

**Identifizierung und Charakterisierung
Faktor H- und FHL-1-bindender CRASP-Proteine
von *Borrelia burgdorferi*,
dem Erreger der Lyme-Borreliose**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Kristina Hartmann
aus Schwelm

Frankfurt 2005
(DF1)

vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang
Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan :

Gutachter :

Datum der Disputation :

Mein Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Volker Brade für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, für fachliche Diskussionen und für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Prof. Dr. Robert Tampé für die Erstellung des Erstgutachtens und für hilfreiche fachliche Diskussionen.

Herrn PD Dr. Peter Kraiczy für die Betreuung der Arbeit, seine ständige Diskussionsbereitschaft und für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Herrn Prof. Dr. Brian Stevenson, Herrn Prof. Dr. Reinhard Wallich und Herrn Prof. Dr. Peter F. Zipfel für diverse zur Verfügung gestellte Antiseren, Plasmide und rekombinante Proteine sowie für fachliche Diskussionen.

Frau Dr. Susan M. Lea für die zur Verfügung gestellte Abbildung des BbCRASP-1-Dimers.

Frau Christa Hansen-Hübner, Frau Rebecca Rödel, Herrn Hermann Juling und Frau Anna Laxa für praktische Hilfen und für die freundschaftliche Atmosphäre.

Frau Andrea Hönes und Frau Denia Frank für hilfreiche Diskussionen, für wertvolle Ratschläge, für praktische Hilfen, für die Motivation nach Rückschlägen und vor allem für die freundschaftliche Unterstützung.

Frau Christine von Rhein und Herrn Dipl.-Biol. Guido Völkerink für viele wertvolle Diskussionen, für hilfreiche Ratschläge, für die kritische Durchsicht des Manuskripts, für ihre Gesellschaft während mancher Nachtschicht und insbesondere für ihre freundschaftliche Unterstützung.

Frau Dipl.-Biol. Sabine Lohrengel für wertvolle Diskussionen, hilfreiche Ratschläge und insbesondere für die freundschaftliche Unterstützung.

Herrn Thorsten Hoppe für die kritische Durchsicht des Manuskripts, für die Motivation und Unterstützung während des Schreibens und für zahlreiche wertvolle Ratschläge.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis		I
Abkürzungen		V
I. Einleitung		1
1	Die Multisystemkrankheit Lyme-Borreliose	1
2	Die Überträger der Lyme-Borreliose	2
3	Die Erreger der Lyme-Borreliose	3
3.1	Taxonomische Einordnung der humanpathogenen Borrelien	3
3.2	Zellaufbau der humanpathogenen Borrelien	5
3.3	Das Genom von <i>Borrelia burgdorferi</i> s.s.	6
4	Die Aktivierung des alternativen Komplementweges durch Borrelien	8
4.1	Der alternative Komplementweg	8
4.2	Die Regulatorproteine Faktor H und FHL-1 des alternativen Komplementweges	10
4.3	Strategien der Komplementresistenz von Borrelien	13
5	Mit den Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1 interagierende Oberflächenproteine von Borrelien	14
5.1	<i>Complement regulator-acquiring surface proteins (CRASPs)</i>	14
5.2	<i>OspE/F-related protein-(Erp-)Proteinfamilie</i>	18
II. Zielsetzung		22
III. Material und Methoden		23
1	Material	23
1.1	Stämme	23
1.1.1	Borrelienstämme	23
1.1.2	<i>E. coli</i> -Stämme	24
1.2	Kulturmedien	24
1.2.1	Kulturmedium zur Anzucht von Borrelien	24
1.2.2	Kulturmedien zur Anzucht von <i>E. coli</i>	25
1.3	Vektoren	26
1.4	Plasmidkonstrukte	27
1.5	Oligonukleotide	29
1.6	Antikörper	31
1.7	Rekombinante Proteine	33
1.8	Normales humanes Serum (NHS)	33
1.9	Enzyme	34
1.10	Säulen für die Affinitätschromatographie/magnetische Partikel	34
1.11	Sonstige Reagenzien und Materialien	34
1.12	Chemikalien	35
1.13	Puffer	36

2	Methoden	40
2.1	Kultivierung von Borrelien	40
2.2	Molekularbiologische Methoden	40
2.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	40
2.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus Borrelien	40
2.2.3	DNA-Konzentrationsbestimmung	41
2.2.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	41
2.2.5	Restriktion von DNA mittels Restriktionsendonukleasen	42
2.2.6	Ligation von DNA	42
2.2.7	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	42
2.2.8	Transformation von <i>E. coli</i>	43
2.2.9	Sequenzierung	43
2.2.10	Agarose-Gelelektrophorese	43
2.2.11	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-(RFLP-) und Plasmidprofil-Analyse mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese	44
2.2.12	5S-23S-rDNA-Restriktionsanalyse von PCR-Fragmenten	45
2.2.13	Southernblot-Analyse	46
2.2.14	Herstellung einer Lambda-Expressionsbibliothek von <i>B. burgdorferi</i> s.s.	46
2.2.15	Screening einer Lambda-Expressionsbibliothek von <i>B. burgdorferi</i> s.s.	47
2.2.16	<i>In vivo</i> -Exzision	48
2.3	Biochemische Methoden	49
2.3.1	Herstellung von Homogenaten ganzer Borrelienzellen	49
2.3.1.1	Herstellung von Homogenaten ganzer Borrelienzellen für die Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	49
2.3.1.2	Herstellung von Homogenaten ganzer Borrelienzellen für die zweidimensionale (2D-)Elektrophorese	49
2.3.2	Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	50
2.3.2.1	Expression rekombinanter Proteine in kleinem Kulturmaßstab	50
2.3.2.2	Expression rekombinanter Proteine in größerem Kulturmaßstab	50
2.3.2.3	Expressionstest	51
2.3.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	51
2.3.4	Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	51
2.3.5	Westernblot-Analyse	52
2.3.6	Ligandenaffinitätsblot-Analyse	52
2.3.7	Isolierung äußerer Membranen von Borrelien	53
2.3.8	Protease-Assay	54
2.3.9	Zweidimensionale (2D-)Elektrophorese	54
2.3.10	Matrix-unterstützte Laserdesorptions-/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS)	55
2.3.11	Affinitätschromatographische Aufreinigung von rekombinanten Proteinen	56
2.3.11.1	Affinitätschromatographie mittels GSTrap-Säulen	56
2.3.11.2	Affinitätschromatographie mittels His Micro Spin-Säulen	57
2.3.11.3	Liganden-gekoppelte Affinitätschromatographie mittels FPLC	57
2.3.11.4	Liganden-gekoppelte magnetische Partikel	57

IV.	Ergebnisse	58
1	Charakterisierung von repräsentativen <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.-Isolaten	58
1.1	Molekularbiologische Genotypisierung von Borrelienisolaten der drei wichtigsten humanpathogenen Genospezies <i>B. burgdorferi</i> s.s., <i>B. afzelii</i> und <i>B. garinii</i>	58
1.2	Charakterisierung von <i>B. burgdorferi</i> s.s.-Isolaten in Hinblick auf Faktor H- und FHL-1-bindende Proteine	62
2	Charakterisierung und Identifizierung der Faktor H-bindenden CRASP-/Erp-Proteine	66
2.1	Immunologische Charakterisierung der Faktor H-bindenden CRASP-/Erp-Proteine	66
2.2	Analyse der Erp-Proteine auf Bindung an Faktor H und FHL-1	69
2.3	Lokalisation der mit den Erp-Proteinen interagierenden Regionen von Faktor H	70
2.4	Identifizierung der spezifisch Faktor H-bindenden CRASP-Proteine des <i>B. burgdorferi</i> s.s.-Isolates LW2	73
3	Identifizierung des Faktor H- und FHL-1-bindenden BbCRASP-1-Proteins	77
3.1	Identifizierung des BbCRASP-1 Proteins des <i>B. burgdorferi</i> s.s.-Isolates LW2	77
4	Identifizierung und Charakterisierung von BbCRASP-2	79
4.1	Identifizierung des BbCRASP-2-Proteins der <i>B. burgdorferi</i> s.s.-Isolate LW2 und B31	79
4.1.1	Screening der Lambda-Expressionsbibliothek zur Isolierung des BbCRASP-2-Proteins	79
4.1.2	Datenbanksuche nach Proteinen mit putativen Bindungsregionen für Faktor H und FHL-1	79
4.1.3	Spezifische Adsorption des BbCRASP-2-Proteins aus dem Homogenat ganzer Zellen des <i>B. burgdorferi</i> s.s.-Isolates LW2 über Bindung an Faktor H und FHL-1	82
4.1.4	Identifizierung des BbCRASP-2-Proteins mittels zweidimensionaler (2D-)Elektrophorese und Matrix-unterstützter Laserdesorptions-/ Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS)	84
4.1.4.1	2D-Elektrophorese mit einem Homogenat ganzer Zellen des <i>B. burgdorferi</i> s.s.-Isolates B31	84
4.1.4.2	2D-Elektrophorese mit äußeren Membranen des <i>B. burgdorferi</i> s.s.-Isolates B31	86
4.1.4.3	Analyse der Proteine BBH06 und BBH37 auf Bindung an Faktor H und FHL-1	89
4.2	Charakterisierung des BbCRASP-2-Proteins von B31	92
4.2.1	Charakterisierung des für BbCRASP-2 kodierenden Gens	92
4.2.2	Analyse der Oberflächenexposition des BbCRASP-2-Proteins	95
4.2.3	Lokalisation der mit dem BbCRASP-2-Protein interagierenden Regionen Faktor H und FHL-1	98
4.2.4	Lokalisation der mit Faktor H und FHL-1 interagierenden Regionen des BbCRASP-2-Proteins	99

V.	Diskussion	102
1	Charakterisierung der Faktor H-bindenden CRASP-/Erp-Proteine	102
1.1	Immunologische Charakterisierung der CRASP-/Erp-Proteine	102
1.2	Lokalisation der mit den BbCRASP-/Erp-Proteinen interagierenden Domänen von Faktor H	105
2	Identifizierung der BbCRASP-Proteine	106
2.1	Identifizierung von BbCRASP-1, BbCRASP-3, BbCRASP-4 und BbCRASP-5	106
2.2	Identifizierung des BbCRASP-2-Proteins	108
3	Charakterisierung des BbCRASP-2-Proteins	110
3.1	Charakterisierung des für das BbCRASP-2-Protein kodierenden <i>bbh06</i> -Gens	110
3.2	Analyse der Oberflächenexposition des BbCRASP-2-Proteins	111
3.3	Lokalisation der für die Bindung an das BbCRASP-2-Protein verantwortlichen Regionen von Faktor H und FHL-1	113
3.4	Lokalisation der Faktor H- und FHL-1-Bindestellen im BbCRASP-2-Protein	115
4	Ausblick	117
VI.	Zusammenfassung	118
VII.	Literaturverzeichnis	119
VIII.	Anhang	135

Abkürzungsverzeichnis

A

A	Alanin
Abb.	Abbildung
ACA	Acrodermatitis chronica atrophicans
A. dest	destilliertes Wasser
A. demin.	demineralisiertes Wasser
AEBSF	4-(2-)Aminoethyl-benzolsulfonylfluorid
AI-2	<i>Autoinducer-2</i>
Ala	Alanin
Amp	Ampicillin
APS	Ammonium-Peroxysulfat
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure

B

<i>B. burgdorferi</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i>
BCA	Bicinchoninsäure
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BSK	Barbour-Stoenner-Kelly-Medium

C

C	Cystein
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethyl-ammonium]-1-propansulfonat
cp	<i>circular plasmid</i>
CRASPs	<i>complement regulators acquiring surface proteins</i>
Cys	Cystein

D

D	Asparaginsäure
2D	zweidimensional
DEPC	Diethylpyrokarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxribonuklease
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol

E

E	Glutaminsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Elp	<i>OspEF-like peptide</i>
Erp	<i>OspE/F-related protein</i>

Abkürzungsverzeichnis

F

F	Phenylalanin
FHL-1	<i>factor H-like protein 1/reconectin</i>
FPLC	<i>fast performance liquid chromatography</i>
FSME	Frühsommer-Meningoenzephalitis

G

g	Konstante der relativen Erdbeschleunigung ($g = 9,80655 \text{ m/s}^2$)
G	Glycin
G/C-Gehalt	Guanin/Cytosin-Gehalt
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
GST	Glutathion S-Transferase
GTQ	gentechnologische Qualität

H

h	Stunde(n)
H	Histidin
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N`-2-ethansulfonsäure
His	Histidin
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
H ₂ O	Wasser
HUSAR	<i>Heidelberg Unix sequence analysis resources</i>

I

I	Isoleucin
IPG	immobilisierte pH-Gradienten
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalactosid
Ile	Isoleucin
<i>I. ricinus</i>	<i>Ixodes ricinus</i>

K

K	Lysin
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton

L

L	Leucin
Leu	Leucin
LMP	<i>low melting point</i>
lp	<i>linear plasmid</i>
LPS	Lipopolysaccharide
Lys	Lysin

Abkürzungsverzeichnis

M

MAC	<i>membrane attack complex</i>
MALDI	Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation
min	Minute(n)
MS	Massenspektrometrie

N

N	Asparagin
N-Terminus	Amino-Terminus
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NHS	normales humanes Serum
nt	Nukleotide

O

OD	optische Dichte
OM	<i>outer membrane</i>
Osp	<i>outer surface protein</i>

P

P	Prolin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
Phe	Phenylalanin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pro	Prolin

R

R	Arginin
RCA	<i>regulators of complement activation</i>
rDNA	ribosomale DNA
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease

S

s	Sekunde(n)
S	Serin
SCRs	<i>short consensus repeats</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Ser	Serin
s.s.	sensu stricto
s.l.	sensu lato

Abkürzungsverzeichnis

T	
T	Threonin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBE-Virus	<i>tick-borne encephalitis virus</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TCC	<i>terminal complement complex</i>
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N,N-Tetramethyl-ethylendiamin
TES	Tris-EDTA-Saccharose
Thr	Threonin
TFA	Perfluoressigsäure
TIGR	<i>The Institute for Genomic Research</i>
Tyr	Tyrosin
U	
UV	ultraviolett
V	
V	Volt
V	Valin
Val	Valin
v/v	<i>volume per volume</i>
W	
w/v	<i>weight per volume</i>
Y	
Y	Tyrosin

Allgemein gebräuchliche Abkürzungen und Maßeinheiten sind nicht gesondert aufgeführt.

I. Einleitung

1 Die Multisystemkrankheit Lyme-Borreliose

Borrelia burgdorferi ist der Erreger der Multisystemerkrankung Lyme-Borreliose, die neben der vom TBE-(*tick-borne encephalitis*-)Virus ausgelösten Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) die häufigste durch Zecken übertragene Infektionskrankheit in Nordamerika und Europa darstellt (Steere, 1989). Schätzungsweise treten in Deutschland 30.000 bis 60.000 Neuinfektionen pro Jahr auf (Kraiczy, 2004). In den USA zählte man mehr als 23.000 neue Fälle für das Jahr 2002 (CDC, 2004).

Bereits Ende des 19. und Anfang des 20. Jahrhunderts wurde von durch Zeckenbisse hervorgerufenen Krankheitsbildern berichtet, deren Ätiologie unklar war. Auf die Spur von Borrelien als wichtigen von Zecken-übertragenen Erregern führte 1977 der Rheumatologe A.C. Steere, der eine neue Form der Gelenkentzündung, die Lyme-Arthritis beschrieb (Steere et al., 1977). W. Burgdorfer und A.G. Barbour konnten 1982 eine Spirochäte aus dem Mitteldarm einer Zecke isolieren und kultivieren und den Nachweis erbringen, dass Sera von an Lyme-Arthritis erkrankten Patienten mit den Spirochäten reagieren (Burgdorfer et al., 1982). Diese Spirochäten erhielten nach dem französischen Mikrobiologen A. Borrel und nach W. Burgdorfer die Bezeichnung *Borrelia burgdorferi*.

Diese Borrelien wurden nicht nur als Erreger der Lyme-Arthritis identifiziert, sondern im nachhinein auch als Ursache einer Multisystemerkrankung erkannt, bei der vor allem die Haut (Dermato-Borreliose), die Gelenke (Lyme-Arthritis) und das Nervensystem (Neuroborreliose) betroffen sein können (Duray und Steere, 1988; Stanek et al., 1996). Die Krankheit wird in drei Stadien unterteilt, wobei das Auftreten aller drei Stadien nicht obligatorisch ist. Im Stadium I (lokalisierte Infektion) zeigt sich Tage bis Wochen nach dem Zeckenbiss eine sich ringförmig ausbreitende Hautrötung (Erythema migrans) um die Bissstelle, welche sich auch ohne Therapie wieder zurück bildet (Burgdorfer et al., 1982; Ackermann et al., 1984; Ackermann, 1985; Schmidt et al., 1985; Steere, 1989). Stadium II (akute Organmanifestation) setzt in der Regel zwei bis zehn Wochen nach der Infektion ein. In diesem Stadium können sich Erkrankungen des peripheren Nervensystems, der Meningen, der Gelenke, des Herzens und des Auges einstellen (Steere, 1989). Charakteristisch für das Monate bis Jahre später auftretende Stadium III (chronische Organmanifestation) ist die Ausbildung eines chronischen, inflammatorischen, organzerstörenden Prozesses der Haut (Acrodermatitis

chronica atrophicans (ACA)), der Gelenke (Lyme-Arthritis) oder des Nervensystems (progressive Enzephalomyelitis, Enzephalopathie, Neuropathie).

Die Klinik der Lyme-Borreliose verläuft aber nicht zwingend in drei Stadien, da Stadien übersprungen und Spätstadien als Erstmanifestation auftreten können.

2 Die Überträger der Lyme-Borreliose

Die Lyme-Borreliose wird durch den Biss einer mit Borrelien infizierten Zecke übertragen. Zecken sind blutsaugende Ektoparasiten. Sie gehören zu den Chelicerata (Spinnenartige) und zählen in der Klasse der *Arachnida* (Spinnentiere) zur Ordnung der Acari (Milben). Die *Borrelia burgdorferi* übertragenden Zecken stammen aus der Familie der *Ixodidae* (Schildzecken). Hauptüberträger von Borrelien in Europa ist *Ixodes ricinus*, der gemeine Holzbock. *I. ricinus* ist beheimatet in Ausläufern von geschlossenen Laub- und Mischwäldern und auf Lichtungen mit hohem Grasbewuchs.

Zecken leben bis zu sechs Jahre, wobei drei Entwicklungsstadien durchlaufen werden. Abbildung I.1 zeigt den typischen Entwicklungszyklus. Die sechsbeinigen Larven sind in der Lage, auf Höhen von 25 cm zu klettern und nehmen ihre Blutmahlzeit vor allem an Kleinnagern ein. Anschließend häuten sie sich am Boden zu achtbeinigen Nymphen, welche sich in Höhen bis zu 50 cm aufhalten. Die Nymphen häuten sich nach einem Blutmahl auf Kleinnagern oder Vögeln zu adulten Zecken. Die adulten weiblichen Zecken können Höhen bis zu 1,50 m erreichen und saugen vor allem an größeren Säugetieren (Rehwild, Hirsche, Haustiere, Menschen) Blut. Diese Blutmahlzeit kann einige Tage bis zu drei Wochen andauern, wonach die Begattung auf dem Wirt stattfindet. Die Männchen sterben kurze Zeit später. Die weibliche Zecke legt im darauffolgenden Frühling mehrere tausend Eier ab, aus denen wenige Wochen danach die Larven schlüpfen.

Eine mit Borrelien infizierte Zecke kann während der Blutmahlzeit die Erreger auf den Wirt übertragen (Abb. I.1). Dabei erfolgt eine Übertragung der Borrelien in der Regel nach 24 bis 48 Stunden (Piesmann, 1993; des Vignes et al., 2001). Frühes Entfernen der Zecke senkt also das Risiko einer Infektion.

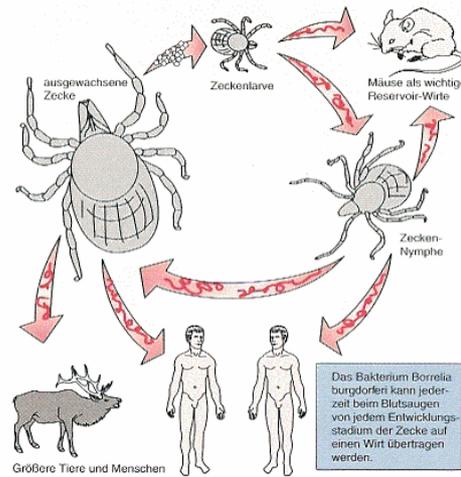


Abb. I.1: Entwicklungszyklus von *Ixodes ricinus* und potentielle Übertragungswege von *Borrelia burgdorferi* (aus Schäfer et al., 1999).

3 Die Erreger der Lyme-Borreliose

3.1 Taxonomische Einordnung der humanpathogenen Borrelien

Seit der Isolierung des ersten Borrelienstammes 1982 (Burgdorfer et al., 1982) konnten weltweit *B. burgdorferi*-Isolate aus verschiedenen geographischen Regionen und mit unterschiedlicher biologischer Herkunft isoliert und kultiviert werden. Diese sind genetisch und phänotypisch divergent. Daraufhin wurde eine nah verwandte Gruppe mit bis dato 12 Genospezies als *B. burgdorferi* sensu lato Komplex definiert (Johnson et al., 1984; Baranton et al., 1992, 1998; Canica et al., 1993; Kawabata et al., 1993; Lebech et al., 1994; Postic et al., 1994, 1998; Marconi et al., 1995; Fukunaga et al., 1996; Foretz et al., 1997; Le Fleche et al., 1997; Wang et al., 1997, 1999; Masuzawa et al., 2001; Parola und Raoult, 2001, Richter et al., 2004). Um zwischen dem Komplex *B. burgdorferi* und der Art *B. burgdorferi* unterscheiden zu können, wurde der Komplex *B. burgdorferi* sensu lato (s.l) genannt und die Art als *B. burgdorferi* sensu stricto (s.s.) bezeichnet. Mit *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* und *B. garinii* sind drei Genospezies dieses Komplexes als humanpathogen einzustufen und gelten als Erreger der Lyme-Borreliose (Steere, 1989). Weiterhin werden die Genospezies *B. valaisiana* und *B. spielmani* als humanpathogen diskutiert (Ryffel et al., 1999; Parola und Raoult, 2001, Richter et al., 2004).

Taxonomisch werden Borrelien zur Ordnung der Spirochaetales gezählt, welche sich in die Familien *Spirochaetaceae* und *Leptospiraceae* unterteilt. Zur Familie der *Spirochaetaceae* gehören die Gattungen *Treponema* (mit *Serpula hyodysenteriae* und verwandte Spezies),

Spirochaeta, *Borrelia* und *Cristispira* (Paster et al., 1991). Die Gattung *Borrelia* schließt mit dem *B. burgdorferi* sensu lato Komplex die Erreger der Lyme-Borreliose sowie mit *B. recurrentis*, *B. duttoni*, *B. hermsii* und anderen die Erreger des Rückfallfiebers ein (Abb. I.3).

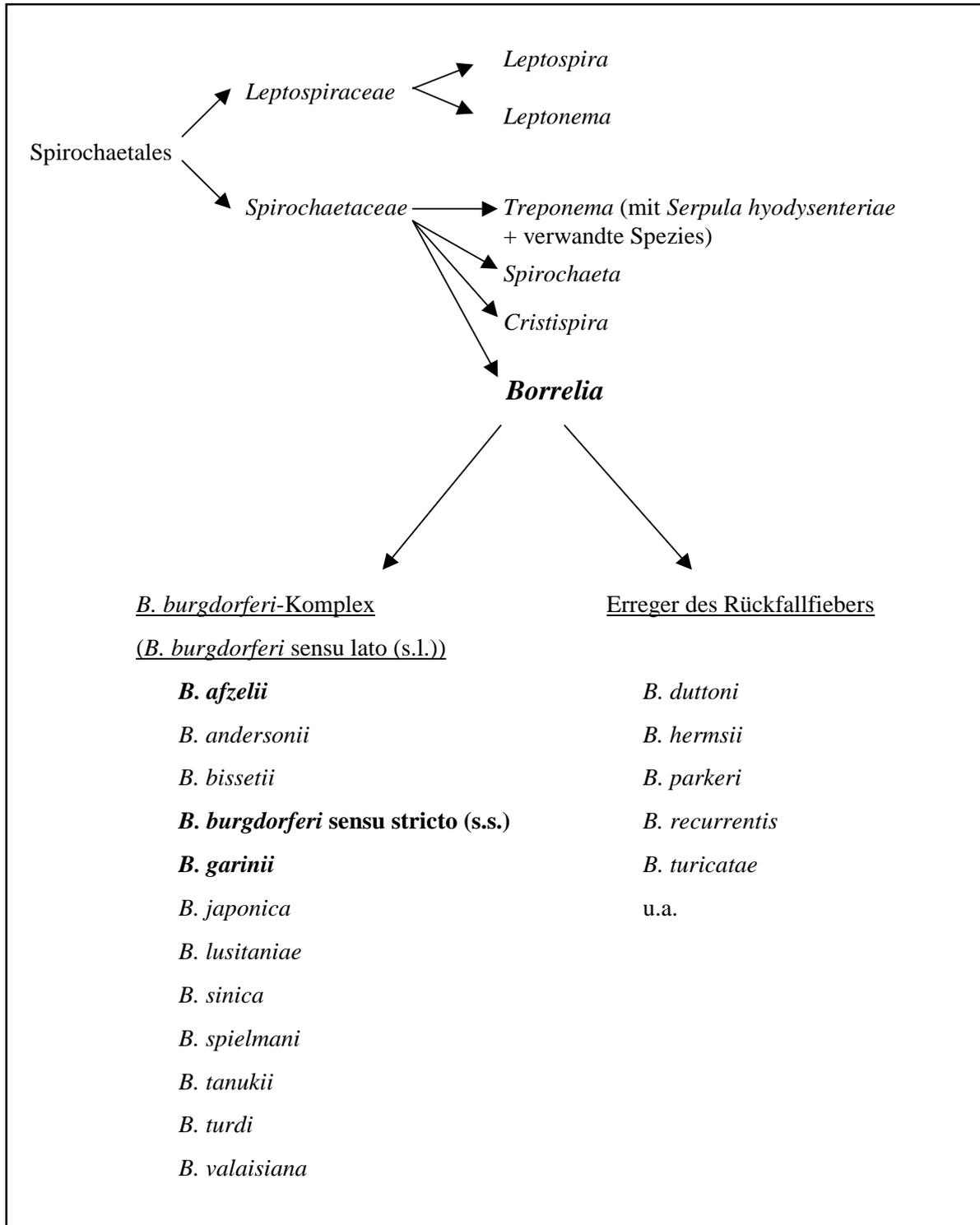


Abb. I.3: Taxonomische Einordnung der Gattung *Borrelia*.

Die wichtigsten humanpathogenen Genospezies sind in Fettdruck dargestellt.

3.2 Zellaufbau der humanpathogenen Borrelienarten

Borrelien sind gram-negative Bakterien und wachsen unter mikroaerophilen Bedingungen. Charakteristisch ist ihr langgestreckter (10-30 μm) dünner (\varnothing 0,2-0,5 μm) Zellkörper, welcher spiralförmig gewunden ist. Am Zellkörper befinden sich sieben bis 11 periplasmatische Flagellen (Barbour und Hayes, 1986).

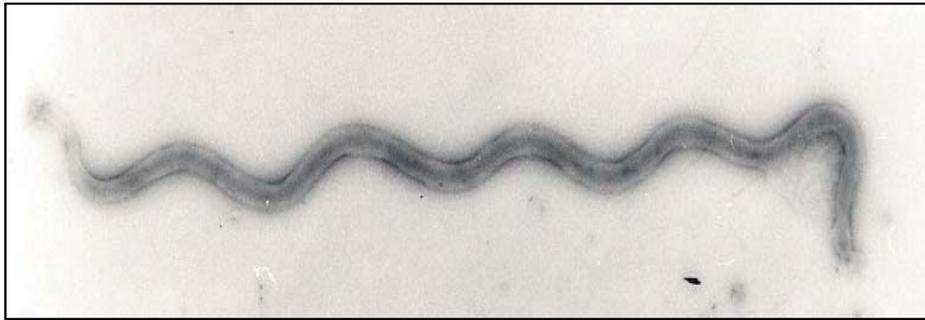


Abb. I.2: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Borrelia burgdorferi* s.s. (aus Kraiczy, 2004).

Morphologisch gesehen sind Borrelien aus einem S-Layer und einer darunterliegenden dreischichtigen hoch flexiblen Membran aufgebaut. Der S-Layer besteht aus einer 2-10 nm dicken amorphen mukoiden Schicht (Kraiczy et al., 1999). Die äußere trilaminare Membran umschließt den periplasmatischen Raum mit den Endoflagellen. Die Endoflagellen dienen der Motilität und Stabilität der Borrelien (Goldstein et al., 1996; Abdul Motaleb et al., 2000; Li et al., 2001) und sind aus Geißelfilament, Geißelhaken und Basalkörper aufgebaut. Die Flagellenbündel inserieren subterminal an den Enden der Borrelienzelle. Durch deren Kontraktion können sich die Borrelien rotierend fortbewegen. Die innere der dreischichtigen Membran umhüllt den protoplasmatischen Zylinder mit dem Nukleoplasma, den Ribosomen, mesosomenartigen Komponenten und kristallinen Strukturelementen (Kraiczy et al., 1999).

Die äußere Membran der Borrelien umschließt den periplasmatischen Raum und den protoplasmatischen Zylinder (Barbour und Hayes, 1986). Obwohl Borrelien zu den gram-negativen Bakterien gezählt werden, unterscheiden sich ihre äußeren Membrankomponenten deutlich von denen anderer gram-negativer Bakterien. Die Unterschiede bestehen in der außergewöhnlichen Fülle an lipidierten Membranproteinen (Brandt et al., 1990), dem Fehlen von Lipopolysacchariden (LPS) (Takayama et al., 1987) und Phosphatidylethanolaminen (Belisle et al., 1994) sowie dem Vorhandensein von Glycolipid-Antigenen, die sich von den LPS unterscheiden (Eiffert et al., 1991; Wheeler et al., 1993; Belisle et al., 1994). Außerdem

enthält die Membran nur wenige Transmembranproteine (Walker et al., 1991; Radolf et al., 1994).

3.3 Das Genom von *Borrelia burgdorferi* s.s.

Derzeit liegt nur das Genom des *B. burgdorferi* s.s.-Isolates B31 vollständig sequenziert vor (Fraser et al., 1997). In der Regel besitzen Bakterien ein einzelnes zirkuläres Chromosom und eventuell noch ein oder mehrere autonom replizierende Plasmide. *B. burgdorferi* s.s. hat dagegen mit einem linearen Chromosom mit einer Größe von 910,725 kb und einem G/C-Gehalt von 28,6 % eine ungewöhnliche Genomstruktur (Fraser et al., 1997). Zusätzlich trägt das Bakterium bis zu 21 extrachromosomale DNA-Elemente in Form von 12 linearen und 9 zirkulären Plasmiden mit einer Gesamtgröße von 610,694 kb (Tab.I.1; Barbour, 1988, 1993; Baril et al., 1989; Ferdows und Barbour, 1989; Bergström et al., 1992; Davidson et al., 1992; Casjens und Huang, 1993; Ojaimi et al., 1994; Casjens et al., 1995, 2000; Xu und Johnson, 1995; Fraser et al., 1997). Der G/C-Gehalt der einzelnen Plasmide liegt zwischen 23,1 % und 32,3 % (Fraser et al., 1997). Die Gesamtgröße des Genoms von *B. burgdorferi* s.s. B31 beträgt somit 1.521,419 kb plus ca. 2 kb unbestimmte Telomersequenzen (Casjens et al., 2000).

Charakteristisch für dieses verhältnismäßig kleine Genom ist das Fehlen von Genen für die Synthese von Aminosäuren, Fettsäuren, Kofaktoren und Nukleotiden, wodurch bei der Kultivierung von *B. burgdorferi* s.s. im Labor ein komplexes, serumsupplementiertes Zellkulturmedium von Nöten ist (Fraser et al., 1997). Außerdem fehlen *B. burgdorferi* s.s. die für die Komponenten der Atmungskettenphosphorylierung kodierenden Gene.

Das Bakterium ist somit von der biochemischen Energiegewinnung über die im Zytoplasma stattfindende Substratphosphorylierung abhängig und verwendet Glukose als primäre Energiequelle (Fraser et al., 1997). Pyruvat als Produkt der Glykolyse wird zu Laktat umgewandelt, was mit der mikroaerophilen Lebensweise der Borrelien übereinstimmt (Fraser et al., 1997). Weiterhin besitzt *B. burgdorferi* s.s. keine für die Enzyme des Tricarbonsäurezyklus und der oxidativen Phosphorylierung kodierenden Gene. Diese limitierte Stoffwechselkapazität bedingt, dass das Bakterium von einem Wirtsorganismus abhängig ist, der ihm die nötigen Nährstoffe zum Überleben liefert.

Tab. I.1: Die 22 Replikon des *B. burgdorferi* s.s.-Isolates B31 (verändert nach Casjens et al., 2000).

Replikon	Geometrie	Größe [bp]
Chromosom	linear	910.725
cp9	zirkulär	9.386
cp26	zirkulär	26.498
cp32-1	zirkulär	30.750
cp32-3	zirkulär	30.223
cp32-4	zirkulär	30.299
cp32-6	zirkulär	29.838
cp32-7	zirkulär	30.800
cp32-8	zirkulär	30.885
cp32-9	zirkulär	30.651
lp5	linear	5.228
lp17	linear	16.928
lp21	linear	18.901
lp25	linear	24.177
lp28-1	linear	28.250
lp28-2	linear	29.766
lp28-3	linear	28.601
lp28-4	linear	27.323
lp36	linear	36.849
lp38	linear	38.829
lp54	linear	53.541
lp56	linear	52.971

Bei Langzeitkultivierung von *B. burgdorferi* s.s. in der Zellkultur kann es zu spontanem Verlust von Plasmiden kommen, was keinen Einfluss auf die Vermehrung der Zellen hat (Schwan et al., 1988), aber die Infektiosität herabsetzen oder sogar zu einem nicht-infektiösen Phänotyp führen kann (Sadziene et al., 1993a,b; Xu et al, 1996; Purser und Norris, 2000; McDowell et al., 2001).

4 Die Aktivierung des alternativen Komplementweges durch Borrelien

4.1 Der alternative Komplementweg

Beim menschlichen Immunsystem unterscheidet man die angeborene unspezifische Immunität und die erworbene adaptive Immunität. Die erworbene adaptive Immunität generiert und aktiviert antigenspezifische T- und B-Zellen und wird somit erst Tage bis Wochen nach dem ersten Kontakt mit dem Erreger aktiv. Die angeborene unspezifische Immunität besteht dagegen u.a. aus zirkulierenden Molekülen und Abwehrzellen und setzt sofort nach dem Eindringen des Fremdorganismus ein. Ein wichtiger Teil der angeborenen Immunität ist das Komplementsystem. Dies spielt eine zentrale Rolle bei dem Schutz der menschlichen Wirtszellen gegen eindringende pathogene Mikroorganismen (Medzhitov und Janeway, 2000).

Die Aktivierung des Komplementsystems erfolgt entweder über den klassischen Weg, den alternativen Weg oder den Lektin-Weg (Law und Reid, 1995; Walport, 2001). Über den alternativen Weg kann das Komplementsystem spontan aktiviert werden. Die Aktivierung wird durch eine spontane Konformationsänderung der zentralen Komplementkomponente C3 ausgelöst (Abb. I.4). Durch die Konformationsänderung entsteht aktiviertes C3b, welches an alle benachbarten mikrobiellen Oberflächen binden kann. An das so gebundene C3b lagert sich Faktor B zum C3bB-Komplex an. Dieser Komplex wird proteolytisch durch Faktor D gespalten. Dabei erfolgt die Abspaltung des Fragmentes Ba, während das Fragment Bb Teil des Komplexes bleibt. Der C3bBb-Komplex wird als C3-Konvertase des alternativen Komplementweges bezeichnet. Die Halbwertszeit des Komplexes wird durch die Anlagerung von Properdin verlängert bzw. stabilisiert. Die C3-Konvertase wirkt enzymatisch auf die Spaltung von C3 in C3a und C3b. Durch diese vermehrte C3b-Bildung kann eine mikrobielle Oberfläche innerhalb kürzester Zeit mit vielen C3b-Molekülen beladen werden (Opsonisierung). Das oberflächengebundene C3b bindet kovalent an den C3bBb-Komplex, wodurch die C5-Konvertase (C3bBb3b) entsteht. Diese spaltet C5 in C5b, wobei C5a freigesetzt wird. C5a ist das stärkste Anaphylatoxin im menschlichen Organismus und damit der wichtigste vom Komplementsystem hergestellte Entzündungsmediator. C5b lagert sich mit C6 und C7 zu einem hydrophoben Komplex (C5b67) zusammen. Dieser Komplex inseriert in die Membran, wo durch Anlagerung von C8 und C9 der *membrane attack complex* (MAC), auch *terminal complement complex* (TCC) genannt, gebildet wird. Der MAC wirkt porenbildend und führt somit zur Zellyse.

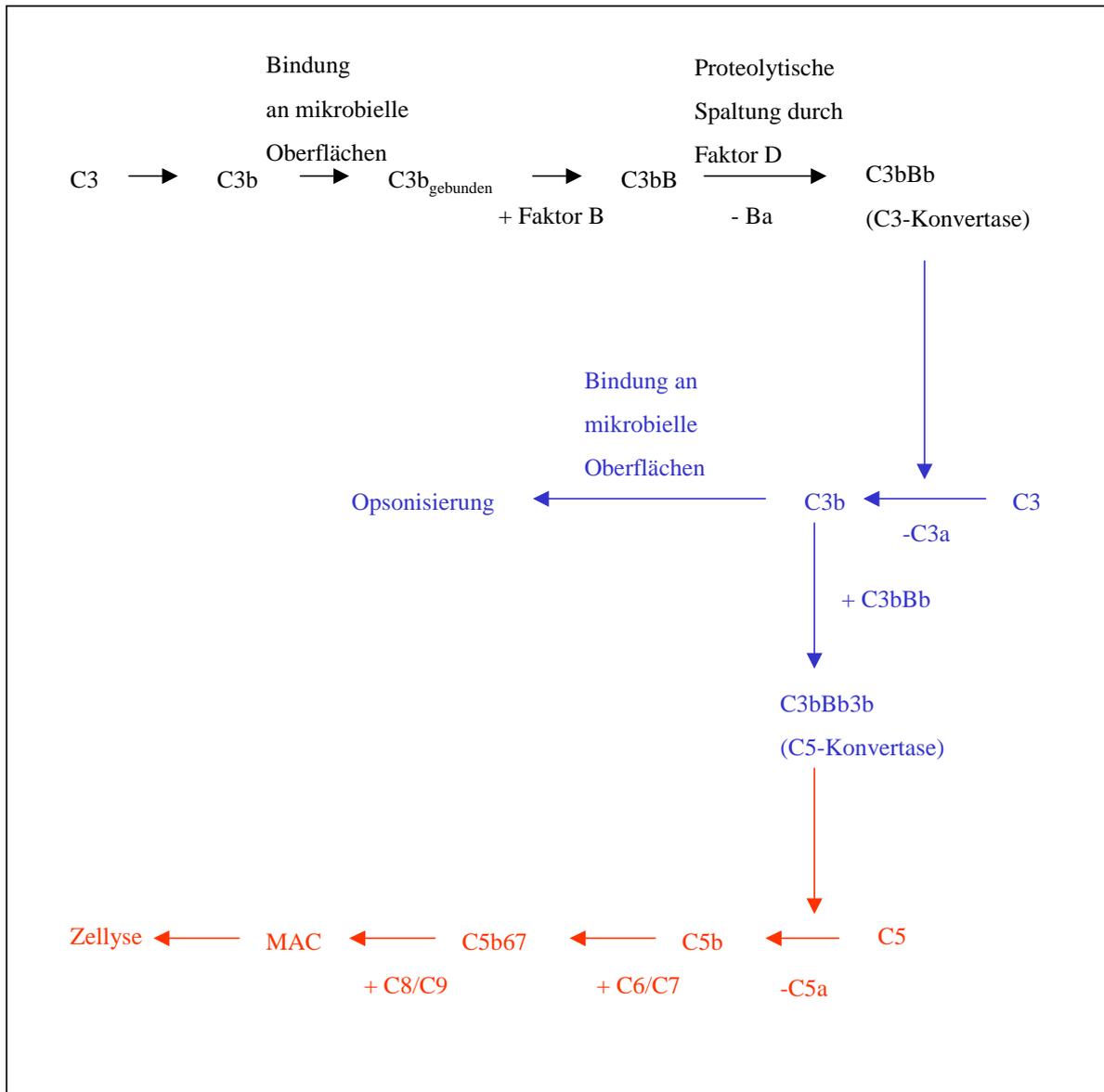


Abb. I.4: Vereinfachte Darstellung der Aktivierung des alternativen Komplementweges. C: Komplementkomponenten; MAC: *membrane attack complex*; C3a/C5a: Anaphylatoxine (Entzündungsmediatoren).

Über den alternativen Weg kann die Komplementkaskade spontan aktiviert werden. Die Aktivierung des Komplementsystems wird über eine Vielzahl von Komplementregulatoren gesteuert, indem diese die Reaktion auf körpereigenen Zellen inhibieren. Bei Abwesenheit der Regulatoren z.B. auf der Oberfläche von Mikroorganismen läuft die Reaktion dagegen vollständig bis zur Eliminierung der Fremdorganismen ab. Mit Hilfe dieser Regulatoren ist das Immunsystem in der Lage zwischen körpereigenen und körperfremden Zellen zu unterscheiden.

Zu den Regulatorproteinen des alternativen Weges zählen z.B. Faktor H und *factor H-like protein-1/reconectin* (FHL-1) (Zipfel und Skerka, 1994, 1999; Jokiranta et al., 1996; Pangburn, 2000). Diese regulieren die Komplementaktivierung auf der Stufe der C3-Konvertase, indem sie als Kofaktor für die Faktor I-vermittelte Spaltung von C3b sowie als Beschleunigungsfaktor (*Decay-accelerating activity*) für den Zerfall der C3-Konvertase dienen (Whaley und Ruddy, 1976; Pangburn et al., 1977; Vik et al., 1989). Weiterhin konkurrieren sie mit Faktor B um die Bindung an C3b (Jokiranta et al., 1996, 2000). Dadurch wird die Opsonisierung der Zellen und die Aktivierung des Komplementsystems verhindert.

4.2 Die Regulatorproteine Faktor H und FHL-1 des alternativen Komplementweges

Faktor H und *factor H-like protein-1/reconectin* (FHL-1) sind Mitglieder der Faktor H-Proteinfamilie (Zipfel und Skerka, 1994, 1999; Zipfel et al., 1999). Die Faktor H-Genfamilie kodiert für multifunktionale aus mehreren Domänen aufgebaute Proteine. Die Domänen werden als *short consensus repeats* (SCRs) bezeichnet und bestehen aus ungefähr 60 Aminosäuren (Abb. I.5). Je vier konservierte Cysteinreste bilden Disulfidbrücken (I-III und II-IV).

Die Proteine dieser Familie sind strukturell verwandt, üben aber unterschiedliche Funktionen aus. Die einzelnen Gene sind aufgrund ihrer sehr ähnlichen Struktur und Organisation vermutlich durch Genduplikationen, Genmodifikationen oder Exonneukombinationen entstanden. Sie liegen nebeneinander im *regulators of complement activation*- (RCA-)Gencluster des menschlichen Chromosoms 1 (1q32) (Hourcade et al., 1989; Rodriguez de Cordoba et al., 1995, 1999; Heine-Suner et al., 1997; Diaz-Guillen et al., 1999; Krushkal et al., 2000). Zu dieser Familie gehören sieben Glykoproteine, die eine hohe immunologische Kreuzreaktivität aufweisen (Zipfel und Skerka, 1994). Die primäre Synthese der Proteine findet in der Leber statt, von wo aus sie ins Plasma sezerniert werden.

1965 wurde Faktor H erstmalig aus humanem Serum isoliert und als β_1 H-Globulin bezeichnet (Nilsson und Müller-Eberhard, 1965). Faktor H ist ein 155 kDa-Glykoprotein und liegt im Plasma in Konzentrationen von ca. 500 μ g/ml vor. Das sezernierte Protein besteht aus 20 SCRs (Abb. I.6), wobei die N-terminalen SCRs 1-4 für die komplementregulative Aktivität des Proteins verantwortlich sind (Abb. I.7; Whaley und Ruddy, 1976; Pangburn et al., 1977; Vik et al., 1989; Gordon et al., 1995).

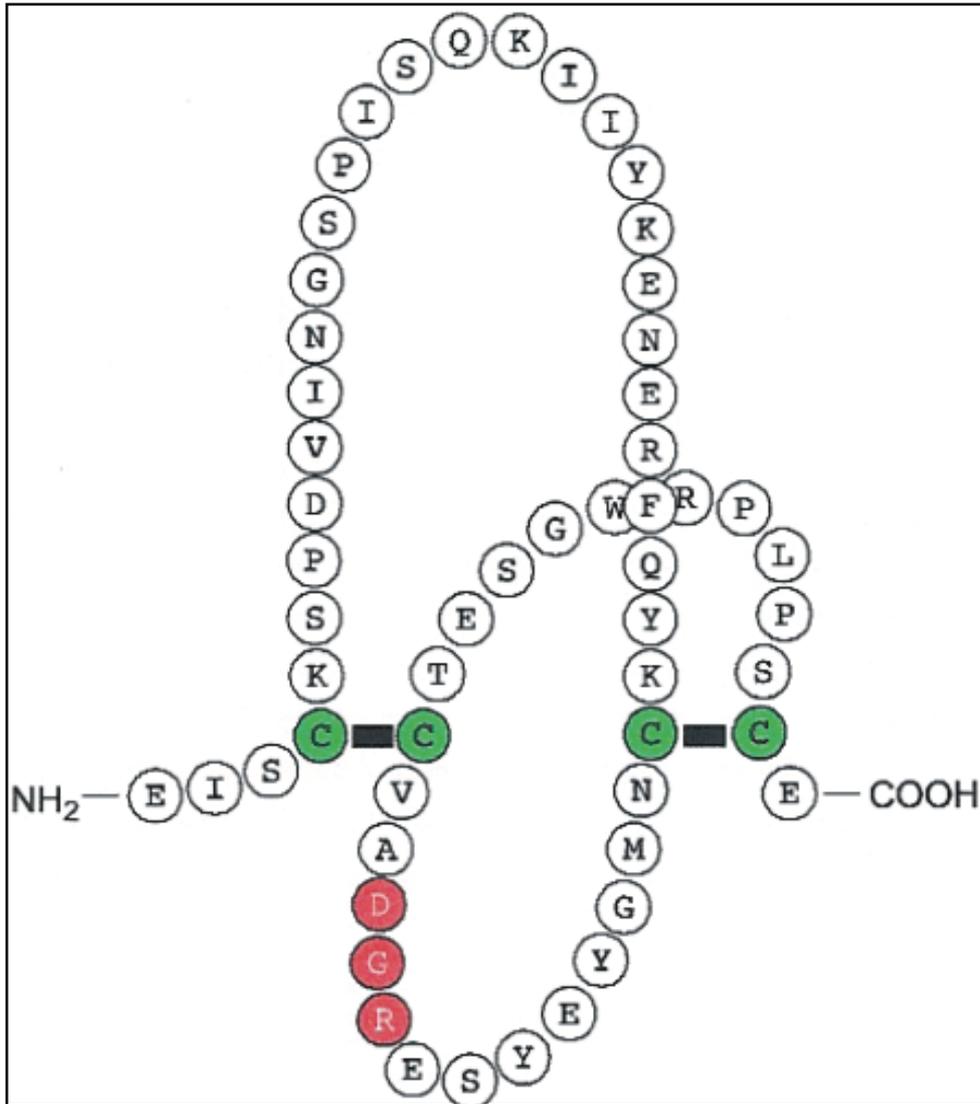


Abb. I.5: Potentielle Struktur des SCR 4 von FHL-1 (aus Zipfel und Skerka, 1999).

