchenden Zecke reprimiert (Miller et al. 2006; Stevenson et al. 2006). Zu Beginn des Saugaktes, der Transmission der Erreger von der Zecke auf die Maus, während der Persistenz des Erregers in der Maus und bei der Übertragung von der Maus auf die saugende Zecke werden diese Gene exprimiert, so dass CRASP-3 und CRASP-5 fortlaufend auf der Zelloberfläche vorhanden sein sollten.

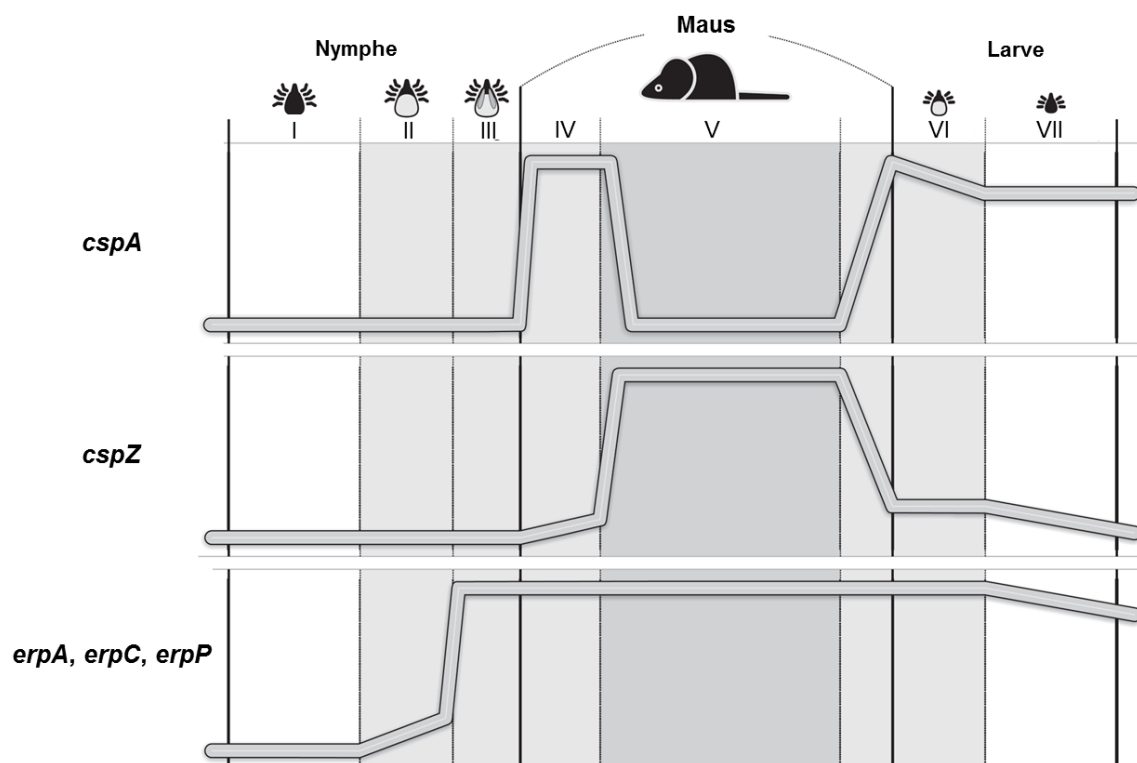


Abb. 48: Vergleich der Expression verschiedener CRASP-kodierender Gene von *B. burgdorferi s.s.* während des Infektionszyklus in der Maus.

Expression des CRASP-1-kodierenden Gens (*cspA*), des CRASP-2-kodierenden Gens (*cspZ*) und der CRASP-3, -4 und -5-kodierenden Gene (*erpA*, *erpC*, *erpP*) in der wirtssuchenden Zecke (I), in der saugenden Zecke (II), in den Speicheldrüsen der Zecke nach dem Saugakt (III), an der Einstichstelle (IV), während der Dissemination im Wirtsorganismus Maus (V), in der saugenden Zecke an einem infizierten Wirt (VI) und nach dem Saugakt der Zecke (VII).

Die Antikörperantwort gegen die verschiedenen CRASP-Moleküle von Borreliosepatienten gibt wichtige Hinweise auf die Produktion und Exposition dieser Proteine auf der Borrelienoberfläche im Menschen. Spezifische Antikörper, welche gegen CRASP-1, CRASP-2, CRASP-3 und CRASP-5 gerichtet sind, lassen sich im Serum von Patienten mit Erythema migrans, Neuroborreliose, Lyme-Arthritis und Acrodermatitis chronica atrophicans, d.h. in allen Stadien der Lyme-Borreliose nachweisen (Stevenson et al. 1998; Miller et al. 2000; Rossmann et al. 2006; Kraiczy et al. 2008b). CRASP-Moleküle sind also während der Infektion und der Manifestation der Krankheit auf der Borrelienoberfläche präsent und es kann vermutet werden, dass die im Mausmodell erhobenen Expressionsdaten der CRASP-kodierenden Gene auf den Menschen übertragbar sind. Die Antikörperantwort, welche in gleicher Weise im Mausmodell gefunden wurde, bewirkt allerdings weder im Menschen noch in der Maus eine ausreichende Protektion (Hefty et al. 2002; Miller et al. 2003; Coleman et al. 2008).

Interaktionen der CRASP-Moleküle mit weiteren erregerspezifischen Oberflächenproteinen könnten den Schutz der Proteine vor der Antigen-Antikörperreaktion und damit der Opsonisierung der Zellen bewirken. Für verschiedene humanpathogene Erreger, wie *Neisseria gonorrhoeae*, *E. coli* und *Brucella spp.* konnte bereits der Nachweis erbracht werden, dass Lipopolysaccharide die Membranproteine vor dem Erkennen durch spezifische Antikörper schützen (van der Ley et al. 1986; Hackstadt 1988; Elkins et al. 1992). Obwohl *B. burgdorferi s.l.* kein LPS besitzt, konnte gezeigt werden, dass die oberflächenständigen Proteine (Osp-Proteine) eine ähnliche Funktion besitzen. Der Schutz vor bakteriziden Antikörpern und der Protease Trypsin ließ sich bereits am P66-Protein demonstrieren (Bunikis and Barbour 1999). Der Schutz von Membranproteinen gegenüber Proteasen durch benachbarte Proteine stellt eine mögliche Erklärung für die Unempfindlichkeit von CRASP-2 gegenüber Trypsin und Proteinase K dar (Abb. 11).

Auch wenn der Schutz des Erregers vor komplementvermittelter Lyse hauptsächlich CRASP-1 zugesprochen wird, sollte die Bedeutung von CRASP-2 für die Immunevasion dieses Erregers nicht unterschätzt werden. CRASP-1 ist im Mausmodell lediglich am Anfang der Infektion vorhanden und schützt die Zelle während des Saugaktes der Zecke im Zeckendarm und bei Eintritt in den Wirt vor Bakteriolyse (Abb. 48). Allerdings muss bedacht werden, dass gerade zu diesem

Zeitpunkt der Infektion komplementregulierende Mechanismen ausgehend von *Ixodes* spp. gleichfalls die Borrelienzelle schützen kann. So wird Komplement im Darm der Zecke durch proteolytische Enzym inaktiviert, wodurch ein Schutz der Borrelienzellen durch CRASP-1 gegenüber Komplement nicht notwendig scheint (Bykowski et al. 2008). Ähnlich stellt sich die Situation an der Einstichstelle der Zecke dar. Der Zeckenspeichel enthält zahlreiche komplementmodulatorische Proteine, welche nicht nur den Stechapparat der Zecke, sondern auch die Borrelien vor einem Komplementangriff schützen könnten (Ribeiro 1987; Lawrie et al. 1999; Wikel 1999; Daix et al. 2007). Die auf der Zelloberfläche der übertragenen Borrelien gebundenen Speichelproteine könnten den Spirochäten initial Schutz verleihen und erst wenn die Zellen mit dem Blutstrom weitergetragen werden, könnte die Bindung von Faktor H und FHL-1 an CRASP-1 allein den Schutz der Zelle vor Komplement bewirken.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass CRASP-2 wie auch CRASP-1 einen wirkungsvollen Schutz der Zelle vor Komplement bewirkt. Im Widerspruch dazu wurde CRASP-2 von Coleman et al. 2008 als irrelevant für die Komplementresistenz beschrieben. Wie bereits in Kapitel 2.2.2 diskutiert, beruht diese Aussage auf einer falschen Interpretation der erhobenen Daten dieser Autoren. Vielmehr weisen Daten zur Expression des *cspZ*-Gens daraufhin, dass CRASP-2 in vivo verstärkt exprimiert wird (Bykowski et al. 2007). Folglich könnte die zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Infektionszyklus stattfindende Produktion der CRASPs einen effizienten Schutz vor Komplement bewirken, initial durch CRASP-1 und anschließend durch CRASP-2.

Die eigentliche Funktion von CRASP-3 und CRASP-5 für die Borrelienzelle konnte in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Dennoch ist es wahrscheinlich, dass beide CRASP-Moleküle zum Schutz der Zelle vor der humanen Immunabwehr beitragen. So kann vermutet werden, dass durch die Bindung von Plasminogen an CRASP-3 und CRASP-5 und dessen Aktivierung zu Plasmin die abgelagerten Komplementkomponenten wie z.B., C3dg, degradiert werden und die Zelle gegenüber weiteren Angriffen des Immunsystems, wie z. B. durch Phagozytose, geschützt sind (Brissette et al. 2009).

Borrelien, die zum *B. burgdorferi* s.l.-Komplex gezählt werden, sind lediglich im Anfangsstadium der Infektion im Blut des Menschen nachweisbar und ziehen sich schnell ins Gewebe zurück, um so dem Komplement und den Effektorzellen des Immunsystems zu entkommen. Der Übertritt des Erregers aus der Blutbahn ins

benachbarte Gewebe erfolgt nach Adhäsion an das Endothel über die „tight junctions“ (Moriarty et al. 2008). Dabei interagiert das Bakterium häufig mit der Gefäßwand bis es über einen Epithelzellzwischenraum schließlich in das Gewebe eintritt. Die Interaktionen der Zelle mit der Gefäßwand sind vielfältiger Natur und können von erregerspezifischen Proteinen aber auch von humanen Liganden verursacht werden. So besteht die Möglichkeit, dass CRASP-Proteine in diesen Prozess involviert sind. CRASP-1 und CRASP-2 können über Interaktionen der Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1 mit dem Endothel interagieren. Faktor H als Brückenmolekül zur Bindung an Epithelzellen konnte bereits für *Streptococcus pneumoniae* gezeigt werden (Hammerschmidt et al. 2007). FHL-1 stellte sich ebenfalls für Streptokokken als wichtiges Brückenmolekül bei der Invasion von Geweben heraus (Pandiripally et al. 2003; Rogers et al. 2009a). Auch CRASP-3 und CRASP-5 könnten über die Bindung von Plasminogen und möglicherweise der Faktor H-verwandten Proteine eine Interaktion mit Epithelzellen herbeiführen.

Ausblick

CRASP-1 als multifunktionales Protein ist in der Lage entweder über die Interaktion mit den Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1 oder durch die Bindung an Komplementkomponenten der terminalen Sequenz eine Inhibition der Komplementaktivierung herbeizuführen und so die Borrelienzelle zu schützen. Welche Bedeutung den einzelnen Interaktionen zum Schutz der Borrelienzelle vor dem Komplement zukommt, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Für zukünftige Studien kann dabei die Transformante G1/pCRASP-1 Y240A sehr hilfreich sein, welche nur noch eine der beiden regulatorischen Aktivitäten, nämlich die Inhibition des TCC, aufweist. Das Herstellen einer weiteren Transformante mit einem veränderten CRASP-1, welches einzig das Komplement durch die Bindung von Faktor H und FHL-1 reguliert, würde die Untersuchungen zum zweiten Interaktionsmechanismus in sinnvoller Weise ergänzen und belegen.

Des Weiteren ist der genaue Mechanismus der Inhibition des TCC durch CRASP-1 zu klären. Da die Struktur von CRASP-1 bekannt ist, können durch bioinformatische Verfahren wie dem „molecular modelling“ erste Anhaltspunkte zur Bindungsstelle des CRASP-1 an den TCC oder zur Bindung einzelner Komplementkomponenten

gefunden werden. Eine Bestätigung kann z.B. durch Immunpräzipitation, Bindungsstudien sowie Kokristallisation von CRASP-1-TCC oder durch in vitro-Mutagenese-Studien erbracht werden.

Die Aufklärung der CRASP-2-Struktur unter physiologischen Bedingungen, möglicherweise durch Kristallisation, ist von großer Bedeutung für die Identifizierung der Faktor H / FHL-1-Bindungsstelle. Gleichfalls kann die Kokristallisation des Moleküls mit den Bindungspartnern Faktor H oder FHL-1 einen wichtigen Beitrag zur detaillierten Bestimmung der CRASP-2 / Faktor H- Bindungsstelle liefern.

CRASP-3 und CRASP-5 binden CFHR-1 aus Humanserum. Da der Nachweis der Bindung von rekombinanten CFHR-1 an CRASP-3 und CRASP-5 nicht gelang, besteht die Möglichkeit, dass weitere Serumproteine in diese Interaktion involviert sein könnten. Zukünftige Studien zum Bindungsmechanismus von CFHR-1 an CRASP-3 und CRASP-5 können hier einen Ansatz zu dessen Aufklärung finden.

Des Weiteren wäre zu klären, welche Rolle die in der vorliegenden Arbeit identifizierten Bindungspartner von CRASP-3 und CRASP-5, nämlich CFHR-1, CFHR-2 und CFHR-5 für die Immunevasion von Borrelien, aber auch anderer humanpathogene Mikroorganismen spielen. Möglicherweise sind die CFHRs in den Prozess der Adhäsion und des Eindringens der Borrelienzelle in das umliegende Gewebe der Blutgefäße involviert.

V. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit liefert einen wichtigen Beitrag zum Verständnis des molekularen Mechanismus der Immunevasion von *B. burgdorferi* s.s., insbesondere der Bedeutung einzelner CRASP-Proteine für die Komplementresistenz. Sie trägt dazu bei, die Relevanz dieser Proteine für die Pathogenese dieses Erregers zu verdeutlichen.

In dieser Arbeit gelang es, verschiedene Vektoren, welche die CRASP-kodierenden Gene *cspA*, *cspZ*, *erpP* bzw. *erpA* aus *B. burgdorferi* s.s. enthielten, erfolgreich in das CRASP-negative Isolat *B. garinii* G1 mittels Elektroporation einzubringen. Darüber hinaus wurden die im *cspA*- oder *cspZ*-Gen mutierten Vektoren ebenfalls in *B. garinii* G1 eingebracht, um die Auswirkungen der aus der Mutation resultierenden Aminosäuresubstitution im CRASP-Molekül auf die Bindungseigenschaft gegenüber Faktor H und FHL-1 in der lebenden Zelle zu untersuchen. Die stabile Replikation der Vektoren in *B. garinii* G1 als auch die Produktion der speziesfremden CRASP-Proteine und deren Transport auf die Zelloberfläche von *B. garinii* G1 wurde durch verschiedene experimentelle Ansätze überprüft und verifiziert (Westernblot- und Ligandenaffinitätsblot-Analyse, Immunfluoreszenztest sowie Protease-Assay zur Oberflächenlokalisation der heterolog produzierten CRASP-Moleküle).

Schließlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das in *B. garinii* G1 produzierte CRASP-1 als auch CRASP-2 mit Faktor H und FHL-1 interagiert und die gebundenen Komplementregulatoren ihre funktionelle Aktivität zur C3b-Inaktivierung aufrechterhalten. Fehlende Ablagerungen der Komplementkomponente C6 und des TCC auf der Membranoberfläche der transformierten Borrelienzellen und das Wachstum dieser Zellen in Humanserum bestätigten, dass beide CRASP unabhängig voneinander Schutz vor komplementvermittelter Lyse verleihen.

Die Untersuchungen mit den veränderten CRASP-1-Molekülen ergaben, dass die Transformante G1/pCRASP-1 E147K eine verringerte Bindung von Faktor H und FHL-1 aufwies, die sich jedoch nicht auf die Komplementresistenz dieser Transformante auswirkte. Im Gegensatz dazu führte eine Aminosäuresubstitution im C-Terminus des CRASP-1-Moleküls an Position 240 zum Verlust der Bindung von Faktor H und einer stark verringerten Bindung von FHL-1. Daraus resultierend konnte keine Kofaktoraktivität beider Regulatorproteine bei G1/pCRASP-1 Y240A

nachgewiesen werden. Trotz des Bindungsverlustes der Komplementregulatoren zeigte die Transformante nur geringe Ablagerungen des TCC auf der Zelloberfläche und Wachstum in Humanserum. Mittels Hämolyse-Assays wurde schließlich festgestellt, dass CRASP-1_{Y240A} direkt die Komplementaktivierung auf der Stufe der Assemblierung des TCC inhibiert.

Die Bedeutung der Aminosäuren an den Positionen 81, 139, 207 und 211 im CRASP-2-Molekül für die Faktor H / FHL-1-Bindung und die daraus resultierenden Auswirkungen auf die Komplementresistenz der Borrelien wurde gleichfalls untersucht. Dabei wies insbesondere die Transformante G1/pCRASP-2 Y211A ein inhibiertes Wachstum in Humanserum und verstärkt Komplementablagerungen auf der Zelloberfläche auf, was auf den Verlust bzw. der sehr schwachen Bindung von FHL-1 und Faktor H zurückzuführen ist (intermediär komplementresistenter Phänotyp). Im Gegensatz zu den Transformanten, welche ein CRASP-2-Molekül mit nur einem Aminosäureaustausch produzierten, zeigten die Transformanten, deren CRASP-2-Molekül zwei Aminosäuresubstitutionen aufwies (G1/pCRASP-2 R139A-Y207A, G1/pCRASP-2 R139A-Y211A, G1/pCRASP-2 Y207A-Y211A) keine Bindung der beiden Regulatorproteine. Diese Transformanten zeichneten sich durch eine massive Ablagerung des TCC auf ihrer Oberfläche als auch durch eine vollständige Inhibition des Wachstums in Gegenwart von Komplement aus (komplementsensitiver Phänotyp). Die für die Interaktion mit Faktor H und FHL-1 relevanten Aminosäuren scheinen demnach am C-Terminus lokalisiert zu sein.

Neue, unerwartete Erkenntnisse ergaben sich aus den Untersuchungen mit Borrelienzellen, welche das CRASP-3- oder CRASP-5-kodierende *erpP*- bzw. *erpA*-Gen enthielten. Obwohl gereinigtes als auch denaturiertes CRASP-3 und CRASP-5 in der Lage war, Faktor H zu binden, wiesen die vitalen Zellen der Transformanten G1/pCRASP-3 und G1/pCRASP-5 keine Bindung von Faktor H auf. Dies wird durch die massive Komplementablagerung auf der Oberfläche der Transformanten und die eindeutige Wachstumsinhibition in Humanserum selbiger bestätigt (komplementsensitiver Phänotyp). Schließlich konnten für gereinigtes CRASP-3 und CRASP-5 als auch für die CRASP-3- oder CRASP-5-produzierenden Transformanten neue Liganden aus Humanserum identifiziert werden. Neben dem

Faktor H verwandten CFHR-1-Protein wurden auch CFHR-2 und CFHR-5 als neue Interaktionspartner ermittelt.

Zusammenfassend lassen sich folgende Aussagen hinsichtlich des molekularen Mechanismus der Komplementresistenz bei *B. burgdorferi* s.s. aus den erhobenen Daten dieser Arbeit mit transformierten Borrelienzellen formulieren:

- CRASP-1 und CRASP-2, nicht jedoch CRASP-3 und CRASP-5 stellen die wichtigsten Moleküle dar, welche die Komplementresistenz der Borrelien durch Bindung der humanen Komplementregulatoren determinieren
- CRASP-1 als multifunktionelles Protein ist zusätzlich in der Lage, direkt mit Komponenten des Komplementsystems zu interagieren
- Die C-terminalen Domänen von CRASP-1 und CRASP-2 sind für die Bindung der beiden Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1 relevant
- CFHR-2 und CFHR-5 konnten als zusätzliche Liganden von CRASP-3 und CRASP-5 identifiziert werden
- CRASP-3 und CRASP-5 auf der Borrelienoberfläche lokalisiert, interagieren mit CFHR-1, CFHR-2 und CFHR-5, aber nicht mit Faktor H

VI. Literaturverzeichnis

- Alitalo, A., T. Meri, H. Lankinen, I. Seppala, P. Lahdenne, P. S. Hefty, D. Akins und S. Meri (2002). "Complement inhibitor factor H binding to Lyme disease spirochetes is mediated by inducible expression of multiple plasmid-encoded outer surface protein E paralogs." J. Immunol. **169**: 3847-3853.
- Alitalo, A., T. Meri, T. Chen, H. Lankinen, Z.-Z. Cheng, T. S. Jokiranta, I. J. T. Seppala, P. Lahdenne, P. S. Hefty, D. R. Akins und S. Meri (2004). "Lysine-dependent multipoint binding of the *Borrelia burgdorferi* virulence factor outer surface protein E to the C terminus of factor H." J. Immunol. **172**: 6195-6201.
- Alitalo, A., T. Meri, P. Comstedt, L. Jeffery, J. Tornberg, T. Strandin, H. Lankinen, S. Bergström, M. Cinco, S. R. Vuppala, D. R. Akins und S. Meri (2005). "Expression of complement factor H binding immunoevasion proteins in *Borrelia garinii* isolated from patients with neuroborreliosis." Eur. J. Immunol. **35**: 3043-3053.
- Alverson, J., S. F. Bundle, C. D. Sohaskey, M. C. Lybecker und D. S. Samuels (2003). "Transcriptional regulation of the *ospAB* and *ospC* promoters from *Borrelia burgdorferi*." Mol. Microbiol. **48**: 1665-1677.
- Babb, K., J. D. McAlister, J. C. Miller und B. Stevenson (2004). "Molecular characterization of *Borrelia burgdorferi* erp promoter / operator elements." J. Bacteriol. **186**: 2745-2756.
- Baranton, G., M. Assous und D. Postic (1992a). "Three bacterial species associated with Lyme borreliosis. Clinical and diagnostic implications." Bull. Acad. Natl. Med. **176**: 1075-1085; discussion 1085-1086.
- Baranton, G., D. Postic, I. Saint Girons, P. Boerlin, J. C. Piffaretti, M. Assous und P. A. Grimont (1992b). "Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis." Int. J. Syst. Bacteriol. **42**: 378-383.
- Barbour, A. G. (1984). "Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes." Yale J. Biol. Med. **57**: 521-525.
- Barbour, A. G. und S. F. Hayes (1986). "Biology of *Borrelia* species." Microbiol. Rev. **50**: 381-400.
- Barbour, A. G. (1988). "Plasmid analysis of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent." J. Clin. Microbiol. **26**: 475-478.
- Berggard, K., E. Johnsson, E. Morfeldt, J. Persson, M. Stalhammar-Carlemalm und G. Lindahl (2001a). "Binding of human C4BP to the hypervariable region of M protein: a molecular mechanism of phagocytosis resistance in *Streptococcus pyogenes*." Mol. Microbiol. **42**: 539-551.
- Berggard, K., G. Lindahl, B. Dahlback und A. M. Blom (2001b). "*Bordetella pertussis* binds to human C4b-binding protein (C4BP) at a site similar to that used by the natural ligand C4b." Eur. J. Immunol. **31**: 2771-2780.
- Blackmore, T. K., T. A. Sadlon, H. M. Ward, D. M. Lublin und D. L. Gordon (1996). "Identification of a heparin binding domain in the seventh short consensus repeat of complement factor H." J. Immunol. **157**: 5422-5427.
- Blackmore, T. K., J. Hellwage, T. A. Sadlon, N. Higgs, P. F. Zipfel, H. M. Ward und D. L. Gordon (1998). "Identification of the second heparin-binding domain in human complement factor H." J. Immunol. **160**: 3342-3348.

- Blom, A. M., A. Rytönen, P. Vasquez, G. Lindahl, B. Dahlback und A. B. Jonsson (2001). "A novel interaction between type IV pili of *Neisseria gonorrhoeae* and the human complement regulator C4B-binding protein." J. Immunol. **166**: 6764-6770.
- Blom, A. M. (2002). "Structural and functional studies of complement inhibitor C4b-binding protein." Biochem. Soc. Trans. **30**: 978-982.
- Breitner-Ruddock, S., R. Würzner, J. Schulze und V. Brade (1997). "Heterogeneity in the complement-dependent bacteriolysis within the species of *Borrelia burgdorferi*." Med Microbiol Immunol. **185**: 253-260.
- Brissette, C. A., A. E. Cooley, L. H. Burns, S. P. Riley, A. Verma, M. E. Woodman, T. Bykowski und B. Stevenson (2008). "Lyme borreliosis spirochete Erp proteins, their known host ligands, and potential roles in mammalian infection." Int. J. Med. Microbiol. **298**: 257-267.
- Brissette, C. A., K. Haupt, D. Barthel, A. E. Cooley, A. Bowman, C. Skerka, R. Wallich, P. F. Zipfel, P. Kraiczy und B. Stevenson (2009). "*Borrelia burgdorferi* infection-associated surface proteins ErpP, ErpA, and ErpC bind human plasminogen." Infect. Immun. **77**: 300-306.
- Brooks, C. S., S. R. Vuppala, A. M. Jett, A. Alitalo, S. Meri und D. R. Akins (2005). "Complement regulator-acquiring surface protein 1 imparts resistance to human serum in *Borrelia burgdorferi*." J. Immunol. **175**: 3299-3308.
- Brorson, O. und S. H. Brorson (2006). "An in vitro study of the activity of telithromycin against mobile and cystic forms of *Borrelia afzelii*." Infection **34**: 26-28.
- Bunikis, J. und A. G. Barbour (1999). "Access of antibody or trypsin to an integral outer membrane protein (P66) of *Borrelia burgdorferi* is hindered by Osp lipoproteins." Infect. Immun. **67**: 2874-2883.
- Burtnick, M. N., J. S. Downey, P. J. Brett, J. A. Boylan, J. G. Frye, T. R. Hoover und F. C. Gherardini (2007). "Insights into the complex regulation of *rpoS* in *Borrelia burgdorferi*." Mol. Microbiol. **65**(2): 277-93.
- Bykowski, T., M. E. Woodman, A. E. Cooley, C. A. Brissette, V. Brade, R. Wallich, P. Kraiczy und B. Stevenson (2007). "Coordinated expression of *Borrelia burgdorferi* complement regulator-acquiring surface proteins during the Lyme disease spirochete's mammal-tick infection cycle." Infect. Immun. **75**: 4227-4236.
- Bykowski, T., M. E. Woodman, A. E. Cooley, C. A. Brissette, R. Wallich, V. Brade, P. Kraiczy und B. Stevenson (2008). "*Borrelia burgdorferi* complement regulator-acquiring surface proteins (BbCRASPs): Expression patterns during the mammal-tick infection cycle." Int. J. Med. Microbiol. **298**: 249-256.
- Byram, R., P. E. Stewart und P. Rosa (2004). "The essential nature of the ubiquitous 26-kilobase circular replicon of *Borrelia burgdorferi*." J. Bacteriol. **186**: 3561-3569.
- Canica, M. M., F. Nato, L. du Merle, J. C. Mazie, G. Baranton und D. Postic (1993). "Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis." Scand. J. Infect. Dis. **25**: 441-448.
- Casjens, S. (2000). "*Borrelia* genomes in the year 2000." J. Mol. Microbiol. Biotechnol. **2**: 401-410.
- Charon, N. W. und S. F. Goldstein (2002). "Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: the spirochetes." Annu. Rev. Genet. **36**: 47-73.