Die vier konservierten Cystein-Reste sind grün dargestellt. Da die Reste I-III und II-IV Disulfidbrücken formen, besteht ein einzelner *short consensus repeat* (SCR) aus drei Schleifen. Die in der zweiten Schleife des SCR 4 lokalisierte Adhäsionserkennungssequenz RGD ist rot markiert.

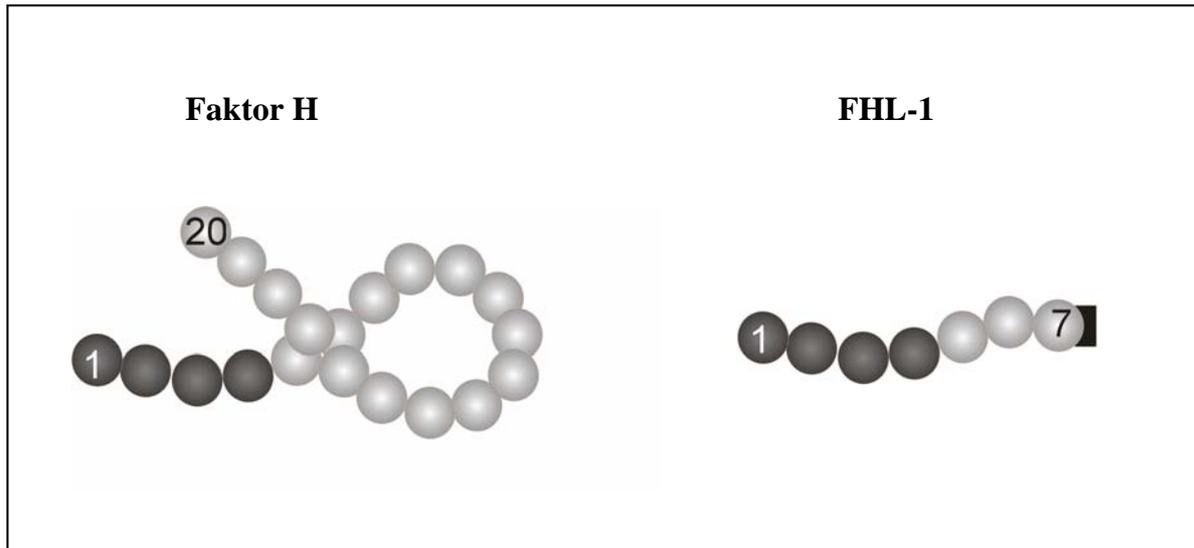


Abb. I.6: Struktureller Aufbau von Faktor H und FHL-1.

Die Plasmaproteine Faktor H und FHL-1 sind aus sich wiederholenden *short consensus repeats* (SCRs) aufgebaut. Jede der dargestellten Kugeln repräsentiert einen SCR. Faktor H besteht aus 20 SCRs, während FHL-1 aus den ersten sieben SCRs von Faktor H aufgebaut ist. FHL-1 besitzt zusätzlich vier konservierte Aminosäuren am C-Terminus (als Rechteck dargestellt). Die für die komplementregulative Aktivität zuständigen SCRs 1-4 sind dunkelgrau gekennzeichnet.

Zusätzlich enthält Faktor H je drei Bindungsstellen für C3 und Heparin (Abb. I.7; Pangburn et al., 1993; Blackmore et al., 1996, 1998a; Jokiranta et al., 1996, 2000; Sharma und Pangburn, 1996; Pangburn, 2000; Giannakis et al., 2001, 2003). Jede der drei C3-Bindungsstellen interagiert mit einer bestimmten Region im C3-Protein (Jokiranta et al., 2000).

Das FHL-1-Protein ist eine Spleißvariante des Faktor H-Gens (Zipfel und Skerka, 1994, 1999; Zipfel et al., 1999). Es besteht aus den sieben N-terminalen SCRs von Faktor H und besitzt zusätzlich die vier Aminosäuren Serin, Phenylalanin, Threonin und Leucin am C-terminalen Ende (Abb. I.6). Die kalkulierte Masse des sezernierten FHL-1-Proteins beträgt 49 kDa. Im Plasma liegt das Protein in Konzentrationen von 10-50 µg/ml vor. Analog zu Faktor H liegen die regulativen Domänen innerhalb der SCRs 1-4 (Abb. I.7; Kühn et al., 1995; Kühn und Zipfel, 1996). Diese enthalten weiterhin eine Bindungsstelle für C3, während in SCR 7 die Heparinbindungsstelle lokalisiert ist (Blackmore et al., 1996). Zusätzlich zur komplementregulativen Aktivität wirkt FHL-1 als Adhäsionsprotein. Die dafür notwendige Arg-Gly-Asp-(RGD-)Sequenz befindet sich in SCR 4 (Abb. I.5; Zipfel und Skerka, 1999).

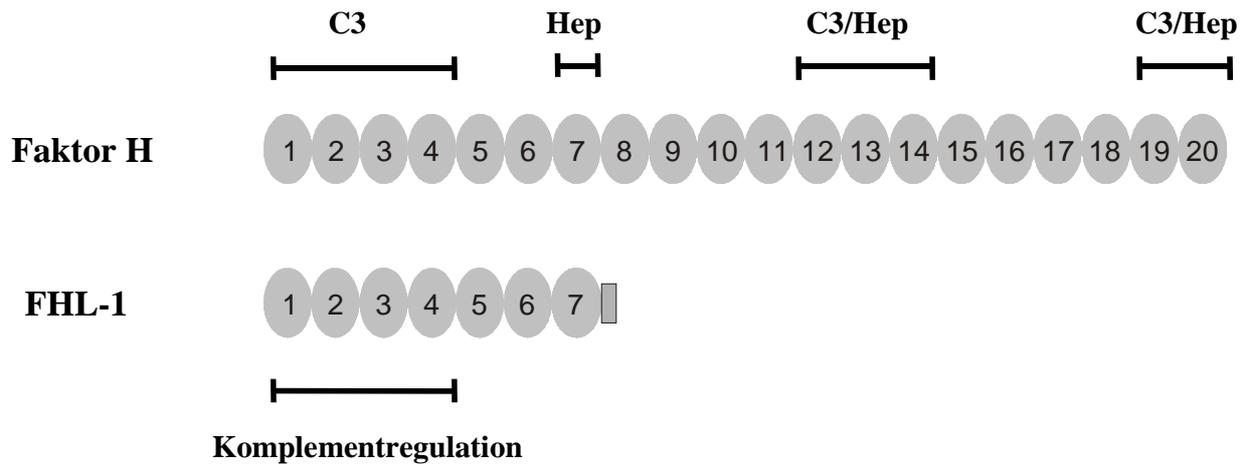


Abb. I.7: Darstellung der funktionalen Domänen von Faktor H und FHL-1.

Gekennzeichnet sind die funktionalen *short consensus repeats* (SCRs) von Faktor H und FHL-1. C3: Bindungsstelle für C3; Hep: Bindungsstelle für Heparin; Komplementregulation: für die komplementregulative Aktivität verantwortliche Domänen.

4.3 Strategien der Komplementresistenz von Borrelien

Die Aktivierung der Komplementkaskade wird durch das Eindringen eines Mikroorganismus in den menschlichen Körper ausgelöst und führt zur Lyse der Zellen. Die drei wichtigsten humanpathogenen Borreliengenospezies *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* und *B. garinii* differieren in ihrer Resistenz gegenüber der lytischen Wirkung von Komplement und werden in resistente, sensitive und intermediär resistente Isolate unterteilt (Brade et al., 1992; Breitner-Ruddock et al., 1997; van Dam et al., 1997; Kraiczy et al., 2000a). Isolate der Genospezies *B. afzelii* zeigen überwiegend einen komplementresistenten Phänotyp, während *B. garinii*-Isolate komplementsensitiv sind. Die Genospezies *B. burgdorferi* s.s. verhält sich intermediär komplementresistent gegenüber der lytischen Komplementwirkung.

Aufgrund der Aktivierung der Komplementkaskade müssen humanpathogene Mikroorganismen zahlreiche Strategien entwickeln, um in ihren Wirten überleben zu können (Joiner, 1988; Cooper, 1991; Horstmann, 1992; Würzner, 1999). Eine dieser Strategien ist die Bindung der Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1 (Lindahl et al., 2000; Zipfel et al., 2002) an die Oberfläche zahlreicher Pathogene wie *B. burgdorferi* s.s. (Alitalo et al., 2001; Hellwage et al., 2001; Kraiczy et al., 2001b; Stevenson et al., 2002), *B. hermsii* (Hovis et al., 2004), *Candida albicans* (Meri et al., 2002a), *Echinococcus granulosus* (Diaz et al., 1997), HIV (Stoiber et al., 1996), *Neisseria gonorrhoeae* (Ram et al., 1998 a,b), *Neisseria meningitidis* (Ram et al., 1999), *Onchocerca volvulus* (Meri et al., 2002b), *Streptococcus*

pyogenes (Blackmore et al., 1998b; Kotarsky et al., 1998), *Streptococcus pneumoniae* (Jarva et al., 2002) und *Yersinia enterocolitica* (China et al., 1993).

Untersuchungen zeigten, dass komplementresistente Borrelien im Gegensatz zu komplementsensitiven Borrelien in der Lage sind, Faktor H und FHL-1 aus normalem humanem Serum (NHS) zu adsorbieren und an ihre Oberfläche zu binden (Kraiczy et al., 2001a,b,d, 2002; Alitalo et al., 2001; Hellwage et al., 2001). Wie schon beschrieben, inhibieren beide Faktoren die Komplementaktivierung, indem sie vor allem den C3b-Abbau beschleunigen. Durch die Bindung dieser Faktoren sind komplementresistente Borrelien in der Lage, die Komplementaktivierung direkt auf ihrer Oberfläche zu regulieren und somit die Opsonisierung und die anschließende Lyse zu verhindern. Dagegen konnten auf der Oberfläche komplementsensitiver Borrelien deutliche Ablagerungen der Komplementkomponenten C3 und C6 sowie des MAC detektiert werden (Breitner-Ruddock et al., 1997; Kraiczy et al., 2000a).

5 Mit den Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1 interagierende Oberflächenproteine von Borrelien

5.1 *Complement regulator-acquiring surface proteins (CRASPs)*

Studien zur Komplementresistenz von Borrelien ergaben, dass für die Adsorption von Faktor H und FHL-1 aus dem Serum bestimmte Borrelienproteine sog. *complement regulator-acquiring surface proteins* (CRASPs) verantwortlich sind (Kraiczy et al., 2001a,b, 2002). Die CRASP-Proteine werden nur von komplementresistenten und intermediär komplementresistenten Isolaten exprimiert. Faktor H und FHL-1 interagieren mit den oberflächenständigen CRASP-Proteinen. Die Bindung wird hauptsächlich über die C-terminalen Domänen von Faktor H und FHL-1 vermittelt, wodurch die in den N-terminalen SCRs 1-4 lokalisierte komplementregulative Aktivität der Faktoren erhalten bleibt (Kraiczy et al., 2001a,b, 2002). Die über die CRASP-Proteine an die Borrelienoberfläche gebundenen Komplementregulatoren können deshalb als Kofaktoren für die Faktor I-vermittelte Inaktivierung von C3b zu iC3b fungieren (Abb. I.8). Diese Spaltung bewirkt die beschleunigte Dissoziation der C3-Konvertase von der Borrelienoberfläche und verhindert die Opsonisierung und Lyse der Borrelienzelle. Die Bindung der Komplementregulatoren durch die CRASP-Proteine inhibiert somit die Aktivierung des Komplementsystems direkt auf der Borrelienoberfläche.

Wie schon erwähnt, zeigen komplementensensitive Isolate keine Expression von CRASP-Proteinen (Kraiczky et al., 2002). Die Aktivierung des klassischen und/oder alternativen Komplementweges führt bei diesen Isolaten deswegen zur massiven Ablagerung von C3b auf der Borrelienoberfläche und schließlich zur Zellyse (Abb. I.9; Brade et al., 1992; Breitner-Ruddock et al., 1997; Kraiczky et al., 2000a).

Um die CRASP-Proteine der verschiedenen Genospezies unterscheiden zu können, wurden die in *B. afzelii*-Stämmen nachgewiesenen CRASP-Proteine als BaCRASPs und die von *B. burgdorferi* s.s.-Isolaten exprimierten CRASP-Proteine als BbCRASPs bezeichnet. Wie die Tabelle I.2 zeigt, konnten für diese Genospezies je fünf CRASP-Proteine detektiert werden.

Tab. I.2: Übersicht über die von komplementresistenten *B. afzelii*- und intermediär komplementresistenten *B. burgdorferi* s.s.-Isolaten exprimierten CRASP-Proteine (modifiziert nach Kraiczky et al., 2002).

Protein	Gruppe	Masse [kDa]*	Bindungsdomäne FHL-1	Bindungsintensität FHL-1	Bindungsdomäne Faktor H	Bindungsintensität Faktor H
BaCRASP-1	I	27,5	SCRs 5-7	++	SCRs 1-7	+
BaCRASP-2	I	20,7	SCRs 6-7	++	SCRs 1-7	++
BaCRASP-3	II	20,4	SCRs 6-7	+	-	-
BaCRASP-4	III	19,2	-	-	SCRs 19-20	+
BaCRASP-5	III	22,6	-	-	SCRs 19-20	+
BbCRASP-1	I	25,9	SCRs 6-7	++	SCRs 1-7 SCRs 19-20	++/+ +
BbCRASP-2	I	23,2	SCRs 6-7	++	SCRs 1-7	+
BbCRASP-3	III	19,8	-	-	SCRs 19-20	+
BbCRASP-4	III	18,5	-	-	SCRs 19-20	+
BbCRASP-5	III	17,7	-	-	SCRs 19-20	++/+

(++) starke Bindungsaffinität, (+) schwache Bindungsaffinität, (-) keine Bindung

* Die Massenbestimmung erfolgte anhand 10 %iger Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamidgele.

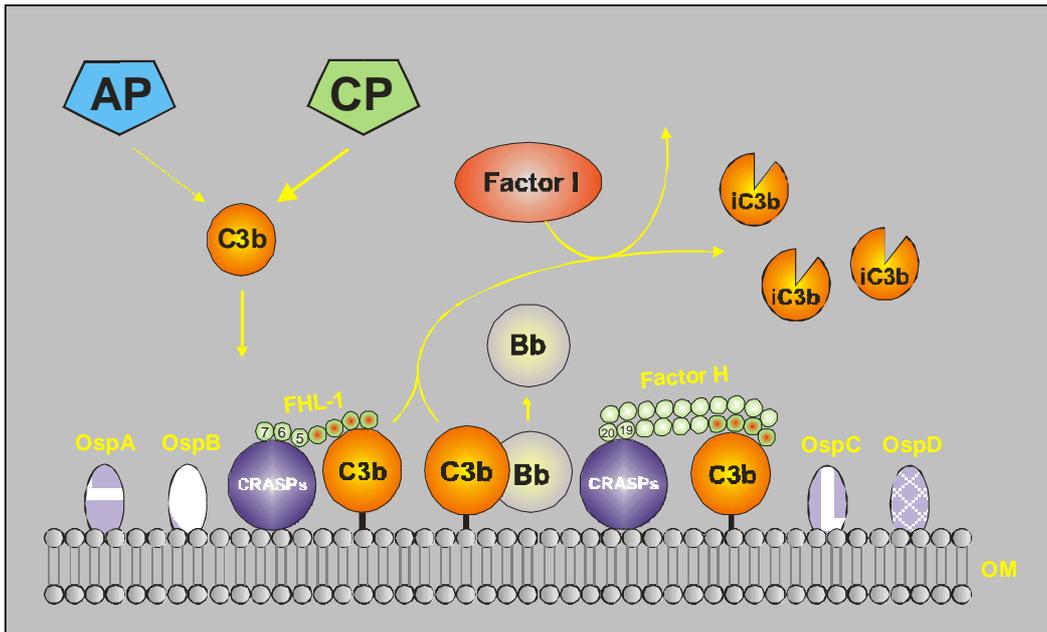


Abb. I.8: Regulation der Komplementaktivierung auf der Oberfläche komplementresistenter und intermediär komplementresistenter Borrelien-Isolate (aus Kraiczy et al., 2002).

AP: alternativer Weg; CP: klassischer Weg; Bb: gesplante Form von Faktor B; C3b: Fragment von C3; iC3b: inaktivierte Form von C3b; C3bBb: C3-Konvertase; CRASPs: *complement regulator-acquiring surface proteins*; OM: äußere Membran; Ospa-D: *outer surface proteins A-D*.

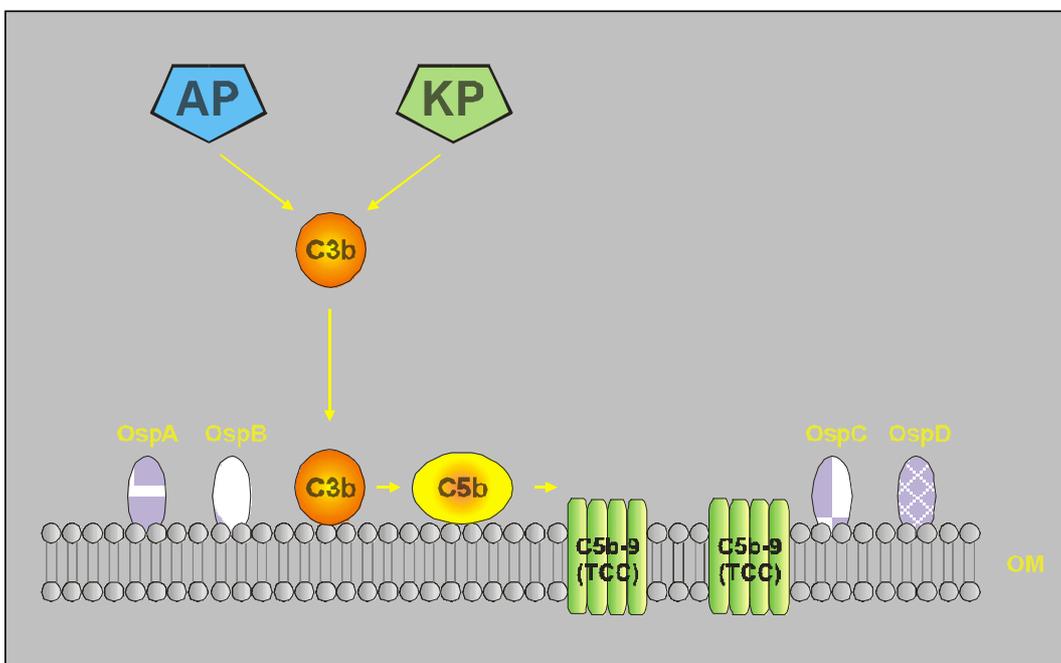


Abb. I.9: Modell der Komplementaktivierung bei komplementsensitiven Borrelien-Isolaten (aus Kraiczy et al., 2002).

AP: alternativer Weg; KP: klassischer Weg; C3b: Fragment von C3; C5b: Fragment von C5; TCC: *terminal complement complex*; OM: äußere Membran; Ospa-D: *outer surface proteins A-D*.

Anhand ihrer unterschiedlichen Bindungsprofile erfolgte die Einteilung der CRASP-Proteine in drei Gruppen. Gruppe I repräsentiert die Proteine, die sowohl Faktor H als auch FHL-1 binden. Hierzu zählen BaCRASP-1, BaCRASP-2, BbCRASP-1 und BbCRASP-2. Charakteristisch für Proteine dieser Gruppe ist die im Vergleich mit Faktor H stärkere Bindungsaffinität zu FHL-1. Gruppe II enthält BaCRASP-3, das nur mit FHL-1 interagiert. Zur Gruppe III gehören mit BaCRASP-4, BaCRASP-5, BbCRASP-3, BbCRASP-4 und BbCRASP-5 die spezifisch Faktor H-bindenden Proteine (Tab. I.2; Kraiczy et al., 2001a, 2002).

Bis jetzt wurden zwei der CRASP-Proteine BbCRASP-1 und BbCRASP-3 weitgehend charakterisiert. Mit Hilfe einer genomischen DNA-Expressionsbibliothek konnte das *bbCRASP-3*-Gen des *B. burgdorferi* s.s.-Stammes ZS7 identifiziert werden (Kraiczy et al., 2003). Der analysierte Klon besitzt einen offenen Leserahmen von 558 nt und kodiert für ein 20,7 kDa-Protein. Die Nukleotidsequenz des *bbCRASP-3*-Gens ist homolog zu dem *bbn38*-Gen des *B. burgdorferi* s.s.-Stammes B31. Weiterhin weist die Aminosäuresequenz von BbCRASP-3 signifikante Homologien zu den Aminosäuresequenzen der ebenfalls Faktor H-bindenden Erp-Proteine (siehe auch I.5.2) ErpP (99,8 % Sequenzidentität), ErpA (82,8 % Sequenzidentität) und ErpC (76,1 % Sequenzidentität) auf (Kraiczy et al., 2003). Dies zeigt, dass BbCRASP-3 ein Mitglied der *OspE/F-related protein*-(Erp-)Proteinfamilie ist, welche von Genen des zirkulären Plasmids cp32 kodiert wird (Stevenson et al., 1996, 1998a; Casjens et al., 2000). BbCRASP-3 bindet spezifisch an den C-Terminus von Faktor H. Mit Hilfe von Deletionsmutanten konnten die neun C-terminalen Aminosäuren Leu-Glu-Val-Leu-Lys-Lys-Asn-Leu-Lys (LEVLKKNLK) von BbCRASP-3 als Faktor H-Bindungsstelle lokalisiert werden (Kraiczy et al., 2003).

Das äußere Membranprotein BbCRASP-1 stellt das dominierende Faktor H- und FHL-1-bindende Protein der Borrelien dar (Kraiczy et al., 2004a). Das BbCRASP-1-Protein des *B. burgdorferi* s.s.-Isolates ZS7 wird von dem *cspA*-Gen kodiert, welches auf dem linearen Plasmid lp54 lokalisiert ist und eine Sequenzidentität von 99,9 % zu dem *bba68*-Gen des Stammes B31 aufweist (Kraiczy et al., 2004a; Wallich et al., 2005). BbCRASP-1 zeigt keine Homologie zu den Erp-Proteinen, sondern gehört der paralogen Genfamilie gbb54 an, die 14 Proteine mit bisher unbekanntenen Funktionen umfasst. Das *cspA*-Gen kodiert ein oberflächenständiges Lipoprotein mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 28 kDa. Für BbCRASP-1 wurden drei potentielle Faktor H-Bindungsstellen in der Mitte und im C-terminalen Bereich des Proteins lokalisiert. Weitere Analysen zeigten, dass die C-terminalen 11 Aminosäuren essentiell für die Bindung an Faktor H und FHL-1 sind. Für

diese Interaktion sind außerdem die SCRs 5-7 von Faktor H und FHL-1 verantwortlich. Weiterhin konnte eine schwache Beteiligung der SCRs 19-20 von Faktor H detektiert werden.

5.2 *OspE/F-related protein-(Erp-)Proteinfamilie*

Neben den CRASP-Proteinen besitzen einige Mitglieder der *outer surface protein (osp)E/F-related protein-(Erp-)Proteinfamilie* die Fähigkeit, an Faktor H zu binden (Hellwage et al., 2001; McDowell et al., 2002, 2004; Stevenson et al., 2002). Diese Erp-Proteine sind in der äußeren Membran lokalisiert und auf der Oberfläche exponiert (Lam et al., 1994; El-Hage et al., 2001).

In der Literatur werden verschiedene Namen für die *erp*-Gene verwendet. Zuerst wurde der Genort bei dem *B. burgdorferi* s.s.-Isolat N40 identifiziert und als *ospEF*-Operon bezeichnet (Lam et al., 1994). Weitere Bezeichnungen für die Gene sind *p21*, *pG*, *elpA*, *elpB*, *bbk2.10*, *bbk2.11* und *upstream homology box* (Lam et al., 1994; Akins et al., 1995, 1999; Suk et al., 1995; Wallich et al., 1995; Marconi et al., 1996). Seitdem bei unterschiedlichen Stämmen mehrere dieser Genorte gefunden wurden, wird aber vor allem der Begriff *erp*-Gene gebraucht. Die Erp-Proteine können aufgrund ihrer evolutionären Abstammung drei verschiedenen Gruppen zugeordnet werden (Stevenson et al., 1998b, 2003; Akins et al., 1999). Die *ospE*-Gruppe enthält die Gene, die dem *ospE*-Gen des Stammes N40 ähneln. Verwandte Gene des *ospF*-Gens von N40 bilden die *ospF*-Familie, während unter die *elp*-(*ospEF-like peptide*)-Gruppe diejenigen Gene fallen, die weder zur *ospE*- noch zur *ospF*-Familie gehören, aber *ospEF*-ähnliche *Leader*-Peptidsequenzen besitzen (Akins et al., 1999). Nach ihrer Familienzugehörigkeit werden die *erp*-Gene deswegen alternativ als *ospE*-, *ospF*- oder *elp*-Gene bezeichnet (Stevenson et al., 2000).

Trotz der unterschiedlichen Abstammung besitzen die *erp*-Genorte einige grundsätzliche Gemeinsamkeiten. Dazu gehören nahezu identische 5' nicht-kodierende Regionen, welche die Promotorsequenzen für die Transkription sowie die regulatorischen Elemente enthalten (Lam et al., 1994; Akins et al., 1995; Wallich et al., 1995; Marconi et al., 1996; Stevenson et al., 1996, 1998a,b; Casjens et al., 1997, 2000b; Sung et al., 1998; Babb et al., 2004). Sequenzanalysen zeigten, dass die *erp*-Gene für Lipoproteine mit gleichen *Leader*-Peptidsequenzen kodieren. Die untersuchten Proteine sind auch *in vivo* in *B. burgdorferi* s.s. lipidiert. Weiterhin handelt es sich bei den Erp-Proteinen um stark geladene Proteine mit vielen Glutamat- und Lysinresten.

Die *erp*-Gene sind auf den cp32-Plasmiden lokalisiert (Casjens et al., 2000; Stevenson et al., 2000). Der *B. burgdorferi* s.s.-Stamm B31 besitzt sieben homologe cp32-Plasmide mit einer Größe von 29 bis 32 kb (Stevenson et al., 1996, 1998a; Zückert und Meyer, 1996; Casjens et al., 1997, 2000). Jedes der cp32-Plasmide enthält einen *erp*-Genort, welcher für ein oder zwei Erp-Proteine kodiert (Abb. I.10). In Abbildung I.10 ist ein Sequenzvergleich der sieben cp32-Plasmide dargestellt. Wie der Abbildung entnommen werden kann, sind die Plasmide stark homolog (Casjens et al., 2000). Es fallen drei Regionen auf, die eine höhere Diversität als die restliche cp32-DNA aufweisen. Diese Regionen sind bei 17 kb (Mlp-Lipoprotein), 22 kb (mutmaßliches Gensegregationscluster) und 27 kb (Erp-Lipoproteine) lokalisiert.

Die umfassende Ähnlichkeit der cp32-Plasmide legt nahe, dass die Plasmide durch Rekombinationen entstanden sind. Aufgrund der hohen Variabilität der Erp- und Mlp-Lipoproteine wird vermutet, dass diese Proteine eine wichtige Rolle bei der Immunevasion spielen (Porcella et al., 1996; Stevenson et al., 1996, 1998a; Casjens et al., 1997)

Es wird weiterhin vermutet, dass die cp32-Plasmide Prophagen repräsentieren könnten, da

- a) einige *B. burgdorferi* s.s.-Stämme Bakteriophagen-ähnliche Partikel produzierten (Hayes et al., 1983; Neubert et al., 1993; Schaller und Neubert et al., 1994);
- b) die Sequenzverwandtschaft der cp32-Plasmide an temperente Bakteriophagenfamilien erinnert (Casjens et al., 1992, 1997);
- c) Prophagen oft Gene exprimieren, welche die Interaktion zwischen Bakterium und Wirt beeinflussen (Cheetham und Katz, 1995).

Diese Theorie wird durch Analysen untermauert, in denen mit *B. burgdorferi* s.s.-Kulturen assoziierte Bakteriophagen-ähnliche Partikel isoliert werden konnten, die cp32-DNA-Moleküle enthielten (Eggers und Samuels, 1999).

Das lineare Plasmid lp56 enthält eine identische Kopie eines cp32-ähnlichen Plasmids (Abb. I.10; Casjens et al., 2000). Diese Region ist nicht identisch mit einem der sieben cp32-Plasmide, stellt aber ein Mitglied der cp32-Sequenzfamilie dar. Vermutlich entstand das lp56-Plasmid durch Integration eines zirkulären cp32-Plasmids in ein lineares Plasmid (Casjens et al., 2000).

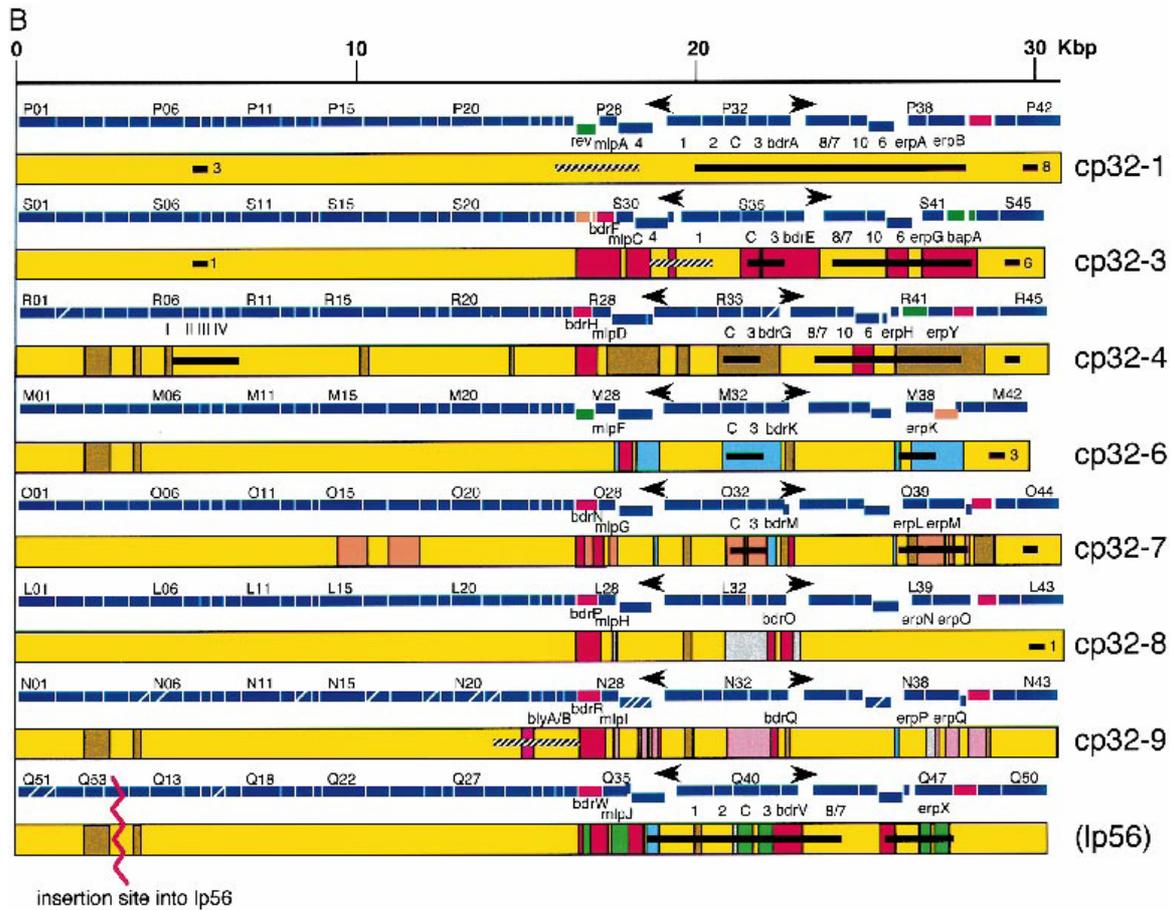


Abb. I.10: Vergleich der cp32-Plasmide des *B. burgdorferi* s.s.-Isolates B31 (aus Casjens et al., 2000).

Abgebildet sind die Genkarten von sieben cp32-Plasmiden und der cp32-ähnlichen Segmente des Ip56-Plasmids. Die verschiedene Farbgebung der einzelnen Balken symbolisiert Sequenzen, die sich um mehr als 10 % voneinander unterscheiden. Gleiche Farbgebung kennzeichnet Sequenzfolgen, die zu mehr als 90 % identisch sind. Die schmalen Balken stellen den vorhergesagten offenen Leserahmen dar. In blau dargestellt symbolisieren diese Balken paraloge Gene, die in allen acht dargestellten Plasmiden vorkommen. Abschnitte, die durch andere Farbgebung (rot, orange, grün) charakterisiert sind, symbolisieren Gene, die nicht auf allen Plasmiden lokalisiert sind. Weiße Schrägstriche innerhalb dieser schmalen Balken markieren Stopkodons oder Leserasterverschiebungen. Horizontale schwarze und schraffierte Balken stellen sequenzierte Regionen dar, welche zum Teil bereits früher einzelnen cp32-Plasmiden zugeordnet wurden (Zückert und Meyer, 1996; Casjens et al., 1997; Gilmore et al., 1997; Guina und Oliver, 1997; Stevenson et al., 1998a). Die Nummerierung einiger dieser Balken bezieht sich auf diejenigen cp32-Plasmide, die in diesen Regionen identisch sind. Die kurzen Pfeile markieren eine ~180 bp lange invertierte Sequenzwiederholung zwischen dem BBP30-BBP34-Gencluster.

Bis jetzt konnten im *B. burgdorferi* s.s.-Stamm B31 auf zehn verschiedenen Genorten 17 *erp*-Gene lokalisiert werden. Die kodierenden Regionen der drei bizistronischen Genorte *erpAB*, *erpIJ* und *erpNO* sind identisch. Aufgrund dessen sind ihre Proteinprodukte nicht voneinander unterscheidbar und werden deshalb als ErpA/I/N (in dieser Arbeit ErpA) und ErpB/J/O (in

dieser Arbeit ErpB) bezeichnet. Die anderen sieben Genorte kodieren für Erp-Proteine, deren Sequenzen Identitätsgrade zwischen 16 und 100 % zueinander aufweisen (Casjens et al., 1997, 2000; Stevenson et al., 1998a,b; Akins et al., 1999; El-Hage et al., 2001).

In Kultur steigt die Synthese der Erp-Proteine bei Erhöhung der Temperatur von 23 °C auf 35 °C an (Stevenson et al., 1995, 1998a; Akins et al., 1998). Dieser Temperaturwechsel entspricht dem Anstieg der Temperatur, den Borrelien im Mitteldarm einer Zecke während der Blutmahlzeit erfahren. Weiterhin nimmt durch den Temperaturwechsel bzw. die Blutmahlzeit die Zahl der Bakterien deutlich zu (Piesman et al., 1990; de Silva und Fikrig, 1995; Stevenson et al., 1995), wodurch ebenfalls Signale für eine erhöhte Produktion an Erp-Proteinen ausgelöst werden könnten. Andere Studien zeigten dagegen, dass die Synthese der Erp-Proteine nicht nur durch den Temperaturwechsel, sondern ebenfalls von chemischen Substanzen im Blut, in der Speicheldrüse der Zecke oder in anderen beteiligten Geweben ausgelöst wird (Akins et al., 1995, 1998; Suk et al., 1995; Wallich et al., 1995; Das et al., 1997; Babb et al., 2001).

II. Zielsetzung

Durch die Bindung der Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1 an die BbCRASP-Proteine sind die Borrelien in der Lage, die Komplementaktivierung direkt auf ihrer Oberfläche zu inhibieren und somit der Bakteriolyse zu entgehen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Isolierung und Charakterisierung von BbCRASP-Proteinen, wobei der Schwerpunkt auf der Identifizierung des bislang unbekanntes BbCRASP-2-Proteins lag. Für diese Untersuchungen wurde das europäische *B. burgdorferi* s.s.-Isolat LW2 ausgewählt, weil dieser Stamm alle fünf BbCRASP-Proteine exprimiert. Zusätzlich fand das nordamerikanische *B. burgdorferi* s.s.-Isolat B31 Verwendung, da dessen Genom vollständig sequenziert vorliegt.

In früheren Arbeiten konnten mit BbCRASP-1 und BbCRASP-3 zwei der fünf BbCRASP-Proteine des *B. burgdorferi* s.s.-Isolates ZS7 weitgehend charakterisiert werden.

Das BbCRASP-3-Protein interagiert spezifisch mit Faktor H und ist ein Mitglied der *OspE/F-related protein*-(Erp-)Proteinfamilie (Kraiczky et al., 2003). BbCRASP-4 und BbCRASP-5 binden ebenfalls nur Faktor H (Kraiczky et al., 2001a, 2002). Da diese spezifische Bindung an Faktor H auch für drei Mitglieder der Erp-Proteinfamilie bekannt ist (Hellwege et al., 2001; Alitalo et al., 2002; Stevenson et al., 2002; Kraiczky et al., 2003; McDowell et al., 2003), wurde vermutet, dass die spezifisch Faktor H-bindenden CRASP- und Erp-Proteine immunologisch verwandte Proteine darstellen. Um diese Theorie zu überprüfen, sollten die Faktor H-bindenden CRASP-Proteine des *B. burgdorferi* s.s.-Isolates B31 sowie der *B. afzelii*-Isolate EB1 und FEM1-D15 mittels Antikörpern gegen die Erp-Proteine ErpA und ErpP immunologisch charakterisiert werden. Weitere Ziele waren die Identifizierung der Faktor H-bindenden BbCRASP-Proteine des *B. burgdorferi* s.s.-Isolates LW2 und die Lokalisierung der mit den CRASP- und Erp-Proteinen interagierenden Regionen von Faktor H.

Im Gegensatz zu BbCRASP-3 bindet das BbCRASP-1-Protein sowohl Faktor H als auch FHL-1. Im Rahmen dieser Arbeit sollte das BbCRASP-1-Protein des Stammes LW2 identifiziert und die erhaltene Sequenz mit den bekannten Sequenzen der BbCRASP-1-Proteine der Isolate ZS7 und B31 verglichen werden.

Das BbCRASP-2-Protein stellt neben BbCRASP-1 das zweite Faktor H- und FHL-1-bindende Protein dar. Nach der Identifizierung des bisher unbekanntes BbCRASP-2-Proteins sollten die Faktor H- und FHL-1-Bindestellen im Protein charakterisiert und die für die Bindung an das Protein verantwortlichen Regionen von Faktor H und FHL-1 ermittelt werden.

III. Material und Methoden

1 Material

1.1 Stämme

1.1.1 Borrelienstämme

Das in dieser Arbeit verwendete Stammkollektiv setzte sich aus 17 Isolaten der drei humanpathogenen Genospezies *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* und *B. garinii* zusammen (Tab. III.1).

Tab. III.1: Stammkollektiv der in dieser Arbeit verwendeten Borrelienisolate.

Isolat	Genospezies	Biologische Herkunft	Geographische Herkunft
LW2	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	Haut	BRD
B31	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	Zecke	USA
PKa-1	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	Liquor	BRD
297	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	Liquor	USA
ZS7	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	Zecke	BRD
N40	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	Zecke	USA
Sh-2-82	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	Zecke	USA
B31-e2	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	Klon des Isolates B31	Casjens et al., 1997
B313	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	Klon des Isolates B31	Sadziene et al., 1992, 1993a, 1995
297mut	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	Klon des Isolates 297	Patarakul et al., 1999
PKo	<i>B. afzelii</i>	Haut	BRD
FEM1-D15	<i>B. afzelii</i>	Haut	BRD
EB1	<i>B. afzelii</i>	Haut	BRD
PSth	<i>B. garinii</i>	Haut	BRD
A87S _B	<i>B. garinii</i>	Haut	Niederlande
ZQ1	<i>B. garinii</i>	Zecke	BRD

1.1.2 *E. coli*-Stämme

Tab. III.2: Zusammenfassung der in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämme.

Stamm	Referenz	Genotyp	Verwendung
<i>E. coli</i> DH5 α F'		F'/endA1 hsdR17(r _k ⁻ m _k ⁺) glnV44 thi-1 recA1 gyrA (Nal ^r) relA1 Δ (lacZYA-argF)U169 deoR(ϕ 80dlac Δ (lacZ)M15)	Transformation, Überexpression rekombinanter Proteine
<i>E. coli</i> XL1-Blue MRF'	Stratagene, Heidelberg	Δ (mcrA)183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI ^q Z Δ M15 Tn10 (Tet ^r)]	Wirtsstamm Phagengenbank
<i>E. coli</i> XL0LR	Stratagene, Heidelberg	Δ (mcrA)183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI ^q Z Δ M15 Tn10 (Tet ^r)] Su ⁻ λ ^r	Wirtsstamm Phagengenbank

1.2 Kulturmedien

1.2.1 Kulturmedium zur Anzucht von Borrelien

Ein modifiziertes BSK-Kulturmedium (Barbour-Stoenner-Kelly-Medium) diente als Nährmedium zur Anzucht aller verwendeten Borrelien-Stämme (Preac-Mursic et al., 1986).

Grundmedium

HEPES	6,0 g/l
Neopepton	5,0 g/l
Natriumcitrat	0,7 g/l
Glucose	5,0 g/l
Natriumbicarbonat	2,2 g/l
Natriumpyruvat	0,8 g/l
Natriumacetylglucosamin	0,4 g/l

Die Lösung des Grundmediums erfolgte in 800 ml A. demin. Anschließend wurde die Lösung mit 100 ml 10x CMRL-Medium (Invitrogen, Karlsruhe) substituiert, der pH-Wert mit 1 M NaOH auf 7,6 eingestellt und mit A. demin. auf ein Endvolumen von 1 l aufgefüllt. Dieses

Grundmedium wurde mit einem 0,22 µm-Filter sterilfiltriert und konnte für 3-4 Monate bei -20 °C gelagert werden.

Kulturmedium

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

Die Lagerung des Kulturmediums erfolgte für 3-4 Wochen bei 4 °C.

Alle verwendeten Festsubstanzen entsprachen dem höchsten Reinheitsgrad.

1.2.2 Kulturmedien zur Anzucht von *E. coli*

LB Broth (Sambrook et al., 1989)

Natriumchlorid	10,0 g/l
Hefe-Extrakt	5,0 g/l
Bacto-Trypton	10,0 g/l
ad 1 l A. dest.	
pH 7,5 (1 M NaOH)	

2x YT Broth (Sambrook et al., 1989)

Natriumchlorid	10,0 g/l
Hefe-Extrakt	10,0 g/l
Bacto-Trypton	16,0 g/l
ad 1 l A. dest.	
pH 7,5 (1 M NaOH)	

NZY Broth (Stratagene, Heidelberg)

Natriumchlorid	5,0 g/l
Magnesiumsulfat x 7 H ₂ O	2,0 g/l
Hefe-Extrakt	5,0 g/l
<i>NZ Amine</i>	10,0 g/l

ad 1 l A. dest.

pH 7,5 (1 M NaOH)

Für Festmedien wurden 1,8 % (w/v) Agar zugesetzt. Bei Bedarf erfolgte die Zugabe der entsprechenden Antibiotika (Ampicillin, Kanamycin je 50 µg/ml gelöst in A. dest., Tetracyclin 12,5 µg/ml gelöst in 50 % (v/v) Ethanol). Für Topagar wurde 0,7 % (w/v) Agarose zu den Flüssigmedien gegeben.

1.3 Vektoren

Tab. III.3: Zusammenfassung der in dieser Arbeit verwendeten Vektoren.