- China, B., M. P. Sory, B. T. N'Guyen, M. De Bruyere und G. R. Cornelis (1993). "Role of the YadA protein in prevention of opsonization of *Yersinia enterocolitica* by C3b molecules." Infect. Immun. **61**: 3129-3136.
- Coleman, A. S., X. Yang, M. Kumar, X. Zhang, K. Promnares, D. Shroder, M. R. Kenedy, J. F. Anderson, D. R. Akins und U. Pal (2008). "*Borrelia burgdorferi* complement regulator-acquiring surface protein 2 does not contribute to complement resistance or host infectivity." PLoS ONE **3**: 3010e.
- Coleman, J. L., J. A. Gebbia, J. Piesman, J. L. Degen, T. H. Bugge und J. L. Benach (1997). "Plasminogen is required for efficient dissemination of *B. burgdorferi* in ticks and for enhancement of spirochetemia in mice." Cell **89**: 1111-1119.
- Cordes, F. S., P. Kraiczy, P. Roversi, C. Skerka, M. Kirschfink, M. M. Simon, V. Brade, E. D. Lowe, P. Zipfel, R. Wallich und S. M. Lea (2004). "Crystallization and preliminary crystallographic analysis of BbCRASP-1, a complement regulator-acquiring surface protein of *Borrelia burgdorferi*." Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. **60**: 929-932.
- Cordes, F. S., P. Roversi, P. Kraiczy, M. M. Simon, V. Brade, O. Jahraus, R. Wallis, C. Skerka, P. F. Zipfel, R. Wallich und S. M. Lea (2005). "A novel fold for the factor H-binding protein BbCRASP-1 of *Borrelia burgdorferi*." Nat. Struct. Mol. Biol. **12**: 276-277.
- Cordes, F. S., P. Kraiczy, P. Roversi, M. M. Simon, V. Brade, O. Jahraus, R. Wallis, L. Goodstadt, C. P. Ponting, C. Skerka, P. F. Zipfel, R. Wallich und S. M. Lea (2006). "Structure-function mapping of BbCRASP-1, the key complement factor H and FHL-1 binding protein of *Borrelia burgdorferi*." Int. J. Med. Microbiol. **296**: 177-184.
- Dahlback, B. und E. R. Podack (1985). "Characterization of human S protein, an inhibitor of the membrane attack complex of complement. Demonstration of a free reactive thiol group." Biochemistry (Mosc.) **24**: 2368-2374.
- Daix, V., H. Schroeder, N. Praet, J. P. Georjin, I. Chiappino, L. Gillet, K. de Fays, Y. Decrem, G. Lebouille, E. Godfroid, A. Bollen, P. P. Pastoret, L. Gern, P. M. Sharp und A. Vanderplasschen (2007). "*Ixodes* ticks belonging to the *Ixodes ricinus* complex encode a family of anticomplement proteins." Insect Mol. Biol. **16**: 155-166.
- Diaz-Guillen, M. A., S. Rodriguez de Cordoba und D. Heine-Suner (1999). "A radiation hybrid map of complement factor H and factor H-related genes." Immunogenetics **49**: 549-552.
- Diaz, A., A. Ferreira und R. B. Sim (1997). "Complement evasion by *Echinococcus granulosus*: sequestration of host factor H in the hydatid cyst wall." J. Immunol. **158**: 3779-3786.
- Dieterich, R., C. Hammerschmidt, D. Richter, C. Skerka, R. Wallich, F. R. Matuschka, P. F. Zipfel und P. Kraiczy (2010). "Inadequate binding of immune regulator factor H is associated with sensitivity of *Borrelia lusitaniae* to human complement." Infect. Immun. **78**: 4467-4476.
- Dunham-Ems, S. M., M. J. Caimano, U. Pal, C. W. Wolgemuth, C. H. Eggers, A. Balic und J. D. Radolf (2009). "Live imaging reveals a biphasic mode of dissemination of *Borrelia burgdorferi* within ticks." J. Clin. Invest. **119**: 3652-3665.
- El-Hage, N., K. Babb, J. A. Carroll, N. Lindstrom, E. R. Fischer, J. C. Miller, R. D. Gilmore, Jr., M. L. Mbow und B. Stevenson (2001). "Surface exposure and protease insensitivity of *Borrelia burgdorferi* Erp (OspEF-related) lipoproteins." Microbiology **147**: 821-830.

- El-Hage, N. und B. Stevenson (2002). "Simultaneous coexpression of *Borrelia burgdorferi* Erp proteins occurs through a specific, erp locus-directed regulatory mechanism." J. Bacteriol. **184**: 4536-4543.
- Elkins, C., N. H. Carbonetti, V. A. Varela, D. Stirewalt, D. G. Klapper und P. F. Sparling (1992). "Antibodies to N-terminal peptides of gonococcal porin are bactericidal when gonococcal lipopolysaccharide is not sialylated." Mol. Microbiol. **6**: 2617-2628.
- Embers, M. E., R. Ramamoorthy und M. T. Philipp (2004). "Survival strategies of *Borrelia burgdorferi*, the etiologic agent of Lyme disease." Microbes Infect. **6**: 312-318.
- Estaller, C., V. Koistinen, W. Schwaeble, M. P. Dierich und E. H. Weiss (1991). "Cloning of the 1.4-kb mRNA species of human complement factor H reveals a novel member of the short consensus repeat family related to the carboxy terminal of the classical 150-kDa molecule." J. Immunol. **146**: 3190-3196.
- Fernie-King, B. A., D. J. Seilly, C. Willers, R. Wurzner, A. Davies und P. J. Lachmann (2001). "Streptococcal inhibitor of complement (SIC) inhibits the membrane attack complex by preventing uptake of C5b7 onto cell membranes." Immunology **103**: 390-398.
- Ferreira, V. P., A. P. Herbert, H. G. Hocking, P. N. Barlow und M. K. Pangburn (2006). "Critical role of the C-terminal domains of factor H in regulating complement activation at cell surfaces." J. Immunol. **177**: 6308-6316.
- Fingerle, V., G. Goettner, L. Gern, B. Wilske und U. Schulte-Spechtel (2007). "Complementation of a *Borrelia afzelii* OspC mutant highlights the crucial role of OspC for dissemination of *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus*." Int. J. Med. Microbiol. **297**: 97-107.
- Frank, K. L., S. F. Bundle, M. E. Kresge, C. H. Eggers und D. S. Samuels (2003). "*aadA* confers streptomycin resistance in *Borrelia burgdorferi*." J. Bacteriol. **185**: 6723-6727.
- Fraser, C. M., S. Casjens, W. M. Huang, G. G. Sutton, R. Clayton, R. Lathigra, O. White, K. A. Ketchum, R. Dodson, E. K. Hickey, M. Gwinn, B. Dougherty, J.-F. Tomb, R. D. Fleischmann, D. Richardson, J. Peterson, A. R. Kerlavage, J. Quackenbush, S. Salzberg, M. Hanson, R. van Vugt, N. Palmer, M. D. Adams, J. Gocayne, J. Weidman, T. Utterback, L. Wathley, L. McDonald, P. Artiach, C. Bowman, S. Garland, C. Fujii, M. D. Cotton, K. Horst, K. Roberts, B. Hatch, H. O. Smith und J. C. Venter (1997). "Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*." Nature **390**: 580-586.
- Fukunaga, M., A. Hamase, K. Okada und M. Nakao (1996). "*Borrelia tanukii* sp. nov. and *Borrelia turdae* sp. nov. found from ixodid ticks in Japan: Rapid species identification by 16S rRNA gene-targeted PCR analysis." Microbiol. Immunol. **40**: 877-881.
- Gasque, P. (2004). "Complement: a unique innate immune sensor for danger signals." Mol. Immunol. **41**: 1089-1098.
- Gautam, A., M. Hathaway, N. McClain, G. Ramesh und R. Ramamoorthy (2008). "Analysis of the determinants of *bba64* (P35) gene expression in *Borrelia burgdorferi* using a gfp reporter." Microbiology **154**: 275-285.
- Gern, L. (2009). "Life cycle of *Borrelia burgdorferi sensu lato* and transmission to humans." Curr. Probl. Dermatol. **37**: 18-30.
- Glockner, G., R. Lehmann, A. Romualdi, S. Pradella, U. Schulte-Spechtel, M. Schilhabel, B. Wilske, J. Suhnel und M. Platzner (2004). "Comparative analysis of the *Borrelia garinii* genome." Nucl. Acids Res. **32**: 6038-6046.

- Gordon, D. L., R. M. Kaufman, T. K. Blackmore, J. Kwong und D. M. Lublin (1995). "Identification of complement regulatory domains in human factor H." J. Immunol. **155**: 348-356.
- Gros, P., F. J. Milder und B. J. C. Janssen (2008). "Complement driven by conformational changes." Nat. Rev. Immunol. **8**: 48-58.
- Hackstadt, T. (1988). "Steric hindrance of antibody binding to surface proteins of *Coxiella burnetii* by phase I lipopolysaccharide." Infect. Immun. **56**: 802-807.
- Hageman, G. S., D. H. Anderson, L. V. Johnson, L. S. Hancox, A. J. Taiber, L. I. Hardisty, J. L. Hageman, H. A. Stockman, J. D. Borchardt, K. M. Gehrs, R. J. Smith, G. Silvestri, S. R. Russell, C. C. Klaver, I. Barbazetto, S. Chang, L. A. Yannuzzi, G. R. Barile, J. C. Merriam, R. T. Smith, A. K. Olsh, J. Bergeron, J. Zernant, J. E. Merriam, B. Gold, M. Dean und R. Allikmets (2005). "A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **102**: 7227-7232.
- Hallstrom, T., P. F. Zipfel, A. M. Blom, N. Lauer, A. Forsgren und K. Riesbeck (2008). "*Haemophilus influenzae* interacts with the human complement inhibitor factor H." J. Immunol. **181**: 537-545.
- Hallstrom, T., K. Haupt, P. Kraiczy, P. Hortschansky, R. Wallich, C. Skerka und P. F. Zipfel (2010). "Complement regulator-acquiring surface protein 1 of *Borrelia burgdorferi* binds to human bone morphogenetic protein 2, several extracellular matrix proteins, and plasminogen." J. Infect. Dis. **202**: 490-498.
- Hammerschmidt, S., V. Agarwal, A. Kunert, S. Haelbich, C. Skerka und P. F. Zipfel (2007). "The host immune regulator factor H interacts via two contact sites with the PspC protein of *Streptococcus pneumoniae* and mediates adhesion to host epithelial cells." J. Immunol. **178**: 5848-5858.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." J. Mol. Biol. **166**: 557-580.
- Hartmann, K., C. Corvey, C. Skerka, M. Kirschfink, M. Karas, V. Brade, J. C. Miller, B. Stevenson, R. Wallich, P. F. Zipfel und P. Kraiczy (2006). "Functional characterization of BbCRASP-2, a distinct outer membrane protein of *Borrelia burgdorferi* that binds host complement regulators factor H and FHL-1." Mol. Microbiol. **61**: 1220-1236.
- Haupt, K., P. Kraiczy, R. Wallich, V. Brade, C. Skerka und P. Zipfel (2007). "Binding of human factor H-related protein 1 to serum-resistant *Borrelia burgdorferi* is mediated by borrelial complement regulator-acquiring surface proteins." J. Infect. Dis. **196**: 124-133.
- Haupt, K., P. Kraiczy, R. Wallich, V. Brade, C. Skerka und P. F. Zipfel (2008a). "FHR-1, an additional human plasma protein, binds to complement regulator-acquiring surface proteins of *Borrelia burgdorferi*." Int. J. Med. Microbiol. **298 S1**: 287-291.
- Haupt, K., M. Reuter, J. van den Elsen, J. Burman, S. Halbich, J. Richter, C. Skerka und P. F. Zipfel (2008b). "The *Staphylococcus aureus* protein Sbi acts as a complement inhibitor and forms a tripartite complex with host complement factor H and C3b." PLoS Pathog. **4**: e1000250.
- Hauser, P. M., W. D. Crabb, M. G. Fiora, F. Scoffone und A. Galizzi (1991). "Genetic analysis of the *flaA* locus of *Bacillus subtilis*." J. Bacteriol. **173**: 3580-3583.
- Hefty, P. S., S. E. Jolliff, M. J. Caimano, S. K. Wikel und D. R. Akins (2002). "Changes in temporal and spatial patterns of outer surface lipoprotein

- expression generate population heterogeneity and antigenic diversity in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*." Infect. Immun. **70**: 3468-3478.
- Heinen, S., P. Sanchez-Corral, M. S. Jackson, L. Strain, J. A. Goodship, E. J. Kemp, C. Skerka, T. S. Jokiranta, K. Meyers, E. Wagner, P. Robitaille, J. Esparza-Gordillo, S. Rodriguez de Cordoba, P. F. Zipfel und T. H. Goodship (2006). "De novo gene conversion in the RCA gene cluster (1q32) causes mutations in complement factor H associated with atypical hemolytic uremic syndrome." Hum. Mutat. **27**: 292-293.
- Heinen, S., U. Wiehl, N. Lauer, H.-M. Dahse, A. Hartmann, S. Schirmer, T. Enghardt, R. Wallich, S. Hälbich, M. Mihlan, U. Schlötzer-Schrehardt, P. Zipfel und C. Skerka (2008). "Disease associated protein complement factor H related protein 1 (CFHR1) is a regulator of the human alternative complement pathway." Mol. Immunol. **45**: 4104-4104.
- Heinen, S., A. Hartmann, N. Lauer, U. Wiehl, H.-M. Dahse, S. Schirmer, K. Gropp, T. Enghardt, R. Wallich, S. Halbich, M. Mihlan, U. Schlotzer-Schrehardt, P. F. Zipfel und C. Skerka (2009). "Factor H related protein 1 (CFHR-1) inhibits complement C5 convertase activity and terminal complex formation." Blood. **114**: 2439-2447.
- Hellwage, J., C. Skerka und P. F. Zipfel (1997). "Biochemical and functional characterization of the factor-H-related protein 4 (FHR-4)." Immunopharmacology **38**: 149-157.
- Hellwage, J., T. Meri, T. Heikkila, A. Alitalo, J. Panelius, P. Lahdenne, I. J. T. Seppala und S. Meri (2001). "The complement regulator factor H binds to the surface protein OspE of *Borrelia burgdorferi*." J. Biol. Chem. **276**: 8427-8435.
- Hellwage, J., T. S. Jokiranta, M. A. Friese, T. U. Wolk, E. Kampen, P. F. Zipfel und S. Meri (2002). "Complement C3b/C3d and cell surface polyanions are recognized by overlapping binding sites on the most carboxyl-terminal domain of complement factor H." J. Immunol. **169**: 6935-6944.
- Herzberger, P., C. Siegel, C. Skerka, V. Fingerle, U. Schulte-Spechtel, A. van Dam, B. Wilske, V. Brade, P. F. Zipfel, R. Wallich und P. Kraiczy (2007). "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. **75**: 4817-4825.
- Hovis, K. M., J. V. McDowell, L. Griffin und R. T. Marconi (2004). "Identification and characterization of a linear-plasmid-encoded factor H-binding protein (FhbA) of the relapsing fever spirochete *Borrelia hermsii*." J. Bacteriol. **186**: 2612-2618.
- Hunfeld, K. P., P. Kraiczy, T. A. Wichelhaus, V. Schafer und V. Brade (2000). "New colorimetric microdilution method for in vitro susceptibility testing of *Borrelia burgdorferi* against antimicrobial substances." Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **19**: 27-32.
- Jarva, H., J. Hellwage, T. S. Jokiranta, M. J. Lehtinen, P. F. Zipfel und S. Meri (2004). "The group B streptococcal {beta} and pneumococcal Hic proteins are structurally related immune evasion molecules that bind the complement inhibitor factor H in an analogous fashion." J. Immunol. **172**: 3111-3118.
- Jewett, M. W., R. Byram, A. Bestor, K. Tilly, K. Lawrence, M. N. Burtnick, F. Gherardini und P. A. Rosa (2007). "Genetic basis for retention of a critical virulence plasmid of *Borrelia burgdorferi*." Mol. Microbiol. **66**: 975-990.
- Johnson, R. C., F. W. Hyde und C. M. Rumpel (1984a). "Taxonomy of the Lyme disease spirochetes." Yale J. Biol. Med. **57**: 529-537.

- Johnson, R. C., G. P. Schmid, F. W. Hyde, A. G. Steigerwalt und D. J. Brenner (1984b). "*Borrelia burgdorferi* sp. nov.: Etiologic agent of Lyme disease." Int. J. Syst. Bacteriol. **34**: 496-497.
- Jokiranta, T. S., J. Hellwage, V. Koistinen, P. F. Zipfel und S. Meri (2000). "Each of the three binding sites on complement factor H interacts with a distinct site on C3b." J. Biol. Chem. **275**: 27657-27662.
- Józsi, M. und P. F. Zipfel (2008). "Factor H family proteins and human diseases." Trends Immunol. **29**: 380-387.
- Kenedy, M. R., S. R. Vuppala, C. Siegel, P. Kraiczy und D. R. Akins (2009). "CspA-mediated binding of human factor H inhibits complement deposition and confers serum resistance in *Borrelia burgdorferi*." Infect. Immun. **77**: 2773-2782.
- Klos, A., A. J. Tenner, K. O. Johswich, R. R. Ager, E. S. Reis und J. Kohl (2009). "The role of the anaphylatoxins in health and disease." Mol. Immunol. **46**: 2753-2766.
- Kraiczy, P., K. P. Hunfeld, S. Breitner-Ruddock, R. Wurzner, G. Acker und V. Brade (2000). "Comparison of two laboratory methods for the determination of serum resistance in *Borrelia burgdorferi* isolates." Immunobiology **201**: 406-419.
- Kraiczy, P., C. Skerka, V. Brade und P. F. Zipfel (2001a). "Further characterization of complement regulator-acquiring surface proteins of *Borrelia burgdorferi*." Infect. Immun. **69**: 7800-7809.
- Kraiczy, P., C. Skerka, M. Kirschfink, V. Brade und P. F. Zipfel (2001b). "Immune evasion of *Borrelia burgdorferi* by acquisition of human complement regulators FHL-1/reconnectin and factor H." Eur. J. Immunol. **31**: 1674-1684.
- Kraiczy, P., C. Skerka, M. Kirschfink, P. F. Zipfel und V. Brade (2001c). "Mechanism of complement resistance of pathogenic *Borrelia burgdorferi* isolates." Int. Immunopharmacol. **1**: 393-401.
- Kraiczy, P., C. Skerka, M. Kirschfink, P. F. Zipfel und V. Brade (2002a). "Immune evasion of *Borrelia burgdorferi*: insufficient killing of the pathogens by complement and antibody." Int. J. Med. Microbiol. **291**: 141-146.
- Kraiczy, P., C. Skerka, P. F. Zipfel und V. Brade (2002b). "Complement regulator-acquiring surface proteins of *Borrelia burgdorferi*: a new protein family involved in complement resistance." Wien. Klin. Wochenschr. **114**: 568-573.
- Kraiczy, P., J. Hellwage, C. Skerka, M. Kirschfink, V. Brade, P. F. Zipfel und R. Wallich (2003). "Immune evasion of *Borrelia burgdorferi*: mapping of a complement-inhibitor factor H-binding site of BbCRASP-3, a novel member of the Erp protein family." Eur. J. Immunol. **33**: 697-707.
- Kraiczy, P. (2004). "Natürliche Komplementresistenz und humorale Immunabwehr bei *Borrelia burgdorferi*, dem Erreger der Lyme-Borreliose." Aachen, Shaker Verlag.
- Kraiczy, P., K. Hartmann, J. Hellwage, C. Skerka, M. Kirschfink, V. Brade, P. F. Zipfel, R. Wallich und B. Stevenson (2004a). "Immunological characterization of the complement regulator factor H-binding CRASP and Erp proteins of *Borrelia burgdorferi*." Int. J. Med. Microbiol. **293**: 152-157.
- Kraiczy, P., J. Hellwage, C. Skerka, H. Becker, M. Kirschfink, M. M. Simon, V. Brade, P. F. Zipfel und R. Wallich (2004b). "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. **279**: 2421-2429.

- Kraiczy, P. und R. Wurzner (2006). "Complement escape of human pathogenic bacteria by acquisition of complement regulators." Mol. Immunol. **43**: 31-44.
- Kraiczy, P., J. Schreiber, C. Skerka, K. Haupt, V. Brade, R. Wallich und P. F. Zipfel (2008a). "Assessment of the regions within complement regulator-acquiring surface protein (CRASP)-2 of *Borrelia burgdorferi* required for interaction with host immune regulators FHL-1 and factor H " Int. J. Med. Microbiol. **298**: 268-271
- Kraiczy, P., A. Seling, C. A. Brissette, E. Rossmann, K. P. Hunfeld, T. Bykowski, L. H. Burns, M. J. Troese, A. E. Cooley, J. C. Miller, V. Brade, R. Wallich, S. Casjens und B. Stevenson (2008b). "*Borrelia burgdorferi* complement regulator-acquiring surface protein 2 (CspZ) as a serological marker of human Lyme disease." Clin. Vaccine Immunol. **15**: 484-491.
- Kraiczy, P., C. Hanssen-Hubner, V. Kitiratschky, C. Brenner, S. Besier, V. Brade, M. M. Simon, C. Skerka, P. Roversi, S. M. Lea, B. Stevenson, R. Wallich und P. F. Zipfel (2009). "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. **299**: 255-268.
- Krupka, M., M. Raska, J. Belakova, M. Horynova, R. Novotny und E. Weigl (2007). "Biological aspects of Lyme disease spirochetes: unique bacteria of the *Borrelia burgdorferi* species group." Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub **151**: 175-186.
- Kudryashev, M., M. Cyrklaff, W. Baumeister, M. M. Simon, R. Wallich und F. Frischknecht (2009). "Comparative cryo-electron tomography of pathogenic Lyme disease spirochetes." Mol. Microbiol. **71**: 1415-1434.
- Kühn, S. und P. F. Zipfel (1995). "The baculovirus expression vector pBSV-8His directs secretion of histidine-tagged proteins." Gene **162**: 225-229.
- Kurtenbach, K., S. De Michelis, S. Etti, S. M. Schafer, H. S. Sewell, V. Brade und P. Kraiczy (2002). "Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato - the key role of host complement." Trends Microbiol. **10**: 74-79.
- Kurtenbach, K., A. G. Hoen, S. J. Bent, S. A. Vollmer, N. H. Ogden und G. Margos (2010). "Population Biology of Lyme Borreliosis spirochetes", John Wiley & Sons, Inc.
- Labandeira-Rey, M. und J. T. Skare (2001). "Decreased infectivity in *Borrelia burgdorferi* strain B31 is associated with loss of linear plasmid 25 or 28-1." Infect. Immun. **69**: 446-455.
- Labandeira-Rey, M., J. Seshu und J. T. Skare (2003). "The absence of linear plasmid 25 or 28-1 of *Borrelia burgdorferi* dramatically alters the kinetics of experimental infection via distinct mechanisms." Infect. Immun. **71**: 4608-4613.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**: 680-685.
- Lambris, J. D., D. Ricklin und B. V. Geisbrecht (2008). "Complement evasion by human pathogens." Nat Rev Micro **6**: 132-142.
- Lawrie, C. H., S. E. Randolph und P. A. Nuttall (1999). "Ixodes ticks: Serum species sensitivity of anticomplement activity." Exp. Parasitol. **93**: 207-214.
- Le Fleche, A., D. Postic, K. Girardet, O. Peter und G. Baranton (1997). "Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis." Int. J. Syst. Bacteriol. **47**: 921-925.

- Limberger, R. J. (2004). "The periplasmic flagellum of spirochetes." J. Mol. Microbiol. Biotechnol. **7**: 30-40.
- Ma, J. und R. T. Coughlin (1993). "A simple, colorimetric microtiter assay for borreliacidal activity of antisera." J. Microbiol. Methods **17**: 145-153.
- Male, D. A., R. J. Ormsby, S. Ranganathan, E. Giannakis und D. L. Gordon (2000). "Complement factor H: sequence analysis of 221 kb of human genomic DNA containing the entire fH, fHR-1 and fHR-3 genes." Mol Immunol **37**: 41-52.
- Marconi, R. T., D. Liveris und I. Schwartz (1995). "Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates." J. Clin. Microbiol. **33**: 2427-2434.
- Margos, G., S. A. Vollmer, M. Cornet, M. Garnier, V. Fingerle, B. Wilske, A. Bormane, L. Vitorino, M. Collares-Pereira, M. Drancourt und K. Kurtenbach (2009). "A new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes." Appl. Environ. Microbiol. **75**: 5410-5416.
- Markiewski, M. M. und J. D. Lambris (2007). "The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight." Am. J. Pathol. **171**: 715-727.
- Masuzawa, T., N. Takada, M. Kudaken, T. Fukui, Y. Yano, F. Ishiguro, Y. Kawamura, Y. Imai und T. Ezaki (2001). "*Borrelia sinica* sp. nov., a Lyme disease-related *Borrelia* species isolated in China." Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **51**: 1817-1824.
- Mbow, M. L., R. D. Gilmore, B. Stevenson, W. T. Golde, J. Piesman und B. J. B. Johnson (2002). "*Borrelia burgdorferi*-specific monoclonal antibodies derived from mice primed with Lyme disease spirochete-infected *Ixodes scapularis* ticks." Hybrid. Hybridomics **21**: 179-182.
- McDowell, J. V., J. Wolfgang, E. Tran, M. S. Metts, D. Hamilton und R. T. Marconi (2003). "Comprehensive analysis of the factor H binding capabilities of *Borrelia* species associated with Lyme disease: Delineation of two distinct classes of factor H binding proteins." Infect. Immun. **71**: 3597-3602.
- McDowell, J. V., J. Wolfgang, L. Senty, C. M. Sundry, M. J. Noto und R. T. Marconi (2004). "Demonstration of the involvement of outer surface protein E coiled coil structural domains and higher order structural elements in the binding of infection-induced antibody and the complement-regulatory protein, factor H." J. Immunol. **173**: 7471-7480.
- McDowell, J. V., M. E. Harlin, E. A. Rogers und R. T. Marconi (2005). "Putative coiled-coil structural elements of the BBA68 protein of Lyme disease spirochetes are required for formation of its factor H binding site." J. Bacteriol. **187**: 1317-1323.
- McRae, J. L., P. J. Cowan, D. A. Power, K. I. Mitchelhill, B. E. Kemp, B. P. Morgan und B. F. Murphy (2001). "Human factor H-related protein 5 (FHR-5). a new complement-associated protein." J. Biol. Chem. **276**: 6747-6754.
- McRae, J. L., B. E. Murphy, H. J. Eyre, G. R. Sutherland, J. Crawford und P. J. Cowan (2002). "Location and structure of the human FHR-5 gene." Genetica **114**: 157-61.
- McRae, J. L., T. G. Duthy, K. M. Griggs, R. J. Ormsby, P. J. Cowan, B. A. Cromer, W. J. McKinstry, M. W. Parker, B. F. Murphy und D. L. Gordon (2005). "Human factor H-related protein 5 has cofactor activity, inhibits C3 convertase