Bezeichnung	Charakteristika	Verwendung	Referenz
pGEX-6P-1	4,9 kb, Ampicillin- Resistenzgen	Überexpression rekombinanter GST- Fusionsproteine	(Genbank-Nummer: U78872) (Amersham Biosciences, Freiburg)
ZAP Express Vektor	38,9 kb, Neomycin-, Kanamycin- Resistenzgen	Klonierung Genbank	(Stratagene, Heidelberg)
pBK-CMV	4,5 kb, Phagemid Neomycin-, Kanamycin- Resistenzgen	<i>In vivo</i> -Exzision	(Stratagene, Heidelberg)

1.4 Plasmidkonstrukte

Tab. III.4: Zusammenfassung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

Bezeichnung	Charakteristika	Referenz
pGEX LW A69	ca. 615 bp Fragment des <i>bba69</i> -Gens des Isolates LW2 in pGEX-6P-1; Oligonukleotide: bba69-141(+), bba69-Eco	diese Arbeit
pGEX B31A69	ca. 615 bp Fragment des <i>bba69</i> -Gens des Isolates B31 in pGEX-6P-1; Oligonukleotide: bba69-141(+), bba69-Eco	diese Arbeit
pGEX B31 BBH06	ca. 660 bp Fragment des <i>bbh06</i> -Gens des Isolates B31 in pGEX-6P-1; Oligonukleotide: bbh06-Bam, bbh06-Xho	diese Arbeit
pGEX B31 BBH06 ₂₁₋₂₃₀	ca. 630 bp Fragment des <i>bbh06</i> -Gens des Isolates B31 in pGEX-6P-1; Oligonukleotide: bbh06-Bam, 229-XhoI	diese Arbeit
pGEX B31 BBH06 ₂₁₋₂₂₀	ca. 600 bp Fragment des <i>bbh06</i> -Gens des Isolates B31 in pGEX-6P-1; Oligonukleotide: bbh06-Bam, bbh06 ₁₇₋₂₂₀ (-)	diese Arbeit
pGEX B31 BBH06 ₂₁₋₁₉₁	ca. 510 bp Fragment des <i>bbh06</i> -Gens des Isolates B31 in pGEX-6P-1; Oligonukleotide: bbh06-Bam, bbh06 ₁₇₋₁₇₁ (-)	diese Arbeit
pGEX B31 BBH06 ₂₁₋₁₄₆	ca. 380 bp Fragment des <i>bbh06</i> -Gens des Isolates B31 in pGEX-6P-1; Oligonukleotide: bbh06-Bam, bbh06 ₁₇₋₁₂₆ (-)	diese Arbeit
pGEX B31 BBH06 ₂₁₋₁₀₉	ca. 270 bp Fragment des <i>bbh06</i> -Gens des Isolates B31 in pGEX-6P-1; Oligonukleotide: bbh06-Bam, bbh06 ₁₇₋₈₉ (-)	diese Arbeit
pGEX LW ErpC	ca. 477 bp Fragment des <i>erpC</i> -Gens des Isolates LW2 in pGEX-6P-1; Oligonukleotide : 42(+), 3nc(-)	diese Arbeit

Bezeichnung	Charakteristika	Referenz
pBK LW P38	mittels <i>in vivo</i> -Exzision aus dem ZAP Express Vektor ausgeschnittenes pBK-CMV-Phagemid, das als Insert DNA des Isolates B31 (u.a. das <i>erpA</i> -Gen) enthält	diese Arbeit
pBK LW N38	mittels <i>in vivo</i> -Exzision aus dem ZAP Express Vektor ausgeschnittenes pBK-CMV-Phagemid, das als Insert DNA des Isolates B31 (u.a. das <i>erpP</i> -Gen) enthält	diese Arbeit
pBK LW A68	mittels <i>in vivo</i> -Exzision aus dem ZAP Express Vektor ausgeschnittenes pBK-CMV-Phagemid, das als Insert DNA des Isolates B31 (u.a. das <i>bba68</i> -Gen) enthält	diese Arbeit
pBK LW OspB	mittels <i>in vivo</i> -Exzision aus dem ZAP Express Vektor ausgeschnittenes pBK-CMV-Phagemid, das als Insert DNA des Isolates B31 (u.a. das <i>ospB</i> -Gen) enthält	diese Arbeit
pBLS511 B31 ErpB	<i>erpB</i> -Gen in pProEx-1 (pProEx-1, Invitrogen, Karlsruhe)	Stevenson et al., 1998a
pBLS513 B31 ErpD	<i>erpD</i> -Gen in pProEx-1 (pProEx-1, Invitrogen, Karlsruhe)	Stevenson et al., 1998a
pBLS515 B31 ErpK	<i>erpK</i> -Gen in pProEx-1 (pProEx-1, Invitrogen, Karlsruhe)	Stevenson et al., 1998a
pBLS517 B31 ErpM	<i>erpM</i> -Gen in pProEx-1 (pProEx-1, Invitrogen, Karlsruhe)	Stevenson et al., 1998a
pBLS527 B31 ErpA	<i>erpA</i> -Gen in pET-15b (pET-15b, Novagen, Bad Soden)	Stevenson et al., 1998a, El-Hage et al., 2001
pBLS528 B31 ErpC	<i>erpC</i> -Gen in pET-15b (pET-15b, Novagen, Bad Soden)	Stevenson et al., 1998a, El-Hage et al., 2001

Bezeichnung	Charakteristika	Referenz
pBLS536 B31 ErpQ	<i>erpQ</i> -Gen in pET-15b (pET-15b, Novagen, Bad Soden)	Stevenson et al., 1998a ; El-Hage et al., 2001
pBLS537 B31 ErpL	<i>erpL</i> -Gen in pET-15b (pET-15b, Novagen, Bad Soden)	Stevenson et al., 1998a ; El-Hage et al., 2001
pBLS538 B31 ErpP	<i>erpP</i> -Gen in pET-15b (pET-15b, Novagen, Bad Soden)	Stevenson et al., 1998a ; El-Hage et al., 2001
pBLS539 B31 ErpX	<i>erpX</i> -Gen in pET-15b (pET-15b, Novagen, Bad Soden)	Stevenson et al., 1998a ; El-Hage et al., 2001
pBLS540 B31 ErpY	<i>erpY</i> -Gen in pET-15b (pET-15b, Novagen, Bad Soden)	Stevenson et al., 1998a; El-Hage et al., 2001

1.5 Oligonukleotide

Tab. III.5: Zusammenfassung der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
pGEX (+) ¹	GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG	Sequenzierung
pGEX (-) ¹	CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GG	Sequenzierung
M13 (+) ¹	GTA AAA CGA CGG CCA GT	Sequenzierung
M13 (-) ¹	CAG GAA ACA GCT ATG AC	Sequenzierung
T3-ZAP ²	CCC TTT AGT GAG GGT TAA TT	Sequenzierung
T7-ZAP ²	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C	Sequenzierung
bba69- 141(+) ²	GAA AAA ACC CGC CAA TCC AGG GGG ATC CAT CCA AAA TTT TAA AG	PCR
bba69-Eco ²	GCC TTT TAT TAG ATT GAA TTC ATT TAG ATT TAT TTG GAT CTG GG	PCR

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
bbh06-Bam ²	CAA TAA GTT TAT TAG GAT CCG ATG TTA GTA GAT TAA ATC	PCR
bbh06-Xho ²	CTT AAA TTT ATA CCT CGA GAT CTA TAA TAA AGT TTG C	PCR
229-XhoI ²	CTA TAA TAA AGT TTG CTC GAG AGC TTT ATA AGC C	PCR
bbh06 ₁₇₋₂₂₀ (-) ²	CCC CCT CAA GTT CTC GAG CAG CAC CTA AAA AAT C	PCR
bbh06 ₁₇₋₁₇₁ (-) ²	TAT CAT TAA CCA TAT CTC GAG TAG TTT TCA CAA TAC	PCR
bbh06 ₁₇₋₁₂₆ (-) ²	ATA ACA TCA AAA CTC TCG AGG TAG GCT AAT ACA AC	PCR
bbh06 ₁₇₋₈₉ (-) ²	CTA TAG CAA AAT CCT CGA GTA ATT TAC TTA AAA AC	PCR
42(+) ²	GCT TTG ATA AGT GGA TCC AAA AAT CAT ACT TTA TAT G	PCR
3nc(-) ²	GCT TTT TGA TTC ATA ATT GTT CTC GAG TAT ACT TCT AAC	PCR
Fla 3 ³	CAT TAA CGC TGC TAA TCT TA	PCR
Fla 4 ³	GTA CTA TTC TTT ATA GAT TC	PCR
BB 5S ¹	CTG CGA GTT CGC GGG AGA	PCR
BB 23S ¹	TCC TAG GCA TTC ACC ATA	PCR
OspE ₄₇₀ (-) ¹	GTA GTG ATA TTG CAT ATT CAG	Sequenzierung
OspE ₃₇ (+) ¹	GTT TTT ATA CTC CCG GGT GCT TGC AAA ATT CAT	Sequenzierung
uhb(+) ¹	GTT GGT TAA AAT TAC ATT TGC G	Sequenzierung
CRASP-1 ₁₂₁ ²	CCA AAA AAA ATC ACC AAT CCG	Sequenzierung
Osp A1 ¹	GGG AAT AGG TCT AAT ATT AGC C	Sequenzierung
Osp A2 ¹	CTA GTG TTT TGC CAT CTT CTT TGA	Sequenzierung

¹aus Kraiczky, 2004, ²diese Arbeit, ³aus Fischer, 2002

1.6 Antikörper

Tab. III.6: Zusammenfassung der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper.

Bezeichnung	Zielprotein / Lokalisation	Eigenschaften / Verdünnung	Referenz	zur Verfügung gestellt von
LA3	Hsp70 (Cytoplasma)	monoklonal (1:100)	Kramer et al., 1990	Prof. Dr. R. Wallich, Institut für Immunologie, Universität Heidelberg
LA22.1	p41/Flagellin (Periplasma)	monoklonal (1:100)	Kramer et al., 1990	Prof. Dr. R. Wallich, Institut für Immunologie, Universität Heidelberg
LA25.1	OspB (äußere Membran)	monoklonal (1:100)	Kramer et al., 1990	Prof. Dr. R. Wallich, Institut für Immunologie, Universität Heidelberg
LA28.1	OspA (äußere Membran)	monoklonal (1:100)	Kramer et al., 1990	Prof. Dr. R. Wallich, Institut für Immunologie, Universität Heidelberg
RH-1	BbCRASP-1 (äußere Membran)	monoklonal (1:100)	Kraiczky et al., 2004a	Prof. Dr. R. Wallich, Institut für Immunologie, Universität Heidelberg
VIG8	SCRs 19 + 20 von Faktor H	monoklonal (unverdünnt)	Prodinger et al., 1998	Prof. Dr. P. F. Zipfel, Abteilung für Infektionsbiologie, Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung, Jena

Bezeichnung	Zielprotein / Lokalisation	Eigenschaften / Verdünnung	Referenz	zur Verfügung gestellt von
SCR1-4	SCRs 1-4 von Faktor H und FHL-1	polyklonal (unverdünnt)	Kühn et al., 1995	Prof. Dr. P. F. Zipfel, Abteilung für Infektionsbiologie, Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung, Jena
B22	SCR 7 von Faktor H und FHL-1	monoklonal (1:100)	Prodingler et al., 1998	Prof. Dr. P. F. Zipfel, Abteilung für Infektionsbiologie, Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung, Jena
ErpA	ErpA (äußere Membran)	polyklonal (1:500)	Kraiczky et al., 2004b	Prof. Dr. B. Stevenson, Department of Microbiology, Immunology and Molecular Genetics, University of Kentucky College of Medicine, Lexington, Kentucky, USA
ErpP	ErpP (äußere Membran)	polyklonal (1:500)	Kraiczky et al., 2004b	Prof. Dr. B. Stevenson, Department of Microbiology, Immunology and Molecular Genetics, University of Kentucky College of Medicine, Lexington, Kentucky, USA

Bezeichnung	Zielprotein / Lokalisation	Eigenschaften / Verdünnung	Referenz	zur Verfügung gestellt von
GST	GST	polyklonal (1 :1000)	Amersham Biosciences, Freiburg	

1.7 Rekombinante Proteine

An rekombinant hergestellten Proteinen wurden in dieser Arbeit FHL-1 (SCRs 1-7) und die Deletionsmutanten von FHL-1 (SCRs 1-2, SCR 1-3, SCR 1-4, SCR 1-5, SCR 1-6) sowie die Deletionsmutanten von Faktor H (SCRs 8-20, SCR 15-20, SCR 19-20) (Kühn et al., 1995; Kühn und Zipfel, 1995) verwendet. Diese wurden von Herrn Prof. Dr. P. F. Zipfel (Abteilung für Infektionsbiologie, Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung, Jena) zur Verfügung gestellt.

Außerdem stellte Prof. Dr. R. Wallich (Institut für Immunologie, Universität Heidelberg) gereinigte GST-Fusionsproteine der Borrelienproteine BbCRASP-1 und BbCRASP-3 für die vorliegende Arbeit zur Verfügung.

1.8 Normales humanes Serum (NHS)

Normales humanes Serum (NHS) wurde in dieser Arbeit als Quelle für Faktor H eingesetzt. Es bestand aus einem Serumpool von 20-30 gesunden Blutspenderseren ohne bekannte Manifestation einer Lyme-Borreliose oder anderer von Spirochäten verursachten Infektionen wie z.B. Syphilis.

Nach der Abnahme wurden die Seren 30 min bei Raumtemperatur aufbewahrt und anschließend bei 3.000 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Es erfolgte eine Analyse jedes Serums auf spezifische Antikörper gegen *B. burgdorferi* mittels eines kommerziell verfügbaren ELISA (Dade Behring, Marburg) und eines Immunoblots (Mikrogen, Martinsried). Der Pool setzte sich aus eindeutig negativen Seren zusammen und wurde in Form von Aliquots (1,5 ml) bei -80 °C gelagert.

Zusätzlich wurde kommerziell erhältliches normales humanes Serum AB (Fa. PAA, Cölbe) als Faktor H-Quelle zum Screenen der Lambda-Expressionsbibliothek verwendet.

1.9 Enzyme

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme aufgeführt:

DNase I (Boehringer, Ingelheim), Lysozym (Sigma-Aldrich, Steinheim), *PreScission* Protease (Amersham Biosciences, Freiburg), Proteinase K (Sigma-Aldrich, Steinheim), RNase A (Boehringer, Ingelheim), Restriktionsenzyme (Biolabs, Frankfurt), Sawady *Pwo*-DNA-Polymerase (Peqlab, Erlangen), T4-DNA-Ligase (Biolabs, Frankfurt; Stratagene, Heidelberg), Taq-DNA-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe), Trypsin (Sigma-Aldrich, Steinheim), Trypsin *sequencing grade* (Roche, Mannheim).

1.10 Säulen für die Affinitätschromatographie/magnetische Partikel

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Materialien zur Reinigung rekombinanter Proteine eingesetzt:

GSTrap FF, HiTrap Chelating HP, His MicroSpin, HiTrap NHS-aktiviert (Amersham Biosciences, Freiburg), Dynabeads (Dynal, Hamburg).

1.11 Sonstige Reagenzien und Materialien

An dieser Stelle sind weitere in dieser Arbeit verwendete Reagenzien und Materialien zusammengefasst:

ABI Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Darmstadt), *BCA Protein Assay Reagent* (Pierce, Bonn), Dokumol Entwicklungslösung (Tetenal, Norderstedt), *ECL direct nucleic acid labelling and detection system* und Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences, Freiburg), Spezialindikator pH 6,5-10,0 (Merck, Darmstadt), Mineralöl (Serva, Heidelberg), Nytran N und Protran BA85 (Schleicher & Schuell MicroScience GmbH, Dassel), QIAmp DNA Kit (Qiagen, Hilden), Ready IPG Strip (Bio-Rad, München), recomBlot Waschpuffer und TMB Substratlösung (Mikrogen, Martinsried), *Reversible Protein Detection Kit* (Sigma-Aldrich, Steinheim), Superfix Fixierungslösung (Tetenal, Norderstedt), Ultrafiltrationseinheiten (Vivascience, Hannover), *ZAP Express Predigested Vector Kit* und *ZAP Express Predigested Gigapack Cloning Kit* (Stratagene, Heidelberg).

1.12 Chemikalien

Folgende Chemikalien wurden verwendet:

Acrylamid 2K (Applichem, Darmstadt), AEBSF (Sigma-Aldrich, Steinheim), Agarose (Sigma-Aldrich, Steinheim), Agarose GTQ (Roth, Karlsruhe), Agarose LMP (Sigma-Aldrich, Steinheim), Ameisensäure (Merck, Darmstadt), 6-Aminocapronsäure (Sigma-Aldrich, Steinheim), Ammoniumbicarbonat (Sigma-Aldrich, Steinheim), Ammoniumsulfat (Sigma-Aldrich, Steinheim), APS (Sigma-Aldrich, Steinheim), Borsäure (Merck, Darmstadt), Brij 58 (Sigma-Aldrich, Steinheim), Bromphenolblau (Sigma-Aldrich, Steinheim), CHAPS (Sigma-Aldrich, Steinheim), Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma-Aldrich, Steinheim), DEPC (Sigma-Aldrich, Steinheim), Desoxycholat (Sigma-Aldrich, Steinheim), DMSO (Sigma-Aldrich, Steinheim), DTT (Sigma-Aldrich, Steinheim), EDTA (Sigma-Aldrich, Steinheim), Glutaraldehyd (Applichem, Darmstadt), Glutathion (Sigma-Aldrich, Steinheim), Harnstoff (Roth, Karlsruhe), HEPES (Roth, Karlsruhe), Jodacetamid (Serva, Heidelberg), Natriumcarbonat (Merck, Darmstadt), Natriumhydrogencarbonat (Merck, Darmstadt), Natrium-Laurosyl-Sarkosin (Sigma-Aldrich, Steinheim), Natriumthiosulfat (Applichem, Darmstadt), ortho-Phosphorsäure (Sigma-Aldrich, Steinheim), PMSF (Sigma-Aldrich, Steinheim), Servablau G (Sigma-Aldrich, Steinheim), Silbernitrat (Applichem, Darmstadt), Silikon DC200 (Serva, Heidelberg), Thioharnstoff (Sigma-Aldrich, Steinheim), TEMED (Roth, Karlsruhe), TFA (Sigma-Aldrich, Steinheim), Triton X-100 (Merck, Darmstadt), Tween 20 (Applichem, Darmstadt).

Hier nicht aufgeführte Chemikalien wurden mit dem jeweils höchsten Reinheitsgrad von den Firmen Applichem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen.

1.13 Puffer

Anodenpuffer

100 mM Tris
ad 1 l A. dest.
pH 8,9

Äquilibrierungspuffer

6 M Harnstoff
50 mM Tris/HCl, pH 8,8
30 % Glycerin
2 % SDS
1 Spatelspitze Bromphenolblau

Inkubationspuffer

9 % Glycerin
20 % SDS
150 mM Tris
8 mg Servablau G
600 µl β-Mercaptoethanol
ad 10 ml A. dest.
pH 7,0

Kathodenpuffer

100 mM Tris
100 mM Tricin
0,1 % SDS
ad 1 l A. dest.
pH 8,25

Lyiselösung

6 mM Tris-HCl
1 M Natriumchlorid
100 mM EDTA
0,5 % Brij 58
0,2 % Desoxycholat
0,5 % Natrium-Laurosyl-Sarkosin
20 µg/ml RNase A
1 mg/ml Lysozym

Lysispuffer

7 M Harnstoff
2 M Thioharnstoff
1 % DTT
4 % CHAPS

Lysozypuffer

50 mM Tris
150 mM Natriumchlorid
5 mM Magnesiumchlorid
3 % BSA
400 µg/ml Lysozym
1 U/ml DNase I

Nukleasepuffer

50 mM Magnesiumchlorid
100 mM Tris, pH 7,0
50 µg/ml RNase A
100 µg/ml DNase I

OM-Puffer

10 mM HEPES

150 mM Natriumchlorid

1 mM Magnesiumchlorid

pH 7,4

PBS

140 mM Natriumchlorid

2,7 mM Kaliumchlorid

10 mM Dinatriumhydrogenphosphat

1,8 mM Kaliumdihydrogenphosphat

Proteinasepuffer

0,5 M EDTA

1 % Natrium-Laurosyl-Sarkosin

Rehydratisierungspuffer

8 M Harnstoff

2 % CHAPS

SM-Puffer

5,8 g Natriumchlorid

2,0 g Magnesiumsulfat x 7 H₂O

50 ml 1 M Tris, pH 7,5

5,0 ml 2 % (w/v) Gelatine

ad 1 l A. dest.

TBE

45 mM Tris

45 mM Borat

1 mM EDTA

pH 8,0

TBS

50 mM Tris

200 mM Natriumchlorid

TE

10 mM Tris

1 mM EDTA

pH 8,0

TES

50 mM Tris

50 mM EDTA

15 % (w/v) Saccharose

pH 8,0

Trypsinpuffer

50 mM Ammoniumhydrogencarbonat

5 mM Calciumchlorid

12,5 ng/μl Trypsin (*sequencing grade*)

Waschpuffer

10 mM Tris/HCl

1 M Natriumchlorid

pH 7,6

2 Methoden

2.1 Kultivierung von Borrelien

Die Kultivierung von Borrelien (Tab. III.1) erfolgte in einem modifizierten BSK-Medium (III. 1.2.1). Dazu wurden 7 ml Medium mit ungefähr 3 ml einer bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerten Borrelienkultur angeimpft und diese primäre Flüssigkultur für 5 Tage bei $33\text{ }^{\circ}\text{C}$ angezogen. Von dieser Kultur wurden dann 3 ml mit dem gleichen Volumen frischen BSK-Mediums versetzt und erneut bebrütet. Dieser Vorgang wiederholte sich bis die Kultur eine Konzentration von ungefähr 1×10^8 vitale Borrelienzellen pro ml und einen Farbumschlag von rot nach gelb innerhalb von 3-4 Tagen aufwies. Für die Kultivierung (Passagierung) wurden 0,5 – 1 ml einer bis zur spätlogarithmischen Phase gewachsenen Borrelienkultur in 10 ml BSK-Medium gegeben und bei $33\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zum Erreichen der spät-logarithmischen Phase angezogen. Bei jeder zweiten Passagierung wurden die Borrelienzellen auf ihre Vitalität und Motilität, sowie auf Kontaminationen im Dunkelfeldmikroskop (Zeiss Standard 25 mit Dunkelfeldkondensator) untersucht. In dieser Arbeit wurden nur niedrigpassagierte (max. 15 Passagen) Borrelienkulturen verwendet.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmid-DNA für Restriktionsreaktionen (III. 2.2.5) wurde mittels alkalischer Lyse nach dem Protokoll von Kraft et al., 1988 isoliert. Um hochreine Plasmid-DNA für PCR- (III. 2.2.4) und Sequenzierungsreaktionen (III. 2.2.9) zu erhalten, wurde das QIAmp DNA Aufarbeitungskit (Qiagen, Hilden) verwendet.

2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Borrelien

Plasmid-DNA aus Borrelien wurde nach Barbour, 1988 isoliert. Dazu wurden die Zellen einer 30 ml Kultur sedimentiert ($5.000 \times g$, 30 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) und in TES-Puffer gewaschen. Das Sediment wurde in 240 μl TES-Puffer aufgenommen und mit 24 μl Lysozym (50 mg/ml) versetzt. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurden 300 μl TES-Puffer mit 1 % SDS und 7 μl DEPC hinzugegeben. Die Suspension wurde für 10 min kräftig geschüttelt. Danach erfolgte die Ausfällung der Proteine, indem die Suspension mit 250 μl einer 7,5 M Ammoniumacetat-

Lösung versetzt wurde und für 10 min bei 11.000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert wurde. Zu dem Überstand wurde 850 µl Isopropanol gegeben und die DNA 30 min auf Eis präzipitiert. Nach der Sedimentation (11.000 x g, 20 min, 4 °C) wurde die DNA mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und anschließend in 300 µl TES aufgenommen. Durch Zugabe von 3 µl RNase A (10 mg/ml) und Inkubation für 30 min bei 37 °C erfolgte die Degradierung der RNA. Danach wurden 2 µl DEPC hinzugegeben, für 5 min kräftig geschüttelt und die RNase A anschließend durch Zugabe von 150 µl einer 7,5 M Ammoniumacetat-Lösung und Zentrifugation (11.000 x g, 5 min, Raumtemperatur) präzipitiert. Die sich im Überstand befindenden Plasmide wurden mit 1,3 ml eiskaltem Ethanol (100 %) für 20 min bei -20 °C präzipitiert und nach dem Waschen mit 70 % (v/v) Ethanol in 20 µl TE-Puffer aufgenommen.

2.2.3 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der DNA-Konzentration einer Lösung erfolgte über Messung der optischen Dichte (OD) bei Wellenlängen von 260/280 nm. Dabei entspricht eine optische Dichte von 1 einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml (Sambrook et al., 1989).

2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

DNA-Fragmente wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Dazu wurde folgender Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 100 µl

100 ng Matrizen-DNA

10 µl 10 x PCR-Puffer

5 µl Magnesiumchlorid

200 µM dNTPs

100 pmol pro Oligonukleotid

2,5 U *Taq* DNA-Polymerase

nach folgendem Reaktionsprotokoll für die Amplifizierung eingesetzt

Denaturierung: 94 °C, 1 min

Annealing: 50 °C, 1 min

Extension: 72 °C, 1 min/kb.

Insgesamt wurden 30 Zyklen durchgeführt.

2.2.5 Restriktion von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Die Restriktion von DNA erfolgte mittels Restriktionsendonukleasen, wobei die Reaktionsbedingungen entsprechend der Herstellerangaben (Biolabs, Frankfurt) gewählt wurden.

2.2.6 Ligation von DNA

Für Klonierungen eingesetzte DNA wurde mit der T4-DNA-Ligase (Biolabs, Frankfurt) ligiert. Dazu wurde ein Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 15 µl über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktionsbedingungen entsprachen den Herstellerangaben.

2.2.7 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Für Transformationen wurden kompetente Zellen des *E. coli*-Stammes DH5α nach dem modifizierten Protokoll von Hanahan et al., 1983 hergestellt. Dazu wurde eine 30 ml Kultur 2 %ig mit einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Die Resuspension der sedimentierten Zellen (5.000 x g, 10 min, 4 °C) erfolgte in 30 ml eiskalter Calciumchlorid-Lösung (50 mM). Anschließend wurden die Zellen 30 min auf Eis inkubiert, erneut sedimentiert (5.000 x g, 10 min, 4 °C) und in 3 ml 50 mM Calciumchlorid/20 % Glycerin aufgenommen. Die Lagerung erfolgte in 200 µl Aliquots bei -80 °C.

2.2.8 Transformation von *E. coli*

Das Transformationsprotokoll wurde in leicht modifizierter Form von Sambrook et al., 1989 übernommen. Ein 200 µl-Aliquot kompetenter Zellen (III. 2.2.7) wurde mit dem gesamten Ligationsansatz (III. 2.2.6) für 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock für 3 min bei 43 °C und eine erneute 30 minütige Inkubation auf Eis. Die Zellen wurden anschließend mit 1 ml 2x YT-Medium versetzt und für 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Das Ausplattieren erfolgte auf 2x YT-Agarplatten, die mit dem entsprechendem Antibiotikum versetzt und über Nacht bei 37 °C bebrütet wurden.

2.2.9 Sequenzierung

Für die Sequenzierung von DNA wurde das *ABI Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Darmstadt) nach Herstellerangaben verwendet. Die weitere Bearbeitung erfolgte bei einem kommerziellen Dienstleistungsunternehmen. Für die Analyse der Sequenzen stand das Programm DNASTAR (Lasergene, Version 4.0) zur Verfügung.

2.2.10 Agarose-Gelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in 0,8 - 2 %igen Agarosegelen bei einer Spannung von 150 V. Als Elektrophoresepuffer wurde TBE verwendet. Als Molekulargewichtsstandards diente mit *Hind* III- (125-13.130 bp) bzw. *BstE* II- (117-8.454 bp) restringierte Lambda-DNA (Biolabs, Frankfurt) sowie der *123 bp DNA Ladder* (123–4.182 bp) (Invitrogen, Karlsruhe). Die Gele wurden mit Ethidiumbromid angefärbt und die DNA im UV-Licht sichtbar gemacht. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe eines Geldokumentationssystems (Videodokumentationssystem CS-1, Cybertech, Berlin).

2.2.11 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-(RFLP-) und Plasmidprofil-Analyse mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese

Für die Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-(RFLP-)Analyse wurde Gesamt-DNA aus Borrelienzellen isoliert, mit der Restriktionsendonuklease *Mlu* I geschnitten und mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese aufgetrennt (Belfaiza et al., 1993). Dazu wurden 30 ml Kulturen der entsprechenden Borrelienisolate bis zur stationären Phase angezogen, sedimentiert (5.000 x g, 30 min, 4 °C), in Waschpuffer gewaschen (2 ml) und im selben Puffer aufgenommen (250–500 µl). Die resuspendierten Zellen wurden danach mit 2 ml einer auf 37 °C erwärmten 1,4 %igen (w/v) LM-Agarose-Lösung (Sigma-Aldrich, Steinheim) versetzt und in eine spezielle Gießvorrichtung gefüllt. Die Suspension wurde bei –20 °C inkubiert bis die Agaroseblöcke aus der Vorrichtung gelöst und halbiert werden konnten. Danach erfolgte die Inkubation eines halben Agaroseblockes in 1 ml Lyselösung für mindestens 12 h unter Schütteln bei 37 °C. Anschließend erfolgte die Vorbereitung der Blöcke für die Deproteinierung in 1 ml Proteinasepuffer bei 37 °C. Nach einer Stunde wurde frischer Proteinasepuffer, mit 2 mg/ml Proteinase K versetzt, hinzugegeben und die Blöcke für mindestens 12 h unter Schütteln bei 55 °C inkubiert. Danach erfolgte die Umpufferung und Äquilibrierung in TE-Puffer für 1 h bei Raumtemperatur. Die Blöcke konnten in TE-Puffer für 4 Wochen bei 4 °C gelagert oder direkt für die Restriktion eingesetzt werden.

Für die Restriktion wurden die Blöcke in Restriktionspuffer nach Herstellerangaben für 1 h bei Raumtemperatur äquilibriert, anschließend mit 40 U *Mlu* I in Restriktionspuffer versetzt und für 20 h bei 37 °C inkubiert.

Für die Auftrennung mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese wurden die Blöcke in die Kammern eines 1 %igen Agarosegels gefüllt und mit flüssiger Agarose überschichtet. Als Molekulargewichtsstandard diente der *MidRange* PFG Marker (15–291 kb) (Biolabs, Frankfurt). Die Elektrophorese wurde in der Pulsfeld-Gelapparatur CHEF DR II (Bio-Rad, München) mit TBE als Laufpuffer durchgeführt. Dazu wurden folgende Parameter eingestellt:

Laufzeit: 22 h

Pulswechselzeit zu Beginn: 5 s

Pulswechselzeit am Ende: 50 s

elektrische Feldstärke: 6 V/cm

eingeschlossener Winkel: 120 °

Temperatur: 14 °C (konstant)

Nach der Auftrennung wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt, die DNA-Banden mit UV-Licht visualisiert und mit Hilfe eines Geldokumentationssystems (Videodokumentationssystem CS-1, Cybertech, Berlin) dokumentiert.

Für die Plasmidprofil-Analyse mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese nach Kraiczy, 2004 wurde die isolierte Plasmid-DNA (III. 2.2.2) submers in die Geltaschen pipettiert. Diese Proben wurden nicht mit Agarose überschichtet, weswegen das Einschalten der Pumpe erst 15 min nach Beginn der Elektrophorese erfolgte, damit die Proben nicht durch die kontinuierliche Pufferumwälzung aus den Taschen gewaschen wurden. Als Molekulargewichtsstandard diente der *LowRange* PFG Marker (2,03-194 kb) (Biolabs, Frankfurt). Die Elektrophorese wurde in der Pulsfeld-Gelapparatur CHEF DR II (Bio-Rad, München) mit TBE als Laufpuffer durchgeführt. Dazu wurden folgende Parameter eingestellt:

Laufzeit: 24 h

Pulswechselzeit zu Beginn: 0,9 s

Pulswechselzeit am Ende: 2,5 s

elektrische Feldstärke: 6 V/cm

eingeschlossener Winkel: 120 °

Temperatur: 14 °C (konstant)

Nach der Auftrennung wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt, die Plasmidbanden mit UV-Licht visualisiert und mit Hilfe eines Geldokumentationssystems (Videodokumentationssystem CS-1, Cybertech, Berlin) dokumentiert.

2.2.12 5S-23S-rDNA-Restriktionsanalyse von PCR-Fragmenten

Die 5S-23S-rDNA-Restriktionsanalyse von PCR-Fragmenten wurde nach Postic et al., 1994 durchgeführt. Dazu wurden 5S-23S-PCR-Fragmente diverser Borrelien-Isolate mittels PCR (III. 2.2.4) mit den Oligonukleotiden BB 5S und BB 23S (III. 1.5) amplifiziert. Die Amplifikate wurden mit der Restriktionsendonuklease *Mse* I nach Herstellerangaben über Nacht bei 37 °C geschnitten. Anschließend wurde die restringierte DNA gelelektrophoretisch mittels eines 12 %igen nativen Polyacrylamidgels aufgetrennt. Nach einer 30 minütigen Einlaufzeit bei 180 V erfolgte die Auftrennung für 5 h bei 250 V. Als Puffer diente TBE und als Molekulargewichtsstandard der *123 bp DNA Ladder* (123-4.182 bp) (Invitrogen, Karlsruhe). Die Gele wurden mit Ethidiumbromid angefärbt und die DNA im UV-Licht

sichtbar gemacht. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe eines Geldokumentationssystems (Videodokumentationssystem CS1+, Cybertech, Berlin).

2.2.13 Southernblot-Analyse

Für Southernblot-Analysen von Borrelien-DNA wurden aus 30 ml Kulturen der entsprechenden Borrelienisolate Plasmid-DNA isoliert (III. 2.2.2) und 1 µg der gereinigten DNA mit der Restriktionsendonuklease *Xba* I nach Herstellerangaben über Nacht bei 37 °C geschnitten. Anschließend erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA mittels eines 0,8 %igen Agarosegels (III. 2.2.10). Nach der Auftrennung wurde das Gel für 30 min in 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl denaturiert, 5 min in A. dest. gewaschen und dann für 60 min in 0,5 M Tris (pH 7,5)/3 M NaCl neutralisiert. Danach erfolgte der Transfer auf eine Nylonmembran (Nytran N, Schleicher & Schuell MicroScience GmbH, Dassel) mittels eines Vakuum-Blotters (Appligene/Boekel, Feasterville, Pennsylvania, USA). Die Detektion der entsprechenden Gene erfolgte anhand des *ECL direct nucleic acid labelling and detection System* (Amersham Biosciences, Freiburg) nach Herstellerangaben. Als Sonden dienten PCR-Fragmente der *B. burgdorferi* s.s. Gene *bbh06* und *flaB*. Die Exposition erfolgte mittels Röntgenfilmen (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences, Freiburg) für 1-60 min bei Raumtemperatur. Die Filme wurden anschließend mit Dokumol Entwicklungslösung und Superfix Fixierungslösung (Tetenal, Norderstedt) nach Vorgaben des Herstellers entwickelt.

2.2.14 Herstellung einer Lambda-Expressionsgenbank von *B. burgdorferi* s.s.

Für die Herstellung einer Lambda-Expressionsgenbank des *B. burgdorferi* s.s.-Isolates LW2 wurde das *ZAP Express Predigested Vector Kit* und das *ZAP Express Predigested Gigapack Cloning Kit* (Stratagene, Heidelberg) verwendet. Aus einer sich in der spät-logarithmischen Phase befindenden 250 ml Kultur wurde Plasmid-DNA isoliert (III 2.2.2). Von dieser Plasmid-DNA wurden 10 µg mit 0,3 U des Restriktionsenzym *Sau3A* für 1 h bei 37 °C partiell restringiert. Nach Hitzeinaktivierung der Restriktionsendonuklease und Präzipitation der DNA wurden 150 ng der geschnittenen DNA mit 1 µg ZAP Express Vektor (vorgeschnitten mit *Bam*H I) nach Herstellerangaben ligiert. Danach erfolgte die Verpackung der ligierten DNA in Lambda-Phagen-Extrakte mittels *Packaging Extracts* (Stratagene, Heidelberg). Nach Herstellerangaben wurde die ligierte DNA zu einem Aliquot *Packaging Extract* gegeben und für 2 h bei 22 °C inkubiert. Anschließend wurden 500 µl SM-Puffer

sowie 20 µl Chloroform hinzugefügt und vorsichtig zentrifugiert. Der abgenommene Überstand enthielt die Phagenpartikel. Um die Ligationseffizienz festzustellen, wurde ein Blau-Weiß-Test nach Herstellervorschrift durchgeführt. Anschließend wurde der Titer des Phagenlysates nach Angaben des Herstellers bestimmt und die Lambda-Expressionsgenbank amplifiziert. Für die Amplifizierung wurde 50 ml LB-Medium mit 0,2 % (w/v) Maltose sowie 10 mM Magnesiumsulfat versetzt und mit einer Kolonie des *E. coli*-Stammes XL1-Blue MRF⁺ angeimpft. Die Kultur wurde über Nacht unter Schütteln bei 30 °C angezogen und anschließend zentrifugiert (500 x g, 10 min, 4 °C). Die sedimentierten Zellen wurden mit 10 mM Magnesiumsulfat bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 verdünnt. 600 µl dieser Zellen wurden mit 5 x 10⁴ Phagen für 15 min bei 37 °C präadsorbiert und danach mit 6,5 ml NZY Topagar (48 °C) auf einer 150 mm NZY Platte ausplattiert. Insgesamt 40 dieser Platten wurden für 7 h bei 37 °C inkubiert und danach mit 10 ml SM-Puffer überschichtet. Durch die Lagerung der Platten über Nacht bei 4 °C sollten die Phagen in den Puffer diffundieren. Der Puffer wurde am folgenden Tag von den Platten gezogen, vereinigt und mit Chloroform bis zu einer Endkonzentration von 5 % (v/v) versetzt. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Phagenpuffer zentrifugiert (500 x g, 10 min, 4 °C) und der Überstand abgenommen. Zu der Genbank wurde Chloroform bis zu einer Endkonzentration von 0,3 % (v/v) gegeben. Anschließend erfolgte die Titerbestimmung der Genbank nach Herstellerangaben. Die Genbank wurde bei 4 °C gelagert. Ein Aliquot wurde mit 7 % DMSO versetzt und bei -80 °C gelagert.

2.2.15 Screening einer Lambda-Expressionsgenbank von *B. burgdorferi* s.s.

Für das Screening der Genbank wurden 100 mm NZY Platten, die mindestens 24 h vor Verwendung hergestellt wurden, 1 h bei 37 °C vorgewärmt. Eine unter Schütteln bei 30 °C angezogene Übernachtskultur des *E. coli*-Stammes XL1-Blue MRF⁺ in LB-Medium mit 0,2 % (v/v) Maltose und 10 mM Magnesiumsulfat wurde sedimentiert (500 x g, 10 min, 4 °C) und mit 10 mM Magnesiumsulfat auf eine OD₆₀₀ von 0,5 verdünnt. 200 µl dieser Zellen wurden mit 1,5 x 10⁴ Phagen für 15 min bei 37 °C präinkubiert und anschließend mit 3 ml NZY Topagar (ca. 48 °C) auf den vorgewärmten NZY-Platten ausplattiert. Die Platten wurden für ca. 7 h bei 42 °C angezogen bis kleine Phagenplaques sichtbar wurden. Danach wurden in 10 mM IPTG (in A. dest.) getränkte Nitrozellulose-Rundfilter (Protran BA85, Schleicher & Schuell MicroScience GmbH, Dassel) auf die Platten gelegt und diese für weitere 3,5 h bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte die Vorbereitung der Filter für die Ligandenaffinitätsblot-

bzw. die Westernblot-Analysen. Die Filter wurden viermal für 15 min in TBS/0,1 % (v/v) Tween 20 gewaschen und anschließend 1 h in 5 % (w/v) Milchpulver (in TBS/0,1 % (v/v) Tween 20) bei Raumtemperatur geblockt. Nach viermaligen Waschen für 10 min in TBS/0,1 % (v/v) Tween 20 erfolgte die Inkubation mit rekombinantem FHL-1 bzw. NHS als Faktor H-Quelle oder mit dem ersten Antikörper in entsprechender Verdünnung über Nacht bei 4 °C. Das weitere Vorgehen erfolgte nach III. 2.3.5 oder III. 2.3.6. Nach Auswertung der Ligandenaffinitätsblot- bzw. der Westernblot-Analysen konnten die positiven Signale auf den Filtern den Phagenplaques auf den entsprechenden Platten zugeordnet werden. Diese Plaques wurden ausgestochen und über Nacht bei 4 °C in SM-Puffer gelagert. Die erhaltene Phagensuspension wurde in den entsprechenden Verdünnungen erneut für weitere Screenings eingesetzt. Der ganze Vorgang wiederholte sich vier- bis fünfmal bis reine Phagenklone vorlagen. Diese Phagen wurden dann für die *in vivo*-Exzision (III. 2.2.16) eingesetzt.

2.2.16 *In vivo*-Exzision

Mit Hilfe der *in vivo*-Exzision konnte aus dem 38,9 kb großen ZAP Express Vektor das 4,5 kb Phagemid pBK-CMV ausgeschnitten werden, wodurch die Analyse der inserierten DNA vereinfacht wurde. Die Phagen wurden durch mehrfaches Screening (III. 2.2.15) bis zur Klonalität gereinigt und anschließend für die *in vivo*-Exzision eingesetzt. Dazu wurde eine Übernachtskultur des *E. coli*-Stammes XL1-Blue MRF⁺ in LB-Medium mit 0,2 % (v/v) Maltose und 10 mM Magnesiumsulfat sowie des *E. coli*-Stammes XL0LR in NZY-Medium bei 30 °C unter Schütteln angezogen. Nach Zentrifugation (500 x g, 10 min, 4 °C) wurden die sedimentierten Zellen in 10 mM Magnesiumsulfat bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 aufgenommen. Zu 200 µl der Zellen des Stammes XL1-Blue MRF⁺ wurden 1 x 10⁵ Phagen des entsprechenden Phagenklons sowie 1 x 10⁶ *ExAssist* Helferphagen gegeben und für 15 min bei 37 °C präadsorbiert. Danach erfolgte die Zugabe von 3 ml NZY-Medium und eine Inkubation für 3 h unter Schütteln bei 37 °C. Nach Lyse der Lambda-Phagen durch Erhitzung für 20 min auf 70 °C und Zentrifugation (1.000 x g, 15 min) wurde der Überstand abgenommen. Dieser enthielt die ausgeschnittenen pBK-CMV-Phagemide mit der inserierten Borrelia-DNA. Um die ausgeschnittenen einzelsträngigen Phagemide auszuplattieren, wurden 200 µl Zellen des Stammes XL0LR (in 10 mM Magnesiumsulfat) mit 100 µl bzw. 10 µl Überstand gemischt und für 15 min bei 37 °C präadsorbiert. Nach der Inkubation erfolgte die Zugabe von 300 µl NZY-Medium und eine Inkubation für 45 min bei 37 °C. Von dem Zellgemisch wurden dann 200 µl auf LB-Agarplatten mit Kanamycin ausplattiert und

über Nacht bei 37 °C inkubiert. Auf der Platte gewachsene Kolonien enthielten das doppelsträngige pBK-CMV-Phagemid mit der inserierten Borrelien-DNA.

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Herstellung von Homogenaten ganzer Borrelienzellen

2.3.1.1 Herstellung von Homogenaten ganzer Borrelienzellen für die Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Herstellung von Homogenaten ganzer Borrelienzellen wurde eine 30 ml Borrelienkultur sedimentiert (5.000 x g, 30 min, 4 °C), viermal in PBS/5 mM Magnesiumchlorid gewaschen und resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in einem Branson B12 Ultraschallgerät (Heinemann, Schwäbisch Gmünd) fünfmal für 30 s bei 4 °C auf Einstellung 7 beschallt, so dass mikroskopisch keine intakten Zellen mehr nachgewiesen werden konnten.

2.3.1.2 Herstellung von Homogenaten ganzer Borrelienzellen für die zweidimensionale (2D-) Elektrophorese

Für die Herstellung von Homogenaten ganzer Borrelienzellen für die 2D-Elektrophorese wurden 2 l des entsprechenden niedrig-passagierten Borrelienisolates bis zur spät-logarithmischen Phase angezogen, sedimentiert (5.000 x g, 30 min, 4 °C) und dreimal mit PBS gewaschen. Nach erneuter Sedimentation wurden die Borrelienzellen in 2 ml PBS aufgenommen, wiederholt zentrifugiert (14.000 x g, 10 min, 4 °C) und in 50 µl Lysispuffer aufgenommen. Um ein homogenes Proteinlysate zu erhalten, wurden die resuspendierten Zellen in einem Branson B12 Ultraschallgerät (Heinemann, Schwäbisch Gmünd) fünfmal für 30 s bei 4 °C auf Einstellung 7 beschallt, so dass mikroskopisch keine intakten Zellen mehr nachweisbar waren. Nach Zugabe von 20 µl Nuklease-Puffer und 5 µl 0,2 M AEBSF sowie einer einstündigen Inkubation bei 4 °C erfolgte eine Zentrifugation für 60 min bei 4 °C. Der abgenommene Überstand wurde entweder bei -80 °C gelagert oder direkt für die 2D-Gelelektrophorese eingesetzt.

2.3.2 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

2.3.2.1 Expression rekombinanter Proteine in kleinem Kulturmaßstab

Für die Expression rekombinanter Proteine in kleinem Kulturmaßstab wurden 5 ml 2x YT-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum sowie einer einzelnen *E. coli*-Kolonie versetzt und über Nacht unter Schütteln bei 37 °C und 200 rpm bebrütet. 10 ml 2xYT-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum wurden 2 %ig mit der Übernachtskultur angeimpft und unter Schütteln bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 – 0,6 angezogen. Anschließend erfolgte die Induktion der Expression des entsprechenden rekombinanten Proteins durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 10 mM) und die weitere Anzucht der Kultur für 3 h unter Schütteln bei 21 °C. Danach wurden die Zellen sedimentiert (5.000 x g, 20 min, 4 °C) und in 500 µl PBS/5 µl 1M DTT resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in einem Branson B12 Ultraschallgerät (Heinemann, Schwäbisch Gmünd) fünfmal für 30 s bei 4 °C auf Einstellung 7 beschallt. Nach Sedimentation der Zellreste (12.000 x g, 10 min, 4 °C) wurde der Überstand abgenommen und bei –20 °C gelagert.

2.3.2.2 Expression rekombinanter Proteine in größerem Kulturmaßstab

Für die Expression rekombinanter Proteinen in größerem Kulturmaßstab wurden 10 ml 2x YT-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum sowie einer einzelnen *E. coli*-Kolonie versetzt und über Nacht unter Schütteln bei 37 °C bebrütet. 200 ml 2xYT-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum wurden 2 %ig mit der Übernachtskultur angeimpft und unter Schütteln bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 – 0,6 angezogen. Anschließend erfolgte die Induktion der Expression des entsprechenden rekombinanten Proteins durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 10 mM) und die weitere Anzucht der Kultur für 4 h unter Schütteln bei 21 °C. Nach Zentrifugation (5.000 x g, 20 min, 4 °C) wurden die sedimentierten Zellen über Nacht bei –70 °C eingefroren. Anschließend erfolgte die Aufnahme der Zellen in 20 ml PBS. Die resuspendierten Zellen wurden mit 200 µl Lysozym (10 mg/ml in 25 mM Tris, pH 8,0) versetzt und 30 min unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Beschallung in einem Branson B12 Ultraschallgerät (Heinemann, Schwäbisch Gmünd), wobei die Zellen sechsmal für 30 s bei 4 °C auf Einstellung 7 beschallt wurden. Anschließend wurde 200 µl 2 %ige (v/v) Triton X-100-Lösung (in A. dest.) zugegeben und die Zellen unter den gleichen Bedingungen erneut beschallt. Nach einer 60 minütigen Inkubation unter

Schütteln auf Eis wurden die Zellreste sedimentiert (14.000 x g, 10 min, 4 °C) und der Überstand bei -20 °C gelagert.

2.3.2.3 Expressionstest

Für den Expressionstest wurden je 3 µl einer bei -80°C eingefrorenen Kultur der jeweiligen Klone auf eine LB-Agarplatte, die mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt wurde, pipettiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Auf einer weiteren LB-Agarplatte wurden 100 µl 2 mM IPTG ausplattiert und ein Nitrozellulosefilter (Protran BA85, Schleicher & Schuell MicroScience GmbH, Dassel) aufgelegt, auf welchen die Klone gepickt wurden. Es folgte eine Inkubation der Platte für 3 h bei 37 °C. Anschließend wurde der Filter zweimal für 1 h in 12,5 ml Lysozypuffer inkubiert, mit 5 % (w/v) Milchpulver in TBS/0,1 % (v/v) Tween 20 geblockt und für Ligandenaffinitätsblot-Analysen mit NHS als Faktor H-Quelle eingesetzt.

2.3.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte anhand des *BCA Protein Assay Kits* (Pierce, Bonn). Anhand dessen lassen sich Proteinkonzentrationen zwischen 20 µg/ml und 2 mg/ml ermitteln. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben in Mikrotiterplatten. Als Proteinstandard diente BSA (Pierce, Bonn).

2.3.4 Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurden 10 %ige Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamidgele nach Schägger und von Jagow, 1987 verwendet. Vor dem Auftragen wurden die Proteinproben 3:1 mit Inkubationspuffer versetzt und für 30 min bei 40 °C inkubiert. Die Auftrennung im Sammelgel erfolgte für ca. 1 h bei einer Spannung von 40 V. Als Laufpuffer dienten Anoden- und Kathodenpuffer und als Molekulargewichtsstandard wurde der *Precision Plus Protein Standard All Blue* (10-250 kDa) (Bio-Rad, München) verwendet. Wenn die Proben das Trenngel erreicht hatten, wurde die Spannung auf 75 V erhöht. Der Gellauf erfolgte für ungefähr 15 h, bis sich die blaue Farbfront am unteren Rand des Gels befand. Nach der Elektrophorese wurden die Gele entweder mit Servablau G (Schägger, 1994) oder mit Silber (Heukeshoven und Dernik, 1988) angefärbt oder für die Westernblot-Analyse eingesetzt.

2.3.5 Westernblot-Analyse

Für die Westernblot-Analyse wurden die Proteine nach gelelektrophoretischer Auftrennung (III. 2.3.4) auf Nitrozellulosemembranen (Protran BA85, Schleicher & Schuell MicroScience GmbH, Dassel) transferiert. Dazu wurde das *Semi-dry-Blot*-Verfahren (200 mA, 2 h, Raumtemperatur) in einem *Semy-dry-Blotter* (LTF, Wasserburg) angewendet. Nach dem Transfer wurden die Proteinbanden mit dem *Reversible Protein Detection Kit* (Sigma-Aldrich, Steinheim) nach Herstellerangaben angefärbt und mit A. dest. entfärbt. Nach Inkubation für 1 h in 5 % (w/v) Milchpulver in TBS/0,1 % (v/v) Tween 20 und viermaligen Waschen mit TBS/0,1 % (v/v) Tween 20 erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in adäquater Verdünnung in recomBlot Waschpuffer (Mikrogen, Martinsried) für 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran viermal für je 10 min in TBS/0,2 % (v/v) Tween 20 gewaschen, um unspezifisch gebundenen Antikörper zu entfernen. Danach erfolgte die Inkubation des sekundären, Peroxidase-gekoppelten Antikörpers für 1 h bei Raumtemperatur in der jeweiligen Verdünnung in recomBlot-Waschpuffer (Mikrogen, Martinsried). Die Nitrozellulosemembran wurde erneut viermal für je 10 min in TBS/0,2 % (v/v) Tween 20 gewaschen, bevor die Detektion des sekundären Antikörper mittels TMB Substratlösung (Mikrogen, Martinsried) erfolgte.