- activity, binds heparin and C-reactive protein, and associates with lipoprotein." J. Immunol. **174**: 6250-6256.
- Mehlhorn, H. (2008). "Encyclopedia of Parasitology." Berlin, Springer-Verlag.
- Meri, S. und M. K. Pangburn (1990). "Discrimination between activators and nonactivators of the alternative pathway of complement: regulation via a sialic acid/polyanion binding site on factor H." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **87**: 3982-3986.
- Meri, S. und M. K. Pangburn (1994). "Regulation of alternative pathway complement activation by glycosaminoglycans: specificity of the polyanion binding site on factor H." Biochem. Biophys. Res. Commun. **198**: 52-59.
- Meri, T., A. Hartmann, D. Lenk, R. Eck, R. Wurzner, J. Hellwage, S. Meri und P. F. Zipfel (2002). "The yeast *Candida albicans* binds complement regulators factor H and FHL-1." Infect. Immun. **70**: 5185-5192.
- Metts, M. S., J. V. McDowell, M. Theisen, P. R. Hansen und R. T. Marconi (2003). "Analysis of the OspE determinants involved in binding of factor H and OspE-targeting antibodies elicited during *Borrelia burgdorferi* infection in mice." Infect. Immun. **71**: 3587-3596.
- Miller, J. C., N. El-Hage, K. Babb und B. Stevenson (2000). "*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. **38**: 1569-1574.
- Miller, J. C., K. von Lackum, K. Babb, J. D. McAlister und B. Stevenson (2003). "Temporal analysis of *Borrelia burgdorferi* Erp protein expression throughout the mammal-tick infectious cycle." Infect. Immun. **71**: 6943-6952.
- Miller, J. C., K. von Lackum, M. E. Woodman und B. Stevenson (2006). "Detection of *Borrelia burgdorferi* gene expression during mammalian infection using transcriptional fusions that produce green fluorescent protein." Microb. Pathog. **41**: 43-47.
- Morgenstern, K. (2008). "Untersuchungen zur in vitro Empfindlichkeit gegen Antibiotika und zur molekularen Charakteristik von *Borrelia spielmanii* im Vergleich zu anderen humanpathogenen Vertretern des *Borrelia burgdorferi*-Komplexes.", Dissertation Justus-Liebig-Universität Giessen.
- Moriarty, T. J., M. U. Norman, P. Colarusso, T. Bankhead, P. Kubes und G. Chaconas (2008). "Real-time high resolution 3D imaging of the Lyme disease spirochete adhering to and escaping from the vasculature of a living host." PLoS Pathog. **4**: e1000090.
- Murgia, R., C. Piazzetta und M. Cinco (2002). "Cystic forms of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: Induction, development, and the role of RpoS." Wien. Klin. Wochenschr. **114**: 574-579.
- Murphy, B. F., J. R. Saunders, M. K. O'Bryan, L. Kirszbaum, I. D. Walker und A. J. d'Apice (1989). "SP-40,40 is an inhibitor of C5b-6-initiated haemolysis." Int. Immunol. **1**: 551-554.
- Nau, R., H.-J. Christen und H. Eiffert (2009). "Lyme disease — Current state of knowledge." Deutsches Ärzteblatt International **106**: 72-82.
- Nordahl, E. A., V. Rydengard, P. Nyberg, D. P. Nitsche, M. Morgelin, M. Malmsten, L. Bjorck und A. Schmidtchen (2004). "Activation of the complement system generates antibacterial peptides." Proc Natl Acad Sci U S A **101**: 16879-16884.
- Okemefuna, A. I., K. Li, R. Nan, R. J. Ormsby, T. Sadlon, D. L. Gordon und S. J. Perkins (2009). "Multimeric interactions between complement factor H and its

- C3d ligand provide new insight on complement regulation." J. Mol. Biol. **391**: 119-135.
- Ormsby, R. J., T. S. Jokiranta, T. G. Duthy, K. M. Griggs, T. A. Sadlon, E. Giannakis und D. L. Gordon (2006). "Localization of the third heparin-binding site in the human complement regulator factor H1." Mol. Immunol. **43**: 1624-1632.
- Palmer, N., C. Fraser und S. Casjens (2000). "Distribution of twelve linear extrachromosomal DNAs in natural isolates of Lyme disease spirochetes." J. Bacteriol. **182**: 2476-2480.
- Pandiripally, V., L. Wei, C. Skerka, P. F. Zipfel und D. Cue (2003). "Recruitment of complement factor H-like protein 1 promotes intracellular invasion by group A streptococci." Infect. Immun. **71**: 7119-7128.
- Pangburn, M. K., R. D. Schreiber und H. J. Muller-Eberhard (1977). "Human complement C3b inactivator: isolation, characterization, and demonstration of an absolute requirement for the serum protein beta1H for cleavage of C3b and C4b in solution." J. Exp. Med. **146**: 257-270.
- Pangburn, M. K. (1998). "Alternative pathway: activation and regulation." The Complement System. K. Rother, G. O. Till, G. M. Hänsch. Berlin, Springer.
- Park, C. T. und S. D. Wright (1996). "Plasma lipopolysaccharide-binding protein is found associated with a particle containing apolipoprotein A-I, phospholipid, and factor H-related proteins." J. Biol. Chem. **271**: 18054-18060.
- Park, C. T. und S. D. Wright (2000). "Fibrinogen is a component of a novel lipoprotein particle: Factor H-related protein (FHRP)-associated lipoprotein particle (FALP)." Blood **95**: 198-204.
- Posey, J. E. und F. C. Gherardini (2000). "Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen." Science **288**: 1651-1653.
- Postic, D., N. M. Ras, R. S. Lane, M. Hendson und G. Baranton (1998). "Expanded diversity among californian *Borrelia* isolates and description of *Borrelia bissetii* sp. nov. (formerly *Borrelia* group DN127)." J. Clin. Microbiol. **36**: 3497-3504.
- Postic, D., M. Garnier und G. Baranton (2007). "Multilocus sequence analysis of atypical *Borrelia burgdorferi sensu lato* isolates - description of *Borrelia californiensis* sp. nov., and genomospecies 1 and 2." Int. J. Med. Microbiol. **297**: 263-271.
- Prodinger, W. M., J. Hellwege, M. Spruth, M. P. Dierich und P. F. Zipfel (1998). "The C-terminus of factor H: monoclonal antibodies inhibit heparin binding and identify epitopes common to factor H and factor H-related proteins." Biochem. J. **331**: 41-47.
- Purser, J. E., M. B. Lawrenz, M. J. Caimano, J. K. Howell, J. D. Radolf und S. J. Norris (2003). "A plasmid-encoded nicotinamidase (PncA) is essential for infectivity of *Borrelia burgdorferi* in a mammalian host." Mol. Microbiol. **48**: 753-764.
- Ren, B., M. A. McCrory, C. Pass, D. C. Bullard, C. M. Ballantyne, Y. Xu, D. E. Briles und A. J. Szalai (2004). "The virulence function of *Streptococcus pneumoniae* surface protein A involves inhibition of complement activation and impairment of complement receptor-mediated protection." J. Immunol. **173**: 7506-7512.
- Ribeiro, J. M. (1987). "*Ixodes dammini*: salivary anti-complement activity." Exp. Parasitol. **64**: 347-353.
- Ribeiro, J. M., T. N. Mather, J. Piesman und A. Spielman (1987). "Dissemination and salivary delivery of Lyme disease spirochetes in vector ticks (Acari: Ixodidae)." J. Med. Entomol. **24**: 201-205.

- Richter, D., D. Postic, N. Sertour, I. Livey, F. R. Matuschka und G. Baranton (2006). "Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu lato* species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. nov." Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **56**: 873-881.
- Rogers, E. A. und R. T. Marconi (2007). "Delineation of species-specific binding properties of the CspZ protein (BBH06) of Lyme disease spirochetes: evidence for new contributions to the pathogenesis of *Borrelia* spp." Infect. Immun. **75**: 5272-5281.
- Rogers, E. A., S. V. Abdunnur, J. V. McDowell und R. T. Marconi (2009a). "Comparative analysis of the properties and ligand binding characteristics of CspZ, a factor H binding protein, derived from *Borrelia burgdorferi* isolates of human origin." Infect. Immun. **77**: 4396-4405.
- Rogers, E. A., D. Terekhova, H. M. Zhang, K. M. Hovis, I. Schwartz und R. T. Marconi (2009b). "Rrp1, a cyclic-di-GMP-producing response regulator, is an important regulator of *Borrelia burgdorferi* core cellular functions." Mol. Microbiol. **71**: 1551-1573.
- Rooijackers, S. H. und J. A. van Strijp (2007). "Bacterial complement evasion." Mol. Immunol. **44**: 23-32.
- Rosa, P. A., K. Tilly und P. E. Stewart (2005). "The burgeoning molecular genetics of the Lyme disease spirochaete." Nat. Rev. Microbiol. **3**: 129-143.
- Rossmann, E., V. Kitziratschky, H. Hofmann, P. Kraiczky, M. M. Simon und R. Wallich (2006). "*Borrelia burgdorferi* complement regulator-acquiring surface protein 1 of the Lyme disease spirochetes is expressed in humans and induces antibody responses restricted to non-denatured structural determinants." Infect. Immun. **74**: 7024-7028.
- Samuels, D. S., R. T. Marconi und C. F. Garon (1993). "Variation in the size of the *ospA*-containing linear plasmid, but not the linear chromosome, among the three *Borrelia* species associated with Lyme disease." J. Gen. Microbiol. **139**: 2445-2449.
- Samuels, D. S., K. E. Mach und C. F. Garon (1994). "Genetic transformation of the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi* with coumarin-resistant *gyrB*." J. Bacteriol. **176**: 6045-6049.
- Samuels, D. S. (1995). "Electrotransformation of the spirochete *Borrelia burgdorferi*." Methods Mol. Biol. **47**: 253-9.
- Sartakova, M., E. Dobrikova und F. C. Cabello (2000). "Development of an extrachromosomal cloning vector system for use in *Borrelia burgdorferi*." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **97**: 4850-4855.
- Schägger, H. und G. von Jagow (1987). "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa." Anal. Biochem. **166**: 368-379.
- Schmidt, C. Q., A. P. Herbert, D. Kavanagh, C. Gandy, C. J. Fenton, B. S. Blaum, M. Lyon, D. Uhrin und P. N. Barlow (2008). "A new map of glycosaminoglycan and C3b binding sites on factor H." J. Immunol. **181**: 2610-2619.
- Schneider, M. C., R. M. Exley, H. Chan, I. Feavers, Y. H. Kang, R. B. Sim und C. M. Tang (2006). "Functional significance of factor H binding to *Neisseria meningitidis*." J. Immunol. **176**: 7566-7575.
- Schreiber, J. (2010). Analyse des molekularen Bindungsmechanismus zwischen BbCRASP-2 von *Borrelia burgdorferi* und den Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1. Dissertation Klinikum der Universität Frankfurt am Main. Frankfurt am Main.

- Shi, Y., Q. Xu, S. V. Seemanaplli, K. McShan und F. T. Liang (2008). "Common and unique contributions of decorin-binding proteins A and B to the overall virulence of *Borrelia burgdorferi*." PLoS ONE **3**: e3340.
- Siegel, C., J. Schreiber, K. Haupt, C. Skerka, V. Brade, M. M. Simon, B. Stevenson, R. Wallich, P. F. Zipfel und P. Kraiczy (2008). "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. **283**: 34855-34863.
- Sim, R. B., K. Kolble, M. A. McAleer, O. Dominguez und V. M. Dee (1993). "Genetics and deficiencies of the soluble regulatory proteins of the complement system." Int Rev Immunol **10**: 65-86.
- Skerka, C., R. D. Horstmann und P. F. Zipfel (1991). "Molecular cloning of a human serum protein structurally related to complement factor H." J. Biol. Chem. **266**: 12015-12020.
- Skerka, C., C. Timmann, R. D. Horstmann und P. F. Zipfel (1992). "Two additional human serum proteins structurally related to complement factor H. Evidence for a family of factor H-related genes." J. Immunol. **148**: 3313-3318.
- Skerka, C. und P. F. Zipfel (2008). "Complement factor H related proteins in immune diseases." Vaccine **26**: 9-14.
- Stevenson, B., J. L. Bono, T. G. Schwan und P. Rosa (1998). "*Borrelia burgdorferi* Erp proteins are immunogenic in mammals infected by tick bite, and their synthesis is inducible in cultured bacteria." Infect. Immun. **66**: 2648-2654.
- Stevenson, B., N. El-Hage, M. A. Hines, J. C. Miller und K. Babb (2002). "Differential binding of host complement inhibitor factor H by *Borrelia burgdorferi* Erp surface proteins: a possible mechanism underlying the expansive host range of Lyme disease spirochetes." Infect. Immun. **70**: 491-497.
- Stevenson, B., K. von Lackum, S. P. Riley, A. E. Cooley, M. E. Woodman und T. Bykowski (2006). "Evolving models of Lyme disease spirochete gene regulation." Wien. Klin. Wochenschr. **118**: 643-652.
- Stewart, P. E., R. Thalken, J. L. Bono und P. Rosa (2001). "Isolation of a circular plasmid region sufficient for autonomous replication and transformation of infectious *Borrelia burgdorferi*." Mol. Microbiol. **39**: 714-721.
- Stewart, P. E., G. Chaconas und P. Rosa (2003). "Conservation of plasmid maintenance functions between linear and circular plasmids in *Borrelia burgdorferi*." J. Bacteriol. **185**: 3202-3209.
- Stoiber, H., C. Pinter, A. G. Siccardi, A. Clivio und M. P. Dierich (1996). "Efficient destruction of human immunodeficiency virus in human serum by inhibiting the protective action of complement factor H and decay accelerating factor (DAF, CD55)." J. Exp. Med. **183**: 307-310.
- Su, H. R. (1996). "S-protein/vitronectin interaction with the C5b and the C8 of the complement membrane attack complex." Int. Arch. Allergy Immunol. **110**: 314-317.
- Thern, A., L. Stenberg, B. Dahlback und G. Lindahl (1995). "Ig-binding surface proteins of *Streptococcus pyogenes* also bind human C4b-binding protein (C4BP), a regulatory component of the complement system." J. Immunol. **154**: 375-386.
- Tilly, K., P. A. Rosa und P. E. Stewart (2008). "Biology of infection with *Borrelia burgdorferi*." Infect. Dis. Clin. North Am. **22**: 217-234.
- Timmann, C., M. Leippe und R. D. Horstmann (1991). "Two major serum components antigenically related to complement factor H are different

- glycosylation forms of a single protein with no factor H- like complement regulatory functions." J. Immunol. **146**: 1265-1270.
- Tyson, K., C. Elkins, H. Patterson, E. Fikrig und A. de Silva (2007). "Biochemical and functional characterization of Salp20, an *Ixodes scapularis* tick salivary protein that inhibits the complement pathway." Insect Mol. Biol. **16**: 469-479.
- van Dam, A. P., A. Oei, R. Jaspars, C. Fijen, B. Wilske, L. Spanjaard und J. Dankert (1997). "Complement-mediated serum sensitivity among spirochetes that cause Lyme disease." Infect. Immun. **65**: 1228-1236.
- van der Ley, P., P. de Graaff und J. Tommassen (1986). "Shielding of *Escherichia coli* outer membrane proteins as receptors for bacteriophages and colicins by O-antigenic chains of lipopolysaccharide." J. Bacteriol. **168**: 449-451.
- von Lackum, K., J. C. Miller, T. Bykowski, S. P. Riley, M. E. Woodman, V. Brade, P. Kraiczy, B. Stevenson und R. Wallich (2005). "*Borrelia burgdorferi* regulates expression of complement regulator-acquiring surface protein 1 during the mammal-tick infection cycle." Infect. Immun. **73**: 7398-7405.
- Wallich, R., O. Jahraus, T. Stehle, T. T. Tran, C. Brenner, H. Hofmann, L. Gern und M. M. Simon (2003). "Artificial-infection protocols allow immunodetection of novel *Borrelia burgdorferi* antigens suitable as vaccine candidates against Lyme disease." Eur. J. Immunol. **33**: 708-719.
- Wallich, R., J. Pattathu, V. Kitiratschky, C. Brenner, P. F. Zipfel, V. Brade, M. M. Simon und P. Kraiczy (2005). "Identification and functional characterization of complement regulator-acquiring surface protein 1 of the Lyme disease spirochetes *Borrelia afzelii* and *Borrelia garinii*." Infect. Immun. **73**: 2351-2359.
- Wallich, R., P. F. Zipfel, C. Skerka, M. Kirschfink, M. M. Simon, B. Stevenson, S. M. Lea und P. Kraiczy (2006). Lyme disease spirochetes evade innate immunity by acquisition of complement regulators, factor H and FHL-1. Amsterdam, The Netherlands, IOS Press BV.
- Walport, M. J. (2001a). "Complement- Second of two parts." N. Engl. J. Med. **344**: 1140-1144.
- Walport, M. J. (2001b). "Complement- First of two parts." N. Engl. J. Med. **344**: 1058-1066.
- Wang, G., A. P. van Dam, A. Le Fleche, D. Postic, O. Peter, G. Baranton, R. de Boer, L. Spanjaard und J. Dankert (1997). "Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19)." Int. J. Syst. Bacteriol. **47**: 926-932.
- Whaley, K. und S. Ruddy (1976). "Modulation of the alternative complement pathways by beta 1 H globulin." J. Exp. Med. **144**: 1147-1163.
- Wikel, S. K. (1999). "Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission." Int. J. Parasitol. **29**: 851-859.
- Wilske, B. (2005). "Epidemiology and diagnosis of Lyme borreliosis." Ann. Med. **37**: 568-579.
- Wu, J., Y. Q. Wu, D. Ricklin, B. J. Janssen, J. D. Lambris und P. Gros (2009). "Structure of complement fragment C3b-factor H and implications for host protection by complement regulators." Nat. Immunol. **10**: 728-733.
- Wywiał, E., J. Haven, S. R. Casjens, Y. A. Hernandez, S. Singh, E. F. Mongodin, C. M. Fraser-Liggett, B. J. Luft, S. E. Schutzer und W. G. Qiu (2009). "Fast, adaptive evolution at a bacterial host-resistance locus: The PFam54 gene array in *Borrelia burgdorferi*." Gene **445**: 26-37.

- Zipfel, P. F. und C. Skerka (1994). "Complement factor H and related proteins: an expanding family of complement-regulatory proteins?" Immunol Today **15**: 121-126.
- Zipfel, P. F., T. S. Jokiranta, J. Hellwage, V. Koistinen und S. Meri (1999). "The factor H protein family." Immunopharmacol. **42**: 53-60.
- Zipfel, P. F. und C. Skerka (1999). "FHL-1/reconectin: a human complement and immune regulator with cell-adhesive function." Immunol. Today **20**: 135-140.
- Zipfel, P. F., C. Skerka, J. Caprioli, T. Manuelian, H. H. Neumann, M. Noris und G. Remuzzi (2001). "Complement factor H and hemolytic uremic syndrome." Int. Immunopharmacol. **1**: 461-468.
- Zipfel, P. F., C. Skerka, J. Hellwage, S. T. Jokiranta, S. Meri, V. Brade, P. Kraiczy, M. Noris und G. Remuzzi (2002). "Factor H family proteins: On complement, microbes and human diseases." Biochem. Soc. Trans. **30**: 971-978.
- Zipfel, P. F., S. Heinen, M. Jozsi und C. Skerka (2006). "Complement and diseases: defective alternative pathway control results in kidney and eye diseases." Mol Immunol **43**: 97-106.

VII. Anhang

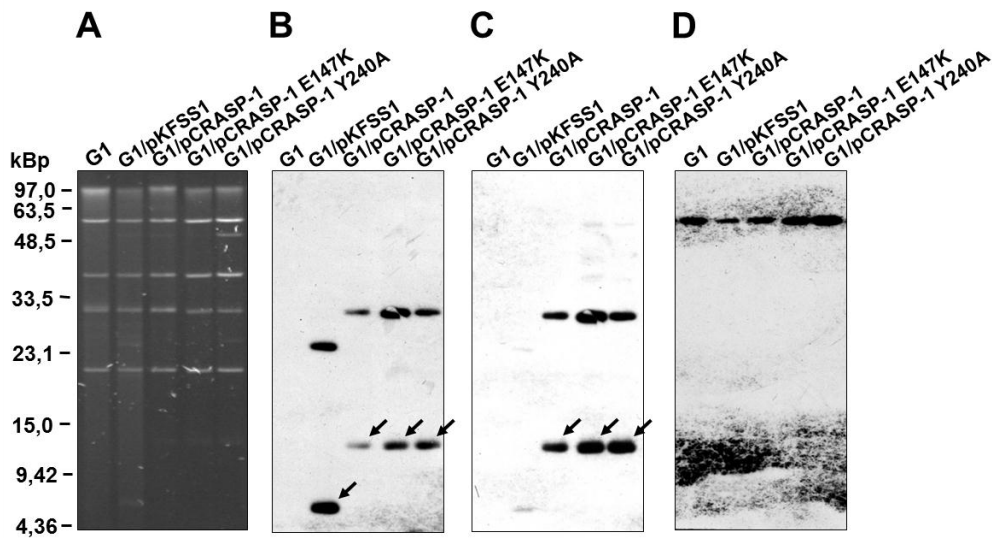


Abb. I: Vergleichende Plasmid-Analyse und Nachweis des *aadA*-Gens, des *cspA*-Gens und des *ospA*-Gens des Isolates *B. garinii* G1 und der Transformanten G1/pKFSS1, G1/pCRASP-1, G1/pCRASP-1 E147K und G1/pCRASP-1 Y240A.

In einem 1%igen Agarosegel wurden je 200 ng Plasmid-DNA des Isolates *B. garinii* G1 und der verschiedenen Transformanten mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese über 22 h aufgetrennt (A). Die DNA wurde auf eine Nylonmembran transferiert und mittels HRP-markierter Gensonden gegen *aadA* (B), *cspA* (C) und *ospA* (D) hybridisiert. Die Detektion hybridisierender DNA erfolgte durch das Chemilumineszenz-Verfahren. Mit Pfeilen markiert sind die erwarteten Signale.

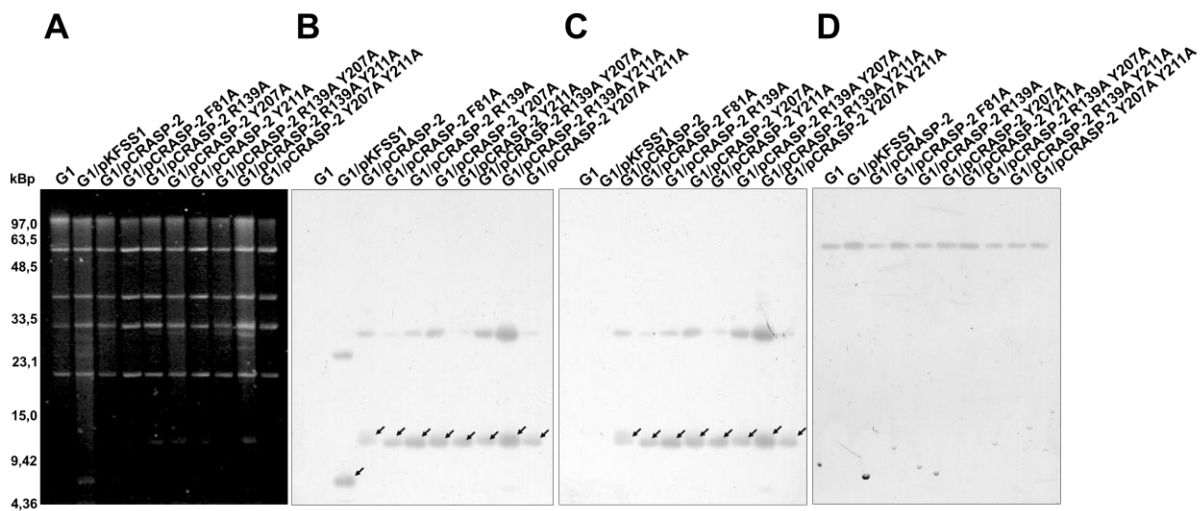


Abb. II: Vergleichende Plasmid-Analyse und Nachweis des *aadA*-Gens, des *cspZ*-Gens und des *ospA*-Gens des Isolates *B. garinii* G1 und verschiedener CRASP-2-tragender Transformanten.

In einem 1%igen Agarosegel wurden je 200 ng Plasmid-DNA des Isolates *B. garinii* G1 und der Transformanten G1/pKFSS1, G1/pCRASP-2, G1/pCRASP-2 F81A, G1/pCRASP-2 R139A, G1/pCRASP-2 Y207A, G1/pCRASP-2 Y211A, G1/pCRASP-2 R139A-Y207A, G1/pCRASP-2 R139A-Y211A und G1/pCRASP-2 Y207A-Y211A mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese über 22 h aufgetrennt (A). Die DNA wurde auf eine Nylonmembran transferiert und mittels HRP-markierter Gensonden gegen *aadA* (B), *cspZ* (C) und *ospA* (D) hybridisiert. Die Detektion hybridisierender DNA erfolgte durch Chemilumineszenz. Mit Pfeilen gekennzeichnet sind die erwarteten Signale.

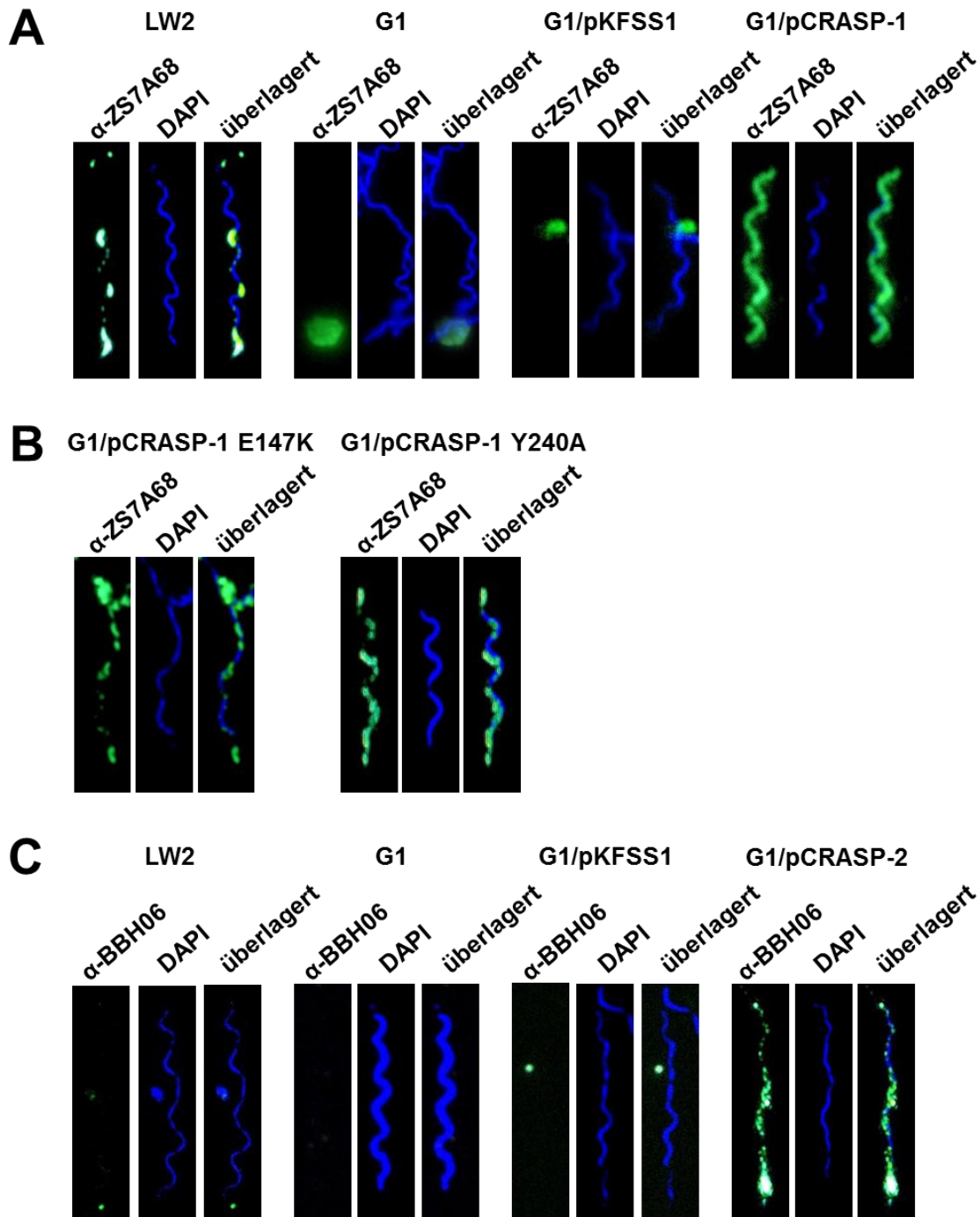


Abb. III: Lokalisation von CRASP-1 (A), von veränderten CRASP-1 (B) und von CRASP-2 (C) auf der Zelloberfläche transformierter *B. garinii* G1-Zellen.

Intakte Zellen der Isolate *B. burgdorferi* LW2 und *B. garinii* G1, der Transformante G1/pKFSS1 sowie der Transformanten G1/pCRASP-1 (A) bzw. der Transformanten G1/pCRASP-1 E147K und G1/pCRASP-1 Y240A (B) oder der Transformante G1/pCRASP-2 (C) wurden mit dem CRASP-1-spezifischen Antikörper anti-ZS7A68 (A und B) bzw. mit dem CRASP-2-spezifischen Antikörper anti-BBH06 (C) in einer jeweiligen Verdünnung von 1:50 inkubiert, anschließend 10 µl der Suspension auf Glasobjektträger pipettiert und die Zellen mit Methanol fixiert. Nach Inkubation der Objektträger mit dem sekundären Antikörper Alexa Fluor 488 Ziege anti-Maus IgG erfolgte die Visualisierung mittels Fluoreszenzmikroskopie (grün). Eine Färbung aller Zellen erfolgte durch den DNA-Farbstoff DAPI (blau). Die hier dargestellten Bilder wurden an einem CX-40 Olympus Fluoreszenzmikroskop mit einer Nikon DS-5MC Digitalkamera bei einer 1000fachen Vergrößerung aufgenommen.