2.3.6 Ligandenaffinitätsblot-Analyse

Die Ligandenaffinitätsblot-Analyse wurde zur Detektion FHL-1- und/oder Faktor H-bindender Borrelienproteine durchgeführt (Kraiczky et al., 2001a,b). Die Homogenate ganzer Borrelienzellen bzw. die rekombinanten Proteine wurden mittels Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (III. 2.3.4) aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert (III. 2.3.5). Analog zum Westernblot erfolgte eine einstündige Inkubation mit 5 % (w/v) Milchpulver in TBS/0,1 % (v/v) Tween 20 bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Membranen viermal für 10 min mit TBS/0,1 % (v/v) Tween 20 gewaschen und über Nacht bei 4 °C mit Zellkulturüberstand von FHL-1, den Deletionsmutanten von Faktor H (III. 1.7) oder mit NHS (III. 1.8) inkubiert. Danach wurden die Membranen viermal für 10 min mit TBS/0,2 % (v/v) Tween 20 gewaschen und mit den entsprechenden Antikörpern gegen FHL-1 bzw. Faktor H (III. 1.7) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem viermaligen Waschen erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Peroxidase-gekoppeltem Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur in der entsprechenden Verdünnung in recomBlot Waschpuffer

(Mikrogen, Martinsried). Vor der Detektion mittels TMB Substratlösung (Mikrogen, Martinsried) erfolgte ein erneutes viermaliges Waschen mit TBS/0,2 % (v/v) Tween 20.

2.3.7 Isolierung äußerer Membranen von Borrelien

Die Isolierung äußerer Membranen erfolgte modifiziert nach Radolf et al., 1995 und Kraiczky et al., 2000b. Dazu wurde eine 2 l Kultur des niedrig-passagierten Borrelienisolates B31 bis zur spät-logarithmischen Phase angezogen und in einem Beckmann 19 Rotor sedimentiert (13.000 x g, 30 min, 4 °C). Anschließend wurden die Zellen in OM-Puffer aufgenommen und in einem Beckmann 50 Ti Rotor erneut sedimentiert (15.000 x g, 30 min, 4 °C). Die Aufnahme der sedimentierten Zellen erfolgte in 6 ml OM-Puffer mit 20 % Saccharose (w/v) und 0,2 M AEBSF. Die Zellen wurden für 2 h auf Eis inkubiert und nach der Inkubation auf lineare Saccharosegradienten (20-60 % (w/v) Saccharose in OM-Puffer) appliziert. Die Gradienten wurden in einem Beckmann SW 41 Rotor für 18 h bei 160.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden Fraktionen mit einem Volumen von 1 ml von der Gradientenoberfläche abpipettiert und die Fraktionen, welche die äußere Membran (obere Gradientenbande) bzw. die innere Membran (untere Gradientenbande) enthielten, vereinigt. Die Fraktionen wurden 1:2 mit OM-Puffer/0,2 M AEBSF verdünnt und in einem Beckmann 50 Ti Rotor sedimentiert (190.000 x g, 3 h, 4 °C). Danach erfolgte die Resuspension der Membranen in OM-Puffer/0,2 M AEBSF und eine erneute Zentrifugation im selben Rotor (190.000 x g, 3 h, 4 °C). Die sedimentierten Membranen wurden in 50 µl Lysispuffer aufgenommen und direkt für die 2D-Gelelektrophorese (III. 2.3.9) eingesetzt. Eine Lagerung der isolierten Membranen war nicht möglich, da bei Lagerung über Nacht (4 °C bis -80 °C) das Signal des BbCRASP-2-Proteins in den Ligandenaffinitätsblot-Analysen signifikant schwächer wurde. Ein Aliquot der Membranen wurde in OM-Puffer/0,2 M AEBSF aufgenommen, die Proteine mittels Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Gele für Westernblot- und Ligandenaffinitätsblot-Analysen eingesetzt. Die Fraktionen, welche die Zellreste enthielten (Gradientenboden) wurden ebenfalls vereinigt, 1:4 mit OM-Puffer/0,2 M AEBSF verdünnt und analog zu den äußeren und inneren Membranen sedimentiert und gewaschen (5.000 x g, 1h, 4 °C). Die Resuspension der Zellreste erfolgte in OM-Puffer/0,2 M AEBSF. Die darin enthaltenen Proteine wurden mittels Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Gele für Westernblot- und Ligandenaffinitätsblot-Analysen eingesetzt.

2.3.8 Protease-Assay

Protease-Assays zum Nachweis der Membranständigkeit der entsprechenden Proteine wurden modifiziert nach Bunikis und Barbour, 1999 durchgeführt. Dabei wurden ganze Zellen einer 30 ml Kultur des niedrig-passagierten Borrelienisolates B31 *in situ* mit den Proteasen Trypsin oder Proteinase K behandelt. Die bis zur spät-logarithmischen Phase angezüchteten Borrelienzellen wurden zweimal mit PBS/5 mM Magnesiumchlorid gewaschen und nach Sedimentation (5.000 x g, 10 min, 4 °C) in 100 µl PBS/5 mM Magnesiumchlorid resuspendiert. In einem Endvolumen von 500 µl wurden 1×10^7 intakte Borrelienzellen mit Proteinase K in A. dest. bzw. Trypsin in 0,001 N HCl (Endkonzentrationen 12,5 – 100 µg/ml) versetzt und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Inhibierung der Proteasen. Proteinase K wurde durch Zugabe von 5 µl PMSF (50 mg/ml in Isopropanol) inhibiert, während den Ansätzen mit Trypsin zusätzlich zum PMSF noch 5 µl AEBSF (100 mg/ml in A. dest.) hinzugefügt wurde. Danach erfolgten zwei Waschschrte mit PBS/5 mM Magnesiumchlorid. Die in 10-20 µl PBS/5 mM Magnesiumchlorid aufgenommenen Zellen wurden anschließend in einem Branson B12 Ultraschallgerät (Heinemann, Schwäbisch-Gmünd) fünfmal für 30 s auf Einstellung 7 beschallt, so dass mikroskopisch keine intakten Zellen mehr nachgewiesen werden konnten. Die Proteine wurden mittels Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese separiert und die Gele für Westernblot- und Ligandenaffinitätsblot-Analysen eingesetzt.

2.3.9 Zweidimensionale (2D-)Elektrophorese

Für die zweidimensionale (2D-)Elektrophorese wurden entweder 50 µl der äußeren Membranen (III. 2.3.7) oder 50 µl des Homogenats ganzer Borrelienzellen (III. 2.3.1.2) eingesetzt. Die Proteine wurden mit 300 µl Rehydratisierungspuffer versetzt, für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und auf immobilisierte pH-Gradienten (IPG) (17 cm, pH 3-10, Bio-Rad, München) appliziert. Nach Überschichtung mit Mineralöl (Serva, Heidelberg) erfolgte die Rehydratisierung der IPG-Streifen für 12 h in der Fokussierungskammer Protean IEF Cell (Bio-Rad, München). An die Rehydratisierung schloss sich die Fokussierung der IPG-Streifen an. Dazu wurden folgende Parameter eingestellt:

Temperatur: 20 °C

Stromstärke: 50 µA/Streifen

Rehydratisierung: 250 V (12 h)

Fokussierung: 150 V *rapid* (1 h)

300 V *rapid* (1 h)

600 V *rapid* (1 h)

1.200 V *rapid* (1 h)

2.400 V *rapid* (1 h)

7.000 V *linear* (1 h)

7.000 V *rapid* bis insgesamt 20.000 Voltstunden erreicht wurden

500 V (15 min)

Die fokussierten IPG-Gelstreifen wurden entweder direkt für die Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese eingesetzt oder bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Vor der gelelektrophoretischen Auftrennung erfolgte die Äquilibration der fokussierten IPG-Streifen für 2×15 min in Äquilibrationpuffer. Die Lösung des ersten Äquilibrationsschrittes enthielt zusätzlich 1 % (w/v) DTT, die des zweiten 260 mM Jodacetamid. Für die zweite Dimension wurde ein 10 %iges Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamidgel hergestellt und mit 1 ml wassergesättigtem 2-Butanol überschichtet. Kurz vor Gebrauch der Gele wurde das 2-Butanol abgeschüttet und die Geloberfläche mit Kathodenpuffer gewaschen. Die äquilibrierten IPG-Streifen wurden kurz mit einer Pipette in den Kathodenpuffer getaucht, luftblasenfrei auf das Gel gelegt und mit einem Spatel leicht angedrückt. Als Molekulargewichtsstandard diente der *Precision Plus Protein Standard All Blue* (10-250 kDa) (Bio-Rad, München). Die Fixierung der IPG-Streifen erfolgte mittels heißer Agarose (0,5 % in Kathodenpuffer). Nach Erstarren der Agarose erfolgte der Gellauf für ungefähr 15 h bei 75 V bis sich die blaue Farbfront am unteren Rand des Gels befand. Danach wurden die Gele entweder für Ligandenaffinitätsblot-Analysen eingesetzt oder mit Servablau G gefärbt. Nach Entfärbung der Gele mit A. dest. wurden die entsprechenden Spots aus dem Gel ausgestochen und über MALDI-Massenspektrometrie analysiert.

2.3.10 Matrix-unterstützte Laserdesorptions-/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS)

Die über 2D-Elektrophorese (III. 2.3.9) isolierten Proteinspots wurden in Vorbereitung für die Matrix-unterstützte Laserdesorptions-/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) mit Trypsin verdaut. Dazu wurden die Gelstücke in 1 mm große Teile zerkleinert und dreimal für 15 min mit 50 % (v/v) Acetonitril/25 mM Ammoniumbicarbonat (pH 8,0) gewaschen.

Anschließend erfolgte die Dehydrierung für zweimal 10 min in 100 % Acetonitril und die Trocknung der Gelstücke für 20 min in einem Vakuumkonzentrator Modell 5301 (Eppendorf, Hamburg). Die getrockneten Gelstücke wurden mit 10 mM DTT in 100 mM Ammoniumbicarbonat für 1 h bei 56 °C reduziert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 55 mM Jodacetamid in 100 mM Ammoniumbicarbonat und eine Inkubation für 45 min im Dunkeln. Danach wurden die Gelstücke dreimal für 5 min mit 100 mM Ammoniumbicarbonat gewaschen und anschließend zweimal 5 min in 100 % Acetonitril dehydriert. Nach Trocknung für 20 min in einem Vakuumkonzentrator Modell 5301 (Eppendorf, Hamburg) wurde Trypsinpuffer zu den Proben gegeben und diese für 45 min auf Eis inkubiert. Der Trypsinpuffer wurde abpipettiert und die Gelstücke mit 50 mM Ammoniumbicarbonat/5 mM Calciumchlorid über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (14.000 x g, 10 min, Raumtemperatur) und dreimal für 20 min in 5 % (v/v) Ameisensäure/50 % (v/v) Acetonitril inkubiert. Danach erfolgte die Zentrifugation der Proben (14.000 x g, 10 min, Raumtemperatur). Die Überstände wurden abgenommen, vereinigt und für 1-2 h in einem Vakuumkonzentrator Modell 5301 (Eppendorf, Hamburg) getrocknet. Die getrockneten Proben wurden anschließend in 5 µl 70 % (v/v) Acetonitril/1 % (v/v) TFA aufgenommen.

Die mit Trypsin behandelten Proben wurden für die MALDI-MS eingesetzt. Die MALDI-MS erfolgte in Zusammenarbeit mit Dipl.-Biol. C. Corvey und Prof. M. Karas (Institut für Pharmazeutische Chemie, Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Frankfurt).

2.3.11 Affinitätschromatographische Aufreinigung von rekombinanten Proteinen

2.3.11.1 Affinitätschromatographie mittels GSTrap-Säulen

Rekombinante GST-Fusionsproteine wurden mittels 1 ml oder 5 ml vorgepackten GSTrap Säulen (Amersham Biosciences, Freiburg) aufgereinigt. Dazu wurden die Säulen mit 5 Säulenvolumen PBS äquilibriert. Nach Applikation von 1 ml Überstand des Bakterienlysats (III. 2.3.2) mit einer Flussrate von 1 ml/min erfolgten das Waschen der Säulen mit 10 Säulenvolumen PBS sowie die Elution der gebundenen Proteine mit 10 Säulenvolumen reduziertem Glutathion (10 mM in 50 mM Tris, pH 8,0). Mit Hilfe von Ultrafiltrationseinheiten (*cut off* 5.000 kDa, Vivascience, Hannover) wurden die eluierten Proteine mit PBS umgepuffert und aufkonzentriert. Die proteolytische Spaltung der gereinigten Fusionsproteine erfolgte mit Hilfe der *PreScission Protease* (Amersham Biosciences, Freiburg) nach Herstellerangaben.

2.3.11.2 Affinitätschromatographie mittels His Micro Spin-Säulen

Rekombinante Histidin-Fusionsproteine wurden mittels His MicroSpin Säulen (Amersham Biosciences, Freiburg) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.3.11.3 Liganden-gekoppelte Affinitätschromatographie mittels FPLC

Bei der Liganden-gekoppelten Affinitätschromatographie wurde 250 µg Faktor H bzw. FHL-1 als Ligand an vorgepackte HiTrap NHS-aktivierte Sepharose Säulen (Amersham Biosciences, Freiburg) nach Herstellerangaben gekoppelt. Die weitere Säulenchromatographie erfolgte bei 4 °C an einer FPLC-Anlage in Kooperation mit Prof. Dr. P. F. Zipfel (Abteilung für Infektionsbiologie, Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung, Jena). Nach Applikation von 25 mg Homogenat ganzer Borrelienzellen in einem Volumen von 5 ml (III. 2.3.1) wurde mit 10 Säulenvolumen PBS gewaschen und mit 10 Säulenvolumen 0,1 M Glycin (pH 2,8) eluiert. Dabei wurden die Elutionsfraktionen sofort mit 30 µl 1 M Tris neutralisiert.

2.3.11.4 Liganden-gekoppelte magnetische Partikel

Liganden-gekoppelte magnetische Partikel wurden als Alternative zu der Liganden-gekoppelten Affinitätschromatographie eingesetzt. Analog zu dieser dienten auch hier 50 µg Faktor H bzw. FHL-1 sowie ein Antikörper gegen FHL-1 (SCR1-4) (III. 1.6) als Ligand. Die Liganden wurden nach Herstellerangaben an magnetische Partikel (Dynabeads, Dynal, Hamburg) gekoppelt. Die magnetischen Partikel wurden mit 2,5 mg Homogenat ganzer Borrelienzellen in einem Volumen von 500 µl (III. 2.3.1) über Nacht unter Rotationsschütteln bei 4 °C inkubiert und anschließend fünfmal mit 500 µl PBS für 4 min gewaschen. Die Elution erfolgte mit dreimal 150 µl 0,1 M Glycin (pH 2,8), wobei die Elutionsfraktionen sofort mit 1 M Tris neutralisiert wurden. Die zur Neutralisation benötigte Menge 1 M Tris wurde mittels eines Indikatorstäbchens (Spezialindikator pH 6,5-10,0, Merck, Darmstadt) bestimmt.

IV. Ergebnisse

1 Charakterisierung von repräsentativen *Borrelia burgdorferi* s.l.-Isolaten

1.1 Molekularbiologische Genotypisierung von Borrelienisolaten der drei wichtigsten humanpathogenen Genospezies *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* und *B. garinii*

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Mechanismen der Komplementresistenz von Borrelien. Dabei standen vor allem die mit den menschlichen Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1 interagierenden CRASP-Proteine von *Borrelia burgdorferi* s.s. im Mittelpunkt. Für die Untersuchungen stand ein Stammkollektiv (Tab. III.1) diverser Borrelienisolat zur Verfügung.

Zu Beginn der Arbeit wurden repräsentative Isolate der drei wichtigsten humanpathogenen Genospezies *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* und *B. garinii* aus dem Stammkollektiv ausgewählt und molekularbiologisch mittels Plasmidprofil- und Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-(RFLP-)Analyse typisiert. Borrelien besitzen neben einem linearen Chromosom extrachromosomale DNA-Elemente in Form von bis zu 20 linearen oder zirkulären Plasmiden mit einem Molekulargewicht zwischen 8 kb und mehr als 60 kb (Barbour, 1988, 1993; Baril et al., 1989; Ferdows und Barbour, 1989; Bergström et al., 1992; Davidson et al., 1992; Casjens und Huang, 1993; Ojaimi et al., 1994; Casjens et al., 1995, 2000; Xu und Johnson, 1995; Fraser et al., 1997).

Um die ausgewählten Isolate typisieren zu können, wurden ihre Plasmide elektrophoretisch in einem Pulsfeldgel aufgetrennt (III. 2.2.11; Kraiczy, 2004). Wie Abbildung IV.1 zeigt, unterscheiden sich die einzelnen Isolate hinsichtlich der Anzahl und des Molekulargewichts ihrer Plasmide deutlich voneinander (Picken et al., 1995; Xu und Johnson, 1995; Busch et al., 1997). Mit Ausnahme der Isolate B31 und LW2 weisen die Stämme eine große Heterogenität untereinander auf. Anhand der individuellen Plasmidmuster der Isolate konnte sicher gestellt werden, dass mit schon beschriebenen Isolaten gearbeitet wurde (Kraiczy, 2004).

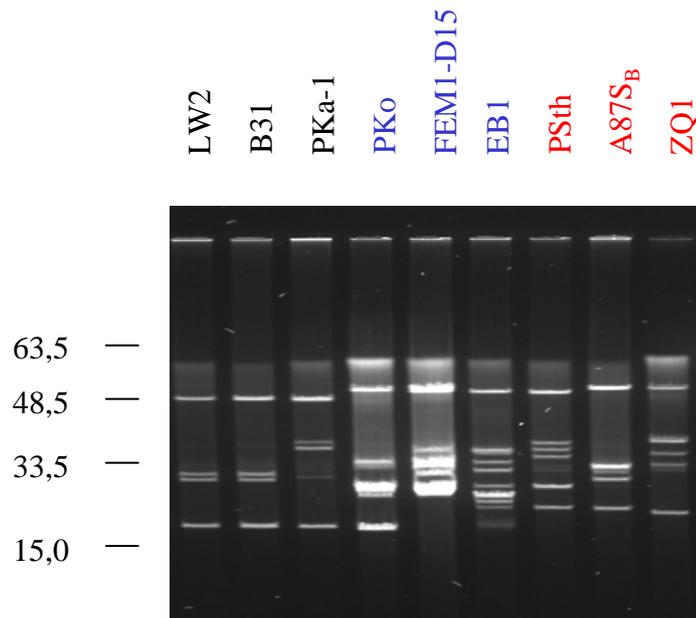


Abb. IV.1: Plasmidprofil-Analyse repräsentativer Borrelienisolat der Genospezies *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* und *B. garinii*.

In einem 1 %igen Agarosegel wurde 1 µg isolierte Plasmid-DNA der *B. burgdorferi* s.s.-Isolate LW2, B31 und PKa-1 (schwarze Schrift), der *B. afzelii*-Isolate PKo, FEM1-D15 und EB1 (blaue Schrift) sowie der *B. garinii*-Isolate PSth, A87S_B und ZQ1 (rote Schrift) mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Größen des DNA-Standards sind seitlich aufgeführt und in kb angegeben.

Für die Genotypisierung wurde die RFLP-Analyse mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) nach Belfaiza et al., 1993 (III. 2.2.11) durchgeführt, die allgemein als Goldstandard für die Typisierung von Borrelienisolaten gilt. Dabei werden jeder Genospezies charakteristische DNA-Fragmente zugeordnet. Wie in Abbildung IV.2 dargestellt, ergab sich für die *B. burgdorferi* s.s.-Isolate ein charakteristisches 135 kb-Fragment, während die Isolate der Genospezies *B. afzelii* drei typische Fragmente mit einer Größe von 460 kb, 320 kb und 90 kb aufwiesen. Kennzeichnend für die *B. garinii*-Isolate waren zwei Fragmente der Größen 220 kb und 80 kb.

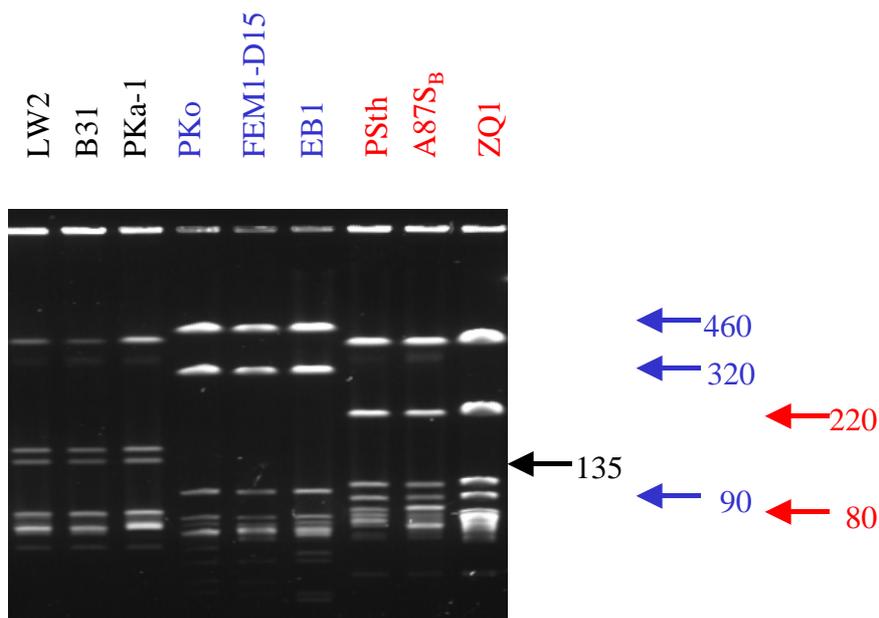


Abb. IV.2: RFLP-Analyse repräsentativer Borrelienisolat der Genospezies *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* und *B. garinii*.

Gezeigt werden mit der Restriktionsendonuklease *Mlu* I restringierte DNA der *B. burgdorferi* s.s.-Isolate LW2, B31 und PKa-1 (schwarze Schrift), der *B. afzelii*-Isolate PKo, FEM1-D15 und EB1 (blaue Schrift) sowie der *B. garinii*-Isolate PStH, A87S_B und ZQ1 (rote Schrift), separiert in einem 1 %igen Agarosegel. Die Größen der DNA-Fragmente sind seitlich aufgeführt und in kb angegeben.

Alternativ zur RFLP-Analyse kann eine 5S-23S-rDNA-Restriktionsanalyse von PCR-Fragmenten nach Postic et al., 1994 (III. 2.2.12) angewendet werden. Mit dieser Methode erzielt man bei der Typisierung von Borrelienisolaten mit geringerem Arbeitsaufwand ein vergleichbares Ergebnis wie mit der RFLP-Analyse mittels PFGE. Analog zur RFLP-Analyse können jeder Genospezies charakteristische Fragmente zugeordnet werden. Wie in Abbildung IV.3 zu sehen, sind Fragmente der Größen 38 bp, 29 bp und 28 bp für *B. burgdorferi* s.s.-Isolate kennzeichnend. Für die Genospezies *B. afzelii* wurde ein charakteristisches 68 bp-Fragment ermittelt, während für *B. garinii*-Isolate ein 95 bp-Fragment typisch ist.

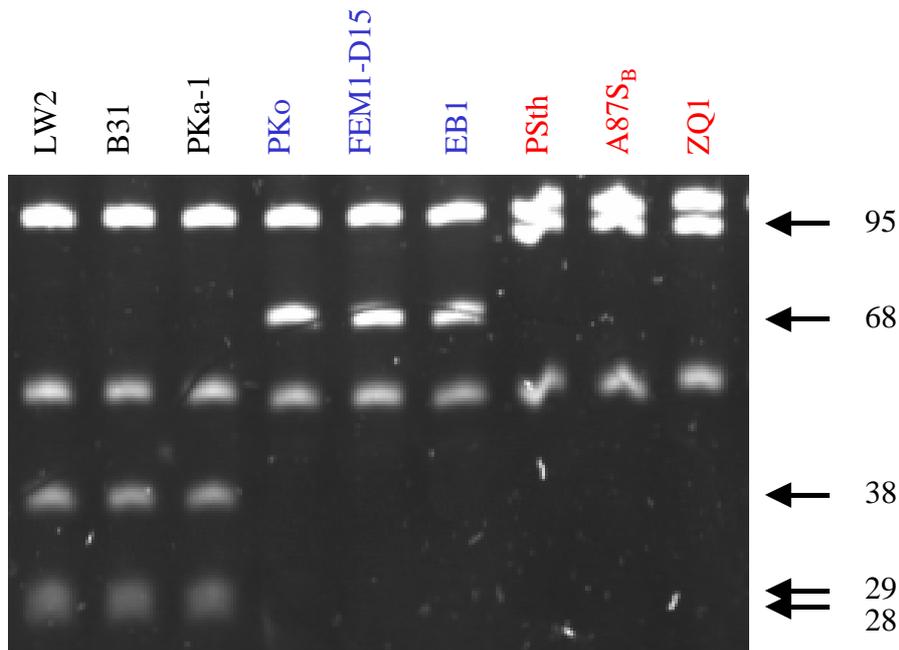


Abb. IV.3: 5S-23S-rDNA-Restrictionsanalyse von PCR-Fragmenten repräsentativer Borrelienisolate der Genospezies *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* und *B. garinii*.

Mittels PCR erfolgte die Amplifizierung der rDNA-Abschnitte zwischen dem 5S und dem 23S Gen der *B. burgdorferi* s.s.-Isolate LW2, B31 und PKa-1 (schwarze Schrift), der *B. afzelii*-Isolate PKo, FEM1-D15 und EB1 (blaue Schrift) sowie der *B. garinii*-Isolate PSth, A87S_B und ZQ1 (rote Schrift). Die amplifizierte DNA wurde anschließend mit der Restriktionsendonuklease *Mse* I behandelt und in einem 12 %igen nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Größen der DNA-Fragmente sind seitlich aufgeführt und in bp angegeben.

1.2 Charakterisierung von *B. burgdorferi* s.s.-Isolaten in Hinblick auf Faktor H- und FHL-1-bindende Proteine

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass hinsichtlich der Komplementresistenz deutliche Unterschiede zwischen den drei wichtigsten humanpathogenen Borreliengenospezies *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* und *B. garinii* bestehen (Brade et al., 1992; Breitner-Ruddock et al., 1997; van Dam et al., 1997; Kraiczy et al., 2000a). Die meisten *B. afzelii*-Isolate sind resistent gegenüber der lytischen Wirkung von Komplement, während der Großteil der *B. burgdorferi* s.s.-Isolate eine intermediäre Komplementresistenz aufweist. Isolate der Genospezies *B. garinii* sind dagegen hauptsächlich komplementsensibel (Kraiczy et al., 2001c). Die Komplementresistenz korreliert mit der Fähigkeit der Borrelien, die Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1 zu binden (Hellwage et al., 2001; Alitalo et al., 2001, 2002; Kraiczy et al., 2001a, 2001b, 2003; Kurtenbach et al., 2002; Stevenson et al., 2002; Metts et al., 2003; McDowell et al., 2003, 2004, 2005). Komplementresistente und intermediär komplementresistente Isolate exprimieren bis zu fünf oberflächenständige Proteine, die als *complement regulator-acquiring surface proteins* oder CRASPs bezeichnet werden (Kraiczy et al., 2001a, 2001b, 2001c, 2002, 2003, 2004a, 2004b). Diese Proteine binden Faktor H und/oder FHL-1, wodurch die Borrelien die Komplementaktivierung direkt auf ihrer Oberfläche kontrollieren und inhibieren können (Kraiczy et al., 2001c). Anhand der Bindungsprofile konnten die Borrelienproteine in drei Gruppen unterteilt werden. Zur Gruppe I gehören die Proteine, die sowohl Faktor H als auch FHL-1 binden. Gruppe II enthält die Proteine, die nur FHL-1 binden, während Gruppe III die Faktor H-bindenden Proteine repräsentiert (Kraiczy et al., 2001a, 2002).

Zu Beginn dieser Arbeit wurden die aus dem Stammkollektiv ausgewählten Isolate der Genospezies *B. burgdorferi* s.s. mit Hilfe von Ligandenaffinitätsblot-Analysen (III. 2.3.6) auf das Vorhandensein Faktor H und FHL-1 bindender Proteine untersucht. Dafür erfolgte die Auftrennung von Proteinen aus Homogenaten ganzer Borrelienzellen (III. 2.3.1.1) der verschiedenen Isolate in einem 10 %igen Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamidgel (III. 2.3.4). Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und diese für Ligandenaffinitätsblot-Analysen eingesetzt. Der Ligandenaffinitätsblot zum Nachweis der Faktor H-bindenden BbCRASP-Proteine ist in Abbildung IV.4 dargestellt. Dafür wurde die Nitrozellulosemembran mit NHS als Faktor H-Quelle inkubiert und die Faktor H-Bindung mit einem spezifischen Antikörper gegen Faktor H (VIG8) detektiert.

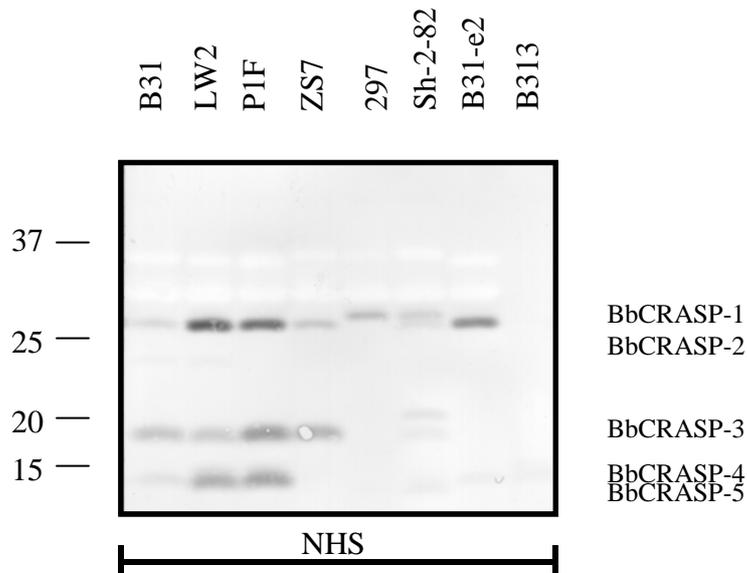


Abb. IV.4: Identifizierung der Faktor H-bindenden Proteine in repräsentativen Isolaten der Genospezies *B. burgdorferi* s.s.

Proteine aus Homogenaten ganzer Zellen verschiedener Borrelienisolate wurden in einem 10 %igen Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamidgel separiert und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membran wurde für eine Ligandenaffinitätsblot-Analysen eingesetzt und mit NHS als Faktor H-Quelle inkubiert. Die Detektion der Bindung erfolgte mit VIG8 als α -Faktor H-Antikörper. Das Molekulargewicht der Markerproteine [kDa] ist seitlich aufgeführt.

Zur Identifizierung der FHL-1-bindenden Proteine wurden die Nitrozellulosemembranen mit rekombinatem FHL-1 inkubiert und die FHL-1-Bindung mit dem polyklonalen Antikörper SCR1-4 (Abb. IV.5) und dem monoklonalen Antikörper B22 (Abb. IV.6) detektiert. Während der SCR1-4-Antikörper BbCRASP-1 und BbCRASP-2 entdeckt, detektiert der B22-Antikörper ausschließlich BbCRASP-2.

Anhand der Abbildungen IV.4-IV.6 erkennt man, dass die Anzahl der von den Isolaten exprimierten BbCRASP-Proteine differierte. Nur das Isolat LW2 exprimierte alle fünf Proteine (BbCRASP-1 bis BbCRASP-5). Je vier BbCRASP-Proteine konnten bei den Stämmen B31 (BbCRASP-1, BbCRASP-2, BbCRASP-3, BbCRASP-5) und P1F (BbCRASP-1, BbCRASP-3, BbCRASP-4, BbCRASP-5) gefunden werden. Das Isolat ZS7 exprimierte zwei Proteine (BbCRASP-1, BbCRASP-3), während für das Isolat 297 nur BbCRASP-1 nachgewiesen werden konnte. Für den Stamm Sh-2-82 konnte die Expression von BbCRASP-1, BbCRASP-2 und BbCRASP-3 gezeigt werden. Die Stämme B31-e2 und B313 sind Klone des B31-Isolates (Sadziene et al., 1992, 1993a, 1995; Casjens et al., 1997). Der Stamm B31-e2 exprimiert BbCRASP-1 und BbCRASP-5, während der Stamm B313 keine Expression von BbCRASP-Proteinen zeigte.

Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse zeigt Tabelle IV.1.

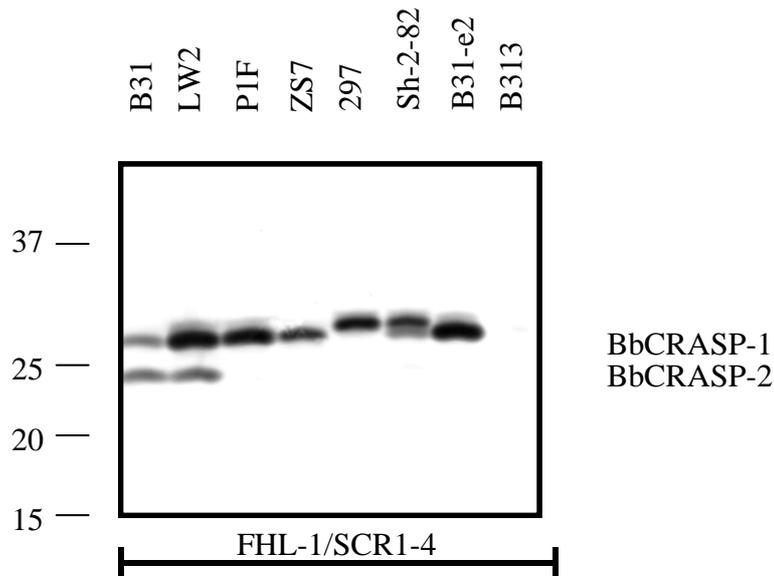


Abb. IV.5: Identifizierung der FHL-1-bindenden Proteine in repräsentativen Isolaten der Genospezies *B. burgdorferi* s.s.

Proteine aus Homogenaten ganzer Zellen verschiedener Borrelienisolates wurden in einem 10 %igen Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamidgel separiert und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membran wurde für eine Ligandenaffinitätsblot-Analysen eingesetzt und mit rekombinatem FHL-1 inkubiert. Die Detektion erfolgte mit SCR1-4 zum Nachweis der FHL-1-Bindung. Das Molekulargewicht der Markerproteine [kDa] ist seitlich aufgeführt.

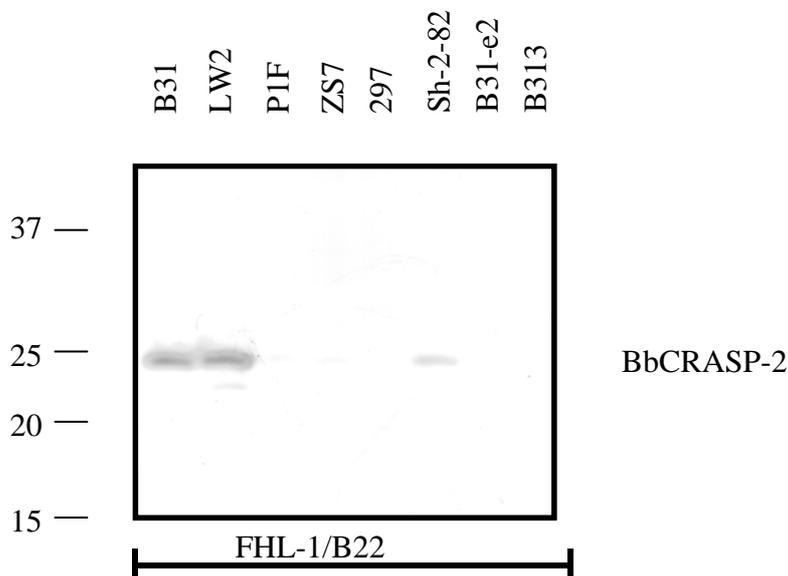


Abb. IV.6: Identifizierung des BbCRASP-2-Proteins in repräsentativen Isolaten der Genospezies *B. burgdorferi* s.s.

Proteine aus Homogenaten ganzer Zellen verschiedener Borrelienisolates wurden in einem 10 %igen Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamidgel separiert und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membran wurde für eine Ligandenaffinitätsblot-Analyse eingesetzt und mit rekombinatem FHL-1 inkubiert. Die Detektion erfolgte mit B22 zum Nachweis der FHL-1-Bindung. Das Molekulargewicht der Markerproteine [kDa] ist seitlich aufgeführt.

Tab. IV.1: Expression der BbCRASP-Proteine in repräsentativen *B. burgdorferi* s.s.-Isolaten.

Isolat	BbCRASP-1	BbCRASP-2	BbCRASP-3	BbCRASP-4	BbCRASP-5
B31	+	+	+	-	+
LW2	+	+	+	+	+
P1F	+	-	+	+	+
ZS7	+	-	+	-	-
297	+	-	-	-	-
SH-2-82	+	+	+	-	-
B31-e2	+	-	-	-	+
B313	-	-	-	-	-

(+) Expression nachweisbar, (-) keine Expression nachweisbar

2 Charakterisierung und Identifizierung der Faktor H-bindenden CRASP-/Erp-Proteine

2.1 Immunologische Charakterisierung der Faktor H-bindenden CRASP-/Erp-Proteine

Gruppe III repräsentiert die Faktor H-bindenden CRASP-Proteine. Dazu gehören bei der Genospezies *B. burgdorferi* s.s. BbCRASP-3, BbCRASP-4 und BbCRASP-5 und bei der Genospezies *B. afzelii* BaCRASP-4 und BaCRASP-5 (Kraiczy et al., 2001b; Kraiczy et al., 2002). Weiterhin ist bekannt, dass auch Mitglieder der Erp-(*OspE/F related protein*-) Proteinfamilie in der Lage sind, Faktor H zu binden (Hellwage et al., 2001; Alitalo et al., 2002; Stevenson et al., 2002; Kraiczy et al., 2003; Metts et al., 2003; McDowell et al., 2004). Aufgrund der Sequenzidentität (Kraiczy et al., 2003) der Proteine BbCRASP-3 und ErpP von 99,8 % sowie ihres identischen Bindungsverhaltens liegt es nahe, dass die Faktor H-bindenden CRASP- und die Erp-Proteine immunologisch verwandte Proteine darstellen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Isolate der humanpathogenen Genospezies *B. burgdorferi* s.s. und *B. afzelii* mit Antikörpern gegen die Proteine ErpA und ErpP auf Kreuzreaktionen der CRASP-Proteine mit den Antikörpern untersucht. Es erfolgte keine Analyse von Isolaten der ebenfalls humanpathogenen Genospezies *B. garinii*, da diese keine Faktor H-bindenden CRASPs exprimieren (Kraiczy et al., 2002).

Homogenate ganzer Borrelienzellen des *B. burgdorferi* s.s.-Isolates B31 und der *B. afzelii*-Isolate EB1 und FEM1-D15 wurden über Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese separiert und die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membranen wurden für Ligandenaffinitätsblot-Analysen zum Nachweis der Faktor H-bindenden CRASP-Proteine sowie für Westernblot-Analysen mit den polyklonalen Antikörpern ErpA und ErpP (III. 1.6) eingesetzt. Bei den Ligandenaffinitätsblot-Analysen erfolgte die Detektion der Faktor H-Bindung mit dem Antikörper VIG8. Dabei konnten für den *B. burgdorferi* s.s.-Stamm B31 mit BbCRASP-2, BbCRASP-3 und BbCRASP-5 drei CRASP-Proteine detektiert werden (Abb. IV.7, Spur 1). Die *B. afzelii*-Isolate exprimierten ebenfalls drei CRASP-Proteine. Für das Isolat EB1 wurden BaCRASP-1, BaCRASP-2 und BaCRASP-4 nachgewiesen (Abb. IV.8, Spur 1), während der Stamm FEM1-D15 die Expression von BaCRASP-1, BaCRASP-2 und BaCRASP-5 zeigte (Abb. IV.9, Spur 1).

Weiterhin wurden die Homogenate ganzer Borrelienzellen der oben genannten Isolate mit dem polyklonalen Antikörper ErpP auf Kreuzreaktionen mit den CRASP-Proteinen getestet. Dabei konnten Kreuzreaktionen mit BbCRASP-3 des Isolates B31 (Abb. IV.7, Spur 3) und

BaCRASP-5 des Stammes FEM1-D15 (Abb. IV.9, Spur 2) detektiert werden. Weiterhin reagierte der Antikörper mit BaCRASP-2 und BaCRASP-4 des Isolates EB1 (Abb. IV.8, Spur 2), wobei BaCRASP-2 ein deutlich schwächeres Signal als BaCRASP-4 zeigte. Diese CRASP-Proteine scheinen also eng verwandt mit dem ErpP-Protein des Stammes B31 zu sein.

Der polyklonale Antikörper gegen ErpA wies Kreuzreaktionen mit BbCRASP-5 des Isolates B31 (Abb. IV.7, Spur 2), mit BaCRASP-2 und BaCRASP-4 des Isolates EB1 (Abb. IV.8, Spur 3) sowie mit BaCRASP-2 und BaCRASP-5 des Stammes FEM1-D15 auf (Abb. IV.7, Spur 3). Das detektierte Signal von BaCRASP-2 war dabei deutlich schwächer als das Signal von BaCRASP-5. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Sequenzhomologien zwischen dem ErpA-Protein und den detektierten CRASP-Proteinen bestehen.

Die Ergebnisse der immunologischen Charakterisierung der CRASP-/Erp-Proteine sind in Tabelle IV.2 zusammengefasst.

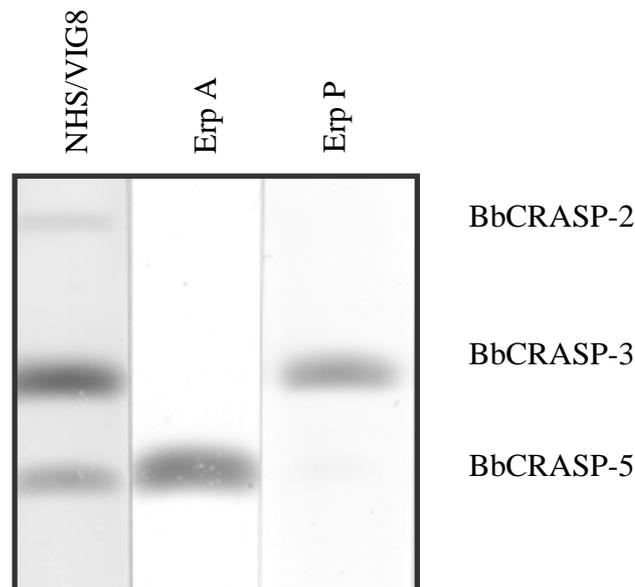


Abb. IV.7: Nachweis der CRASP-/Erp-Proteine des *B. burgdorferi* s.s.-Isolates B31.

Ein Homogenat ganzer Borrelienzellen des *B. burgdorferi* s.s.-Isolates B31 wurde über Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese separiert und die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membran wurde für eine Ligandenaffinitätsblot-Analyse mit NHS als Faktor H-Quelle (Spur 1) sowie für Westernblot-Analysen (Spur 2 und 3) mit den polyklonalen Antikörpern ErpP und ErpA eingesetzt. Bei den Ligandenaffinitätsblots erfolgte die Detektion der Bindung mit dem monoklonalen α -Faktor H-Antikörper VIG8.

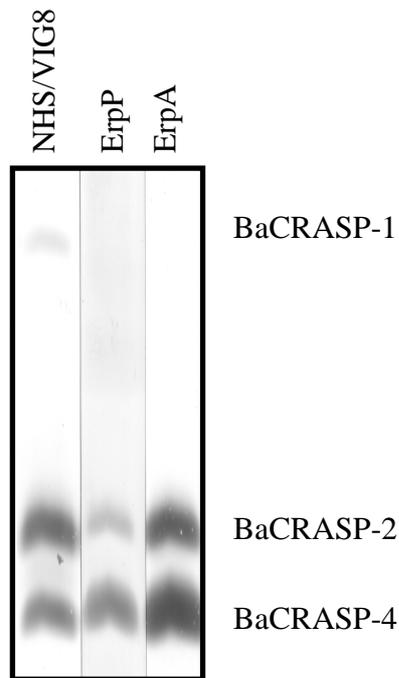


Abb. IV.8: Nachweis der CRASP-/Erp-Proteine des *B. afzelii*-Isolates EB1.

Ein Homogenat ganzer Borrelienzellen des *B. afzelii*-Isolates EB1 wurde über Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese separiert und die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membran wurde für eine Ligandenaffinitätsblot-Analyse mit NHS als Faktor H-Quelle (Spur 1) sowie für Westernblot-Analysen (Spur 2 und 3) mit den polyklonalen Antikörpern ErpP und ErpA eingesetzt. Bei den Ligandenaffinitätsblots erfolgte die Detektion der Bindung mit dem monoklonalen α -Faktor H-Antikörper VIG8.

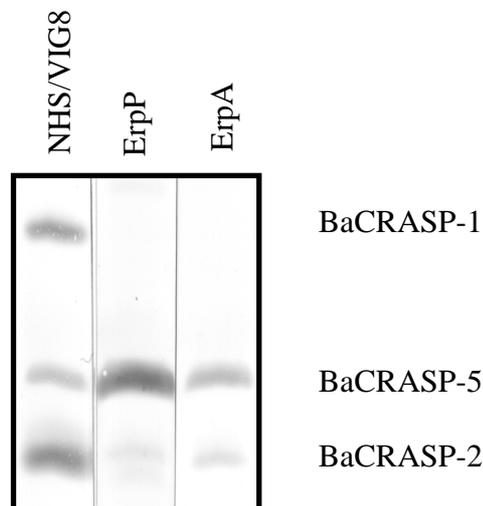


Abb. IV.9: Nachweis der CRASP-/Erp-Proteine des *B. afzelii*-Stammes FEM1-D15.

Ein Homogenat ganzer Borrelienzellen des *B. afzelii*-Stammes FEM1-D15 wurde über Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese separiert und die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membran wurde für eine Ligandenaffinitätsblot-Analyse mit NHS als Faktor H-Quelle (Spur 1) sowie für Westernblot-Analysen (Spur 2 und 3) mit den polyklonalen Antikörpern ErpP und ErpA eingesetzt. Bei den Ligandenaffinitätsblots erfolgte die Detektion der Bindung mit dem monoklonalen α -Faktor H-Antikörper VIG8.

Tab. IV.2: Immunologische Charakterisierung der CRASP-/Erp-Proteine mittels polyklonaler Antikörper.

Protein	Masse [kDa]	Kreuzreaktion mit α -ErpP	Kreuzreaktion mit α -ErpA
BbCRASP-1	25,9	-	-
BbCRASP-2	23,2	-	-
BbCRASP-3	19,8	++	-
BbCRASP-4	18,5	-	-
BbCRASP-5	17,7	-	++
BaCRASP-1	27,5	-	-
BaCRASP-2	20,7	+	+ / ++
BaCRASP-4	19,2	++	++
BaCRASP-5	22,6	++	+

(++) starke Kreuzreaktion, (+) schwache Kreuzreaktion, (-) keine Kreuzreaktion

(+ / ++) schwache Kreuzreaktion bei dem Isolat FEM1-D15, starke Kreuzreaktion bei dem Isolat EB1

2.2 Analyse der Erp-Proteine auf Bindung an Faktor H und FHL-1

Drei Mitglieder der Erp-(*OspE/F related protein*-)Proteinfamilie konnten in früheren Studien als Faktor H-bindende Proteine charakterisiert werden (Hellwage et al., 2001; Alitalo et al., 2002; Stevenson et al., 2002; Kraiczy et al., 2003; Metts et al., 2003; McDowell et al., 2004). Ziel dieser Untersuchung war die Analyse des Bindungsverhaltens weiterer Erp-Proteine. Dafür stellte Prof. Dr. B. Stevenson (Department of Microbiology, Immunology and Molecular Genetics, University of Kentucky College of Medicine, Lexington, Kentucky, USA) Plasmidkonstrukte für die Expression Polyhistidin-fusionierter Erp-Proteine zur Verfügung (III. 1.4; Stevenson et al., 1998a; El-Hage et al., 2001). In B31 kodieren die Gene *erpA*, *erpI* und *erpN* sowie die Gene *erpB*, *erpJ* und *erpO* jeweils identische Proteine (Casjens et al., 1997; Stevenson et al., 1998a; El-Hage et al., 2001). Deswegen werden diese Proteine in der vorliegenden Arbeit zusammengefasst und als ErpA und ErpB bezeichnet.