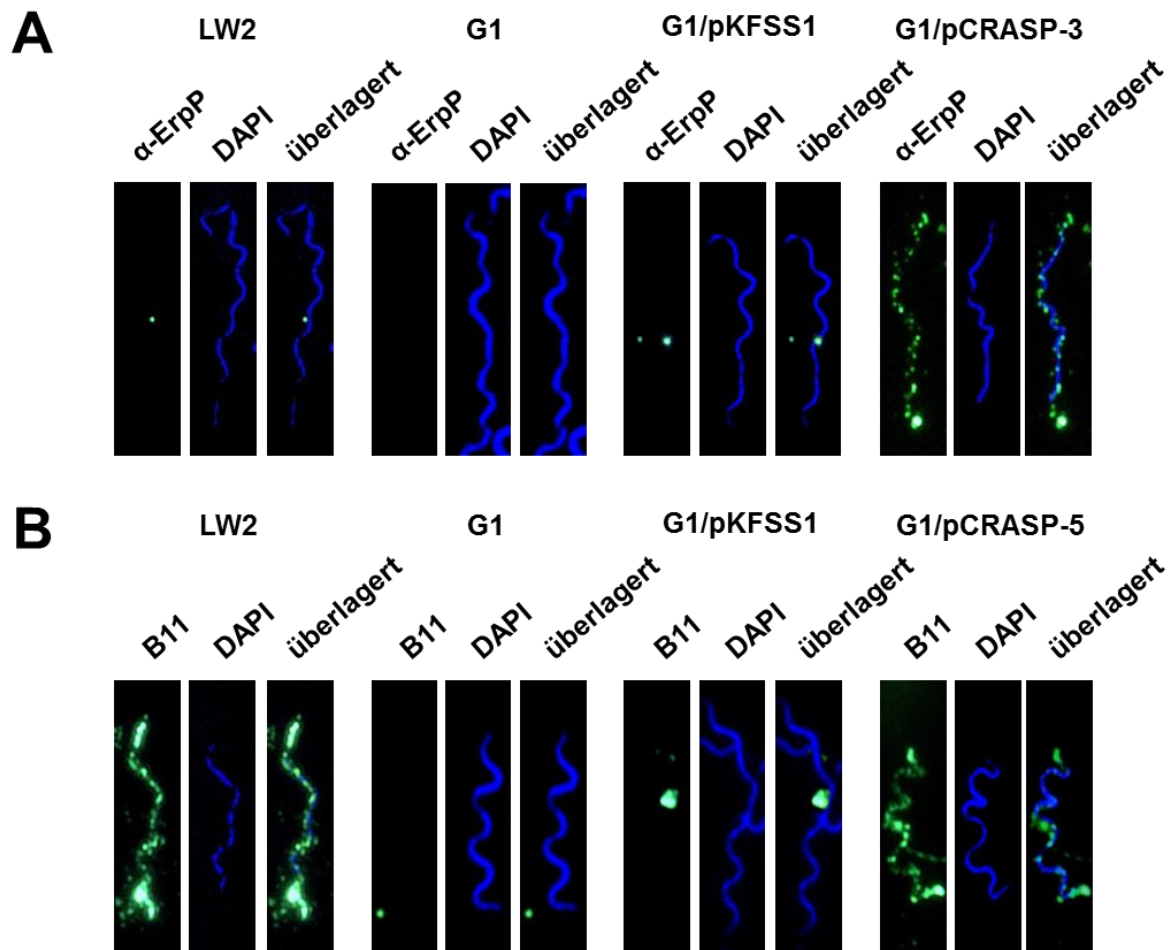


Abb. IV: Lokalisation von CRASP-3 (A) und CRASP-5 (B) auf der Zelloberfläche von transformierten *B. garinii* G1-Zellen.

Intakte Zellen der Isolate *B. burgdorferi* LW2, *B. garinii* G1 und der Transformanten G1/pKFSS1, G1/pCRASP-3 (**A**) und G1/pCRASP-5 (**B**) wurden mit dem CRASP-3-spezifischen Antikörper anti-ErpP (1:50 verdünnt) (A) bzw. den CRASP-5-spezifischen Antikörper B11 (1:20 verdünnt) (B) inkubiert, anschließend 10 μ l der Suspension auf Glasobjektträger pipettiert und die Zellen mit Methanol fixiert. Nach Inkubation der Objektträger mit dem sekundären Antikörper Alexa Fluor 488 Ziege anti-Ziege IgG erfolgte die Visualisierung mittels Fluoreszenzmikroskopie (grün). Eine Färbung aller Zellen erfolgte durch den DNA-Farbstoff DAPI (blau). Die hier dargestellten Bilder wurden an einem CX-40 Olympus Fluoreszenzmikroskop mit einer Nikon DS-5MC Digitalkamera bei einer 1000fachen Vergrößerung aufgenommen.

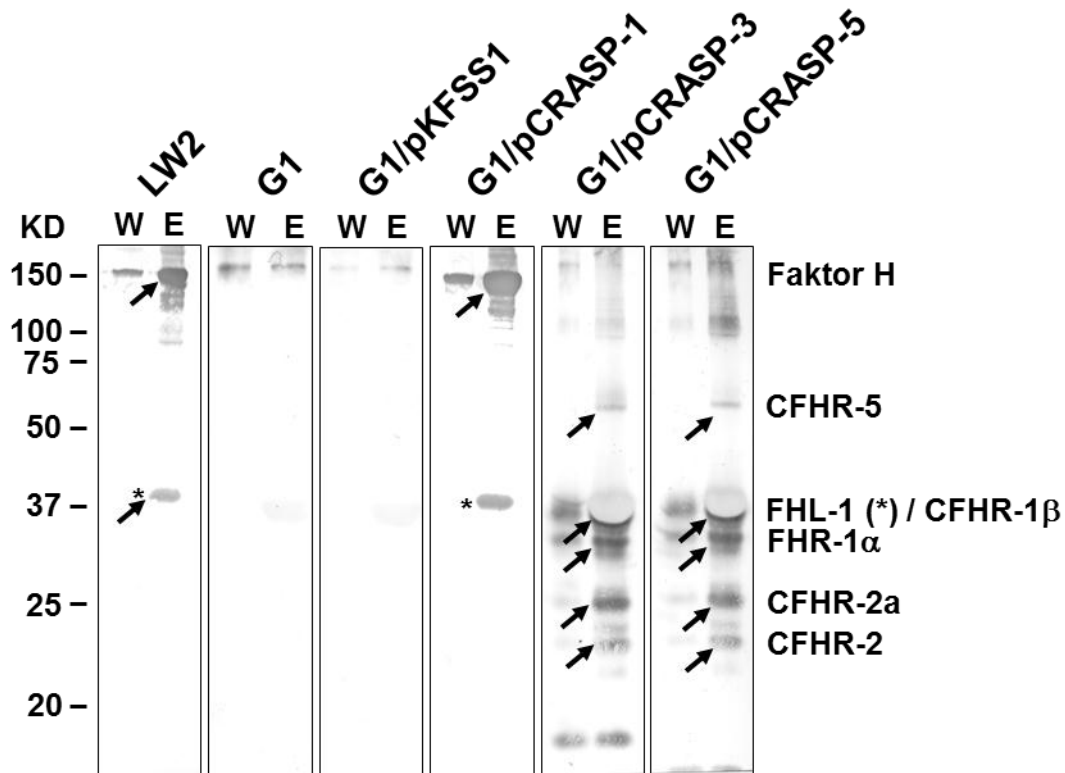


Abb. V: Nachweis von interagierenden Serumproteinen mit CRASP der Isolate *B. burgdorferi* LW2 und verschiedener Transformanten mittels polyklonalem anti-Faktor H-Antikörper.

Nach Inkubation von intakten Borrelienzellen der Isolate *B. burgdorferi* LW2, *B. garinii* G1 und der Transformanten G1/pKFSS1, G1/pCRASP-1, G1/pCRASP-3 und G1/pCRASP-5 mit NHS-EDTA wurde die letzte Waschfraktion (W) aufgehoben und die an die Zelloberfläche gebundenen Proteine eluiert. Die Waschfraktionen und die Eluate (E) wurden im 12,5%igen Laemmli SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Nachweis von Faktor H und den weiteren Faktor H-verwandten Proteinen erfolgte im Westernblot mittels des polyklonalen Antikörpers anti-Faktor H. Die Signale der rechts angegebenen Proteine sind mit Pfeilen bzw. mit einem Stern gekennzeichnet. Links angegeben ist der Größenstandard Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad).

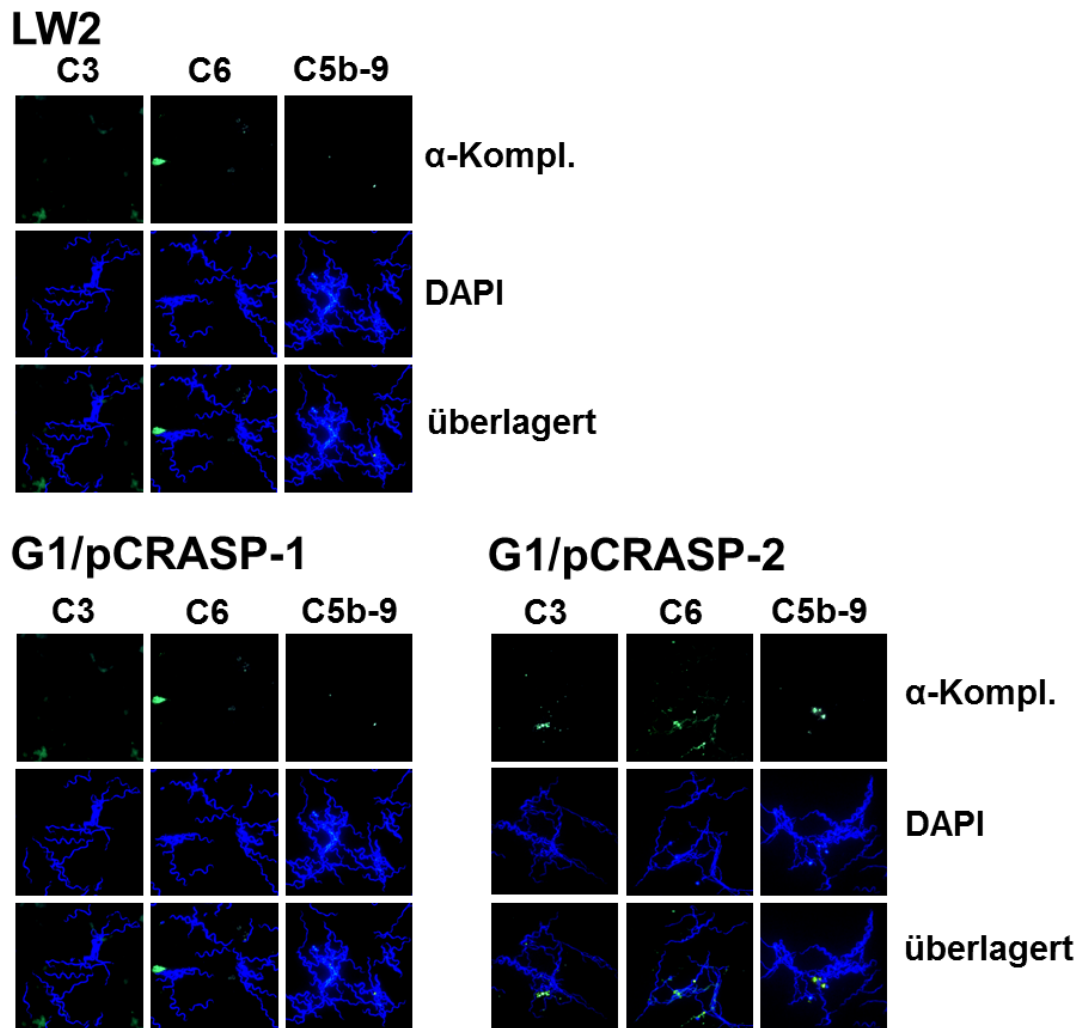


Abb. VI: Nachweis der spezifischen Bindung der Antikörper im IFT an die Komplementkomponenten C3b, C6 und C5b-9 auf der Zelloberfläche der Borrelien nach Inkubation mit NHS.

Nach Inkubation intakter Zellen des Isolates *B. burgdorferi* LW2 und der Transformanten G1/pCRASP-1 und G1/pCRASP-2 mit 25 % hiNHS wurden die Zellen auf Glasobjektträger appliziert und mit Methanol fixiert. Die Detektion der Komplementkomponenten C3b und C6 auf der Zelloberfläche erfolgte mit den spezifischen polyklonalen Antikörpern anti-C3 (und anti-C6) (grün). Der terminale Komplementkomplex (C5b-9) wurde mit dem monoklonalen Antikörper anti-C5b-9 nachgewiesen (grün). Alle vorhandenen Zellen wurden mit dem DNA-Farbstoff DAPI angefärbt (blau). Die hier dargestellten Bilder wurden an einem CX-40 Olympus Fluoreszenzmikroskop mit einer Nikon DS-5MC Digitalkamera bei einer 1000fachen Vergrößerung aufgenommen.