Die rekombinanten Erp-Proteine wurden exprimiert (III. 2.3.2.1) und mittels eines Expressionstests (III. 2.3.2.3) auf Bindung an Faktor H und FHL-1 untersucht. Nur für drei der getesteten 11 Erp-Proteine konnte eine Bindung an Faktor H detektiert werden. Es handelte sich hierbei um die schon früher als Faktor H-bindend beschriebenen Proteine ErpA, ErpC und ErpP. Weiterhin war keine Interaktion der untersuchten Erp-Proteine mit FHL-1

nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Die Erp-Proteine ErpA, ErpC und ErpP binden somit spezifisch Faktor H, während die anderen Mitglieder der Erp-Proteinfamilie keine Faktor H- bzw. FHL-1-bindenden Proteine darstellen. Die Ergebnisse der Bindungsstudie fasst Tabelle IV.3 zusammen.

Tab. IV.3: Analyse von Mitgliedern der Erp-Proteinfamilie auf Bindung an Faktor H und FHL-1.

Protein	Bindung an Faktor H	Bindung an FHL-1
ErpA	+	-
ErpB	-	-
ErpC	+	-
ErpD	-	-
ErpK	-	-
ErpL	-	-
ErpM	-	-
ErpP	+	-
ErpQ	-	-
ErpX	-	-
ErpY	-	-

(+) Bindung detektierbar, (-) Bindung nicht detektierbar

2.3 Lokalisation der mit den Erp-Proteinen interagierenden Regionen von Faktor H

Die Bindung der drei Faktor H-bindenden Erp-Proteine ErpA, ErpC und ErpP an Faktor H sollte durch Lokalisation der mit diesen Proteinen interagierenden Regionen von Faktor H weitergehend charakterisiert werden. Diese Untersuchung erfolgte mit Hilfe von Ligandenaffinitätsblot-Analysen mit den affinitätschromatographisch gereinigten Erp-Proteinen (III. 2.3.11.2) und Deletionsmutanten von Faktor H und FHL-1 (SCRs 1-2 bis SCRs 1-7, SCRs 8-20, SCRs 15-20, SCRs 19-20; III. 1.7). Dazu wurden je 200 ng rekombinante Erp-Proteine auf ein 10 %iges Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamidgel appliziert und nach dem Gellauf auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, welche mit Deletionsmutanten von FHL-1 und Faktor H sowie rekombinatem FHL-1 (SCRs 1-7) inkubiert wurde. Die Detektion der Bindung erfolgte mit Antikörpern gegen FHL-1 (SCR1-4) bzw. Faktor H

(VIG8). Anhand der Abbildungen IV.10 – IV.12 ist zu sehen, dass die Erp-Proteine ein einheitliches Bindungsverhalten an Faktor H zeigten. Es konnte für alle drei Proteine eine Bindung an die Deletionsmutanten SCRs 8-20, SCRs 15-20 und SCRs 19-20 von Faktor H detektiert werden, wobei die Mutante SCRs 19-20 die stärkste Bindung aufwies. Dagegen konnte für FHL-1 und die N-terminalen Deletionsmutanten von Faktor H keine Bindung nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse indizieren, dass die Bindung von Faktor H an die Erp-Proteine über den C-Terminus von Faktor H erfolgt.

Als Kontrolle wurde 15 µg eines Homogenats ganzer Borrelienzellen des Isolates B31 (Spur 1) aufgetragen, die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und diese mit NHS als Faktor H-Quelle inkubiert. Die Bindungsdetektion erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper VIG8, wodurch BbCRASP-1, BbCRASP-2, BbCRASP-3 sowie BbCRASP-5 dargestellt werden konnten.

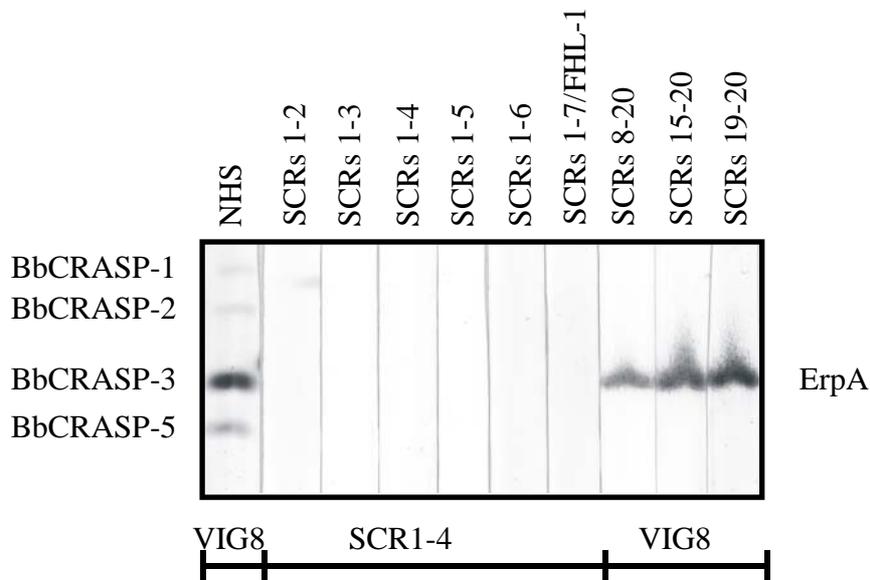


Abb. IV.10: Lokalisation der mit dem ErpA-Protein interagierenden Regionen von Faktor H.

200 ng rekombinantes ErpA-Protein wurde in einem 10 %igen Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamidgel separiert, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und diese für Ligandenaffinitätsblot-Analysen eingesetzt. Die Membran wurde mit Deletionsmutanten von FHL-1 und Faktor H (SCRs 1-2, SCRs 1-3, SCRs 1-4, SCRs 1-5, SCRs 1-6, SCRs 8-20, SCRs 15-20, SCRs 19-20) sowie rekombinantem FHL-1 (SCRs 1-7) inkubiert. Die Detektion der Bindung erfolgte mit Antikörpern gegen FHL-1 (SCR1-4) und Faktor H (VIG8). In Spur 1 wurde als Kontrolle 15 µg eines Ganzzellhomogenats von B31 aufgetragen, mit NHS als Faktor H-Quelle inkubiert und die Faktor H-Bindung mit dem VIG8-Antikörper detektiert.

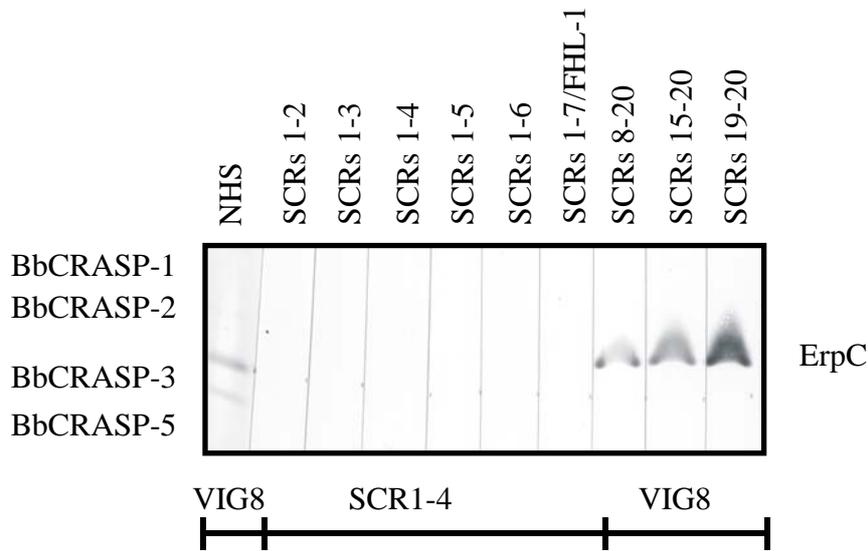


Abb. IV.11: Lokalisation der mit ErpC interagierenden Regionen von Faktor H.

200 ng rekombinantes ErpC-Protein wurde in einem 10 %igen Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamidgel separiert, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und diese für Ligandenaffinitätsblot-Analysen eingesetzt. Die Membran wurde mit Deletionsmutanten von FHL-1 und Faktor H (SCRs 1-2, SCRs 1-3, SCRs 1-4, SCRs 1-5, SCRs 1-6, SCRs 8-20, SCRs 15-20, SCRs 19-20) sowie rekombinantem FHL-1 (SCRs 1-7) inkubiert. Die Detektion der Bindung erfolgte mit Antikörpern gegen FHL-1 (SCR1-4) und Faktor H (VIG8). In Spur 1 wurde als Kontrolle 15 µg eines Ganzzellhomogenats von B31 aufgetragen, mit NHS inkubiert und die Faktor H-Bindung mit dem VIG8-Antikörper detektiert.

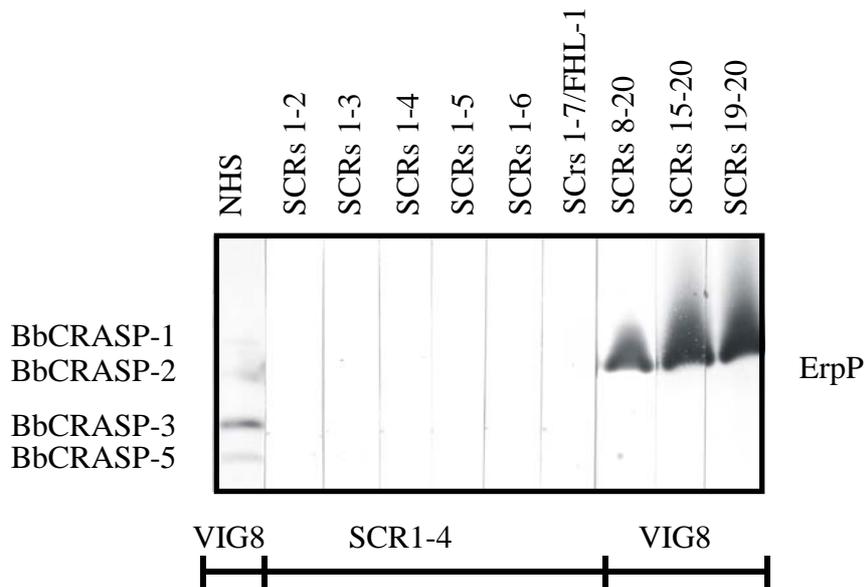


Abb. IV.12: Lokalisation der mit dem ErpP-Protein interagierenden Regionen von Faktor H.

200 ng rekombinantes ErpP-Protein wurde in einem 10 %igen Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamidgel separiert, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und diese für Ligandenaffinitätsblot-Analysen eingesetzt. Die Membran wurde mit Deletionsmutanten von FHL-1 und Faktor H (SCRs 1-2, SCRs 1-3, SCRs 1-4, SCRs 1-5, SCRs 1-6, SCRs 8-20, SCRs 15-20, SCRs 19-20) sowie rekombinantem FHL-1 (SCRs 1-7) inkubiert. Die Detektion der Bindung erfolgte mit Antikörpern gegen FHL-1 (SCR1-4) und Faktor H (VIG8). In Spur 1 wurde als Kontrolle 15 µg eines Ganzzellhomogenats von B31 aufgetragen, mit NHS als Faktor H-Quelle inkubiert und die Faktor H-Bindung mit dem VIG8-Antikörper detektiert.

2.4 Identifizierung der spezifisch Faktor H-bindenden CRASP-Proteine des *B. burgdorferi* s.s.-Isolates LW2

Ein Ziel dieser Arbeit war es, sämtliche CRASP-Proteine des *B. burgdorferi* s.s.-Isolates LW2 zu identifizieren. Der Stamm LW2 exprimiert als einziges Isolat alle fünf BbCRASP-Proteine (IV. 1.2). Für die Isolierung der Proteine wurde eine Lambda-Expressionsbibliothek dieses Isolates hergestellt und 80.000 Phagen mit NHS als Faktor H-Quelle auf die Expression der CRASP-Proteine getestet (III. 2.2.15). Nach Auswertung der Ligandenaffinitätsblots und Identifikation der positiven Phagenklone konnten 89 Phagen isoliert werden. Davon wurden zehn Phagenklone erneut für weitere Screenings mit den polyklonalen Antikörpern ErpA und ErpP eingesetzt. Aufgrund der Kreuzreaktionen dieser Antikörper mit BbCRASP-3 bzw. BbCRASP-5 konnte anhand dieses Screenings zwischen ErpA-/BbCRASP-5- und ErpP-/BbCRASP-3-exprimierenden Phagen unterschieden werden. Die Screenings wurden wiederholt bis reine Phagenklone vorlagen. Diese Phagenklone wurden dann für die *in vivo*-Exzision (III. 2.2.16) eingesetzt. Mit Hilfe der *in vivo*-Exzision konnte aus dem 38,9 kb großen ZAP Express Vektor das 4,5 kb Phagemid pBK-CMV ausgeschnitten werden, wodurch die Analyse der inserierten DNA vereinfacht wurde. Das Insert wurde anschließend mittels spezifischer Oligonukleotide (III. 1.5) sequenziert (III. 2.2.9). Auf diese Weise konnten die Proteine BbCRASP-3 und BbCRASP-5 des Isolates LW2 identifiziert werden. Die anhand der Klone abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Proteine sind in den Abbildungen IV.7 und IV.8 im Vergleich mit den homologen der Datenbank entnommenen Sequenzen der Proteine ErpP und ErpA des *B. burgdorferi* s.s.-Isolates B31 dargestellt. Wie man den Abbildungen entnehmen kann, sind die Sequenzen von BbCRASP-3 und ErpP sowie BbCRASP-5 und ErpA identisch.

3 Identifizierung des Faktor H- und FHL-1-bindenden BbCRASP-1-Proteins

3.1 Identifizierung des BbCRASP-1 Proteins des *B. burgdorferi* s.s.-Isolates LW2

Wie bereits in Abschnitt IV. 2.3 erwähnt, war ein Teilziel der vorliegenden Arbeit die Identifikation sämtlicher CRASP-Proteine des *B. burgdorferi* s.s.-Isolates LW2. Dazu zählen neben den Faktor H-bindenden CRASP-/Erp-Proteinen (Gruppe III) die zur Faktor H- und FHL-1-bindenden Gruppe I gehörenden Proteine BbCRASP-1 und BbCRASP-2. Analog zu den Faktor H-bindenden CRASP-Proteinen (IV. 2.4) sollte BbCRASP-1 mit Hilfe der Lambda-Expressionsbibliothek des Isolates LW2 (III. 2.2.14) isoliert werden.

```

HKKAKLNI IKINIIAMILTLICTSCAPFSKIDPKANANTKPKKITNPGENTQNFEDKSGDLSTSD
      10      20      30      40      50      60
A HKKAKLNI IKINIIAMILTLICTSCAPFSKIDPKANANTKPKKITNPGENTQNFEDKSGDLSTSD
B HKKAKLNI IKINIIAMILTLICTSCAPFSKIDPKANANTKPKKITNPGENTQNFEDKSGDLSTSD
C HKKAKLNI IKINIIAMILTLICTSCAPFSKIDPKANANTKPKKITNPGENTQNFEDKSGDLSTSD

EKIMETIASSELKAI GKELLEDQKKEENIQIAKIAKEKFD FLSTFKVGPYDLIDEDI QMKIKRRTLYS
      70      80      90      100     110     120     130
EKIMETIASSELKAI GKELLEDQKKEENIQIAKIAKEKFD FLSTFKVGPYDLIDEDI QMKIKRRTLYS
EKIMETIASSELKAI GKELLEDQKKEENIQIAKIAKEKFD FLSTFKVGPYDLIDEDI QMKIKRRTLYS
EKIMETIASSELKAI GKELLEDQKKEENIQIAKIAKEKFD FLSTFKVGPYDLIDEDI QMKIKRRTLYS

SLDYKKENIEK LKEILEILKKNSEHYNIIGRLIYHISWGIQFQIEQNLELIQNGVENLSQEEESKS
      140     150     160     170     180     190
SLDYKKENIEK LKEILEILKKNSEHYNIIGRLIYHISWGIQFQIEQNLELIQNGVENLSQEEESKS
SLDYKKENIEK LKEILEILKKNSEHYNIIGRLIYHISWGIQFQIEQNLELIQNGVENLSQEEESKS
SLDYKKENIEK LKEILEILKKNSEHYNIIGRLIYHISWGIQFQIEQNLELIQNGVENLSQEEESKS

LLMQIKSNLEIKQRLKKTTLNETLKVYQNQTQDNEKILAEHFNKYYKDFD TLKPAFY
      200     210     220     230     240     250
LLMQIKSNLEIKQRLKKTTLNETLKVYQNQTQDNEKILAEHFNKYYKDFD TLKPAFY
LLMQIKSNLEIKQRLKKTTLNETLKVYQNQTQDNEKILAEHFNKYYKDFD TLKPAFY
LLMQIKSNLEIKQRLKKTTLNETLKVYQNQTQDNEKILAEHFNKYYKDFD TLKPAFY
    
```

Abb. IV.16: Vergleich der Aminosäuresequenzen der BbCRASP-1-Proteine der *B. burgdorferi* s.s.-Isolate B31, ZS7 und LW2.

Diese Abbildung zeigt die mittels einer Lambda-Expressionsbibliothek identifizierte Aminosäuresequenz des BbCRASP-1-Proteins des *B. burgdorferi* s.s.-Isolates LW2 (C) im Vergleich mit den homologen Sequenzen der *B. burgdorferi* s.s.-Isolate ZS7 (B) (Kraiczy et al., 2004a) und B31 (A) (Datenbank-Nr. AAC66286).

Das Screening der Expressionsgenbank (III. 2.2.15) mit rekombinantem FHL-1 lieferte 62 positive Phagenklone aus 230.000 getesteten Phagen. Anhand des gegen das BbCRASP-1-Protein des Stammes ZS7 gerichteten monoklonalen Antikörpers RH-1 (III. 1.6) konnte zwischen den BbCRASP-1-exprimierenden Phagenklonen und denen, die BbCRASP-2 exprimierten, unterschieden werden. Die 62 Phagenklone zeigten durchweg positive Signale mit dem RH-1-Antikörper. Vier Klone wurden für die *in vivo*-Exzision (III. 2.2.15) eingesetzt und sequenziert. Abbildung IV.16 vergleicht die aus den Klonen abgeleitete Aminosäuresequenz des isolierten BbCRASP-1-Proteins des *B. burgdorferi* s.s.-Isolates LW2 mit den homologen BbCRASP-1-Sequenzen der *B. burgdorferi* s.s.-Isolate ZS7 (Kraiczy et al., 2004a) und B31 (Datenbank-Nr. AAC66286). Die Sequenzen weisen keine Unterschiede auf.

4 Identifizierung und Charakterisierung des BbCRASP-2-Proteins

4.1 Identifizierung des BbCRASP-2-Proteins der *B. burgdorferi* s.s.-Isolate LW2 und B31

4.1.1 Screening der Lambda-Expressionsbibliothek zur Isolierung des BbCRASP-2-Proteins

Im Vorfeld dieser Arbeit konnte mit Hilfe von Ligandenaffinitätsblot-Analysen ein Faktor H- und FHL-1-bindendes Protein mit einem Molekulargewicht von 23,2 kDa im Homogenat ganzer Borrelienzellen einiger Isolate der Genospezies *B. burgdorferi* s.s. nachgewiesen werden (Abb. IV.6; Kraiczy et al., 2001a, 2001b). Das BbCRASP-2-Protein gehört wie BbCRASP-1 zur Faktor H- und FHL-1-bindenden Gruppe I, wobei mit Faktor H ein schwächeres Bindungssignal detektiert wurde als mit FHL-1.

In dieser Arbeit sollte das BbCRASP-2-Protein der *B. burgdorferi* s.s.-Isolate LW2 und B31 identifiziert und charakterisiert werden. Dazu erfolgte wie schon unter Abschnitt IV. 3.1 beschrieben ein Screening der Lambda-Expressionsbibliothek des Stammes LW2 (III. 2.2.15) mit rekombinantem FHL-1. Aus 230.000 getesteten Phagen konnten dabei 62 positive Phagen isoliert und gereinigt werden. Da sowohl das BbCRASP-2-Protein als auch das BbCRASP-1-Protein an FHL-1 bindet, wurden die positiven Phagen für weitere Screenings mit dem monoklonalen α -BbCRASP-1-Antikörper RH-1 eingesetzt. So konnten BbCRASP-1-exprimierende Phagen von den Phagen unterschieden werden, die BbCRASP-2 exprimierten. Die 62 der im FHL-1 Screening als positiv getesteten Phagen reagierten mit dem RH-1-Antikörper, enthielten also alle ein DNA-Insert, das für BbCRASP-1 kodiert. Eine Isolierung von BbCRASP-2 auf diesem Weg war demnach nicht möglich.

4.1.2 Datenbanksuche nach Proteinen mit putativen Bindungsregionen für Faktor H und FHL-1

Da es nicht möglich war, BbCRASP-2 mit Hilfe der Lambda-Expressionsbibliothek zu isolieren, mussten zur Identifizierung des Proteins andere Methoden gewählt werden. Das BbCRASP-2-Protein bindet wie BbCRASP-1 sowohl an Faktor H als auch an FHL-1. Aufgrund der bereits charakterisierten Bindung des BbCRASP-1-Proteins des Isolates ZS7 an Faktor H und FHL-1 (Kraiczy et al., 2004a) konnte die identifizierte Faktor H- und FHL-1-Bindungsregion als Basis für eine Datenbanksuche nach Proteinen mit putativen

Bindungsregionen für Faktor H und FHL-1 dienen. Für BbCRASP-1 wurden zwei putative Faktor H-Bindungsstellen in der Mitte und eine in der C-terminalen Region des Proteins ermittelt (Kraiczky et al., 2004a). Weiterhin wiesen Analysen C-terminaler Deletionsmutanten des BbCRASP-1-Proteins daraufhin, dass die C-terminalen 11 Aminosäuren relevant für die Bindung an Faktor H und FHL-1 sind.

Die Datenbanksuche erfolgte mittels des *basic local alignment search tool* (BLAST) anhand der Sequenz des BbCRASP-1-Proteins. Dafür wurde der Stamm B31 ausgewählt, weil das Genom dieses Isolates vollständig sequenziert vorliegt. Die bei der Suche erhaltenen Sequenzen wurden mittels der C-terminalen putativen Faktor H- und FHL-1-Bindungsregion des BbCRASP-1-Proteins (Ala-Glu-His-Phe-Asn-Lys-Tyr-Tyr-Lys-Asp-Phe-Asp-Thr-Leu-Lys-Pro) auf das Vorhandensein eventueller Faktor H- und FHL-1-Bindungsstellen analysiert. Dabei wurde mit dem BbCRASP-1 paralogen Protein BBA69 ein potentieller Kandidat gefunden.

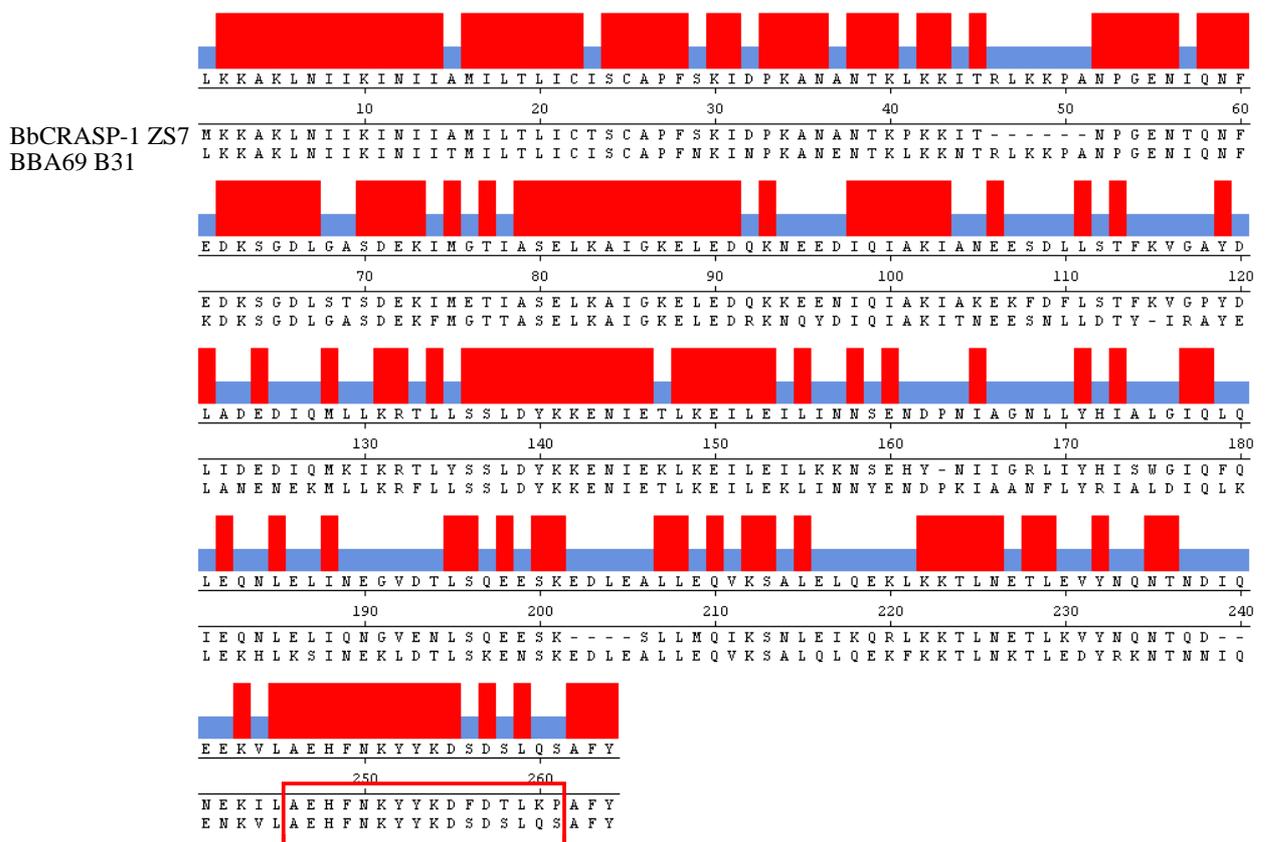


Abb. IV.17: Alignment des BbCRASP-1-Proteins des *B. burgdorferi* s.s-Isolates ZS7 und des BBA69-Proteins des *B. burgdorferi* s.s-Isolates B31.

Vergleich der Aminosäuresequenz des BbCRASP-1-Proteins des *B. burgdorferi* s.s-Isolates ZS7 (Kraiczky et al., 2004a) und der BBA69-Sequenz des *B. burgdorferi* s.s-Stammes B31 (Datenbank-Nr. AAC66287). Die putative Faktor H- und FHL-1-Bindungsregion (Kraiczky et al., 2004a) ist durch einen roten Rahmen gekennzeichnet. Rote Balken kennzeichnen die homologen, blaue Balken die nicht-homologen Regionen.

Die Proteine BbCRASP-1 und BBA69 sind zu 61,4 % homolog, wobei die C-terminale putative Bindungsregion des BbCRASP-1-Proteins eine 76,5 %ige Sequenzidentität zu dem C-Terminus von BBA69 aufweist. Ein Alignment der beiden Proteine zeigt Abbildung IV.17. Das für BBA69 kodierende Gen wurde mittels entsprechender Oligonukleotide amplifiziert und in den pGEX-6P-1-Vektor kloniert. Das GST-fusionierte BBA69-Protein wurde exprimiert und für eine Ligandenaffinitätsblot-Analyse mit rekombinantem FHL-1 eingesetzt. Wie in der Abbildung IV.18B zu sehen ist, konnte keine Bindung an FHL-1 detektiert werden. Dieses Ergebnis indiziert, dass es sich bei dem BBA69-Protein nicht um das gesuchte BbCRASP-2-Protein handelt. Die als Kontrolle durchgeführte Westernblot-Analyse mit einem Antikörper gegen GST war positiv (Abb. IV.18A). Als Positivkontrolle der Ligandenaffinitätsblot-Analyse diente rekombinantes GST-BbCRASP-1-Protein.

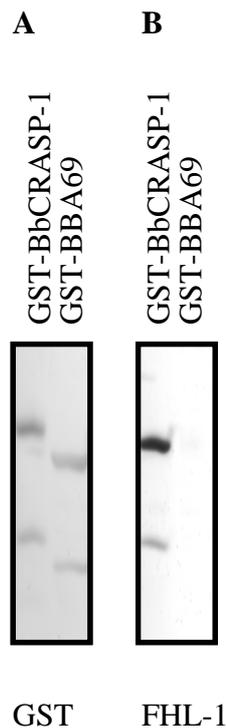


Abb. IV.18: Bindungsanalyse des BbCRASP-1 paralogen Proteins BBA69.

Rekombinantes GST-BBA69 und rekombinantes GST-BbCRASP-1 (Positivkontrolle) wurden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und für Westernblot-Analysen mit einem Antikörper gegen GST (A) sowie für eine Ligandenaffinitätsblot-Analyse mit rekombinantem FHL-1 (B) eingesetzt. Die FHL-1-Bindung wurde mit dem SCR1-4-Antikörper detektiert.

4.1.3 Spezifische Adsorption des BbCRASP-2-Proteins aus dem Homogenat ganzer Zellen des *B. burgdorferi* s.s-Isolates LW2 über Bindung an Faktor H und FHL-1

Liganden-gekoppelte Affinitätschromatographien (III. 2.3.11.3) und Liganden-gekoppelte magnetische Partikel (III. 2.3.11.4) stellen weitere Methoden zur Isolierung von Proteinen, die mit spezifischen Liganden interagieren, dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurde FHL-1 bzw. Faktor H als Ligand an eine Säulenmatrix bzw. an magnetische Partikel gekoppelt, um das BbCRASP-2-Protein aus dem Proteingemisch des Homogenats ganzer Zellen des *B. burgdorferi* s.s-Isolates LW2 zu adsorbieren. Beide Methoden wurden in Kooperation mit Prof. Dr. P. F. Zipfel (Abteilung für Infektionsbiologie, Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung, Jena) durchgeführt. Die Säulenchromatographie erfolgte an einer *fast performance liquid chromatography*-(FPLC-)Anlage. Sowohl bei der Säulenchromatographie als auch bei den magnetischen Partikeln konnten in den Elutionsfraktionen keine Proteine detektiert werden. Es fand also weder eine Bindung des BbCRASP-2-Proteins an die FHL-1- bzw. Faktor H-gekoppelten Säulen noch an die auf die gleiche Weise gekoppelten magnetischen Partikel statt (Daten nicht gezeigt). Vermutlich veränderte sich das Bindungsverhalten von Faktor H und FHL-1 durch die Kopplung an das Trägermaterial, so dass BbCRASP-2 nicht mehr binden konnte. Demnach war eine Isolierung des Proteins auf diesem Weg nicht möglich.

Um das Bindungsverhalten des Liganden bei der Kopplung zu erhalten, wurde versucht FHL-1 indirekt über den α -FHL-1-Antikörper SCR1-4 an das Trägermaterial zu binden. Danach erfolgte die Inkubation der gekoppelten Partikel mit einem Homogenat ganzer Borrelienzellen des Isolates LW2 und als Positivkontrolle mit rekombinantem BbCRASP-1-Protein. Wie in den Abbildungen IV.19 und IV.20 zu sehen ist, enthielten die Elutionsfraktionen keine Proteine. Die Proteine BbCRASP-2 und BbCRASP-1 konnten in der ersten Waschfraktion nachgewiesen werden (Abb. IV.19). Ebenso befand sich das zur Kontrolle eingesetzte rekombinante BbCRASP-1-Protein in der ersten Waschfraktion (Abb. IV.20).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass keine Bindung des BbCRASP-2- oder des BbCRASP-1-Proteins an die gekoppelten magnetischen Partikel stattgefunden hat. Das Bindungsverhalten von FHL-1 schien sich auch bei der indirekten Kopplung mittels eines Antikörpers gegen FHL-1 zu verändern. Deswegen konnte mit dieser Methodik keine Isolierung des BbCRASP-2-Proteins erreicht werden.

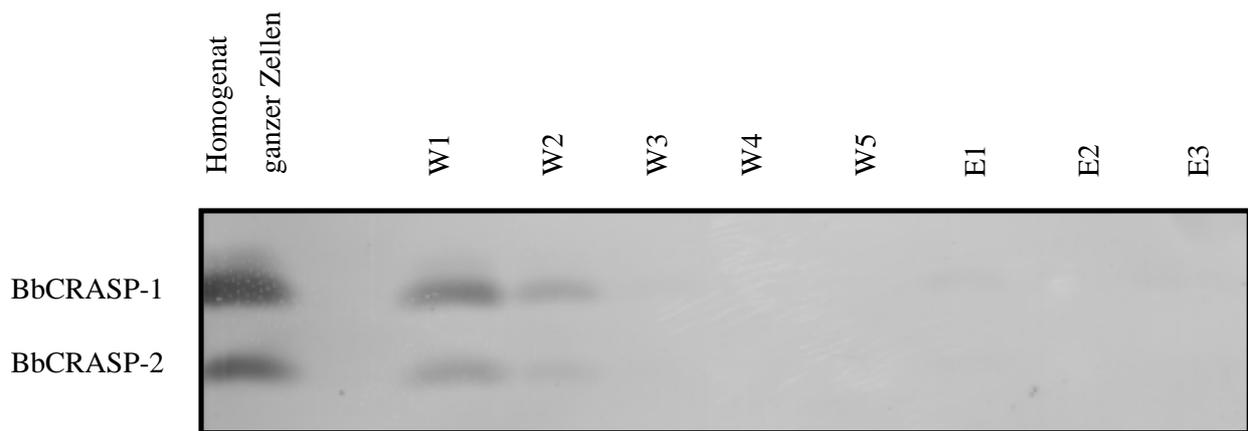


Abb. IV.19: Liganden-gekoppelte magnetische Partikel inkubiert mit einem Homogenat ganzer Zellen des *B. burgdorferi* s.s.-Isolates LW2.

FHL-1 wurde indirekt über den α -FHL-1-Antikörper SCR1-4 an das Trägermaterial der magnetischen Partikel gekoppelt. Diese wurden dann mit einem Homogenat ganzer Zellen des *B. burgdorferi* s.s.-Isolates LW2 inkubiert und mit Glycinpuffer (0,1 M, pH 2,8) eluiert. Das Homogenat ganzer Zellen des Isolates LW2, die Waschfraktionen 1-5 (W1-W5) und die Elutionsfraktionen 1-3 (E1-E3) sind in einer Ligandenaffinitätsblot-Analyse zum Nachweis der FHL-1-bindenden Proteine BbCRASP-1 und BbCRASP-2 dargestellt. Dazu wurde die Membran mit rekombinatem FHL-1 inkubiert und die FHL-1-Bindung mit dem SCR1-4-Antikörper detektiert.



Abb. IV.20: Liganden-gekoppelte magnetische Partikel inkubiert mit rekombinatem BbCRASP-1-Protein.

FHL-1 wurde indirekt über den α -FHL-1-Antikörper SCR1-4 an das Trägermaterial der magnetischen Partikel gekoppelt. Diese wurden dann mit rekombinatem BbCRASP-1-Protein (BbCRASP-1_{rek}) inkubiert und mit Glycinpuffer eluiert. Das Homogenat ganzer Borrelienzellen (LW2), die Waschfraktionen 1-5 (W1-W5) und die Elutionsfraktionen 1-3 (E1-E3) sind in einer Westernblot-Analyse mit einem Antikörper gegen das BbCRASP-1-Protein (RH-1) dargestellt.

4.1.4 Identifizierung des BbCRASP-2-Proteins mittels zweidimensionaler (2D-) Elektrophorese und Matrix-unterstützter Laserdesorptions-/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS)

4.1.4.1 2D-Elektrophorese mit dem Homogenat ganzer Zellen des *B. burgdorferi* s.s.- Isolates B31

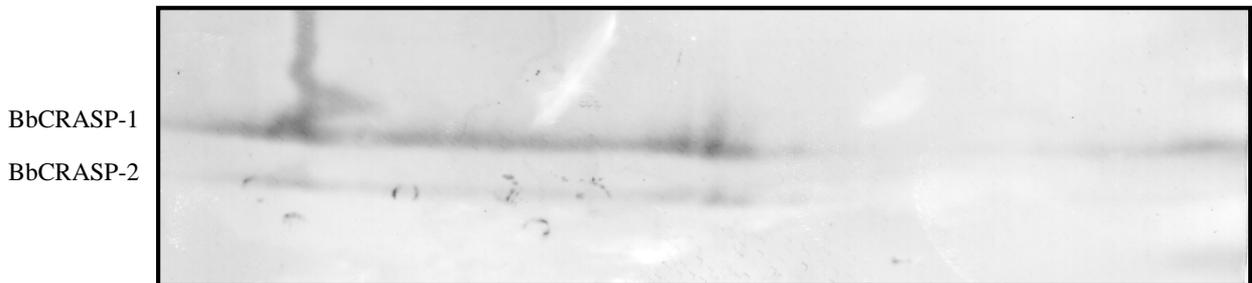
Die zweidimensionale (2D-)Elektrophorese stellt die Methode mit dem höchsten Auflösungsvermögen für die Analyse komplexer Proteingemische wie z.B. Homogenate ganzer Zellen dar. Diese Methode sollte in der vorliegenden Arbeit genutzt werden, um das BbCRASP-2-Protein aus dem Proteingemisch des Homogenats ganzer Borrelienzellen zu isolieren. Eine Ligandenaffinitätsblot-Analyse der 2D-Gele mit rekombinantem FHL-1 erlaubt anschließend die Identifizierung des BbCRASP-2-Proteinspots in dem 2D-Gel. Die Matrix-unterstützte Laserdesorptions-/ Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) liefert dann die Daten des isolierten BbCRASP-2-Proteinspots, welche für eine Datenbanksuche nach dem BbCRASP-2-Protein eingesetzt werden kann.

Für die 2D-Elektrophorese (III. 2.3.9) wurde ein Homogenat ganzer Borrelienzellen (III. 2.3.1.2) der *B. burgdorferi* s.s.-Stämme B31 und B31-e2 verwendet. B31-e2 ist die Bezeichnung für einen Klon des Stammes B31 (Casjens et al., 1997). Dieser Klon entstand aus einer Einzelkolonie eines hoch-passagierten B31-Isolates, das auf BSK-Festmedium ausplattiert wurde. Aufgrund der hohen Passagierung enthält der Klon im Vergleich zum Wildtypstamm B31 eine deutlich reduzierte Plasmidanzahl. Der Klon besitzt mit den Plasmiden cp32-1, cp32-3, cp32-4, cp26, lp17, lp38 und lp54 nur sieben der 21 Plasmide des Wildtyps. In Ligandenaffinitätsblot-Analysen mit Faktor H und FHL-1 konnte gezeigt werden, dass dieser Plasmidverlust den Verlust an Faktor H- und FHL-1-bindenden BbCRASPs bedingt. Der Klon B31-e2 exprimiert nur die Proteine BbCRASP-1 und BbCRASP-5 (IV. 1.2), zeigt also im Gegensatz zu B31 keine BbCRASP-2-Expression und wurde deswegen als Kontrollstamm eingesetzt. Weiterhin konnte ausgeschlossen werden, dass sich das für das BbCRASP-2-Protein kodierende Gen auf den in B31-e2 enthaltenen Plasmiden cp32-1, cp32-3, cp32-4, cp26, lp17, lp38 oder lp54 befindet.

Zur Herstellung eines Homogenats ganzer Borrelienzellen für die 2D-Elektrophorese wurden je 2 Liter des Isolates B31 und des Kontrollstammes B31-e2 verwendet. Die Auftrennung der darin enthaltenen Proteine erfolgte in der ersten Dimension anhand immobilisierter pH-Gradienten (IPG, 17 cm, pH 3-10, Bio-Rad, München). Die fokussierten IPG-Streifen wurden

anschließend für die Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese eingesetzt (2. Dimension). Nach den Gelläufen erfolgte entweder die Färbung der Gele mit Coomassie (Abb. IV.24B) oder der Transfer der zweidimensional aufgetrennten Proteine auf Nitrozellulosemembranen, die dann für Ligandenaffinitätsblot-Analysen mit rekombinantem FHL-1 eingesetzt wurden. Wie in Abbildung IV.21 zu sehen ist, konnten anhand der Ligandenaffinitätsblot-Analysen die Proteine BbCRASP-1 und BbCRASP-2 im Stamm B31 nachgewiesen werden (Abb. IV.21A), während der Kontrollstamm B31-e2 wie erwartet keine Expression des BbCRASP-2-Proteins (Abb. IV.21B) zeigte. Es war allerdings nicht möglich, das BbCRASP-2-Protein einem einzelnen Proteinspot zuzuordnen, da das BbCRASP-Signal horizontal über die Nitrozellulosemembran verlief. Zudem war dieses Signal nur schwach ausgeprägt.

A



B

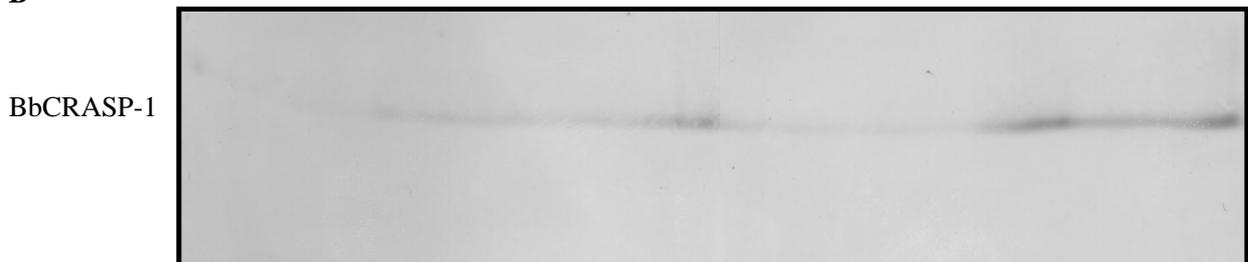


Abb. IV.21 Ligandenaffinitätsblot-Analyse der über 2D-Elektrophorese separierten Proteine aus einem Homogenat ganzer Borrelienzellen der Stämme B31 und B31-e2.

Mittels 2D-Elektrophorese wurde das Homogenat ganzer Borrelienzellen der Stämme B31 (A) und B31-e2 (B) aufgetrennt, die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und diese für Ligandenaffinitätsblot-Analysen mit rekombinantem FHL-1 eingesetzt. Die Detektion der FHL-1-Bindung erfolgte mit dem SCR1-4-Antikörper.

4.1.4.2 2D-Elektrophorese mit äußeren Membranen des *B. burgdorferi* s.s.-Isolates B31

Um eine Anreicherung des BbCRASP-2-Proteins im 2D-Gel zu erzielen, wurden äußere Membranen aus dem *B. burgdorferi* s.s.-Isolat B31 isoliert (III. 2.3.7; Radolf et al., 1995; Kraiczy et al., 2000b). Dafür wurden die Borrelienzellen in hypertonischer Saccharose inkubiert und aus den plasmolysierten Zellen mittels isopyknischer Zentrifugation die äußeren Membranen isoliert. Von der 2 l Borrelienausgangskultur wurden 30 ml zur Herstellung eines Homogenats ganzer Zellen abgenommen, das als Kontrolle diente.

Um die Reinheit der Membranisolierung zu überprüfen, erfolgten Westernblot-Analysen der äußeren Membranen und der bei der Isolierung der äußeren Membranen entstandenen Zellreste sowie des Homogenats ganzer Borrelienzellen mit Antikörpern gegen das Hitzeschockprotein 70 (Hsp70) und das Filamentprotein der Flagellen (FlaB) sowie gegen das äußere Membranprotein OspA. Das 41kDa große periplasmatische FlaB-Protein und das 70 kDa große zytoplasmatische Protein HSP70 wurden zur Identifizierung von Kreuzkontaminationen ausgewählt. Wie in Abbildung IV.22 zu sehen ist, konnten beide Proteine erwartungsgemäß in großen Mengen in dem Homogenat ganzer Borrelienzellen und in den Zellresten detektiert werden. Die äußeren Membranen zeigten dagegen bei Inkubation mit Antikörpern gegen die beiden Proteine nur schwache Banden und somit eine leichte Kontamination mit nicht-oberflächenexponierten Proteinen. Als Marker für Bestandteile der äußeren Membranen diente das OspA-Protein, welches in allen untersuchten Fraktionen detektiert werden konnte (Abb. IV.22).

Weiterhin wurden das Homogenat ganzer Borrelienzellen, die Zellreste und die äußeren Membranen für eine Ligandenaffinitätsblot-Analyse mit rekombinantem FHL-1 eingesetzt. Dabei konnten sowohl BbCRASP-1 als auch BbCRASP-2 in allen untersuchten Fraktionen nachgewiesen werden (Abb. IV.23). Auffällig ist eine deutliche Anreicherung des BbCRASP-2-Proteins in den äußeren Membranen.

Die Auftrennung der Proteine der äußeren Membranen erfolgte über 2D-Elektrophorese. Dabei liefen zeitgleich zwei Gele unter den selben Bedingungen, wobei auf das eine Gel nur 1/9 der Proteinmenge des anderen Gels appliziert wurde.

Nach der 2D-Elektrophorese erfolgte die Färbung des Gels mit der höheren Proteinkonzentration mit Coomassie. Abbildung IV.24 zeigt dieses Gel (Abb. IV.24A) im Vergleich zu dem unter Abschnitt IV. 4.1.4.1 beschriebenen 2D-Gel (Abb. IV.24B). Wie zu erwarten enthielten die äußeren Membranen im Gegensatz zu den ganzen Zellen deutlich weniger Proteine.

Ergebnisse

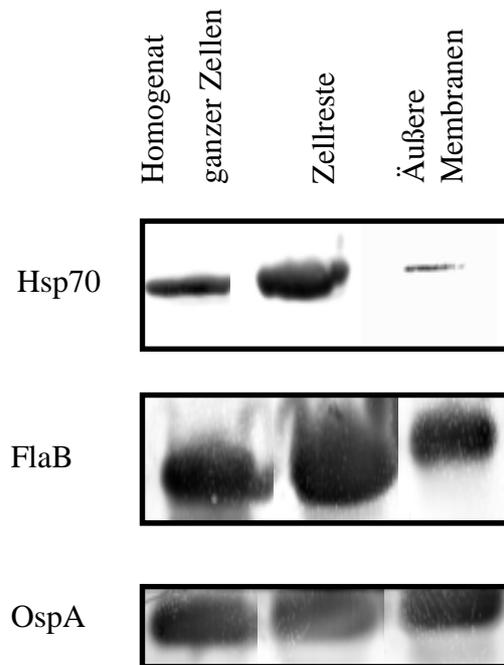


Abb. IV.22: Westernblot-Analysen zur Überprüfung der Reinheit der isolierten äußeren Membranen des *B. burgdorferi* s.s.-Isolates B31.

Ein Homogenat ganzer Zellen des Stammes B31 (Spur 1) und die bei der äußeren Membranisolierung entstandenen Zellreste (Spur 2) sowie die äußeren Membranen (Spur 3) wurden für eine Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese eingesetzt. Nach Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wurde diese mittels Westernblot-Analysen mit Antikörpern gegen HSP70 (LA3), FlaB (LA22.1) und OspA (LA28.1) untersucht.

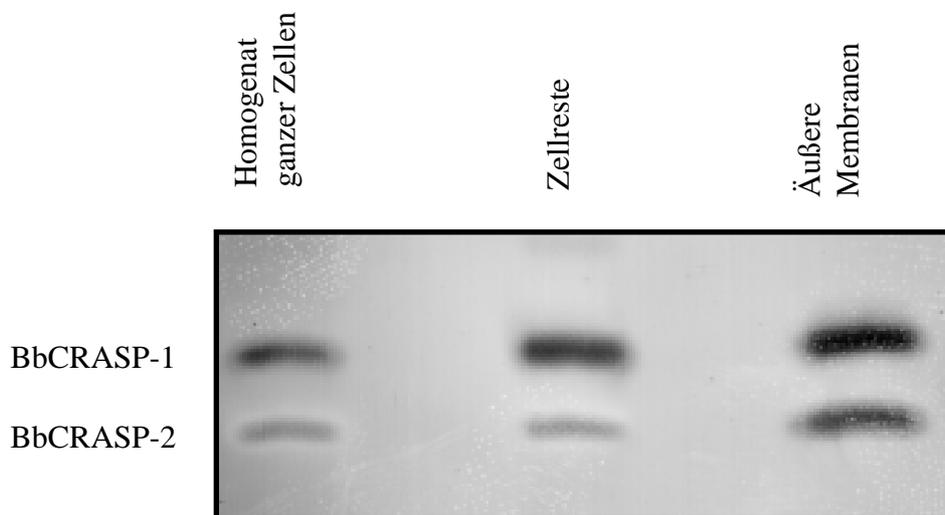


Abb. IV.23: Ligandenaffinitätsblot-Analyse zum Nachweis des BbCRASP-2-Proteins in den äußeren Membranen des *B. burgdorferi* s.s.-Isolates B31.

Ein Homogenat ganzer Zellen des Stammes B31 (Spur 1) und die bei der äußeren Membranisolierung entstandenen Zellreste (Spur 2) sowie die äußeren Membranen (Spur 3) wurden für eine Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese eingesetzt. Nach Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wurde diese für Ligandenaffinitätsblots mit rekombinantem FHL-1 eingesetzt. Die Detektion der FHL-1-Bindung erfolgte mit dem SCR1-4-Antikörper.

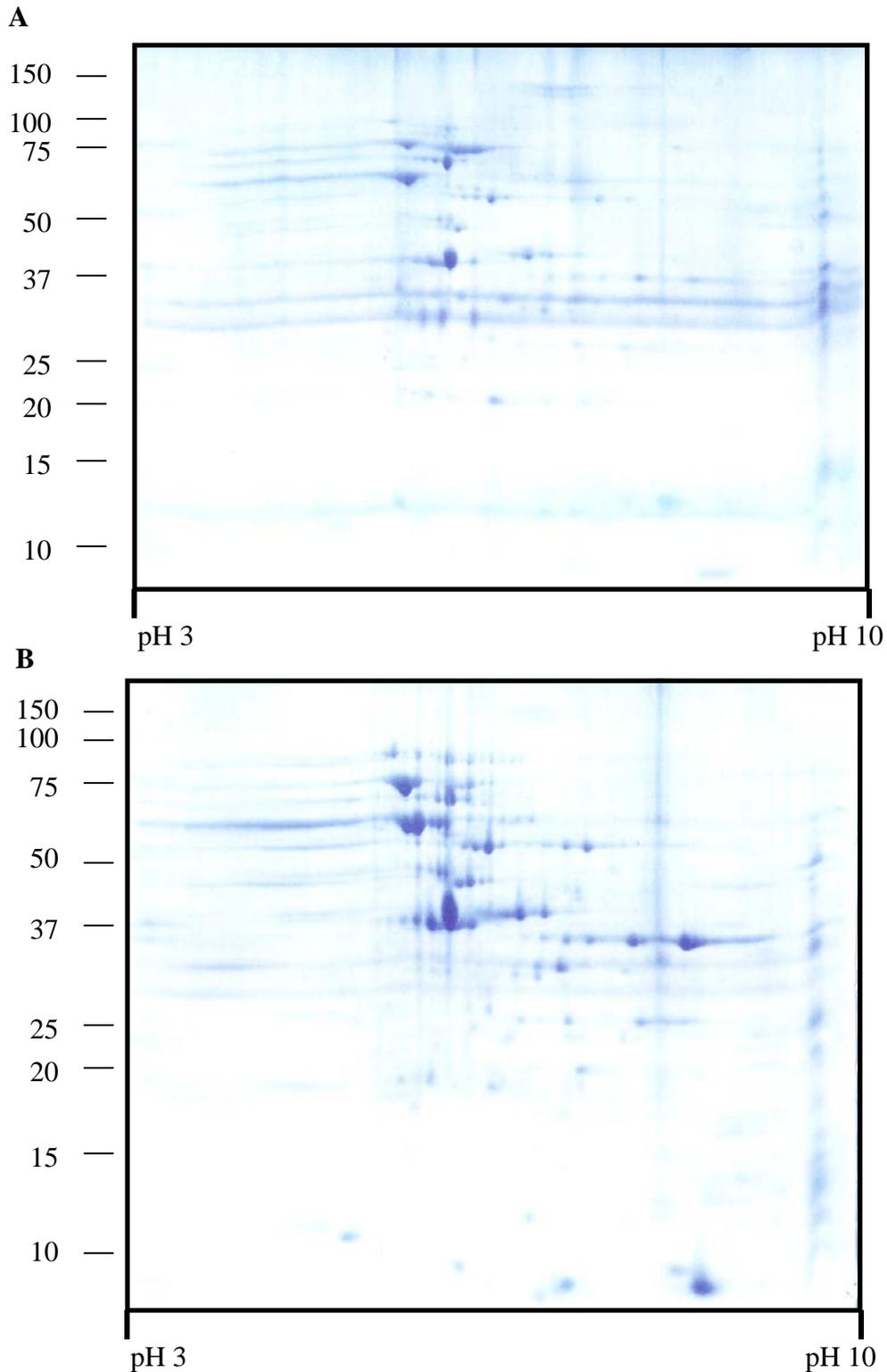


Abb. IV.24: Vergleich der zweidimensional aufgetrennten Proteine der äußeren Membranen (A) und des Homogenats ganzer Zellen (B) des *B. burgdorferi* s.s.-Isolates B31.

Proteine aus äußeren Membranen (A) bzw. einem Homogenat ganzer Zellen (B) wurden über 2D-Elektrophorese separiert und mit Coomassie angefärbt. Das Molekulargewicht der Markerproteine [kDa] ist seitlich aufgeführt. Der lineare pH-Gradient der IPG-Streifen ist am unteren Rand des Gels dargestellt.

BbCRASP-1
BbCRASP-2



Abb. IV.25: Ligandenaffinitätsblot-Analyse der zweidimensional aufgetrennten Proteine der äußeren Membranen des *B. burgdorferi* s.s.-Stammes B31.

Proteine aus äußeren Membranen wurden über 2D-Elektrophorese aufgetrennt, die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und diese für eine Ligandenaffinitätsblot-Analyse mit rekombinantem FHL-1 eingesetzt. Die Detektion der FHL-1-Bindung erfolgte mit dem SCR1-4-Antikörper.

Das Gel mit der niedrigeren Proteinkonzentration wurde für eine Ligandenaffinitätsblot-Analyse mit rekombinantem FHL-1 eingesetzt. Wenn man Abbildung IV.25 mit Abbildung IV.21 vergleicht, sieht man, dass sich das BbCRASP-2-Signal in den äußeren Membranen (Abb. IV.25) im Vergleich zu dem Homogenat ganzer Borrelienzellen (Abb. IV. 21) deutlich verstärkte.

Durch einen Vergleich des Ligandenaffinitätsblots (Abb. IV.25) mit dem gefärbtem Gel (Abb. IV.24A) konnten die Proteinspots identifiziert werden, die sich in der Nähe des BbCRASP-2-Signals befanden. Diese Proteinspots wurden isoliert und für die matrixunterstützte Laserdesorptions-/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) (III. 2.3.10) eingesetzt. Die MALDI-MS erfolgte in Zusammenarbeit mit Dipl.-Biol. C. Corvey und Prof. M. Karas (Institut für Pharmazeutische Chemie, Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Frankfurt).

4.1.4.3 Analyse der Proteine BBH06 und BBH37 auf Bindung an Faktor H und FHL-1

Die mit Hilfe der MALDI-MS erhaltenen Massendaten wurden mit denen der Borreliendatenbank verglichen. Unter den Ergebnissen befanden sich mit BBE20, BBH06 und BBH37 drei stark geladene Proteine, bei denen es sich aufgrund der kalkulierten Masse und des Genortes um das BbCRASP-2-Protein handeln konnte. BBE20 hat eine kalkulierte Masse von 22,8 kDa. Der zugehörige Genort befindet sich auf dem linearen Plasmid lp25. Das kalkulierte Molekulargewicht von BBH06 beträgt 27,2 kDa und das für dieses Protein kodierende Gen liegt auf dem linearen Plasmid lp28-3. Auf dem gleichen Plasmid befindet sich auch der Genort von BBH37. Die für BBH37 kalkulierte Masse liegt bei 35,3 kDa.

Zwei dieser Proteine, BBH06 und BBH37, wurden als potentielle Membranproteine charakterisiert, da die N-Termini der beiden Proteine signifikante Sequenzhomologien zu der für Lipoproteine von Spirochäten charakteristischen Lipobox aufweisen (Haake, 2000). Aus diesem Grund wurden die Gene *bbh06* und *bbh37* in den pGEX-6P-1-Vektor kloniert, als GST-Fusionsproteine überexprimiert (III. 2.3.2.2) und für Ligandenaffinitätsblot-Analysen mit rekombinantem FHL-1 eingesetzt. Wie in Abbildung IV.26 dargestellt, konnte für das BBH06-Protein eine starke Bindung an FHL-1 detektiert werden. Das BBH37-Protein wies dagegen keine Bindung an den Komplementregulator auf.

Zur Überprüfung dieser Ergebnisse erfolgten weitere Analysen des BBH06-Proteins. Abbildung IV.27 zeigt Ligandenaffinitätsblot-Analysen des GST-BBH06-Fusionsproteins mit rekombinantem FHL-1, wobei in Spur 1 mit dem SCR1-4-Antikörper und zum Vergleich mit dem B22-Antikörper (Spur 2) detektiert wurde. Man sieht in beiden Spuren eine Bindung an FHL-1. In Spur 3 ist eine Ligandenaffinitätsblot-Analyse mit NHS als Faktor H-Quelle dargestellt, bei der die Bindung des BBH06-Proteins an Faktor H nachgewiesen werden konnte. Es handelt sich bei dem BBH06-Protein demnach um ein FHL-1- und Faktor H-bindendes Protein. In Spur 4 wurde BBH06 mit dem gegen BbCRASP-1 gerichteten monoklonalen Antikörper RH-1 inkubiert, wobei kein Signal detektiert werden konnte. Diese Ergebnisse beweisen, dass es sich bei dem BBH06-Protein um das gesuchte BbCRASP-2-Protein handelt.

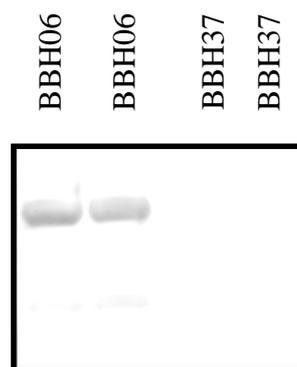


Abb. IV.26: Nachweis der FHL-1-Bindung der Proteine BBH06 und BBH37.

BBH06 und BBH37 wurden als GST-Fusionsproteine überexprimiert, mittels Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese separiert und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Anschließend erfolgte die Analyse der FHL-1-Bindung der Proteine in einer Ligandenaffinitätsblot-Analyse mit rekombinantem FHL-1. Die Detektion der FHL-1-Bindung erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper B22.

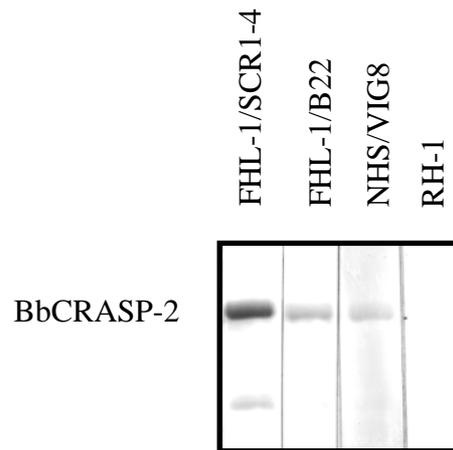


Abb. IV.27: Bindungsstudie des BBH06-Proteins.

BBH06 wurde als GST-Fusionsprotein überexprimiert und für Ligandenaffinitätsblot- und Westernblot-Analysen eingesetzt. Spuren 1 und 2: Ligandenaffinitätsblots mit rekombinantem FHL-1. Die FHL-1-Bindung wurde mit den Antikörpern SCR1-4 (Spur 1) und B22 (Spur 2) detektiert. Spur 3: Ligandenaffinitätsblot mit NHS als Faktor H-Quelle. Die Detektion der Faktor H-Bindung erfolgte mit dem VIG8-Antikörper. Spur 4: Westernblot mit dem gegen BbCRASP-1 gerichteten Antikörper RH-1.

4.2 Charakterisierung des BbCRASP-2-Proteins des *B. burgdorferi* s.s.-Isolates B31

4.2.1 Charakterisierung des für BbCRASP-2 kodierenden Gens

Die charakteristische Faktor H- und FHL-1-Bindung des BBH06-Proteins (IV. 4.1.4.3) weist darauf hin, dass das BbCRASP-2-Protein des Isolates B31 von dem auf dem linearen Plasmid lp28-3 lokalisiertem *bbh06*-Gen kodiert wird (Abb. IV.29). Das aus der Nukleotidsequenz des *bbh06*-Gens abgeleitete BbCRASP-2-Protein besteht aus 236 Aminosäuren (Abb. IV.29) mit einem stark hydrophoben N-Terminus (Abb. IV.28). Die N-terminale Sequenz des BbCRASP-2-Proteins zeigt signifikante Homologien zur der für Lipoproteine von Spirochäten charakteristischen Lipobox (Haake, 2000): -Leu(Ala,Ser)₄-Leu(Val,Phe,Ile)₃-Ile(Val,Gly)₂-Ala(Ser,Gly)₁-Cys₊₁-. Diese Sequenz ist in Abbildung IV.28 in roter Schrift dargestellt.

Eine Proteinstrukturanalyse mittels des *Heidelberg Unix sequence analysis resources*- (HUSAR-)Programms zeigte mehrere flexible Sequenzen im Protein (Abb. IV.30) sowie mögliche Antigenstellen (Abb. IV.31) auf. Das anhand der Aminosäuresequenz kalkulierte Molekulargewicht des BbCRASP-2-Proteins beträgt 27,2 kDa, wohingegen die mittels Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese berechnete Masse bei 23,3 kDa liegt (Kraiczky et al., 2001a). Das BbCRASP-2-Protein unterscheidet sich deutlich von dem BbCRASP-1-Protein und den spezifisch Faktor H-bindenden BbCRASP-Proteinen. Die Sequenzvergleiche der fünf BbCRASP-Proteine ergaben eine Identität von 21,1 % für die Sequenzen von BbCRASP-2 und BbCRASP-1 sowie Sequenzidentitäten von ca. 20 % für BbCRASP-2 und die Faktor H-bindenden BbCRASP-Proteine (Sequenzvergleiche nicht gezeigt). Im Gegensatz zu BbCRASP-1 und BbCRASP-3 gehört das BbCRASP-2-Protein laut Casjens et al. (2000) zu keiner bekannten Proteinfamilie von *B. burgdorferi* s.s.

ATGAAAAAAGTTTTTATCAATATACATGTTAATTTCAATAAGTTTATTATCATGTGAT	60
M K K S F L S I Y M L I S I S L L S C D	20
GTTAGTAGATTAATCAGAGAAATATTAATGAGCTTAAAATTTTTGTTGAAAAGGCCAAG	120
V S R L N Q R N I N E L K I F V E K A K	40
TATTATTCTATAAGATTAGACGCTATTTATAACGAATGTACAGGAGCATATAATGATATT	180
Y Y S I R L D A I Y N E C T G A Y N D I	60
ATGACTTATTCGGAAGGTACATTTTCTGATCAAAGTAAGGTTAATCAAGCTATATCTATA	240
M T Y S E G T F S D Q S K V N Q A I S I	80
TTAAAAAAGACAATAAAATTGTTAATAAGTTTAAGGAGCTTGAAAAGATTATAGAAGAA	300
F K K D N K I V N K F K E L E K I I E E	100
TACAAACCTATGTTTTAAGTAAATTAATTGATGATTTTGCTATAGAATTAGACCAAGCT	360
Y K P M F L S K L I D D F A I E L D Q A	120
GTAGATAATGATGTGTCTAATGCCAGACATGTTGCTGATTCTTATAAAAACTTAGAAAA	420
V D N D V S N A R H V A D S Y K K L R K	140
TCTGTTGTATTAGCCTACATTGAGAGTTTTGATGTTATATCTTCTAAGTTTGTTGATAGT	480
S V V L A Y I E S F D V I S S K F V D S	160
AAGTTTGTTGAAGCTTCTAAAAATTTGTCAATAAAGCTAAAGAGTTTGTAGAGGAAAAT	540
K F V E A S K K F V N K A K E F V E E N	180
GATCTTATAGCTCTTGAGTGTATTGTGAAAATTTGGAGATATGGTTAATGATAGGGAA	600
D L I A L E C I V K T I G D M V N D R E	200
ATAAATCAAGAAGCAGGTATAATAATTTTTATAAAAAAGAAGCAGATTTTTTAGGTGCT	660
I N S R S R Y N N F Y K K E A D F L G A	220
GCTGTAGAACTTGAGGGGGCTTATAAAGCTATTAAGCAAACCTTTATTATAG	711
A V E L E G A Y K A I K Q T L L *	236

Abb. IV.28: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz des für das BbCRASP-2-Protein des *B. burgdorferi* s.s.-Isolates B31 kodierenden *bbh06*-Gens.

Die Nummerierung der Nukleotide bezieht sich auf das putative ATG-Startkodon. Der offene Leserahmen kodiert ein Polypeptid mit einer Länge von 236 Aminosäuren. Der N-Terminus zeigt signifikante Homologien zur der für Lipoproteine von Spirochäten charakteristischen Lipobox (Haake, 2000). Hier dargestellt in roten Schriftzeichen. Die putative C-terminale Faktor H- und FHL-1-Bindungsregion ist durch blaue Schrift gekennzeichnet.

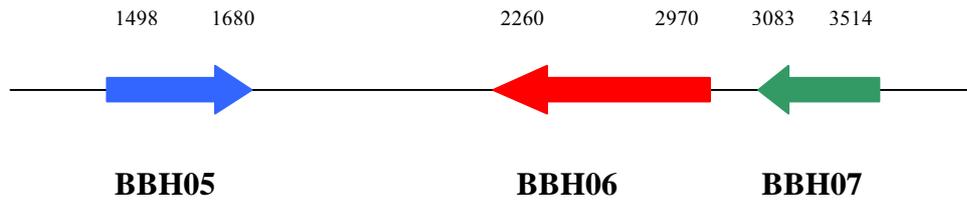


Abb. IV.29: Lokalisierung des für das BbCRASP-2-Protein des *B. burgdorferi* s.s.-Isolates B31 kodierenden *bbh06*-Gens auf dem linearen Plasmid lp28-3.

Abb. IV.30-31: Proteinstrukturanalysen des BbCRASP-2-Proteins mittels des HUSAR-Programms (siehe Anhang).

Zum Nachweis des *bbh06*-Gens in anderen Isolaten der Genospezies *B. burgdorferi* s.s. erfolgten Southernblot-Analysen (III. 2.2.13) mit *Xba* I-restringierter DNA diverser Stämme. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der DNA und Transfer auf eine Nylonmembran wurde die Membran mit einem mittels der Oligonukleotide *bbh06-bam* und *bbh06-xho* (III. 1.5) amplifizierten Fragment des *bbh06*-Gens (ca. 660 bp) hybridisiert. Wie in Abbildung IV.32B dargestellt, konnte das *bbh06*-Gen in den Isolaten B31, LW2, 297 und Sh-2-82 nachgewiesen werden. Der Stamm ZS7 zeigte dagegen nur ein schwaches *bbh06*-Signal, während für das Isolat P1F und die Stämme B31-e2, B313 und 297mut keine Signale detektiert werden konnten.

Zur Kontrolle wurde die Membran zusätzlich mit einem 792 bp-Fragment des *flaB*-Gens rehybridisiert. Dazu erfolgte die Amplifikation des *flaB*-Gens mit den Oligonukleotiden Fla3 und Fla4 (III. 1.5). Das gereinigte Fragment wurde anschließend als Sonde für die Southernblot-Analysen eingesetzt, wobei das Gen erwartungsgemäß in allen Stämmen nachgewiesen werden konnte (Abb. IV.32C).

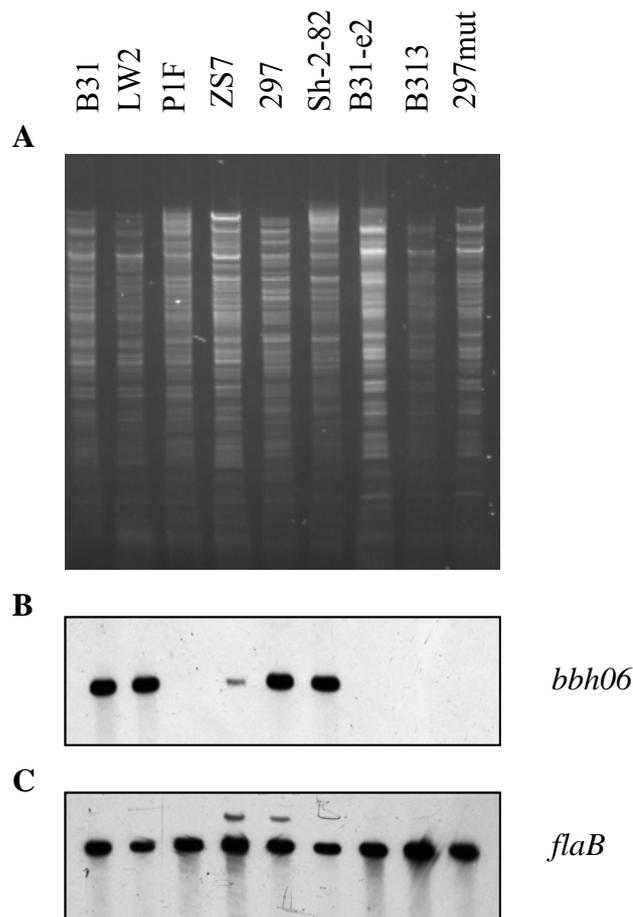


Abb. IV.32: Southernblot-Analyse zum Nachweis des *bbh06*-Gens in Isolaten der Genospezies *B. burgdorferi* s.s.

*Xba*I-restringierte DNA der *B. burgdorferi* s.s.-Isolate B31, LW2, P1F, ZS7, 297, Sh-2-82, B31-e2, B313 und 297mut wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (A) und in Southernblot-Analysen mit Fragmenten der Gene *bbh06* (B) und *flaB* (C) hybridisiert.

4.2.2 Analyse der Oberflächenexposition des BbCRASP-2-Proteins

In Ligandenaffinitätsblot-Analysen mit äußeren Membranen des Stammes B31 (IV. 4.1.4.2; Abb. IV.23) konnte eine deutliche Anreicherung des BbCRASP-2-Signals im Vergleich zum Homogenat ganzer Zellen nachgewiesen werden. Dies charakterisiert BbCRASP-2 als membranständiges Protein. Zudem lässt die Sequenzhomologie des N-Terminus von BbCRASP-2 mit der für Spirochäten charakteristischen Lipobox vermuten (Abb. IV.28; Haake, 2000), dass es sich bei BbCRASP-2 ebenfalls um ein Lipoprotein handelt.

Aufgrund der Membranständigkeit des BbCRASP-2-Proteins lag es nahe, die Oberflächenexposition des Proteins anhand von Protease-Assays zu untersuchen (III. 2.3.8). Dazu erfolgte eine zweistündige Inkubation nativer Borrelienzellen mit aufsteigenden

Proteinase K- und Trypsinkonzentrationen. Das Homogenat der behandelten Borrelienzellen wurde anschließend in Westernblot- und Ligandenaffinitätsblot-Analysen getestet. Abbildung IV.33A zeigt weder für die Behandlung mit Proteinase K noch für die Inkubation mit Trypsin eine Reduktion der Signale der Proteine FlaB und HSP70. FlaB diente als Markerprotein für die im Periplasma lokalisierten Proteine und HSP70 als Marker für die zytoplasmatischen Proteine. Dagegen konnte für das oberflächenständige äußere Membranprotein OspB ein Signlrückgang bei Behandlung mit Proteinase K der Konzentrationen $\geq 12,5$ $\mu\text{g/ml}$ festgestellt werden. Bei Inkubation mit ansteigenden Trypsinkonzentrationen veränderte sich das OspB-Signal dagegen im Vergleich zur Nullkontrolle nicht.

Die in Abbildung IV.33B dargestellte Ligandenaffinitätsblot-Analyse mit Faktor H zeigte einen vollständigen Rückgang der Signale von BbCRASP-3 und BbCRASP-5, wenn die Borrelienzellen mit Proteinase K der Konzentrationen $\geq 12,5$ $\mu\text{g/ml}$ behandelt wurden. Eine Inkubation der Borrelienzellen mit der spezifischer angreifenden Protease Trypsin ergab ebenfalls eine deutlichen Abnahme der Signalintensitäten der beiden Proteine bei Konzentrationen $\geq 12,5$ $\mu\text{g/ml}$, aber keinen vollständigen Rückgang der Signale. Dies induziert eine Oberflächenexposition des BbCRASP-3- und des BbCRASP-5-Proteins, welche schon in früheren Analysen nachgewiesen wurde (Kraiczky et al., 2004a).

In Ligandenaffinitätsblot-Analysen mit FHL-1 konnte dagegen keine Veränderung der Intensität des BbCRASP-2-Signals bei Behandlung mit Proteinase K oder Trypsin festgestellt werden (Abb. IV.33B).

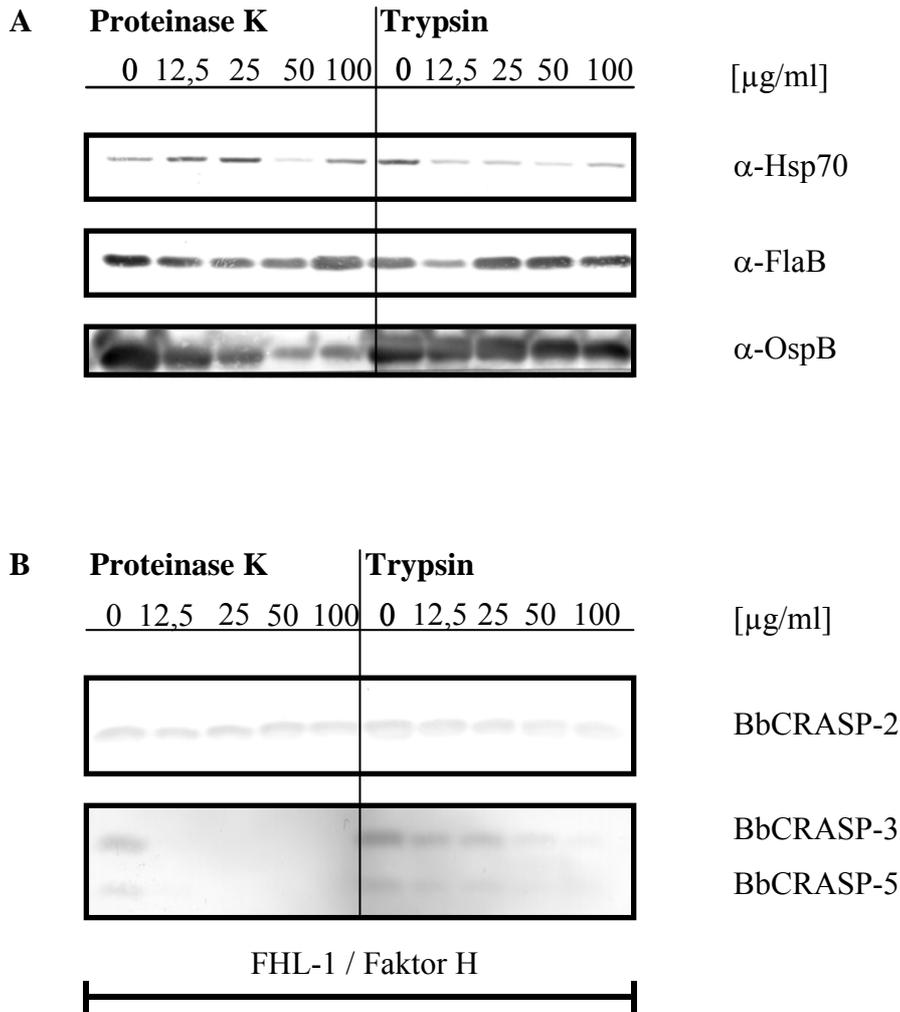


Abb. IV.33: Protease-Assay zur Analyse der Oberflächenexposition des BbCRASP-2-Proteins.

Native Borrelien wurden für 2 h mit den angegebenen Konzentrationen an Proteinase K und Trypsin inkubiert. Das Homogenat der behandelten Borrelienzellen wurde über Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Diese wurde für Westernblot-Analysen (A) mit Antikörpern gegen HSP70 (LA3), FlaB (LA22.1) und OspB (LA25.1) sowie für Ligandenaffinitätsblot-Analysen (B) mit FHL-1 bzw. Faktor H eingesetzt. Die Detektion der Bindung erfolgte bei den Ligandenaffinitätsblot-Analysen mit dem $\alpha\text{-FHL-1}$ -Antikörper B22 bzw. dem gegen Faktor H gerichteten Antikörper VIG8.

4.2.3 Lokalisation der mit dem BbCRASP-2-Protein interagierenden Regionen von Faktor H und FHL-1

Zur Charakterisierung der Bindung von Faktor H und FHL-1 an das BbCRASP-2-Protein wurden Ligandenaffinitätsblot-Analysen mit rekombinantem BbCRASP-2 als GST-Fusionsprotein und verschiedenen Deletionskonstrukten Faktor H und FHL-1 durchgeführt. Faktor H und FHL-1 sind strukturell verwandt und aus individuell gefalteten Proteindomänen, sogenannten *short consensus repeats* (SCRs) aufgebaut (Zipfel und Skerka, 1994; Zipfel et al., 2002). Faktor H besteht aus 20 SCRs, während FHL-1 als Spleißvariante von Faktor H, aus den ersten sieben SCRs von Faktor H aufgebaut ist. Zusätzlich besitzt FHL-1 vier hydrophobe Aminosäuren am C-Terminus.

Nitrozellulosemembranen mit rekombinantem GST-BbCRASP-2-Protein wurden mit rekombinantem FHL-1 und NHS als Faktor H-Quelle sowie mit den Deletionskonstrukten von Faktor H und FHL-1, welche die einzelnen SCRs repräsentieren, inkubiert. Wie Abbildung IV.34 zeigt, wird die Bindung von Faktor H und FHL-1 an das BbCRASP-2-Protein nur über SCR 7 vermittelt. Es konnte keine Bindung an eine der anderen Deletionsmutanten detektiert werden.

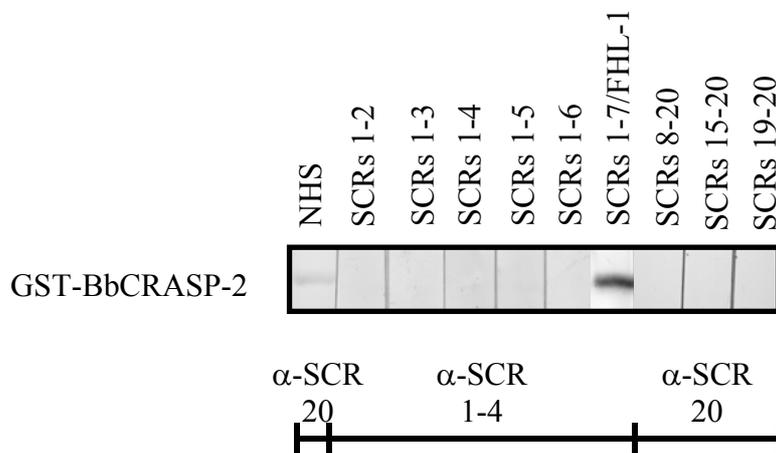


Abb. IV.34: Lokalisation der für die Bindung an das BbCRASP-2-Protein verantwortlichen Domänen von Faktor H und FHL-1.

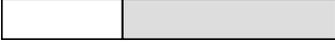
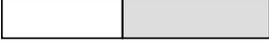
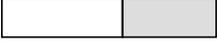
Rekombinantes GST-BbCRASP-2-Protein wurde über eine Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese separiert und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Diese wurde mit NHS als Faktor H-Quelle (Spur 1) und rekombinantem FHL-1 (SCRs 1-7, Spur 7) sowie Deletionskonstrukten von FHL-1 (SCRs 1-2, SCRs 1-3, SCRs 1-4, SCRs 1-5, SCRs 1-6 (Spuren 2-6)) und Faktor H (SCRs 8-20, SCRs 15-20, SCRs 19-20 (Spuren 8-10)) inkubiert. Die Bindung wurde mit spezifischen Antikörpern gegen die SCRs 1-4 von FHL-1 (SCR1-4) und gegen SCR 20 von Faktor H (VIG8) detektiert.

4.2.4 Lokalisation der mit Faktor H und FHL-1 interagierenden Regionen des BbCRASP-2-Proteins

Zur Lokalisation der mit Faktor H und FHL-1 interagierenden Regionen des BbCRASP-2-Proteins wurden C-terminale Deletionsmutanten von BbCRASP-2 hergestellt. Einen Überblick über die Deletionskonstrukte gibt Abbildung IV.35A. Wie in der Abbildung zu sehen ist, wurden fünf Deletionsmutanten unterschiedlicher Länge konstruiert und zur Kontrolle in einer Westernblot-Analyse mit einem gegen GST gerichteten Antikörper untersucht (Abb. IV.35B). Die Konstrukte wurden weiterhin mittels Ligandenaffinitätsblot-Analysen auf Bindung an Faktor H und FHL-1 analysiert. Als Positivkontrollen dienten dabei rekombinante GST-BbCRASP-1 und GST-BbCRASP-3 Proteine. Beide Proteine zeigten eine Bindung an Faktor H, aber keine Interaktion mit FHL-1. Die FHL-1-Bindung wurde mit dem gegen FHL-1 gerichteten Antikörper B22 nachgewiesen, welcher die FHL-1-Bindung an BbCRASP-2 detektiert. Die Interaktion von BbCRASP-1 mit FHL-1 ist mit diesem Antikörper nicht nachweisbar (Abb. IV.6 und IV.35C).

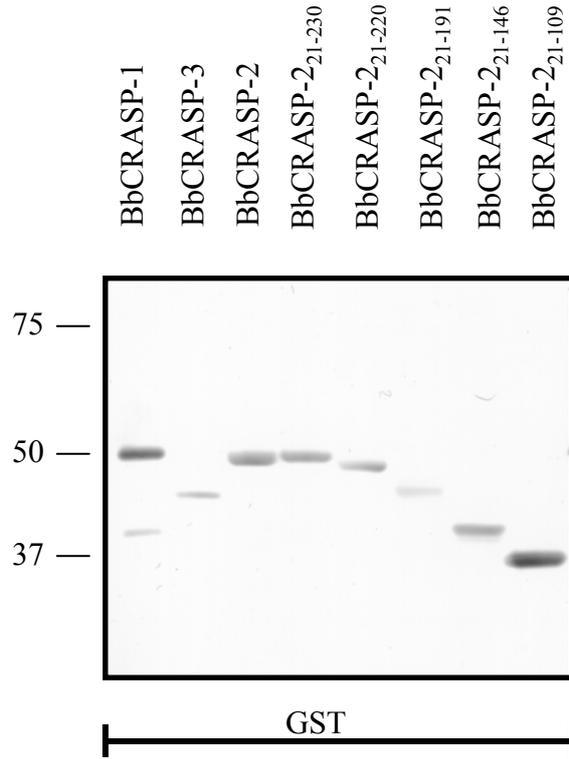
Wie die Abbildungen IV. 35B und IV.35C zeigen, konnten nur für das nicht mutierte BbCRASP-2-Protein und für die Deletionsmutante BbCRASP-2₂₁₋₂₃₀ eine Bindung an FHL-1 und Faktor H detektiert werden. Die anderen Deletionsmutanten zeigten keine Faktor H- und FHL-1-Bindung. Diese Ergebnisse legen nahe, dass sich die mit Faktor H und FHL-1 interagierende Region innerhalb der letzten 16 Aminosäuren des BbCRASP-2-Proteins befindet. Diese Region ist in Abbildung IV.28 in blauer Schrift dargestellt.

A

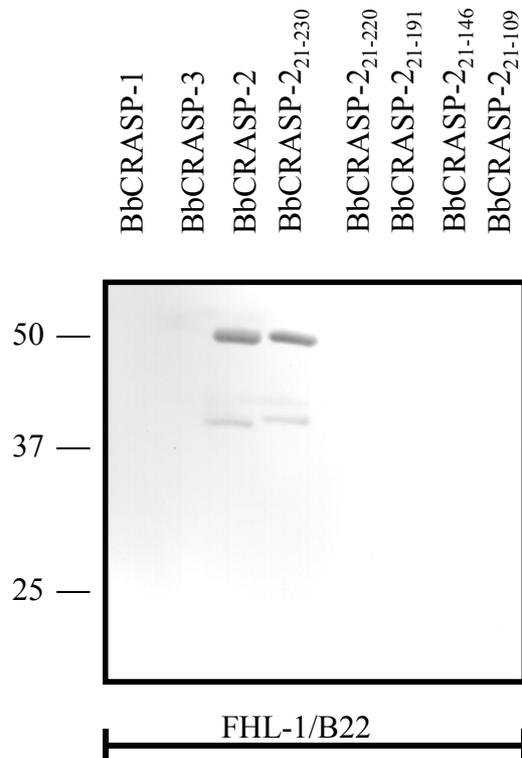
		Bindung von	
		FHL-1	FH
BbCRASP-2 (nativ)		++	+
	1 236		
BbCRASP-2 (rek.)		++	+
	21 236		
BbCRASP-2₂₁₋₂₃₀		++	+
	21 230		
BbCRASP-2₂₁₋₂₂₀		-	-
	21 220		
BbCRASP-2₂₁₋₁₉₁		-	-
	21 191		
BbCRASP-2₂₁₋₁₄₆		-	-
	21 146		
BbCRASP-2₂₁₋₁₀₉		-	-
	21 109		

(++) starke Bindung, (+) schwache Bindung, (-) keine Bindung 99

B



C



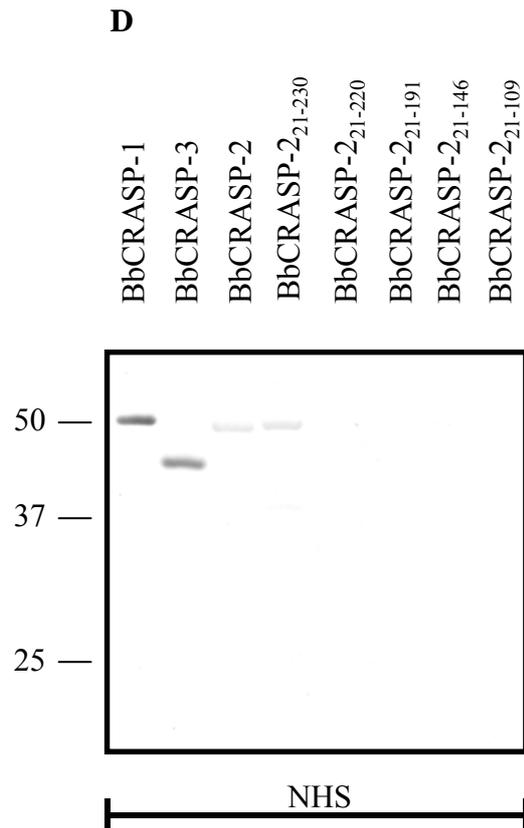


Abb. IV.35: Lokalisation der Faktor H- und FHL-1-Bindungsregion im BbCRASP-2-Protein.

Schematische Darstellung des nativen und des rekombinanten BbCRASP-2-Proteins sowie der Deletionsmutanten von BbCRASP-2 (A). Die Nummern beziehen sich auf die Anzahl der Aminosäuren. Weiße Kästchen symbolisieren den GST-Anteil, graue Kästchen den BbCRASP-2-Anteil am GST-BbCRASP-2-Fusionsprotein. Die über Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese separierten Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und für Westernblot-Analysen mit einem gegen GST gerichteten Antikörper (B) und für Ligandenaffinitätsblot-Analysen mit FHL-1 (C) und NHS als Faktor H-Quelle (D) eingesetzt. Die Detektion der Bindung bei den Ligandenaffinitätsblot-Analysen erfolgte mit dem gegen FHL-1 gerichteten Antikörper B22 und dem gegen Faktor H gerichteten Antikörper VIG8.

V. Diskussion

1 Charakterisierung der Faktor H-bindenden CRASP-/Erp-Proteine

1.1 Immunologische Charakterisierung der CRASP-/Erp-Proteine

In Europa werden neben der auch in Nordamerika vorkommenden Genospezies *B. burgdorferi* s.s. die ebenfalls humanpathogenen Genospezies *B. afzelii* und *B. garinii* aus Zecken und Patienten isoliert. Zahlreiche Studien belegen einen Organotropismus der drei wichtigsten humanpathogenen Borreliengenospezies. Das Auftreten von Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA) wird zumeist auf *B. afzelii*-Isolate zurückgeführt, während für die Lyme-Arthritis vor allem *B. burgdorferi* s.s.-Stämme verantwortlich sind (Assous et al., 1993; Anthonissen et al., 1994; van Dam et al., 1993; Ohlenbusch et al., 1996; Peter et al., 1997; Dunand et al., 1998; Ryffel et al., 1999; Wang et al., 1999). Neurologische Symptome wie z.B. die Lähmung eines Gesichtsnervs (Facialisparese) werden dagegen oft von Isolaten der Genospezies *B. garinii* verursacht (Assous et al., 1993; Anthonissen et al., 1994; van Dam et al., 1993; Demaerschallck et al., 1995; Cinco et al., 1996; Peter et al., 1997; Ryffel et al., 1999).

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurde angenommen, dass die Faktor H-bindenden CRASP- und Erp-Proteine aufgrund ihres ähnlichen Bindungsverhaltens und der nachgewiesenen Sequenzhomologie zwischen dem BbCRASP-3-Protein des europäischen *B. burgdorferi* s.s.-Isolates ZS7 und dem ErpP-Protein des nordamerikanischen *B. burgdorferi* s.s.-Isolates B31 verwandte Proteine darstellen könnten (Kraiczky et al., 2001a, 2003). In der vorliegenden Studie erfolgte die immunologische Charakterisierung der Faktor H-bindenden CRASP- und Erp-Proteine mittels polyklonaler Antikörper gegen die Proteine ErpA und ErpP des Isolates B31. Dazu wurden neben dem intermediär komplementresistenten *B. burgdorferi* s.s.-Isolat B31 mit den Stämmen EB1 und FEM1-D15 auch zwei komplementresistente *B. afzelii*-Isolate untersucht. Es erfolgte keine Analyse der komplementsensitiven *B. garinii*-Isolate, da diese keine Faktor H-bindenden CRASP-Proteine exprimieren.

Mit dem Antikörper gegen ErpP konnten in allen drei Isolaten Faktor H-bindende CRASP-Proteine detektiert werden (Abb. IV.7-IV.9). Es wurden starke Kreuzreaktionen mit dem BbCRASP-3-Protein des Isolates B31 sowie mit dem BaCRASP-5-Protein des Stammes FEM1-D15 und dem BaCRASP-4-Protein des Isolates EB1 nachgewiesen. Diese Ergebnisse

zeigen, dass die detektierten CRASP-Proteine und das ErpP-Protein des Isolates B31 identische Bindungsepitope aufweisen. Das BaCRASP-2-Protein von EB1 reagierte nur schwach mit dem ErpP-Antikörper, was vermutlich auf eine unspezifische Bindung schließen lässt.

Der Antikörper gegen ErpA erkannte ebenfalls Faktor H-bindende CRASP-Proteine in allen drei Isolaten (Abb. IV.7-IV.9). Es ergaben sich starke Kreuzreaktionen mit dem BbCRASP-5-Protein des Stammes B31 sowie mit den Proteinen BaCRASP-2 und BaCRASP-4 des Isolates EB1. Diese CRASP-Proteine sind wahrscheinlich mit dem ErpA-Protein des Stammes B31 verwandt. Nur schwache Bindungen konnten dagegen für das BaCRASP-2- und das BaCRASP-5-Protein des Stammes FEM1-D15 nachgewiesen werden, wobei es sich vermutlich ebenfalls um eine unspezifische Bindung des Antikörpers handelt.

In dieser Studie fällt auf, dass keine immunologische Verwandtschaft zwischen den Erp-Proteinen und den Faktor H- und FHL-1-bindenden CRASP-Proteinen der Gruppe I sowie dem spezifisch FHL-1-bindenden Protein BaCRASP-3 der Gruppe II gefunden wurde. Diese Proteine scheinen demnach keine Mitglieder der Erp-Proteinfamilie zu sein. Einzige Ausnahme ist das Gruppe I-Protein BaCRASP-2 des Isolates EB1, welches eine starke Kreuzreaktionen mit dem ErpA-Antikörper aufwies. Dieses Ergebnis indiziert, dass das BaCRASP-2-Protein ähnliche immunogene Epitope wie das ErpA-Protein des Stammes B31 besitzt.

Die spezifisch Faktor H-bindenden Proteine BbCRASP-3 und BbCRASP-5 der Gruppe III zählen dagegen vermutlich zu der Erp-Proteinfamilie. In dieser Arbeit konnte eine starke Bindung des ErpP-Antikörpers an das BbCRASP-3-Protein des Isolates B31 nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Untersuchungen überein, in denen gezeigt wurde, dass die Aminosäuresequenz des BbCRASP-3-Proteins des Stammes ZS7 eine Identität von 99,8 % mit der Sequenz des ErpP-Proteins des Stammes B31 aufweist (Kraiczky et al., 2003). Aufgrund dieser Daten sind die Proteine BbCRASP-3 und ErpP als identisch anzusehen. Weiterhin indiziert die starke Kreuzreaktion des ErpA-Antikörpers mit dem BbCRASP-5-Protein, dass BbCRASP-5 und ErpA ebenfalls identisch sind. Keine Kreuzreaktion mit den beiden Antikörpern wies das ebenfalls zur Gruppe III gehörende BbCRASP-4-Protein des Stammes B31 auf. Es liegt die Vermutung nahe, dass BbCRASP-4 dem dritten Faktor H-bindenden Erp-Protein ErpC entspricht. Dieses Protein konnte bei der in dieser Studie durchgeführten immunologischen Charakterisierung nicht berücksichtigt werden, weil kein geeigneter Antikörper gegen ErpC zur Verfügung stand.

Die ebenfalls zur Gruppe III gehörenden Proteine BaCRASP-4 und BaCRASP-5 der Isolate EB1 und FEM1-D15 zeigten starke Kreuzreaktionen sowohl mit dem ErpP- als auch dem ErpA-Antikörper. Es besteht also immunologische Verwandtschaft zwischen diesen CRASP-Proteinen und den Erp-Proteinen des Stammes B31. Frühere Untersuchungen zeigten, dass die Faktor H-bindenden CRASP-Proteine der Genospezies *B. burgdorferi* s.s. und *B. afzelii* sowie die Erp-Proteine des Stammes B31 ähnliche Molekulargewichtsgrößen aufweisen (Stevenson et al., 1996; Kraiczy et al., 2001a, 2003). Diese Ergebnisse lassen auf eine Verwandtschaft der CRASP- und der Erp-Proteine unterschiedlicher Genospezies schließen, was in weiterführenden Analysen der bis jetzt noch wenig untersuchten BaCRASP-Proteine der *B. afzelii*-Isolate bestätigt werden müsste. Zur Bestimmung der tatsächlichen Verwandtschaftsgrade ist eine Klonierung und Sequenzierung der für die BaCRASP-Proteine kodierenden Gene unumgänglich.