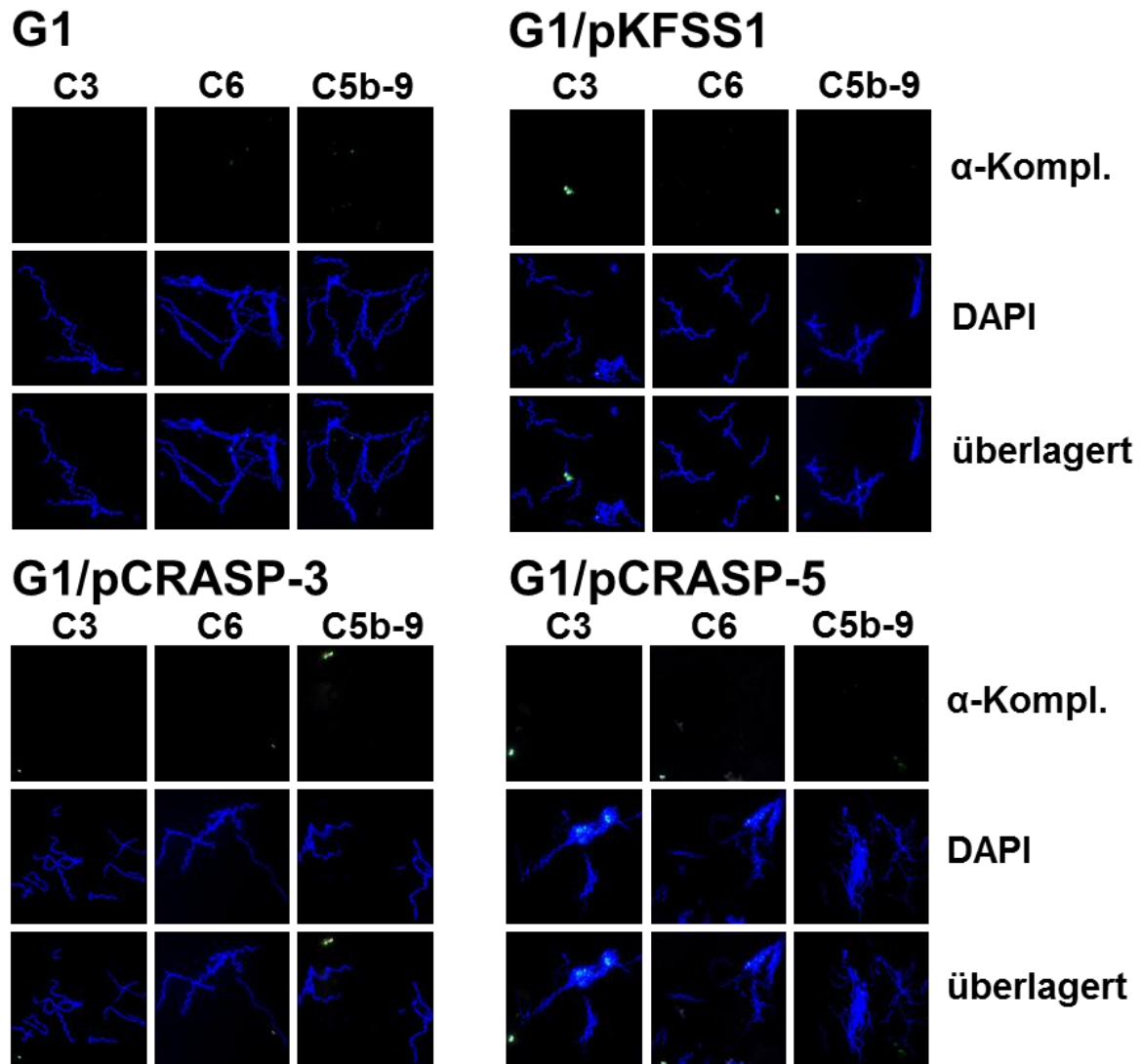


Abb. VII: Nachweis der spezifischen Bindung der Antikörper im IFT an die Komplementkomponenten C3b, C6 und C5b-9 auf der Zelloberfläche der Borrelien nach Inkubation mit NHS.

Nach Inkubation intakter Zellen des Isolates *B. garinii* G1 und der Transformanten G1/pKFSS1, G1/pCRASP-3 und G1/pCRASP-5 mit 25 % hiNHS wurden die Zellen auf Glasobjektträger appliziert und mit Methanol fixiert. Die Detektion der Komplementkomponenten C3b und C6 auf der Zelloberfläche erfolgte mit den spezifischen polyklonalen Antikörpern anti-C3 und anti-C6 (grün). Der Nachweis des terminalen Komplementkomplexes (C5b-9) erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper anti-C5b-9 (grün). Alle vorhandenen Zellen wurden mit dem DNA-Farbstoff DAPI angefärbt (blau). Die hier dargestellten Bilder wurden an einem CX-40 Olympus Fluoreszenzmikroskop mit einer Nikon DS-5MC Digitalkamera bei einer 1000fachen Vergrößerung aufgenommen.

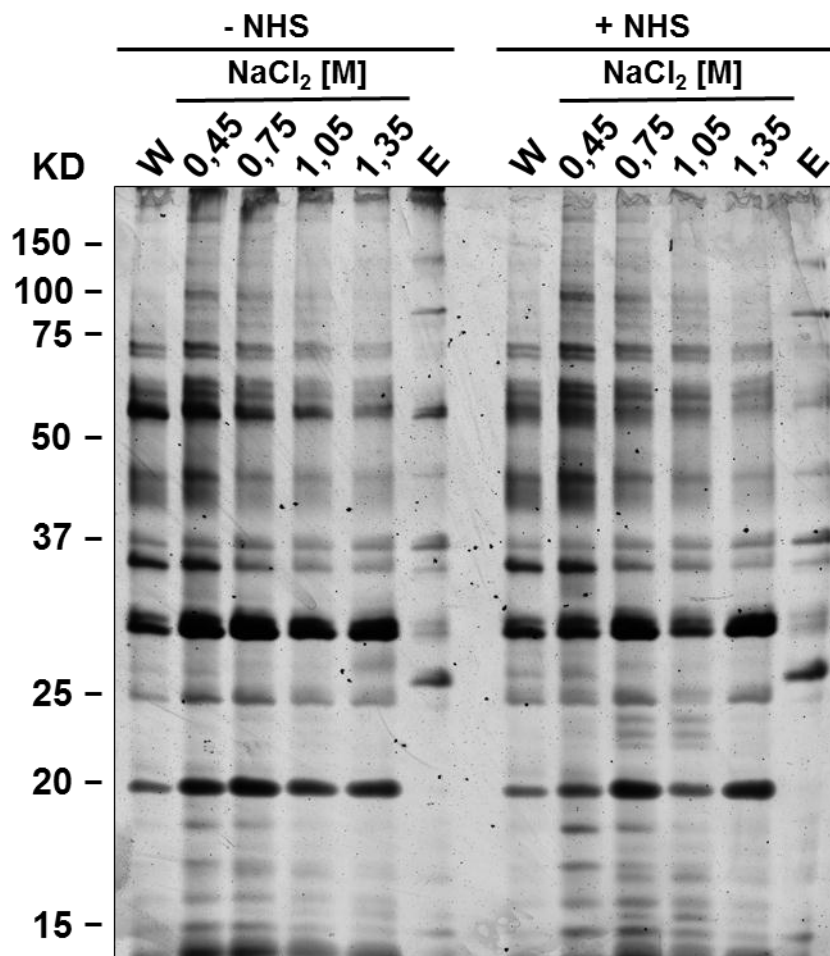


Abb. VIII: Nachweis gebundener Serumproteine mittels steigender Salzkonzentrationen nach Inkubation von *B. garinii* G1 mit Humanserum.

Intakte Borrelienzellen des Isolates *B. garinii* G1 wurden ohne NHS-EDTA (- NHS) oder mit NHS-EDTA (+ NHS) inkubiert und anschließend dreimal mit PBSA-Tween20 gewaschen, wobei die letzte Waschfraktion behalten wurde. Die Proteine wurden mit 0,45 M, 0,75 M, 1,05 M, 1,35 M NaCl₂ und schließlich mit 0,1 M Glycin pH 2,0 von der bakteriellen Oberfläche abgelöst. Nachdem die Waschfraktionen (W) und die Eluatfraktionen (0,45, 0,75, 1,05, 1,35, E) auf einem 12,5%igem Laemmli SDS-Gel separiert wurden, erfolgte eine Silberfärbung des Gels. Links angegeben ist der Größenstandard: Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad).

Danksagung

Mein Dank gilt im Besonderen Prof. Dr. Peter Kraiczky für die Bereitstellung des Themas, die engagierte Betreuung der Arbeit durch fachliche Diskussionen und Ratschläge und für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Prof. Dr. Volker Brade, Leiter des Instituts für medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene des Universitätsklinikums Frankfurt am Main im Ruhestand, und den jetzigen Leiter des Instituts Prof. Dr. Volkhard J. Kempf möchte ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes danken.

Prof. Dr. Volker Müller möchte ich für die Vertretung der Arbeit am Fachbereich Biowissenschaften der Johann Wolfgang Goethe - Universität in Frankfurt am Main als Erstgutachter sowie für die Gesprächsbereitschaft und für seine Unterstützung bei der Vorbereitung auf die Disputation danken.

Mein Dank gilt außerdem Prof. Dr. P. F. Zipfel, PD Dr. C. Skerka, Prof. Dr. B. Stevenson, Dr. R. Wallich sowie ihren Mitarbeitern für die zur Verfügung gestellten Antisera, Antikörper, rekombinante Proteine und Plasmidkonstrukte sowie für die konstruktiven Gespräche und die gute Zusammenarbeit. Hier möchte ich insbesondere Dr. Teresia Hallström für den freundlichen Laboraufenthalt und die zur Verfügung gestellten Daten zur Inhibition des terminalen Komplementkomplexes durch CRASP-1 danken.

Des Weiteren möchte ich mich bei Christa Hansen-Hübner, Jane Herrlich und Linda Stolz für ihre tatkräftige Unterstützung im Labor insbesondere in der Borrelien-Kultivierung und für ein immer funktionierendes Labor bedanken.

Bei Denia Frank, Simone Schermuly, Linda Stolz, Jane Herrlich und Anna Laxa sowie meinen treuen Mitdoktorandinnen Dr. med. Pia Herzberger, Meike Schmidt, Dr. med. vet. Kristina Morgenstern, Roswitha Dieterich, Anne Selig und Claudia Hammerschmidt danke ich für aufmunternde und konstruktive Gespräche und für die immerwährende freundliche Atmosphäre im Labor.

Lebenslauf

Corinna Siegel

Geboren am 20.01.1982 in Sebnitz

seit 07 / 2006	Promotion im Fachbereich Biologie der Johann Wolfgang Goethe - Universität Frankfurt am Main <u>Externe Arbeit</u> am Klinikum der Johann Wolfgang Goethe - Universität Frankfurt am Main
2005 - 2006	<u>Diplomarbeit</u> an der Biologischen Anstalt Helgoland des Alfred Wegener - Instituts „Charakterisierung von aktiven Bakterienpopulationen in der Deutschen Bucht vor Helgoland“
2002 - 03/2006	Hauptstudium der Biologie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg <u>Studienschwerpunkte:</u> Mikrobiologie (Prof. Dr. Goebel), Pharmazeutische Biologie (Prof. Dr. Roitsch) und Bioinformatik (Prof. Dr. Dandekar)
2000 - 2002	Grundstudium der Biologie an der Universität Bremen
1992 - 2000	Johann Wolfgang von Goethe - Gymnasium in Chemnitz
1988 - 1992	Juri Gagarin - Oberschule in Karl-Marx-Stadt / Chemnitz

Publikationen

Siegel, C., J. Schreiber, K. Haupt, C. Skerka, V. Brade, M. M. Simon, B. Stevenson, R. Wallich, P. F. Zipfel und P. Kraiczy (2008). „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. **283**: 34855-34863.

Herzberger, P., C. Siegel, C. Skerka, V. Fingerle, U. Schulte-Spechtel, A. van Dam, B. Wilske, V. Brade, P. F. Zipfel, R. Wallich und P. Kraiczy (2007) . „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. **75**: 4817-4825.

Herzberger, P., C. Siegel, C. Skerka, V. Fingerle, U. Schulte-Spechtel, B. Wilske, V. Brade, P. F. Zipfel, R. Wallich und P. Kraiczy (2009). „Identification and characterization of the factor H and FHL-1 binding complement regulator-acquiring surface protein 1 of the Lyme disease spirochete *Borrelia spielmanii* spp. nov.“ Int J Med Microbiol. **299**: 141-154.

Kenedy, M. R., S. R. Vuppala, C. Siegel, P. Kraiczy und D. R. Akins (2009). „CspA-mediated binding of human factor H inhibits complement deposition and confers serum resistance in *Borrelia burgdorferi*.“ Infect Immun. **77**: 2773-2782.

Seling, A., C. Siegel, V. Fingerle, B. L. Jutras, C. A. Brissette, C. Skerka, R. Wallich, P. F. Zipfel, B. Stevenson und P. Kraiczy (2010). „Functional characterization of *Borrelia spielmanii* outer surface proteins that interact with distinct members of the human factor H protein family and with plasminogen.“ Infect Immun. **78**: 39-48.

Siegel, C., T. Hallström, C. Skerka, H. Eberhardt, B. Uzonyi, T. Beckhaus, M. Karas, R. Wallich, B. Stevenson, P. F. Zipfel und P. Kraiczy (2010). „Complement factor H-related proteins CFHR2 and CFHR5 represent novel ligands for the infection-associated CRASP proteins of *Borrelia burgdorferi*.“ PLoS ONE **5**: e13519.

Kongressbeiträge

IX INTERNATIONAL JENA SYMPOSIUM ON TICK-BORNE DISEASES (IJSTD)

2007:

Siegel, C., P. Herzberger, C. Skerka, V. Brade, V. Fingerle, U. Schulte-Spechtel, B. Wilske, P. F. Zipfel, R. Wallich und P. Kraiczy (2008). "Binding of complement regulatory protein factor H enhances serum resistance of *Borrelia spielmanii* sp. nov." Int J Med Microbiol. **298**: 292-294.

60. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) e.V. 2008:

Siegel, C., T. Beckhaus, C. Skerka, M. Karas, V. Brade, B. Stevenson, R. Wallich, P. F. Zipfel und P. Kraiczy. "Interaction of virulence-associated complement regulator-acquiring surface proteins with distinct members of the human factor H protein family influences serum resistance of *Borrelia burgdorferi*."

X INTERNATIONAL JENA SYMPOSIUM ON TICK-BORNE DISEASES (IJSTD)

2009:

Siegel, C., T. Beckhaus, C. Skerka, M. Karas, V. Brade, B. Stevenson, R. Wallich, P. F. Zipfel und P. Kraiczy. "Role of BbCRASP-3 (ErpP) and BbCRASP-5 (ErpA) for preventing *Borrelia burgdorferi* from complement-mediated lysis."

Preise

IX INTERNATIONAL JENA SYMPOSIUM ON TICK-BORNE DISEASES (IJSTD)

2007:

2. Platz des Sinnecker-Kunz Award for junior researchers in the field of tickborne diseases.