Die Faktor H-bindenden CRASP- und Erp-Proteine werden aufgrund ihrer Bindungseigenschaften als ausschlaggebende Determinanten für die Komplementresistenz von *B. burgdorferi* s.s. und *B. afzelii* beschrieben (Hellwege et al., 2001; Kraiczy et al., 2001a,b,c, 2003, 2004a; Alitalo et al., 2002; McDowell et al., 2002; Stevenson et al., 2002). Um verschiedene Wirte infizieren zu können, müssen die Borrelien die Synthese einer Vielzahl von Proteinen in den wechselnden Umgebungen koordinieren. Mehrere Studien zeigten, dass infizierte Menschen und Labortiere in den ersten zwei bis vier Wochen der Infektion Antikörper gegen Erp-Proteine produzieren, was eine Synthese der Erp-Proteine während des Anfangsstadiums der Infektion nahe legt (Nguyen et al., 1994; Akins et al., 1995; Stevenson et al., 1995; Suk et al., 1995; Wallich et al., 1995; Das et al., 1997; Stevenson et al., 1998a, Miller et al., 2000; Sung et al., 2000).

Eine Anhebung der Kulturtemperatur von 23 °C auf 35 °C bewirkt eine verstärkte Expression der Erp-Proteine (Stevenson et al., 1995; Akins et al., 1998; Stevenson et al., 1998a). Dieser Temperaturanstieg entspricht dem Wechsel, den Bakterien im Darm einer Zecke während der Blutmahlzeit erfahren. Die Erhöhung der Kulturtemperatur bewirkt außerdem einen drei- bis vierfachen Anstieg der Wachstumsrate der Bakterien, was im Gegenzug Signale für eine gesteigerte Synthese der Erp-Proteine hervorrufen könnte (Stevenson et al., 1995, 2001). Andere Studien legen für die Regulation der Synthese der Erp-Proteine chemische Signale nahe (Akins et al., 1995; Suk et al., 1995; Wallich et al., 1995; Das et al., 1997; Akins et al., 1998; Stevenson und Babb, 2002; Miller und Stevenson, 2004), da in einigen Kulturmedien ein Temperaturanstieg keine Auswirkungen auf die Erp-Proteinsynthese zeigte (Babb et al., 2001). Diese Studien favorisieren den sogenannten *quorum sensing* Mechanismus, der auf der

Erp-Proteinsynthese mit Hilfe des *Autoinducer-2* (AI-2) basiert und einer Temperatur-abhängigen Regulation unterliegt (Stevenson und Babb, 2002).

Während der Übertragung der Borrelien von den Nymphen auf ihre Säugetierwirte nimmt die Synthese der Erp-Proteine zu (Miller und Stevenson, 2004). Borrelien in Nymphen vor der Blutmahlzeit exprimieren keine Erp-Proteine, während für sämtliche auf den Wirt übertragene Borrelien die Expression der Erp-Proteine nachgewiesen wurde. Aufgrund dieser Befunde postulierten die Autoren ein Modell, wonach die Synthase LuxS, die den letzten enzymatischen Schritt der AI-2-Biosynthese katalysiert (Schauder et al., 2001; Chen et al., 2002), von den Borrelien im Darm der Nymphen vor der Blutmahlzeit nicht transkribiert wird (Miller und Stevenson, 2004). Folglich ist kein AI-2 zur Stimulation der Erp-Proteinsynthese vorhanden. Während der Blutmahlzeit steigt die Temperatur im Darm der Nymphen aufgrund des eingesaugten Blutes an, worauf die Borrelien die LuxS-Synthase transkribieren. Diese produziert AI-2 in ausreichenden Konzentrationen, wodurch wiederum die Synthese der Erp-Proteine induziert wird.

Die Produktion der oberflächenständigen Erp-Proteine erlaubt den Borrelien während der Übertragung auf den Wirt die Bindung des Komplementregulators Faktor H, wodurch sie die Aktivierung des alternativen Komplementweges direkt auf ihrer Oberfläche kontrollieren können. Diese Ergebnisse weisen auf die Bedeutung der Erp- und der mit ihnen verwandten CRASP-Proteine für die Etablierung persistierender Borrelieninfektionen im Wirt hin.

1.2 Lokalisation der mit den BbCRASP-/Erp-Proteinen interagierenden Domänen von Faktor H

Die CRASP-Proteine der Gruppe III (BbCRASP-3, BbCRASP-4, BbCRASP-5) und drei Mitglieder der Erp-Proteinfamilie (ErpA, ErpC, ErpP) binden spezifisch an den Komplementregulator Faktor H (Hellwage et al., 2001; Kraiczy et al., 2001b, 2002, 2003; Alitalo et al., 2002; Stevenson et al., 2002; Metts et al., 2003). Im Rahmen dieser Arbeit wurden in Ligandenaffinitätsblot-Analysen mittels Deletionsmutanten von Faktor H vor allem die Domänen SCR 19 und SCR 20 als die für die Interaktion mit den Erp-Proteinen verantwortlichen Regionen von Faktor H lokalisiert (Abb. IV.10-IV.12). Es konnte somit erstmalig gezeigt werden, dass alle Faktor H-bindenden Erp-Proteine spezifisch mit dem C-Terminus des Komplementregulators interagieren. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Untersuchungen überein, in denen für das BbCRASP-3-Protein des Isolates ZS7 ebenfalls eine Bindung an die SCRs 19 und 20 von Faktor H ermittelt wurde (Kraiczy et al., 2003). Da

die komplementregulatorischen Domänen von Faktor H im N-Terminus des Proteins lokalisiert sind (Abb. I.7; Whaley und Ruddy, 1976; Pangburn et al., 1977; Vik et al., 1989; Gordon et al., 1995), kann Faktor H aufgrund der C-terminalen Bindung an die BbCRASP- und die Erp-Proteine seine komplementregulatorische Aktivität behalten und die Aktivierung des Komplementsystems auf der Oberfläche der Borrelien regulieren.

2 Identifizierung der BbCRASP-Proteine

2.1 Identifizierung von BbCRASP-1, BbCRASP-3, BbCRASP-4 und BbCRASP-5

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit lag in der Isolierung der fünf BbCRASP-Proteine des europäischen *B. burgdorferi* s.s.-Isolates LW2 und dem Vergleich der erhaltenen Sequenzen mit den entsprechenden Proteinsequenzen anderer *B. burgdorferi* s.s.-Stämme.

Mit Hilfe einer Lambda-Expressionsbibliothek konnten die für BbCRASP-3- und BbCRASP-5 kodierenden Gene des Isolates LW2 identifiziert werden. Die aus den Nukleotidsequenzen abgeleiteten Aminosäuresequenzen der BbCRASP-Proteine wurden mit den Sequenzen der Proteine ErpA (Datenbank-Nr. AAF07400) und ErpP (Datenbank-Nr. AAF07678) des nordamerikanischen Isolates B31 verglichen. Die Sequenzvergleiche zeigten, dass BbCRASP-3 identisch mit ErpP und BbCRASP-5 identisch mit ErpA ist (Abb. IV.13-IV.14). Diese Daten bestätigen den durch die immunologische Charakterisierung (V. 1.1) erhaltenen Hinweis und charakterisieren die CRASP-Proteine BbCRASP-3 und BbCRASP-5 als Mitglieder der Erp-Proteinfamilie.

Es war nicht möglich, das BbCRASP-4-Protein mittels der Lambda-Expressionsbibliothek zu isolieren, da kein geeigneter Antikörper gegen ErpC zur Verfügung stand. Deswegen wurde das BbCRASP-4-Protein des Isolates LW2 mittels PCR amplifiziert. Für die Auswahl geeigneter Oligonukleotide konnte die Sequenz des ErpC-Proteins des Stammes B31 verwendet werden, da ErpC und BbCRASP-4 wahrscheinlich identische Proteine darstellen (V. 1.1). Analog zu den anderen BbCRASP-Proteinen erfolgte nach Klonierung und Sequenzierung des amplifizierten Gens aus dem Isolat LW2 ein Sequenzvergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz mit der Aminosäuresequenz des ErpC-Proteins von B31 (Abb. IV.15). Mit Ausnahme eines wahrscheinlich auf die Klonierung zurückzuführenden Aminosäureaustausches an Position 18 sind die Sequenzen der beiden Proteine identisch.

Anhand der Lambda-Expressionsbibliothek konnte neben den spezifisch Faktor H-bindenden BbCRASP-Proteinen auch das Faktor H- und FHL-1-bindende BbCRASP-1-Protein des

Isolates LW2 identifiziert werden. Das BbCRASP-1-Protein wurde in früheren Studien als das dominierende Faktor H- und FHL-1-bindende Protein von *B. burgdorferi* s.s. beschrieben (Kraiczy et al., 2004a). Die Isolate der Genospezies *B. burgdorferi* s.s. variieren in der Anzahl der von ihnen exprimierten BbCRASP-Proteine, wobei aber bei sämtlichen untersuchten Isolaten die Expression von BbCRASP-1 nachgewiesen werden konnte (Abb. IV.4 und IV.5; Kraiczy et al., 2004a). Die in der vorliegenden Arbeit identifizierte BbCRASP-1-Sequenz des europäischen Isolates LW2 wurde mit der bekannten Aminosäuresequenz des BbCRASP-1-Proteins des ebenfalls in Europa isolierten Stammes ZS7 (Kraiczy et al., 2004a) sowie der BbCRASP-1-Sequenz des nordamerikanischen Isolates B31 (Datenbank-Nr. AAC66286) verglichen (Abb. IV.16). Der Sequenzvergleich ergab, dass die BbCRASP-1-Proteine der untersuchten *B. burgdorferi* s.s.-Isolate identisch sind.

Auffallend an diesen Ergebnissen ist, dass die BbCRASP-Proteine der in verschiedenen Verbreitungsgebieten isolierten *B. burgdorferi* s.s.-Stämme keine Sequenzunterschiede aufweisen. In dieser Arbeit wurden die Aminosäuresequenzen der aus europäischen Stämmen isolierten BbCRASP-Proteine mit den Sequenzen der entsprechenden BbCRASP-Proteine des nordamerikanischen Isolates B31 verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die Sequenzen der BbCRASP-Proteine der verschiedenen Isolate identisch sind, obwohl die Stämme auf verschiedenen Kontinenten isoliert wurden. Diese Identität ist außergewöhnlich, da viele Borrelienproteine starke Heterogenitäten zeigen. Die Erp-Proteine ErpA und ErpB des Stammes B31 weisen z.B. nur eine Identität ihrer Aminosäuresequenzen von 19 % auf (Stevenson et al., 1998b). Die identischen Sequenzen der BbCRASP-Proteine der verschiedenen *B. burgdorferi* s.s.-Stämme lassen einen gemeinsamen Vorfahren oder einen genetischen Austausch der aus verschiedenen Verbreitungsgebieten stammenden Isolate vermuten (Marti Ras et al., 1997).

Im Gegensatz zu den intermediär komplementresistenten *B. burgdorferi* s.s.-Stämmen sind die Isolate der Genospezies *B. afzelii* überwiegend komplementresistent, obwohl die Anzahl der von ihnen exprimierten CRASP-Proteine geringer ist (Kraiczy, 2001a). Die meisten *B. afzelii*-Isolate exprimieren ein einzelnes Faktor H- und FHL-1-bindendes Protein, das als BaCRASP-1 bezeichnet wird (Kraiczy et al., 2001a, 2002). BaCRASP-1 und BbCRASP-1 gehören beide zur orthologen gbb54-Proteinfamilie, werden aber von unterschiedlichen Genen kodiert (Wallich et al., 2005). Nach der Nomenklatur des *Institute for Genomic Research* (TIGR) kodiert das *bba68*-Gen für BbCRASP-1, während BaCRASP-1 von dem *bba71*-Gen kodiert wird. Das BaCRASP-1-Protein des *B. afzelii*-Isolates MMS weist eine 48 %ige Sequenzidentität zu dem BbCRASP-1-Protein des *B. burgdorferi* s.s.-Isolates LW2

auf (Wallich et al., 2005). BaCRASP-1 zeigt weiterhin eine stärkere Bindungsaffinität zu FHL-1 als BbCRASP-1 und ist möglicherweise in höheren Konzentrationen auf der Oberfläche der Borrelienzelle repräsentiert, was die Unterschiede in der Komplementresistenz der Genospezies *B. burgdorferi* s.s. und *B. afzelii* erklären könnte (Kraiczky et al., 2001; Wallich et al., 2005).

2.2 Identifizierung des BbCRASP-2-Proteins

Analog zu BbCRASP-1 und BbCRASP-3-5 sollte das bislang unbekannte BbCRASP-2-Protein ebenfalls mittels der Lambda-Expressionsbibliothek des *B. burgdorferi* s.s.-Isolates LW2 identifiziert werden. Da die FHL-1-Bindung des BbCRASP-2-Proteins signifikant stärker ist als die Interaktion mit Faktor H (Kraiczky et al., 2001a, 2001b), wurde die Phagenbibliothek mit rekombinantem FHL-1 gescreent. Die positiven Phagen enthielten jedoch DNA-Inserts, die für das ebenfalls an FHL-1 bindende BbCRASP-1-Protein kodierten. Somit war eine Isolierung des BbCRASP-2-Proteins auf diesem Wege nicht möglich. Ein Grund dafür könnte die stärkere Bindungsaffinität von FHL-1 zu BbCRASP-1 als zu BbCRASP-2 sein (Kraiczky et al., 2001a).

Sowohl das BbCRASP-1-Protein als auch das BbCRASP-2-Protein sind in der Lage, Faktor H und FHL-1 zu binden. Aufgrund ihres ähnlichen Bindungsprofils wurde zu Beginn der Arbeit spekuliert, dass beide CRASP-Proteine eine vergleichbare Bindungsregion für die Komplementregulatoren aufweisen. Aus diesem Grund wurde die bekannte Bindungsregion des BbCRASP-1-Proteins (Kraiczky et al., 2004a) als Basis für eine Datenbankrecherche nach Proteinen mit putativen Faktor H- und FHL-1-Bindungsregionen verwendet. Das auf diesem Weg identifizierte BbCRASP-1 paraloge Protein BBA69 des Isolates B31 zeigte aber trotz einer Sequenzidentität von 76,5 % zwischen seinem C-Terminus und der C-terminalen Bindungsregion des BbCRASP-1-Proteins in Ligandenaffinitätsblot-Analysen keine Bindung an FHL-1 (Abb. IV.18). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass sich die Faktor H- und FHL-1-Bindungsregion des BbCRASP-2-Proteins vermutlich deutlich von der des BbCRASP-1-Proteins unterscheidet.

Ein neuer Ansatzpunkt zur Identifizierung des BbCRASP-2-Proteins war die spezifische Adsorption des Proteins aus dem Homogenat ganzer Zellen über Faktor H- und FHL-1-gekoppelte Affinitätschromatographien bzw. magnetische Partikel. Mit beiden Methoden konnte jedoch keine Isolierung des BbCRASP-2-Proteins erreicht werden. Vermutlich veränderte sich das Bindungsverhalten von Faktor H und FHL-1 durch die Kopplung an das

Trägermaterial, so dass das BbCRASP-2-Protein nicht mehr binden konnte. Ebenso schlug der Versuch fehl, die Konformation von FHL-1 durch indirekte Kopplung über einen Antikörper zu erhalten. Weder das BbCRASP-2-Protein noch das zur Kontrolle eingesetzte rekombinante BbCRASP-1-Protein interagierten mit den mit einem Antikörper gegen FHL-1 gekoppelten magnetischen Partikeln (Abb. IV.19-IV.20). Dies lässt vermuten, dass sich auch bei dieser Kopplung die Konformation von FHL-1 veränderte, so dass keine Bindung mit den BbCRASP-Proteinen mehr zustande kommen konnte.

Die in dieser Arbeit als weitere Methode zur Identifikation des BbCRASP-2-Proteins durchgeführte 2D-Elektrophorese des Homogenats ganzer Zellen des Isolates B31 offenbarte nur geringe BbCRASP-2-Konzentrationen. Zudem konnte in einer Ligandenaffinitätsblot-Analyse des 2D-Gels das BbCRASP-2-Signal nicht eindeutig einem einzelnen Proteinspot zugeordnet werden, weil das Signal horizontal über die Membran verlief (Abb. IV.21). Deswegen war es nicht möglich, das BbCRASP-2-Protein auf diese Weise zu identifizieren. Sowohl BbCRASP-1 als auch BbCRASP-3 wurden in früheren Untersuchungen als oberflächenständige Proteine charakterisiert (Kraiczky et al., 2003, 2004a). Deswegen lag die Vermutung nahe, dass es sich bei BbCRASP-2 ebenfalls um ein äußeres Membranprotein handeln könnte. Die Präparation der äußeren Membranen des Isolates B31 bewies diese Annahme. Im Vergleich zu dem Homogenat ganzer Zellen war in den äußeren Membranen ein deutlicher Anstieg des BbCRASP-2-Signals sichtbar (Abb. IV.23).

Da die äußeren Membranen eine höhere BbCRASP-2-Konzentration als das Homogenat ganzer Zellen aufwiesen, wurde die 2D-Elektrophorese mit den äußeren Membranen wiederholt. Eine Ligandenaffinitätsblot-Analyse des 2D-Gels erlaubte die Identifizierung der Proteinspots im 2D-Gel, die sich in der Nähe des BbCRASP-2-Signals befanden. Diese wurden isoliert und für eine MALDI-Massenspektrometrie eingesetzt. Die erhaltenen Ergebnisse wurden mit den Proteinmassen aus der Borreliendatenbank verglichen. Außerdem konnten anhand des Kontrollstammes B31-e2, der kein BbCRASP-2-Protein exprimiert, die Proteine ausgeschlossen werden, die auf den in B31-e2 enthaltenen Plasmiden cp32-1, cp32-3, cp32-4, cp26, lp17, lp38 oder lp54 lokalisiert sind. Der Vergleich der Proteinmassen mit der Borreliendatenbank ergab drei stark geladene Proteine, bei denen es sich aufgrund der kalkulierten Masse und des Genortes um das BbCRASP-2-Protein handeln konnte. Zwei dieser Proteine, BBH06 und BBH37, stellen potentielle Lipoproteine dar, da ihre N-terminalen Sequenzen signifikante Sequenzhomologien zu den Signalpeptidase-Schnittstellen anderer bakterieller Lipoproteine zeigen (Haake, 2000). Aus diesem Grund wurden die Proteine BBH06 und BBH37 überexprimiert und in Ligandenaffinitätsblot-

Analysen mit rekombinantem FHL-1 auf Bindung an den Komplementregulator getestet. Das BBH06-Protein interagiert stark mit FHL-1, während das BBH37-Protein keine Bindung aufwies. Weiterhin konnte in Ligandenaffinitätsblot-Analysen mit NHS als Faktor H-Quelle gezeigt werden, dass das BBH06-Protein ebenfalls an Faktor H bindet. Zur Kontrolle wurde das Protein für eine Westernblot-Analyse mit dem gegen das BbCRASP-1-Protein gerichteten monoklonalen Antikörper RH-1 eingesetzt. Dabei konnte kein Signal detektiert werden. Diese Ergebnisse beweisen, dass es sich bei dem BBH06-Protein um das gesuchte BbCRASP-2-Protein handelt.

3 Charakterisierung des BbCRASP-2-Proteins

3.1 Charakterisierung des für das BbCRASP-2-Protein kodierenden *bbh06*-Gens

Das BbCRASP-2-Protein des *B. burgdorferi* s.s.-Stammes B31 wird von dem *bbh06*-Gen kodiert, welches auf dem linearen Plasmid lp28-3 lokalisiert ist. Die aus der Nukleotidsequenz des *bbh06*-Gens abgeleitete Aminosäuresequenz von BbCRASP-2 unterscheidet sich deutlich von den Aminosäuresequenzen der anderen BbCRASP-Proteine (Abb. IV.28). Mit Hilfe von Sequenzvergleichen der fünf BbCRASP-Proteine konnten Identitäten von 21,1 % für BbCRASP-2 und BbCRASP-1 sowie von ca. 20 % für BbCRASP-2 und die Faktor H-bindenden BbCRASP-Proteine ermittelt werden. Diese Daten belegen, dass das BbCRASP-2-Protein kein Mitglied der Erp- oder der gbb54-Proteinfamilie ist. Weiterhin gehört BbCRASP-2 laut Casjens et al. (2000) zu keiner anderen bekannten *B. burgdorferi* s.s.-Proteinfamilie. Die Faktor H- und FHL-1-bindenden BbCRASP-Proteine werden also im Gegensatz zu den spezifisch Faktor H-bindenden BbCRASP-Proteinen der Erp-Proteinfamilie nicht von Genen einer Familie kodiert. Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse charakterisieren das BbCRASP-2-Protein als ein neues eigenständiges Protein.

Mittels Southernblot-Analysen konnte das *bbh06*-Gen in den *B. burgdorferi* s.s.-Isolaten B31, LW2 und Sh-2-82 nachgewiesen werden (Abb. IV.32). Diese drei Stämme zeigten in Ligandenaffinitätsblot-Analysen ebenfalls eine starke Expression des BbCRASP-2-Proteins (Abb. IV.6). Schwache Signale wurden sowohl für das *bbh06*-Gen als auch für das BbCRASP-2-Protein des Isolates ZS7 detektiert, während der Stamm P1F in beiden Analysen keine Signale zeigte. Wie erwartet konnten für die klonalen Isolate B31-e2 und B313 weder in Ligandenaffinitätsblot-Analysen noch in Southernblot-Analysen die Existenz von

BbCRASP-2 nachgewiesen werden. Mit 297mut zeigte ein weiteres Isolat, für das in der Ligandenaffinitätsblot-Analyse keine BbCRASP-2-Expression detektierbar war (Daten nicht gezeigt), kein *bbh06*-Signal. Southernblot- und Ligandenaffinitätsblot-Analysen stimmen bei diesen Isolaten überein.

Dagegen wurde für das Isolat 297 überraschenderweise ein starkes *bbh06*-Signal in der Southernblot-Analyse detektiert, obwohl dieser Stamm in der Ligandenaffinitätsblot-Analyse keine Expression von BbCRASP-2 zeigte. Dieses Isolat sollte demnach eine Kopie des für das BbCRASP-2-Protein kodierenden Gens besitzen, zeigt aber keine Expression des BbCRASP-2-Proteins. Langzeitkultivierung von *B. burgdorferi* s.s. in der Zellkultur kann zu spontanem Verlust von Plasmiden führen, was aber keinen Einfluss auf die Vermehrung der Zellen hat (Schwan et al., 1988). Für die Southernblot- und die Ligandenaffinitätsblot-Analyse wurde die DNA und das Ganzzellhomogenat der selben Passage eines niedrigpassagierten 297-Isolates verwendet. Die fehlende Expression des BbCRASP-2-Proteins in der Ligandenaffinitätsblot-Analyse kann also nicht auf den Verlust des lp28-3-Plasmids durch zu lange Passagierung des Isolates zurückgeführt werden. Eine mögliche Erklärung für die fehlende Expression des BbCRASP-2-Proteins des Stammes 297 wären Mutationen innerhalb des Promotors. Weiterhin könnte das *bbh06*-Gen dieses Stammes ein Pseudogen darstellen, da die meisten identifizierten Genabschnitte des lp28-3-Plasmids Pseudogene darstellen (Casjens et al., 2000) Für zukünftige Projekte wäre es deswegen interessant, das *bbh06*-Gen des Stammes 297 zu isolieren und auf etwaige Unterschiede zu dem homologen Gen des Stammes B31 zu untersuchen.

3.2 Analyse der Oberflächenexposition des BbCRASP-2-Proteins

Die N-terminale Sequenz des BbCRASP-2-Proteins zeigt eine signifikante Homologie zur der für Lipoproteine von Spirochäten charakteristischen Lipobox (Abb. IV.28; Haake, 2000). Diese Sequenzhomologie lässt vermuten, dass das BbCRASP-2-Protein analog zu den anderen BbCRASP-Proteinen lipidiert ist. Die Anreicherung des BbCRASP-2-Signals in den isolierten äußeren Membranen von *B. burgdorferi* s.s. charakterisiert das BbCRASP-2-Protein als ein äußeres Membranprotein (Abb. IV.23). In Protease-Assays mit nativen Borrelien konnte aber keine Empfindlichkeit des BbCRASP-2-Proteins für Proteinase K und Trypsin nachgewiesen werden (Abb. IV.33B). Dieser Assay legt zugrunde, dass oberflächenständige Proteine bei Behandlung mit Proteasen degradiert werden, während nicht-oberflächenexponierte Proteine aufgrund ihrer Lokalisation vor dem Proteaseabbau geschützt

sind. Die Proteine FlaB und HSP70 dienen als Marker für periplasmatische und zytosolische Proteine und wiesen wie erwartet keine Empfindlichkeit für die Proteasen auf (Abb. IV.33A). Das äußere Membranprotein OspB zeigte dagegen Sensitivität für Proteinase K, aber keine Empfindlichkeit für Trypsin. Diese Trypsinresistenz des OspB-Proteins wurde schon in früheren Studien belegt (Lefebvre et al., 1993; Probert et al., 1995).

Die Proteaseresistenz des BbCRASP-2-Proteins legt die Vermutung nahe, dass das Protein trotz seiner Membranständigkeit im Gegensatz zu BbCRASP-1 und BbCRASP-3 nicht auf der Oberfläche der Borrelien exponiert wird. Andererseits könnte das BbCRASP-2-Protein eventuell durch andere Proteine vor dem Abbau durch Proteasen geschützt werden. Dies ist zum Beispiel für das äußere Membranprotein P66 von *B. burgdorferi* s.s. bekannt (Bunikis und Barbour, 1999). Bunikis und Barbour zeigten, dass sich die Empfänglichkeit von P66 für die Spaltung durch Trypsin erhöhte, wenn den getesteten Zellen die äußeren Membranproteine OspA, OspB und OspC fehlten. Vor allem die Anwesenheit von OspA schien die Zugänglichkeit von Trypsin zu dem P66-Protein zu limitieren.

Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass die als ausschließlich oberflächenständig charakterisierten Proteine OspA, OspB und OspC nur in begrenzten Mengen auf der Oberfläche der Borrelien vorhanden sind (Cox et al., 1993). Anhand dieser Daten wurde ein Modell für die molekulare Membranstruktur von *B. burgdorferi* s.s. entwickelt (Abb. V.1). Dabei wird zugrunde gelegt, dass *B. burgdorferi* s.s. zwei Klassen integraler Membranproteine aufweist (Brandt et al., 1990). Die eine Klasse besteht aus den Polypeptiden, die membranüberspannende Domänen besitzen und wenig immunogen sind, während zur zweiten Klasse hydrophile, immunogene Proteine gehören, die über N-terminale Lipide in der Membran verankert sind (z.B. Lipoproteine). Das Modell schlägt einen sekretorischen Mechanismus zur Translokation der polaren Polypeptide der Lipoproteine durch die äußere Membran auf die Oberfläche der Borrelien vor (Cox et al., 1993). Weiterhin wird angenommen, dass der sekretorische Mechanismus die Menge an oberflächenexponierten Proteinen regulieren kann, was die Anzahl dieser Proteine auf der Oberfläche limitieren würde und die Antigenität der pathogenen Borrelien verringern könnte. Zusammenfassend kann man sagen, dass es sich bei dem BbCRASP-2-Protein um ein membranständiges Lipoprotein handelt, wobei zum gegenwärtigen Zeitpunkt ungeklärt ist, ob das BbCRASP-2-Protein auf der Oberfläche der Borrelien exponiert wird.

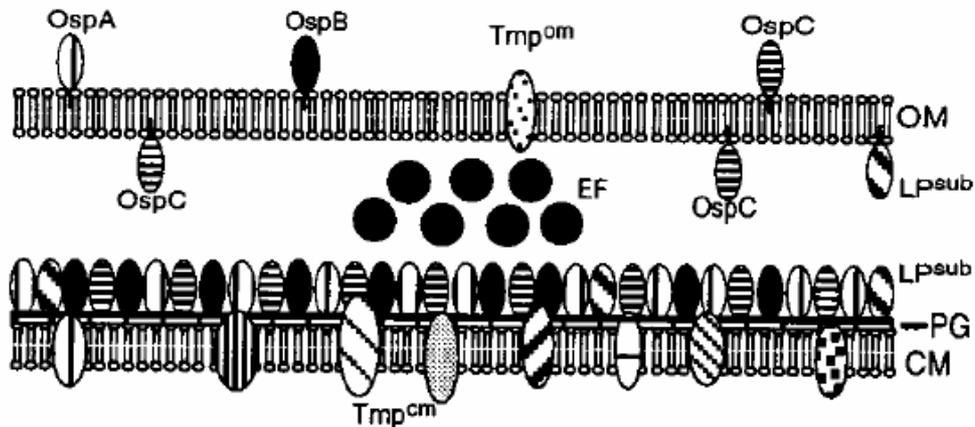


Abb. V.1: Modell der molekularen Membranstruktur von *B. burgdorferi* s.s. (aus Cox et al., 1993).

OM: äußere Membran; CM: cytoplasmatische Membran; PG: Peptidoglycan der Bakterienzellwand; Tmp^{om}/Tmp^{cm}: Proteine der äußeren/cytoplasmatischen Membran, die transmembrane Domänen besitzen; LP^{sub}: Lipoproteine, die nicht auf der Oberfläche der äußeren Membran lokalisiert sind.

3.3 Lokalisation der für die Bindung an das BbCRASP-2-Protein verantwortlichen Regionen von Faktor H und FHL-1

Frühere Untersuchungen zeigten, dass einige humanpathogene Mikroorganismen oberflächenständige Proteine exprimieren, welche mit Faktor H und zum Teil auch mit FHL-1 interagieren. Dazu gehören zum Beispiel das Fhba-Protein von *Borrelia hermsii* (Hovis et al., 2004), das M-Protein der Gruppe A-Streptokokken (Horstmann et al., 1988; Blackmore et al., 1998b; Johnsson et al., 1998; Kotarsky et al., 1998), das β -Protein der Gruppe B-Streptokokken (Jarva et al., 2004), das PspC- und das Hic-Protein von *Streptococcus pneumoniae* (Dave et al., 2004; Jarva et al., 2004) sowie das Por1A-Protein von *Neisseria gonorrhoeae* (Ram et al., 1998a,b). Für einige der Proteine konnten die für die Bindung verantwortlichen Regionen von Faktor H und FHL-1 lokalisiert werden. Das M-Protein von *Streptococcus pyogenes* bindet zum Beispiel über SCR 7 an beide Komplementregulatoren (Blackmore et al., 1998b; Johnsson et al., 1998; Kotarsky et al., 1998), während das β -Protein von *Streptococcus agalactiae* über die Domäne SCR 13 oder SCR 20 mit Faktor H interagiert (Jarva et al., 2004). Weiterhin wurden für die Proteine PspC und Hic von *Streptococcus pneumoniae* Bindungen an die Domänen SCRs 13-15 bzw. SCRs 8-11 und 12-14 von Faktor H detektiert (Dave et al., 2004; Jarva et al., 2004).

Die BbCRASP-Proteine von *B. burgdorferi* s.s. stellen die bislang am besten charakterisierten Faktor H- und FHL-1-bindenden Proteine dar. Frühere Daten ergaben für das BbCRASP-1-Protein eine starke Interaktion mit den SCRs 5-7 von Faktor H und FHL-1 sowie eine schwache Interaktion mit SCR 20 von Faktor H (Kraiczky et al., 2004a). Das BbCRASP-3-Protein und die Faktor H-bindenden Erp-Proteine interagieren dagegen ausschließlich über die Domänen SCR 19 und SCR 20 mit Faktor H (IV. 2.2; Kraiczky et al., 2001a, 2003).

Die vorliegende Arbeit komplettiert die Charakterisierung der für die Interaktion mit den BbCRASP-Proteinen verantwortlichen Regionen der Komplementregulatoren. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Bindung von FHL-1 und Faktor H an das BbCRASP-2-Protein nur über die SCR 7-Domäne von Faktor H und FHL-1 vermittelt wird (Abb. IV.34). Die Interaktion des BbCRASP-2-Proteins mit FHL-1 und Faktor H unterscheidet sich somit von der Bindung der anderen BbCRASP-Proteine an die Komplementregulatoren.

Analog zur Interaktion des BbCRASP-1-Proteins mit Faktor H und FHL-1 behalten beide Komplementregulatoren vermutlich auch nach Bindung an das BbCRASP-2-Protein ihre in den SCRs 1-4 lokalisierte komplementregulatorische Aktivität. Sie wären somit trotz Bindung an das BbCRASP-2-Protein in der Lage, die Komplementaktivierung zu regulieren.

Weiterhin wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit der gegen FHL-1 gerichtete Antikörper B22 als spezifisch die FHL-1-Bindung des BbCRASP-2-Proteins detektierender Antikörper charakterisiert. Die Interaktion von FHL-1 mit dem zweiten FHL-1-bindenden BbCRASP-1-Protein kann mit diesem Antikörper nicht nachgewiesen werden. Das BbCRASP-1-Protein interagiert mit den Domänen SCRs 5-7 von FHL-1 (Kraiczky et al., 2004a), während das BbCRASP-2-Protein wie oben beschrieben nur über die SCR 7-Domäne an FHL-1 bindet. Aufgrund der Interaktion von BbCRASP-1 mit drei nebeneinanderliegenden Domänen von FHL-1 scheint der Antikörper nicht mehr an den FHL-1/BbCRASP-1-Komplex binden zu können. Möglicherweise ist die Bindung des BbCRASP-2-Proteins an FHL-1 flexibler, so dass der Antikörper sein Bindungs epitop noch erkennen kann. Aufgrund der unterschiedlichen Interaktion der Proteine BbCRASP-1 und BbCRASP-2 mit FHL-1, kann der B22-Antikörper daher als spezifischer Antikörper für die Detektion der FHL-1-Bindung an das BbCRASP-2-Protein verwendet werden.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden Faktor H- und FHL-1-Deletionsmutanten sowie rekombinantes FHL-1 in Ligandenaffinitätsblot-Analysen verwendet. Die vorliegenden Daten stammen somit aus Versuchen, die unter denaturierenden

Bedingungen durchgeföhrt wurden, und müsssten zur Kontrolle unter physiologischen Bedingungen z.B. mittels *surface plasmon resonance*-Analysen wiederholt werden.

3.4 Lokalisation der Faktor H- und FHL-1-Bindestellen im BbCRASP-2-Protein

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die mit Faktor H und FHL-1 interagierende Domäne des BbCRASP-2-Proteins innerhalb der C-terminalen 16 Aminosäuren des Proteins lokalisiert werden (Abb. IV.35). Frühere Analysen C-terminaler BbCRASP-1-Deletionsmutanten zeigten, dass eine Domäne von 11 C-terminalen Aminosäuren essentiell für die Bindung des BbCRASP-1-Proteins an Faktor H und FHL-1 ist (Kraiczky et al., 2004). Weiterhin konnten für das BbCRASP-3-Protein neun C-terminale Aminosäuren als Faktor H-Bindestelle identifiziert werden (Kraiczky et al., 2003). Diese Ergebnisse legen dar, dass alle näher charakterisierten BbCRASP-Proteine trotz deutlicher Sequenzunterschiede über den C-Terminus an Faktor H und/oder FHL-1 binden. Dagegen sprechen allerdings neuere Daten zum BbCRASP-1-Protein, welche zeigen, dass die fehlende Bindung an Faktor H und FHL-1 der C-terminalen BbCRASP-1-Deletionsmutanten nicht auf einen Verlust der Bindungsstelle, sondern auf eine strukturelle Destabilisierung des Proteins zurückzuführen ist (Cordes et al., 2005). Die von den Autoren postulierte Struktur des BbCRASP-1-Proteins ist in Abbildung V.2 dargestellt.

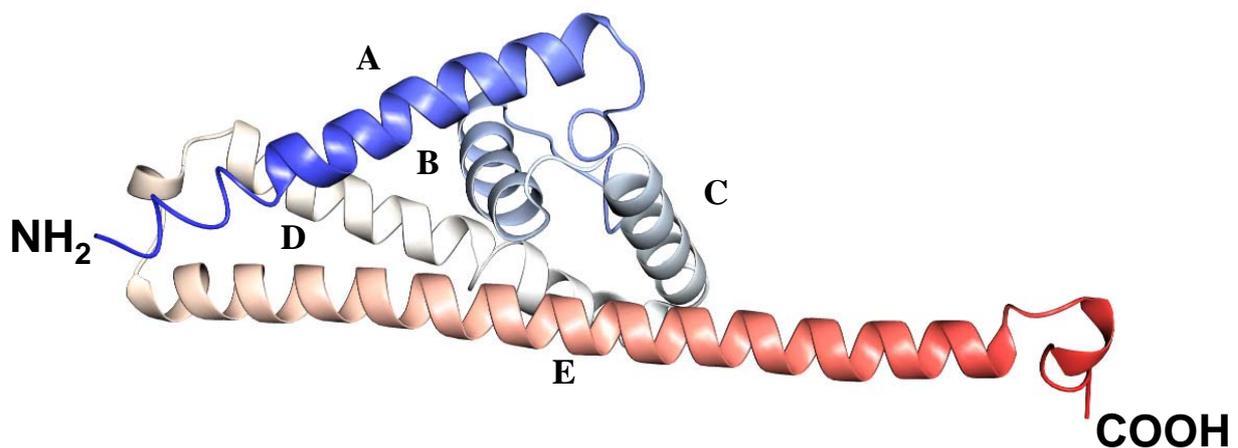


Abb. V.2: Struktur des BbCRASP-1-Monomers (aus Cordes et al., 2005).

Darstellung der Struktur des BbCRASP-1-Monomers. Die einzelnen Helices sind ausgehend vom N-Terminus (Aminosäure 70) zum C-Terminus (Aminosäure 250) von blau nach rot farbig dargestellt. Koordinaten und Strukturdaten sind unter den Datenbank-Nummern 1W33 (natives Protein) und 1W3Z (SeMet-markiertes Protein) hinterlegt.

Die atomare Struktur des BbCRASP-1-Proteins ergab, dass sich das Protein aus zwei Monomeren zusammensetzt, welche ein Homodimer bilden (Abb. V.3).

Die BbCRASP-1-Monomere werden über die C-Termini zusammengehalten, wobei die C-terminale Hälfte eines Monomers über der N-terminale Hälfte der langen E-Helix des anderen Monomers liegt. Eine Deletion des C-Terminus führt zur Destabilisierung des biologisch relevanten Dimers, weswegen für die C-terminalen Deletionsmutanten des BbCRASP-1-Proteins keine Bindungen an Faktor H und FHL-1 nachgewiesen werden konnten. Die Analysen der Deletionsmutanten identifizierten deshalb nicht die Faktor H- und FHL-1-Bindestelle, sondern eine strukturell sensitive Region.

Es kann daher spekuliert werden, dass das BbCRASP-2-Protein ebenso wie das BbCRASP-1-Protein in der biologisch relevanten Form als Dimer vorliegt. Dies legt die Wahrscheinlichkeit nahe, dass die C-terminalen Deletionsmutanten des BbCRASP-2-Proteins aufgrund der Destabilisierung des Dimers keine Bindung an Faktor H und FHL-1 zeigten und nicht, wie bisher angenommen, aufgrund der Deletion der Bindungsstelle. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen der BbCRASP-2-Deletionskonstrukte würden demnach auf eine strukturell sensitive Region hinweisen. Diese Theorie müsste z.B. durch die Kristallisation des BbCRASP-2-Proteins bestätigt werden.

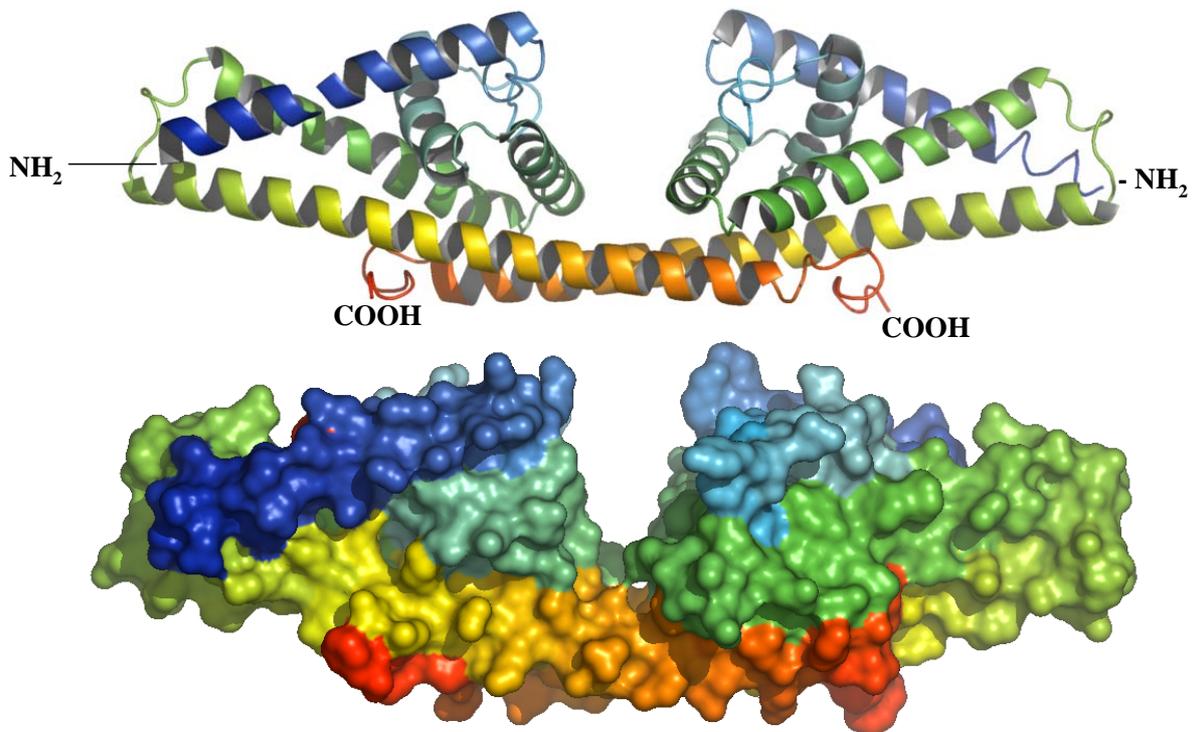


Abb. V.3: Struktur des BbCRASP-1-Dimers (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. S. M. Lea).

Computergraphische Darstellung des BbCRASP-1-Dimers als schematisches Modell (oben) und als Kalottenmodell (unten).

4 Ausblick

Für die weiterführende Charakterisierung des BbCRASP-2-Proteins sollte vor allem die Kristallisation zur Aufklärung der Struktur dieses Proteins unter physiologischen Bedingungen ein wichtiges Ziel sein. Informationen über die Organisation des BbCRASP-2-Proteins als Monomer oder als Dimer wären hilfreich bei Fragestellungen zur Art der Interaktion mit FHL-1 und Faktor H. Die Kokristallisation des Proteins mit FHL-1 und/oder Faktor H könnte die Frage nach den genauen Bindungsstellen der Komplementregulatoren im BbCRASP-2-Protein lösen. Eine weitere Möglichkeit, die Bindungsstelle zu charakterisieren wären Analysen mittels *in vitro*-Mutagenese.

Außerdem müsste die Bedeutung des BbCRASP-2-Proteins für die Komplementresistenz der Borrelien geklärt werden, indem z.B. BbCRASP-2-Deletionsstämme mit dem *bbh06*-Gen transformiert und auf etwaige Unterschiede in ihrer Komplementresistenz analysiert würden. Zudem wäre es von Interesse, die Expression des BbCRASP-2-Proteins während des Zecken-Wirt-Infektionszyklus zu klären.

Ein weiteres Ziel könnte die Identifizierung und Charakterisierung der CRASP-Proteine aus Isolaten der Genospezies *B. afzelii* sein. Für die CRASP-Proteine BaCRASP-4 und BaCRASP-5 der komplementresistenten *B. afzelii*-Isolate EB1 und FEM1-D15 konnten in der vorliegenden Arbeit immunologische Verwandtschaft mit den Proteinen ErpA und ErpP des *B. burgdorferi* s.s.-Isolates B31 nachgewiesen werden. Eine Identifizierung dieser Proteine würde Auskunft über die tatsächlichen Verwandtschaftsgrade geben.

VI. Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation liefert einen Beitrag zur Identifizierung und Charakterisierung der an der Komplementresistenz von Borrelien beteiligten CRASP-Proteine aus Isolaten der Genospezies *B. burgdorferi* s.s. und *B. afzelii*.

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es mittels Identifizierung und immunologischer Charakterisierung der spezifisch Faktor H-bindenden BbCRASP-Proteine BbCRASP-3, BbCRASP-4 und BbCRASP-5 deren Zugehörigkeit zur Erp-Proteinfamilie zu beweisen. Als verantwortliche Domänen für die Interaktion der CRASP-/Erp-Proteine mit Faktor H wurden die SCRs 19 und 20 von Faktor H identifiziert.

Die in der vorliegenden Arbeit ebenfalls aufgezeigte immunologische Kreuzreaktion der Erp-Proteine ErpA und ErpP des *B. burgdorferi* s.s.-Isolates B31 mit den CRASP-Proteinen BaCRASP-4 und BaCRASP-5 der *B. afzelii*-Isolate EB1 und FEM1-D15 lässt eine immunologische Verwandtschaft zwischen CRASP-Proteinen aus Isolaten unterschiedlicher Genospezies vermuten.

Weiterhin konnte das Faktor H- und FHL-1-bindende BbCRASP-1-Protein des *B. burgdorferi* s.s.-Isolates LW2 identifiziert werden. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz dieses Proteins mit den Sequenzen der BbCRASP-1-Proteine der Stämme ZS7 und B31 ergab, dass die BbCRASP-1-Proteine der aus verschiedenen geographischen Regionen stammenden *B. burgdorferi* s.s.-Isolate identisch sind.

Mit dem BbCRASP-2-Protein wurde ein bis dahin unbekanntes Faktor H- und FHL-1-bindendes CRASP-Protein aus den äußeren Membranen des *B. burgdorferi* s.s.-Isolates B31 isoliert und charakterisiert. BbCRASP-2 stellt innerhalb der CRASP-Proteinfamilie ein neues eigenständiges Lipoprotein mit einer Länge von 236 Aminosäuren dar. Es ist lokalisiert auf dem linearen Plasmid lp28-3 und wird von dem *bbh06*-Gen kodiert. Die Aminosäuresequenz des BbCRASP-2-Proteins unterscheidet sich deutlich von den Sequenzen der anderen CRASP-Proteine. Es ist weder ein Mitglied der *gbb54*- oder der Erp-Proteinfamilie, noch gehört es zu einer anderen bekannten Proteinfamilie von *B. burgdorferi* s.s. In Ligandenaffinitätsblot-Analysen konnte mit Hilfe von rekombinantem FHL-1 sowie Deletionsmutanten von Faktor H und FHL-1 gezeigt werden, dass die Bindung von Faktor H und FHL-1 an das BbCRASP-2-Protein ausschließlich über die SCR 7-Domäne vermittelt wird. Die Analysen C-terminaler Deletionsmutanten von BbCRASP-2 unterstrichen die Bedeutung der letzten 16 Aminosäuren des BbCRASP-2-Proteins für die Interaktion mit Faktor H und FHL-1.

VII. Literaturverzeichnis

Abdul Motaleb Md, Corum L, Bono JL, Elias AF, Rosa P, Samuels DS, Charon NW (2000) *Borrelia burgdorferi* periplasmic flagella have both skeletal and motility functions. Proc Natl Acad Sci USA 97: 10899-10904.

Ackermann R, Kabatzki J, Boisten HP, Steere AC, Grodzicki RL, Hartung S, Runne U (1984) Spirochäten-Ätiologie der *Erythema-chronicum migrans*-Krankheit. Dtsch Med Wochenschr 109: 92-97.

Ackermann R (1985) *Erythema-migrans*-Borreliose und Frühsommer-Meningoenzephalitis. Dtsch Ärtztbl 83: 1765-1774.

Akins DR, Porcella SF, Popova TG, Shevchenko D, Baker SI, Li M, Norgard MV, Radolf JD (1995) Evidence for *in vivo* but not *in vitro* expression of a *Borrelia burgdorferi* outer surface protein F (OspF) homologue. Mol Microbiol 18: 507-520.

Akins DR, Bourell KW, Caimano MJ, Norgard MV, Radolf JD (1998) A new animal model for studying Lyme disease spirochetes in a mammalian host-adapted state. J Clin Invest 101: 2240-2250.

Akins DR, Caimano MJ, Yang X, Cerna F, Norgard MV, Radolf JD (1999) Molecular and evolutionary analysis of *Borrelia burgdorferi* 297 circular plasmid-encoded lipoproteins with OspE- and OspF-like leader peptides. Infect Immun 67: 1526-1532.

Alitalo A, Meri T, Ramo L, Jokiranta TS, Heikkila T, Sepälä IJT, Oksi J, Vijanen M, Meri S (2001) Complement evasion by *Borrelia burgdorferi*: serum-resistant strains promote C3b inactivation. Infect Immun 69: 3685-3691.

Alitalo A, Meri T, Lankinen H, Sepälä I, Lahdenne P, Hefty PS, Akins D, Meri S (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.

Anthonissen FM, De Kesel M, Hoet PP, Bigaignon GH (1994) Evidence for involvement of different genospecies of *Borrelia* in the clinical outcome of Lyme disease in Belgium. Res Microbiol 145: 327-331.

Assous MV, Postic D, Paul G, Nevot P, Baranton G (1993) Western blot analysis of sera from Lyme borreliosis patients according to the genomic species of the *Borrelia* strains used as antigens. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 12 : 261-268.

Babb K, El-Hage N, Miller JC, Carroll JA, Stevenson B (2001) Distinct regulatory pathways control the synthesis of *Borrelia burgdorferi* infection-associated OspC and Erp (OspEF-related) surface proteins. Infect Immun 69: 4146-4153.

Babb K, McAlister JD, Miller JC, Stevenson B (2004) Molecular characterization of *Borrelia burgdorferi* erp promoter/operator elements. J Bacteriol 186:2745-2756.

- Baranton G, Postic D, Saint Girons I, Boerlin P, Piffaretti JC, Assous M, Grimont PA (1992)** Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garnii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *Int J Syst Bacteriol* 42: 378-383.
- Baranton G, Ras NM, Postic D (1998)** Molecular epidemiology of the aetiological agent of Lyme borreliosis. *Wien Klin Wochenschr* 110: 850-855.
- Barbour AG, Hayes SF (1986)** Biology of *Borrelia* species. *Microbiol Rev* 50: 381-400.
- Barbour AG (1988)** Plasmid analysis of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. *J Clin Microbiol* 26: 475-478.
- Barbour AG (1993)** Linear DNA of *Borrelia* species and antigenic variation. *Trends Microbiol* 1: 236-239.
- Baril C, Richaud C, Baranton G, Saint Girons I (1989)** Linear chromosome of *Borrelia burgdorferi*. *Res Microbiol* 140: 507-516.
- Belfaiza J, Postic D, Bellenger E, Baranton G, Saint Girons I (1993)** Genomic fingerprinting of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 31: 2873-2877.
- Belisle JT, Brandt ME, Radolf JD, Norgard MV (1994)** Fatty acids of *Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi* lipoproteins. *J Bacteriol* 176: 2151-2157.
- Bergström S, Garon CF, Barbour AG, MacDougall J (1992)** Extrachromosomal elements of spirochetes. *Res Microbiol* 143: 623-628.
- Blackmore TK, Sadlon TA, Ward HM, Lublin DM, Gordon DL (1996)** Identification of a heparin binding domain in the seventh short consensus repeat of complement factor H. *J Immunol* 157: 5422-5427.
- Blackmore TK, Hellwage J, Sadlon TA, Higgs TA, Zipfel PF, Ward HM, Lublin DM, Gordon DL (1998a)** Identification of the second heparin-binding domain in human complement factor H. *J Immunol* 160: 3342-3348.
- Blackmore TK, Fischetti VA, Sadlon TA, Ward HM, Gordon DL (1998b)** M protein of the group A *Streptococcus* binds to the seventh short consensus repeat of human complement factor H. *Infect Immun* 66: 1427-1431.
- Brade V, Kleber I, Acker G (1992)** Differences of two *Borrelia burgdorferi* strains in complement activation and serum resistance. *Immunobiology* 185: 453-465.
- Brandt ME, Riley BS, Radolf JD, Norgard MV (1990)** Immunogenic integral membrane proteins of *Borrelia burgdorferi* are lipoproteins. *Infect Immun* 58: 983-991.
- Breitner-Ruddock S, Würzner R, Schulze J, Brade V (1997)** Heterogeneity in the complement-dependent bacteriolysis within the species of *Borrelia burgdorferi*. *Med Microbiol Immunol* 185: 253-260.

- Bunikis J, Barbour AG (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.
- Burgdorfer W, Barbour AG, Grunwaldt E, Hayes SF (1982)** Lyme disease – a tick-borne spirochetosis? *Science* 216: 1317-1319.
- Busch U, Will G, Hizo-Teufel C, Wilske B, Preac-Mursic V (1997)** Long-term *in vitro* cultivation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains: Influence on plasmid patterns, genome stability and expression of proteins. *Res Microbiol* 148: 109-118.
- Canica MM, Nato F, du Merle L, Mazie JC, Baranton G, Postic D (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, Hatfull G, Hendrix R (1992)** Evolution of dsDNA tailed-bacteriophage genomes. *Semin Virol* 3: 383-397.
- Casjens S, Huang WM (1993)** Linear chromosome and physical and genetic map of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. *Mol Microbiol* 8: 967-980.
- Casjens S, Delange M, Ley HL 3rd, Rosa P, Huang WM (1995)** Linear chromosome of Lyme disease agent spirochetes: genetic diversity and conservation of gene order. *J Bacteriol* 177: 2769-2780.
- Casjens S, van Vugt R, Tilly K, Rosa PA, Stevenson B (1997)** Homology throughout the multiple 32-kilobase circular plasmids present in Lyme disease spirochete. *J Bacteriol* 179: 217-227.
- Casjens S, Palmer N, van Vugt R, Huang WM, Stevenson B, Rosa P, Lathigra R, Stutton G, Peterson J, Dodson RJ, Haft D, Hickey E, Gwinn M, White O, Fraser CM (2000)** A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Mol Microbiol* 35: 490-516.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2004)** Lyme disease-United States, 2001-2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2004 53: 365-369.
- Cheetham BF, Katz ME (1995)** A role for bacteriophages in the evolution and transfer of bacterial virulence determinants. *Mol Microbiol* 18: 201-208.
- Chen X, Schauder S, Potier N, Van Dorsselaer A, Pelczar I, Bassler BL, Hughson FM (2002)** Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature* 415: 545-549.
- China B, Sory MP, N'Guyen BT, De Bruyere M, Cornelis GR (1993)** Role of the YadA protein in prevention of opsonization of *Yersinia enterocolitica* by C3b molecules. *Infect Immun* 61: 3129-3136.

Cinco M, Murgia R, Ruscio M, Andriolo B (1996) IgM and IgG significant reactivity to *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* among Italian patients affected by Lyme arthritis or neuroborreliosis. FEMS Immunol Med Microbiol 14: 159-166.

Cooper NR (1991) Complement evasion strategies of microorganism. Immunol Today 12: 327-331.

Cordes FS, Roversi P, Kraiczy P, Simon MM, Brade V, Jahraus O, Wallis R, Skerka C, Zipfel PF, Wallich R, Lea SM (2005) A novel fold for the factor H-binding protein BbCRASP-1 of *Borrelia burgdorferi*. Nat Struct Mol Biol 12:276-277.

Cox DL, Akins DR, Bourell KW, Lahdenne P, Norgard MV, Radolf JD (1993) Limited surface exposure of *Borrelia burgdorferi* outer surface lipoproteins. Proc Natl Acad Sci USA 93: 7973-7978.

Das S, Barthold SW, Stocker Giles S, Montgomery RR, Telford SR, Fikrig E (1997) Temporal pattern of *Borrelia burgdorferi* p21 expression in ticks and the mammalian host. J Clin Invest 99: 987-995.

Dave S, Paangburn MK, Pruitt C, McDaniel LS (2004) Interaction of human factor H with PspC of *Streptococcus pneumoniae*. Indian J Med Res 119: 66-73.

Davidson BE, MacDougall J, Saint Girons I (1992) Physical map of the linear chromosome of the bacterium *Borrelia burgdorferi* 212, a causative agent of Lyme disease, and localization of rRNA genes. J Bacteriol 174: 3766-3774.

Demaerschalck I, Messsaoud AB, de Kesel M, Hoyois B, Lobet Y, Hoet P, Bigaignon G, Bollen A, Godfroid E (1995) Simultaneous presence of different *Borrelia burgdorferi* genospecies in biological fluids of Lyme disease patients. J Clin Microbiol 33: 602-608.

de Silva AM, Fikrig E (1995) Growth and migration of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes* ticks during blood feeding. Am J Trop Med Hyg 53: 397-404.

des Vignes F, Piesmann J, Heffernan R, Schulze TL, Stafford KC 3rd, Fish D (2001) Effect of tick removal on transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by *Ixodes scapularis* nymphs. J Infect Dis 183: 773-778.

Diaz A, Ferreira A, Sim RB (1997) Complement evasion by *Echinococcus granulosus*: sequestration of host factor H in the hydatid cyst wall. J Immunol 158: 3779-3786.

Diaz-Guillen MA, Rodriguez de Cordoba S, Heine-Suner D (1999) A radiation hybrid map of complement factor H and factor H-related genes. Immunogenetics 49: 549-552.

Dunand V, Bretz AG, Suard A, Praz G, Dayer E, Peter O (1998) Acrodermatitis chronica atrophicans and serologic confirmation of infection due to *Borrelia afzelii* and/or *Borrelia garinii* by immunoblot. Clin Microbiol Infect 4: 159-163.

Duray PH, Steere AC (1988) Clinical pathologic correlations of Lyme disease by stage. Ann NY Acad Sci 539: 65-79.

Eggers CH, Samuels DS (1999) Molecular evidence for a new bacteriophage of *Borrelia burgdorferi*. J Bacteriol 181: 7308-7313.

Eiffert H, Jarecki-Khan K, Thomssen R (1991) Identification of an immunoreactive nonproteinaceous component in *Borrelia burgdorferi*. Med Microbiol Immunol 180: 229-237.

El-Hage N, Babb K, Carroll JA, Lindstrom N, Fischer ER, Miller JC, Gilmore JR RD, Mbow ML, Stevenson B (2001) Surface exposure and protease intensivity of *Borrelia burgdorferi* Erp (OspE/F-related) lipoproteins. Microbiol 147: 821-830.

Ferdows MS, Barbour AG (1989) Megabase-sized linear DNA in the bacterium *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. Proc Natl Acad Sci USA 86: 5969-5973.

Fischer U (2002) Etablierung einer routine-tauglichen Polymerase-Kettenreaktion zum Nachweis von *Borrelia burgdorferi* aus menschlichen Untersuchungsmaterialien unter Nutzung des Flagellin-Gens. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin, Institut für Medizinische Mikrobiologie, J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main.

Foretz M, Postic D, Baranton G (1997) Phylogenetic analysis of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto by arbitrarily primed PCR and pulse-field gel electrophoresis. Int J Syst Bacteriol 47: 11-18.

Fraser CM, Casjens S, Huang WM, Sutton GG, Clayton R, Lathigra R, White O, Ketchum KA, Dodson R, Hickey EK, Gwinn M, Dougherty B, Tomb JF, Fleischmann RD, Richardson D, Peterson J, Kerlavage AR, Quackenbush J, Salzberg S, Hanson M, van Vugt R, Palmer N, Adams MD, Gocayne J, Weidman J, Utterback T, Wathley L, MacDonald L, Artiach P, Bowman Ch, Garland S, Fujii C, Cotton MD, Horst K, Roberst K, Hatch B, Smith HO, Venter JC (1997) Genomic sequence of Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. Nature 390: 580-586.

Fukunaga M, Hamase A, Okada K, Nakao M (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.

Giannakis E, Male DA, Ormsby RJ, Mold C, Jokiranta TS, Ranganathan S, Gordon DL (2001) Multiple ligand binding sites on domain seven of human complement factor H. Immunopharmacol 1: 433-443.

Giannakis E, Jokiranta TS, Male DA, Ranganathan S, Ormsby RJ, Fischetti VA, Mold C, Gordon DL (2003) A common site within factor H SCR 7 responsible for binding heparin, C-reactive protein and streptococcal M protein. Eur J Immunol 33: 962-969.

Gilmore Jr RD, Kappel KJ, Johnson BJ (1997) Molecular characterization of a 35-kilodalton protein of *Borrelia burgdorferi*, an antigen of diagnostic importance in early Lyme disease. J Clin Microbiol 35: 86-91.

Goldstein SF, Buttle KF, Charon NW (1996) Structural analysis of the *Leptospiraceae* and *Borrelia burgdorferi* by high-voltage electron microscopy. J Bacteriol 178: 6539-6545.

Gordon DL, Kaufman RM, Blackmore TK, Kwong J, Lublin DM (1995) Identification of complement regulatory domains in human factor H. *J Immunol* 155: 348-356.

Guina T, Oliver DB (1997) Cloning and analysis of a *Borrelia burgdorferi* membrane-interactive protein exhibiting haemolytic activity. *Mol Microbiol* 24: 1201-1213.

Haake DA (2000) Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiol* 146: 1491-1504.

Hanahan D (1983) Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557.

Hayes SF, Burgdorfer W, Barbour AG (1983) Bacteriophage in the *Ixodes dammini* spirochete, etiological agent of Lyme disease. *J Bacteriol* 154: 1436-1439.

Heine-Suner D, Diaz-Guillen MA, Pardo-Manuel de Villena F, Robledo M, Benitz J, Rodriguez des Cordoba S (1997) A high resolution map of the regulator of complement activation gene cluster on lq32 that integrates new genes and markers. *Immunogenetics* 45: 422-427.

Hellwage J, Meri T, Heikkila A, Panelius J, Lahdenne P, Sepälä I, Meri S (2001) The complement regulator factor H binds to the surface protein OspE of *Borrelia burgdorferi*. *J Biol Chem* 276: 8427-8435.

Heukeshoven J, Dernik R (1988) Increased sensitivity for Coomassie staining of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using PhastSystem Development Unit. *Electrophoresis* 9: 60-61.

Horstmann RD, Sievertsen HJ, Knobloch J, Fischetti VA (1988) Antiphagocytic activity of streptococcal M protein: selective binding of complement control protein factor H. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 1657-1661.

Horstmann RD (1992) Target recognition failure by the non-specific defense system: surface constituents of pathogens interfere with the alternative pathway of complement activation. *Infect Immun* 60: 721-727.

Hourcade D, Holers VM, Atkinson JP (1989) The regulators of complement activation (RCA) gene cluster. *Adv Immunol* 45: 381-416.

Hovis KM, McDowell JV, Griffin L, Marconi RT (2004) Identification and characterization of a linear-plasmid-encoded factor H-binding protein (FhbA) of the relapsing fever spirochete *Borrelia hermsii*. *J Bacteriol* 2004 186: 2612-2618.

Jarva H, Janulczyk R, Hellwage J, Zipfel PF, Bjorck L, Meri S (2002) *Streptococcus pneumoniae* evades complement attack and opsonophagocytosis by expressing the pspC locus-encoded Hic protein that binds to short consensus repeats 8-11 of factor H. *J Immunol* 168: 1886-1894.

- Jarva H, Hellwage J, Jokiranta TS, Lehtinen MJ, Zipfel PF, Meri S (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.
- Johnson RC, Schmid FW, Hyde FW, Steigerwalt AG, Brenner DJ (1984)** *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiological agent of Lyme disease. *Int J Syst Bacteriol* 34: 596-597.
- Johnsson E, Berggard K, Kotarsky H, Hellwage J, Zipfel PF, Sjobring U, Lindahl G (1998)** Role of the hypervariable region in streptococcal M proteins: binding of a human complement inhibitor. *J Immunol* 161: 4894-4901.
- Joiner KA (1988)** Complement evasion by bacteria and parasites. *Annu Rev Microbiol* 42: 201-230.
- Jokiranta TS, Zipfel PF, Hakulinen J, Kühn S, Pangburn MK, Tamerius JD, Meri S (1996)** Analysis of the recognition mechanism of the alternative pathway of complement by monoclonal anti-factor H antibodies: evidence for multiple interaction between H and surface bound C3b. *FEBS Lett* 393: 297-302.
- Jokiranta TS, Hellwage J, Koistinen V, Zipfel PF, Meri S (2000)** Each of the three binding sites of factor H interacts with a distinct site on C3b. *J Biol Chem* 275: 27657-27662.
- Kawabata H, Masuzawa T, Yanagihara Y (1993)** Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. *Microbiol Immunol* 37: 843-848.
- Kotarsky H, Hellwage J, Johnsson E, Skerka C, Svensson HG, Lindahl G, Sjobring U, Zipfel PF (1998)** Identification of a domain in human factor H and factor H-like protein-1 required for the interaction with streptococcal M proteins. *J Immunol* 160: 3349-3354.
- Kraft R, Tardiff J, Krauter KS, Leinwand LA (1988)** Using mini-prep plasmid DNA for sequencing double stranded templates with Sequenase. *Biotechniques* 6: 544-546.
- Kraiczy P, Acker G, Brade V (1999)** Erregereigenschaften. In: Lyme Borreliose und Frühsommer-Meningoenzephalitis, Eds. P. Oschmann und P. Kraiczy, Uni-Med, Bremen, Seiten 16-23.
- Kraiczy P, Hunfeld KP, Breitner-Ruddock S, Würzner R, Acker G, Brade V (2000a)** Comparison of two laboratory methods for the determination of serum resistance in *Borrelia burgdorferi* isolates. *Immunobiology* 201: 406-419.
- Kraiczy P, Hunfeld KP, Peters S, Würzner R, Acker G, Wilske B, Brade V (2000b)** Borreliacidal activity of early Lyme disease sera against complement-resistant *Borrelia afzelii* FEM1 wild-type and an OspC-lacking FEM1 variant. *J Med Microbiol* 49: 917-928.
- Kraiczy P, Skerka C, Brade V, Zipfel PF (2001a)** Further Characterization of Complement Regulator-Acquiring Surface Proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 69: 7800-7809.

Kraiczy P, Skerka C, Kirschfink M, Brade V, Zipfel PF (2001b) Immune evasion of *Borrelia burgdorferi* by acquisition of human complement regulators FHL-1/reconectin and Faktor H. Eur J Immunol 31: 1674-1684.

Kraiczy P, Skerka C, Kirschfink M, Zipfel PF, Brade V (2001c) Mechanism of complement resistance of pathogenic *Borrelia burgdorferi* isolates. Intern Immunopharmacol 1: 393-401.

Kraiczy P, Skerka C, Kirschfink M, Zipfel PF, Brade V (2001d) Mechanism of complement resistance of pathogenic *Borrelia burgdorferi* isolates. Int Immunopharmacol 1:393-401.

Kraiczy P, Skerka C, Zipfel PF, Brade V (2002) Complement regulator-acquiring surface proteins of *Borrelia burgdorferi*: A new protein family involved in complement resistance. Wien Klin Wochenschr 114: 568-573.

Kraiczy P, Hellwage J, Skerka C, Kirschfink M, Brade V, Zipfel PF, Wallich R (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. Schriften aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main. Band 1. Shaker Verlag.

Kraiczy P, Hellwage J, Skerka C, Becker H, Kirschfink M, Simon MM, Brade V, Zipfel PF, Wallich R (2004a) 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, Hartmann K, Hellwage J, Skerka C, Kirschfink M, Brade V, Zipfel PF, Wallich R, Stevenson B (2004b) Immunological characterization of the complement regulator factor H-binding CRASP and Erp proteins of *Borrelia burgdorferi*. Int J Med Microbiol 293: 152-157.

Kramer MD, Schaible UE, Wallich R, Moter SE, Petzoldt D, Simon MM (1990) Characterization of *Borrelia burgdorferi* associated antigens by monoclonal antibodies. Immunobiology 181: 357-366.

Krushkal J, Bat O, Gigli I (2000) Evolutionary relationship among proteins encoded by the regulator of complement activation gene cluster. Mol Biol Evol 17: 1718-1730.

Kühn S, Zipfel PF (1995) The baculovirus expression vector pBSV-8His directs secretion of histidine-tagged proteins. Gene 162: 225-229.

Kühn S, Skerka C, Zipfel PF (1995) Mapping of the complement regulatory domains in the human factor H-like protein 1 and in factor H. J Immunol 155: 5663-5670.

Kühn S, Zipfel PF (1996) Mapping of the domains required for decay acceleration activity of the human factor H-like protein 1 and factor H. *Eur J Immunol* 26:2383-2387.

Kurtenbach K, De Michaelis S, Etti S, Schäfer SM, Sewell HS, Brade V, Kraiczy P (2002) Host association of *Borrelia burgdorferi*- the key role of host complement. *Trends Microbiol* 10: 74-79.

Lam TT, Nguyen TPK, Montgomery RR, Kantor FS, Fikrig E, Flavell RA (1994) Outer surface proteins E and F of *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease. *Infect Immun* 62: 290-298.

Law SKA, Reid KBM (1995) Complement. 2nd ed. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.

Lebech AM, Hansen K, Wilske B, Theisen M (1994) Taxonomic classification of 29 *Borrelia burgdorferi* strains isolated from patients with Lyme borreliosis: a comparison of five different phenotypic and genotypic typing schemes. *Med Microbiol Immunol (Berlin)* 183: 325-341.

Lefebvre RB, Probert WS, Perng GC (1993) Characterization of a chromosomal gene and the antigen it expresses from the Lyme disease agent, *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol* 31: 2146-2151.

Le Fleche A, Postic D, Girardet K, Peter O, Baranton G (1997) Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *Int J Syst Bacteriol* 47: 921-925.

Li C, Abdul Motaleb Md, Sal M, Goldstein SF, Charon NW (2001) Gyration, rotations, periplasmic flagella: The biology of spirochete motility. In: *The spirochetes. Molecular and cellular microbiology*. Eds. Saier MH, Garcia-Lara Jr and J. Horizon Scientific Press, Wymondham, United Kingdom, pp. 11-22.

Lindahl G, Sjöbring U, Johnsson E (2000) Human complement regulators: a major target for pathogenic microorganisms. *Curr Opin Immunol* 12: 44-51.

Marconi RT, Liveris D, Schwartz I (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.

Marconi RT, Sung SY, Norton Hughes CA, Carlyon JA (1996) Molecular and evolutionary analyses of a variable series of genes in *Borrelia burgdorferi* that are related to *ospE* and *ospF*, constitute a gene family, and share a common upstream homology box. *J Bacteriol* 178: 5615-5626.

Marti Ras N, Postic D, Foretz M, Baranton G (1997) *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, a bacterial species "made in the U.S.A."? *Int J Syst Bacteriol* 47: 1112-1117.

- Masuzawa T, Takada N, Kudeken M, Fukui T, Yano Y, Ishiguro F, Kawamura Y, Imai Y, Ezaki T (2001)** *Borrelia sinica* sp. nov., a Lyme disease-related *Borrelia* species isolated in Japan. *Int J Sys Bacteriol* 51: 1817-1824.
- McDowell JV, Ying Sung S, Labandeira-Rey M, Skare JT, Marconi RT (2001)** Analysis of mechanisms with loss of infectivity of clonal populations of *Borrelia burgdorferi* B31 MI. *Infect Immun* 69: 3670-3677.
- McDowell JV, Sung SY, Hu LT, Marconi RT (2002)** Evidence that the variable regions of the central domain of VlsE are antigenic during infection with Lyme disease spirochetes. *Infect Immun* 70: 4196-4203.
- McDowell JV, Wolfgang J, Tran E, Metts MS, Hamilton D, Marconi RT (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 JV, Wolfgang J, Senty L, Sundry CM, Noto MJ, Marconi RT (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 JV, Harlin ME, Rogers EA, Marconi RT (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.
- Medzhitov R, Janeway C (2000)** Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* 173: 89-97.
- Meri T, Hartmann A, Lenk D, Eck R, Würzner R, Hellwage J, Meri S, Zipfel PF (2002a)** The yeast *Candida albicans* binds complement regulators factor H and FHL-1. *Infect Immun* 70: 5185-5192.
- Meri T, Jokiranta TS, Hellwage J, Bialonski A, Zipfel PF, Meri S (2002b)** *Onchocerca volvulus* microfilariae avoid complement attack by direct binding of factor H. *Infect Dis* 185: 1786-1793.
- Metts MS, McDowell JV, Theisen M, Hansen PR, Marconi RT (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 JC, El-Hage N, Babb K, Stevenson B (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 JC, Stevenson B (2004)** Increased expression of *Borrelia burgdorferi* factor H-binding surface proteins during transmission from ticks to mice. *Int J Med Microbiol* 293: 120-125.

- Neubert U, Schaller M, Januschke E, Stolz W, Schmieger H (1993)** Bacteriophages induced by ciprofloxacin in a *Borrelia burgdorferi* skin isolate. Zentralbl Bakteriol 279: 307-315.
- Nguyen TPK, Lam TT, Barthold SW, Telford SR, Flavell RA, Fikrig E (1994)** Partial destruction of *Borrelia burgdorferi* within ticks that engorged on OspE- or OspF-immunized mice. Infect Immun 62: 2079-2084.
- Nilsson B, Müller-Eberhard HJ (1965)** Isolation of β_1 H-globulin from human serum and its characterization as the fifth component of complement. J Exp Med 122: 277-298.
- Ohlenbusch A, Matuschka FR, Richter D, Christen HJ, Thomssen R, Spielman A, Eiffert H (1996)** Etiology of the acrodermatitis chronica atrophicans lesion in Lyme disease. Infect Dis 174: 421-423.
- Ojaimi C, Davidson BE, Saint Girons I, Old IG (1994)** Conservation of gene arrangement and an unusual organization of rRNA genes in the linear chromosomes of the Lyme disease spirochetes *B. burgdorferi*, *B. afzelii* and *B. garinii*. Microbiology 140: 2931-2940.
- Pangburn MK, Schreiber RD, Müller-Eberhard HJ (1977)** Human complement C3b inactivator: isolation, characterization, and demonstration of an absolute requirement for the serum protein β_1 H for cleavage of C3b and C4b in solution. J Exp Med 146: 257-270.
- Pangburn MK, Atkinson MAL, Meri S (1993)** Localization of the heparin-binding site on complement factor H. J Biol Chem 266: 16847-16853.
- Pangburn MK (2000)** Host recognition and target differentiation by factor H, a regulator of the alternative pathway of complement. Immunopharmacol 49: 149-157.
- Parola P, Raoult D (2001)** Tick-borne bacterial diseases emerging in Europe. Clin Microbiol Infect 7: 80-83.
- Paster BJ, Dewhirst FE, Weisburg WG, Tordoff LA, Fraser GJ, Hespell RB, Stanton TB, Zablen L, Mandelco L, Woese CR (1991)** Phylogenetic analysis of the spirochetes. J Bacteriol 173: 6101-6109.
- Peter O, Bretz AG, Postic D, Dayer E (1997)** Association of distinct species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato with neuroborreliosis in Switzerland. Clin Microbiol Infect 3: 423-431.
- Picken RN, Cheng Y, Han D, Nelson JA, Griridher Reddy A, Hayden MK, Picken MM, Strle F, Bouseman JK, Trendholme GM (1995)** Genotypic and phenotypic characterization of *Borrelia burgdorferi* isolated from ticks and small animals in Illinois. J Clin Microbiol 33: 2304-2315.
- Piesmann J, Oliver JR, Sinsky RJ (1990)** Growth kinetics of the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*) in vector ticks (*Ixodes dammini*). Am J Trop Med Hyg 42: 352-357.
- Piesmann J (1993)** Dynamics of *Borrelia burgdorferi* transmission by nymphal *Ixodes dammini* ticks. J Infect Dis 167: 1082-1085.

- Porcella SF, Popova TG, Akins DR, Li M, Radolf JD, Norgard MV (1996)** *Borrelia burgdorferi* supercoiled plasmids encode multicopy tandem open reading frames and a lipoprotein gene family. *J Bacteriol* 178: 3293-3307.
- Postic D, Assous MV, Grimont PAD, Baranton G (1994)** Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of *rrf*(5S)-*rrl*(23S) intergenic spacer amplicons. *Int J Sys Bacteriol* 44: 743-752.
- Postic D, Ras NM, Lane RS, Hendson M, Baranton G (1998)** Expanded Diversity among California *Borrelia* isolates and description of *Borrelia bissettii* sp. nov. (formerly *Borrelia* group DN127). *J Clin Microbiol* 36: 3497-3504.
- Preac-Mursic V, Wilske B, Schierz G (1986)** European *Borrelia burgdorferi* isolated from humans and ticks: culture conditions and antibodies susceptibility. *Zentrbl Bakteriol Mikrobiol* 263: 112-118.
- Probert WS, Allsup KM, LeFebvre RB (1995)** Identification and characterization of a surface-exposed, 66-kilodalton protein from *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 63: 1933-1939.
- Prodinger WM, Hellwage J, Spruth M, Dierich MP, Zipfel PF (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 JE, Norris SJ (2000)** Correlation between plasmid content and infectivity in *Borrelia burgdorferi*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 13865-13870.
- Radolf JD, Bourell KW, Akins DR, Brusca JS, Norgard MV (1994)** Analysis of *Borrelia burgdorferi* membrane architecture by freeze-fracture electron microscopy. *J Bacteriol* 176: 21-31.
- Radolf JD, Goldberg MS, Bourell K, Baker SI, Jones JD, Norgard MV (1995)** Characterization of outer membranes isolated from *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete. *Infect Immun* 63: 2154-2163.
- Ram S, Sharma AK, Simpson SD, Gulati S, McQuillen (DP), Pangburn MK, Rice PA (1998a)** A novel sialic acid binding site on factor H mediates serum resistance of sialylated *Neisseria gonorrhoeae*. *J Exp Med* 187: 743-752.
- Ram S, McQuillen DP, Gulati S, Elkins C, Pangburn MK, Rice PA (1998b)** Binding of complement factor H to loop 5 of porin protein 1A: a molecular mechanism of serum resistance of nonsialylated *Neisseria gonorrhoeae*. *J Exp Med* 188: 671-680.
- Ram S, Mackinnon FG, Gulati S, McQuillen DP, Vogel U, Frosch M, Elkins C, Guttormsen HK, Wetzler LM, Oppermann M, Pangburn MK, Rice PA (1999)** The contrasting mechanisms of serum resistance of *Neisseria gonorrhoeae* and group B *Neisseria meningitidis*. *Mol Immunol* 36: 915-928.

- Richter D, Schlee DB, Allgower R, Matuschka FR (2004)** Relationships of a novel Lyme disease spirochete, *Borrelia spielmani* sp. nov., with its hosts in Central Europe. *Appl Environ Microbiol* 70:6414-6419.
- Rodriguez de Cordoba S, Lublin DM, Rubinstein P, Atkinson JP (1995)** Human genes for three complement components that regulate the activation of C3 are tightly linked. *J Exp Med* 161: 1189-1195.
- Rodriguez de Cordoba S, Diaz-Guillen MA, Heine-Suner D (1999)** An integrated map of the human regulator of complement activation (RCA) gene cluster on Iq32. *Mol Immunol* 36: 803-808.
- Ryffel K, Peter O, Rutti B, Suard A, Dayer E (1999)** Scored antibody reactivity determined by immunoblotting shows association between clinical manifestations and presence of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii*, and *Borrelia valaisiana* in humans. *J Clin Microbiol* 37: 4086-4092.
- Sadziene A, Rosa PA, Thompson PA, Hogan DM, Barbour AG (1992)** Antibody-resistant mutants of *Borrelia burgdorferi*: in vitro selection and characterization. *J Exp Med* 176: 799-809.
- Sadziene A, Wilske B, Ferdows MS, Barbour AG (1993a)** The cryptic ospC gene of *Borrelia burgdorferi* B31 is located on a circular plasmid. *Infect Immun* 61: 2192-2195.
- Sadziene A, Barbour AG, Rosa PA, Deneé Thomas D (1993b)** An OspB mutant of *Borrelia burgdorferi* has reduced invasiveness *in vitro* and reduced infectivity *in vivo*. *Infect Immun* 61: 3590-3596.
- Sadziene A, Deneé Thomas D, Barbour AG (1995)** *Borrelia burgdorferi* mutant lacking osp: biological and immunological characterization. *Infect Immun* 63: 1573-1580.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989)** Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY USA.
- Schäfer C, Hahn M, Oschmann P (1999)** Tick ecology and epidemiology. In: Lyme Borreliosis and Tick-borne encephalitis. Eds. Oschmann P, Kraiczy P, Halperin J, Brade V, Uni-Med, Bremen, Seiten 30-40.
- Schägger H, von Jagow G (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.
- Schägger H (1994)** Denaturing electrophoretic techniques. In: A practical guide to membrane protein purification. Eds. Schägger H, von Jagow G, Academic Press, USA, pp.57-59.
- Schaller M, Neubert U (1994)** Bacteriophages and ultrastructural alterations of *Borrelia burgdorferi* induced by ciprofloxacin. *J Spirochetal Tick Borne Dis* 1: 37-40.

- Schauder S, Shokat S, Surette MG, Bassler BL (2001)** The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Mol Microbiol* 41: 463-476.
- Schmidt R, Kawabatki J, Hartung S, Ackermann R (1985)** Erythema-migrans-Borreliose in der Bundesrepublik Deutschland. *Dtsch Med Wochenschr* 110: 1803-1807.
- Schwan TG, Burgdorfer W, Garon C (1988)** Changes in infectivity and plasmid profiles of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, as a result of *in vitro* cultivation. *Infect Immun* 56: 1831-1836.
- Sharma AK, Pangburn MK (1996)** Identification of three physically and functionally distinct binding sites for C3b in human complement factor H by deletion mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:10996-11001.
- Stanek G, O'Connell S, Cimmino M, Aberer E, Kristoferitsch W, Grandström M, Guy E, Gray J (1996)** European Union concerted action on risk assessment in Lyme borreliosis: clinical case definitions for Lyme borreliosis. *Wien Klin Wochenschr* 108: 741-747.
- Steere AC, Malawista SE, Syndman DR, Shope RE, Andiman WA, Ross MR, Steele FM (1977)** Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. *Arthritis Rheum* 20: 7-17.
- Steere AC (1989)** Lyme disease. *N Engl J Med* 321: 586-596.
- Steere AC (2001)** Lyme disease. *N Engl J Med* 345: 115-125.
- Stevenson B, Schwan TG, Rosa PA (1995)** Temperature-related differential expression of antigens in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 63: 4535-4539.
- Stevenson B, Tilly K, Rosa PA (1996)** A family of genes located on four separate 32-kilobase circular plasmids in *Borrelia burgdorferi* B31. *J Bacteriol* 178: 3508-3516.
- Stevenson B, Bono JL, Schwan TG, Rosa PA (1998a)** *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, Casjens S, Rosa PA (1998b)** Evidence of past recombination events among the genes encoding the Erp antigens of *Borrelia burgdorferi*. *Microbiology* 144: 1869-1879.
- Stevenson B, Zückert WR, Akins DR (2000)** Repetition, conservation, and variation: the multiple cp32 plasmids of *Borrelia* species. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2: 411-422.
- Stevenson B, Babb K (2002)** LuxS-mediated quorum sensing in *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete. *Infect Immun* 70: 4099-4105.

Stevenson B, El-Hage N, Hines MA, Miller JC, Babb K (2002) Differential binding to host complement inhibitor factor H by *Borrelia burgdorferi* Erp surface proteins: a possible mechanism underlying the expansive host range of Lyme disease spirochete. *Infect Immun* 70: 491-497.

Stevenson B, Miller JC (2003) Intra- and interbacterial genetic exchange of Lyme disease spirochete *erp* genes generates sequence identity amidst diversity. *J Mol Evol* 57: 309-324.

Stoiber H, Pinter C, Siccardi AG, Clivio A, Dierich MP (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). *Exp Med* 183: 307-310.

Suk K, Das S, Sun W, Jwang B, Barthold SW, Flavell RA, Fikrig E (1995) *Borrelia burgdorferi* genes selectively expressed in the infected host. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 4269-4273.

Sung SY, Lavoie CP, Carlyon JA, Marconi RT (1998) Genetic divergence and evolutionary instability in *ospE*-related members of the upstream homology box gene family in *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex isolates. *Infect Immun* 66: 4656-4668.

Sung SY, McDowell JV, Carlyon JA, Marconi RT (2000) Mutation and recombination in the upstream homology box-flanked *ospE*-related genes of the Lyme disease spirochetes result in the development of new antigenic variants during infection. *Infect Immun* 68: 1319-1327.

Takayama K, Rothenberg RJ, Barbour AG (1987) Absence of lipopolysaccharide in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 55: 2311-2313.

van Dam AP, Kuiper H, Vos K, Widdjojokusumo A, de Jongh BM, Spanjaard S, Ramselaar ACT, Kramer MD, Dankert J (1993) Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. *Clin Infect Dis* 17: 708-717.

van Dam AP, Oei A, Jaspers R, Fijen C, Wilske B, Spanjaard J, Dankert J (1997) Complement-mediated serum sensitivity among spirochetes that cause Lyme disease. *Infect Immun* 65:1228-1236.

Vik DP, Munoz-Canovez P, Chaplin DD, Tack BF (1989) Faktor H. *Curr Topics Microbiol Immunol* 153: 147-162.

Wallich R, Brenner C, Kramer MD, Simon MM (1995) Molecular cloning and immunological characterization of a novel linear-plasmid-encoded gene, *pG*, of *Borrelia burgdorferi* expressed only *in vivo*. *Infect Immun* 63: 3327-3335.

Wallich R, Pattathu J, Kitiratschky V, Brenner C, Zipfel PF, Brade V, Simon MM, Kraiczky P (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.

- Walker EM, Borenstein LA, Blanco DR, Miller JN, Lovett MA (1991)** Analysis of outer membrane ultrastructure of pathogenic *Treponema* and *Borrelia* species by freeze-fracture electron microscopy. *J Bacteriol* 173: 5585-5588.
- Walport MJ (2001)** Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 344: 1058-1066.
- Wang G, van Dam AP, Le Fleche A, Postic D, Peter O, Baranton G, de Boer R, Spanjaard L, Dankert J (1997)** Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic group VS116 and M19). *Int J Syst Bacteriol* 47: 926-932.
- Wang G, van Dam AP, Schwartz I, Dankert J (1999)** Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: Taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 12: 633-653.
- Whaley K, Ruddy S (1976)** Modulation of the alternative complement pathways by β_1 H globulin. *J Exp Med* 144: 1147-1163.
- Wheeler CM, Monco JCG, Benach JL, Golightly MG, Habicht GS, Steere AC (1993)** Nonprotein antigens of *Borrelia burgdorferi*. *J Infect Dis* 167: 665-674.
- Würzner R (1999)** Evasion of pathogens by avoiding recognition or eradication by complement, in part via molecular mimicry. *Mol Immunol* 36: 249-260.
- Xu Y, Johnson RC (1995)** Analysis and comparison of plasmid profiles of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains. *J Clin Microbiol* 33: 2679-2685.
- Xu Y, Kodner C, Coleman L, Johnson RC (1996)** Correlation of plasmids of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto type strain B31. *Infect Immun* 64: 3870-3876.
- Zipfel PF, Skerka C (1994)** Complement factor H and related proteins: an expanding family of complement-regulatory proteins. *Immunol Today* 15: 121-126.
- Zipfel PF, Skerka C (1999)** FHL-1/reconnectin: a human complement and immune regulator with cell-adhesive function. *Immunol Today* 20: 135-140.
- Zipfel PF, Jokiranta TS, Hellwage J, Koistinen V, Meri S (1999)** The factor H protein family. *Immunopharmacology* 42: 53-60.
- Zipfel PF, Skerka C, Hellwage J, Jokiranta ST, Meri S, Brade V, Kraiczy P, Noris M, Remuzzi G (2002)** Structure-function studies of the complement system. *Biochem Soc Trans* 30: 971-978.
- Zückert WR, Meyer J (1996)** Circular and linear plasmids of Lyme disease spirochetes have extensive homology: characterization of a repeated DNA element. *J Bacteriol* 178: 2287-2298.

VIII. Anhang

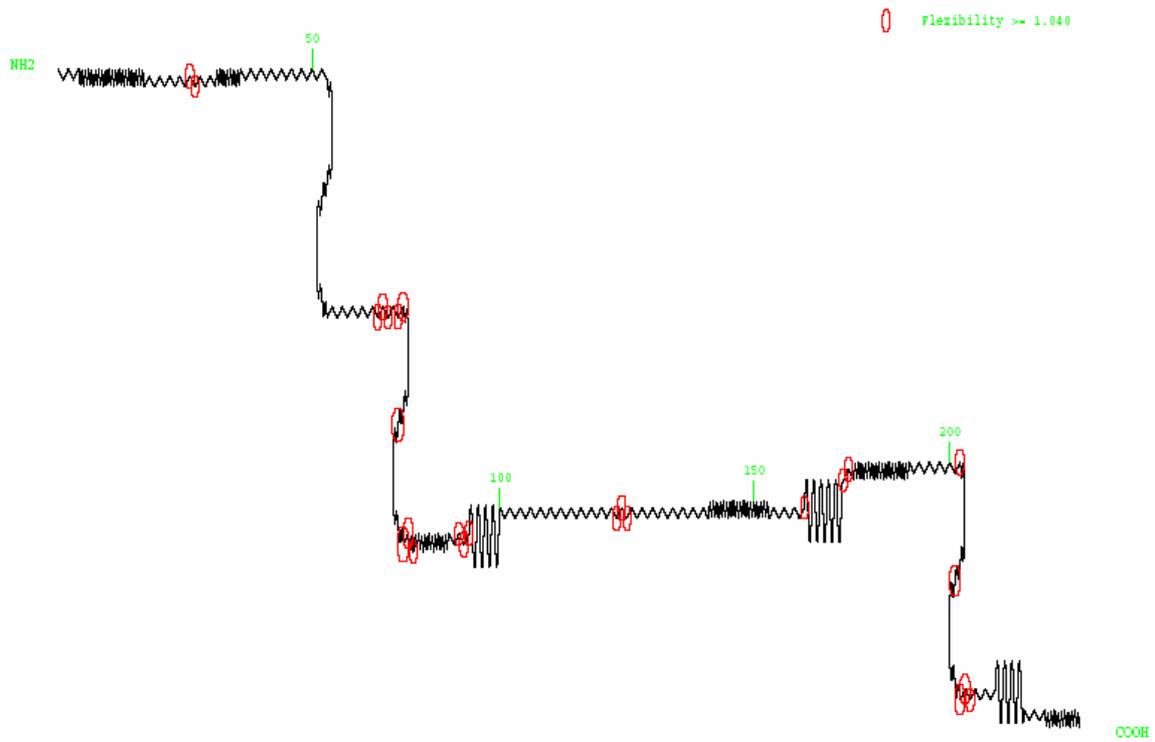


Abb. IV.30: Proteinstrukturanalysen des BbCRASP-2-Proteins mittels des HUSAR-Programms. Untersucht wurde die Flexibilität des BbCRASP-2-Proteins.

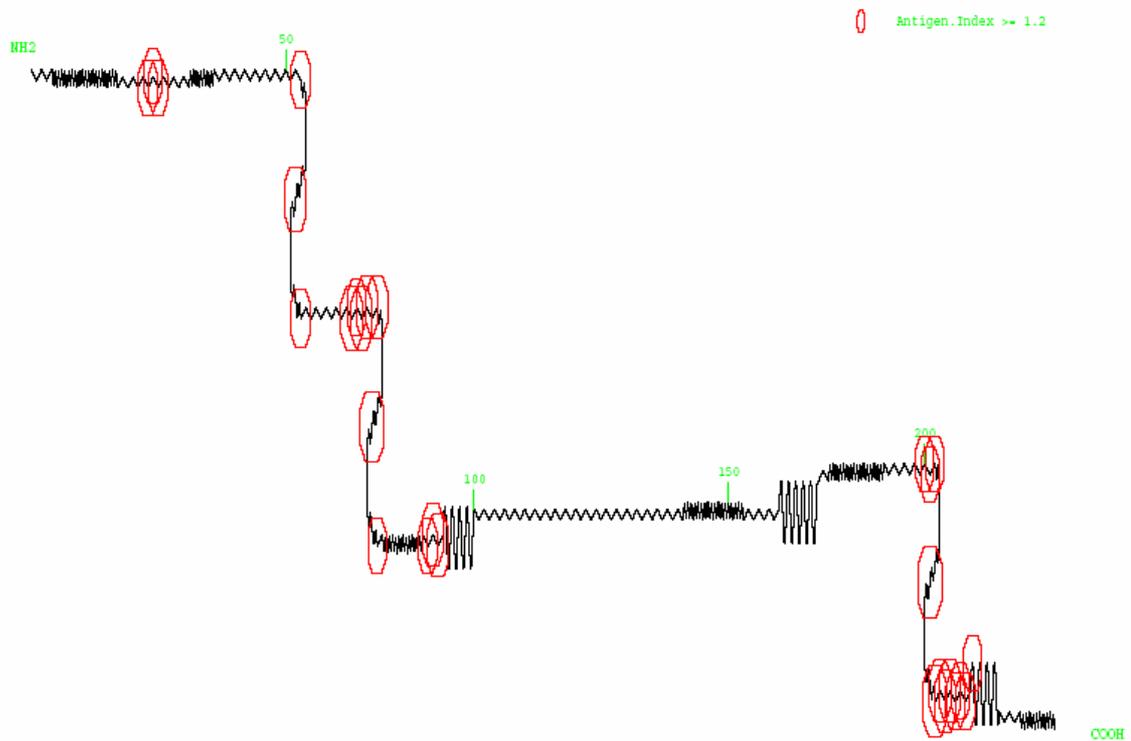


Abb. IV.31: Proteinstrukturanalyse des BbCRASP-2-Proteins mittels des HUSAR-Programms. Das BbCRASP-2-Protein wurde auf antigene Regionen untersucht.

Lebenslauf

Kristina Hartmann, geboren am 08.02.1978 in Schwelm

08/1988-06/1997 Besuch des Märkischen Gymnasiums in Schwelm mit Abschluss Abitur

10/1997–01/2002 Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum
Diplomarbeit am Lehrstuhl für Allgemeine und Molekulare Botanik über die biochemische Reinigung und Charakterisierung von RNA-bindenden Proteinen aus Chloroplasten unter Leitung von PD Dr. J. Nickelsen

ab 06/2002 Promotionsstudium an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main
Doktorarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main über die Identifizierung und Charakterisierung Faktor H- und FHL-1-bindender CRASP-Proteine von *Borrelia burgdorferi*, dem Erreger der Lyme-Borreliose, unter Leitung von Prof. Dr. R. Tampé und Prof. Dr. V. Brade

Publikationen

Ossenbühl F, Hartmann K, Nickelsen J (2002) A chloroplast RNA binding protein from stromal thylakoid membranes specifically binds to the 5' untranslated region of the *psbA* mRNA. Eur J Biochem 269: 3912-3919.

Kraiczky P, Hartmann K, Hellwage J, Skerka C, Kirschfink M, Brade V, Zipfel PF, Wallich R, Stevenson B (2004) Immunological characterization of the complement regulator factor H-binding CRASP and Erp proteins of *Borrelia burgdorferi*. Int J Med Microbiol 293: 152-157.

Hartmann K, Corvey C, Skerka C, Kirschfink M, Karas M, Brade V, Zipfel PF, Wallich R, Kraiczky P Characterization of BbCRASP-2, a novel plasmid-encoded factor H- and FHL-1-binding CRASP protein, isolated from outer-membrane fractions of *Borrelia burgdorferi*. In Vorbereitung.