

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Zentrum der Hygiene
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene
Direktor: Prof. Dr. Volkhard A. J. Kempf

**Vergleichende Analysen zur Interaktion von Plasminogen mit dem Vlp15/16
und GlpQ Protein von *Borrelia miyamotoi***

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Frederik Lennart Schmidt

aus Heidelberg

Frankfurt am Main, 2023

Dekan: Prof. Dr. Stefan Zeuzem

Referent: Prof. Dr. Peter Kraiczy

Korreferent: Prof. Dr. Heiko Mühl

Tag der mündlichen Prüfung: 20.03.2024

Gewidmet meinem Freund und Laborpartner
Martin Amborn

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	- 4 -
Abbildungsverzeichnis	- 7 -
Tabellenverzeichnis	- 8 -
Abkürzungsverzeichnis	- 9 -
1 Einleitung	- 11 -
1.1 Der Erreger <i>Borrelia miyamotoi</i>	- 11 -
1.1.1 Borrelien	- 11 -
1.1.2 <i>Borrelia miyamotoi</i>	- 12 -
1.2 Die Proteine GlpQ und Vlp15/16 von <i>B. miyamotoi</i>	- 17 -
1.3 Plasminbindung als Pathogenitätsfaktor von Borrelien	- 18 -
1.4 Fragestellung	- 20 -
2 Material und Methoden	- 21 -
2.1 Bakterienstämme	- 21 -
2.1.1 <i>Escherichia coli</i>	- 21 -
2.1.2 Borrelien	- 21 -
2.2 Antikörper	- 21 -
2.3 Proteine	- 22 -
2.4 Verwendete Reagenzienpackungen	- 23 -
2.5 Größenstandards	- 23 -
2.6 Oligonukleotide und Vektoren	- 24 -
2.6.1 Oligonukleotide	- 24 -
2.6.2 Expressionsvektor	- 25 -
2.7 Chemikalien, Puffer, Materialien, Geräte und Software	- 25 -
2.8 Proteinbiochemische Methoden	- 32 -
2.8.1 Produktion von rekombinanten Proteinen in <i>E. coli</i> und affinitätschromatographische Reinigung	- 32 -
2.8.2 Produktion von rekombinanten Proteinen im kleinen Versuchsmaßstab	- 33 -
2.8.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	- 34 -
2.8.4 Silbernitrat-Färbung von separierten Proteinen im SDS-Polyacrylamid-Gel	- 34 -
2.8.5 Konzentrierung und Konzentrationsbestimmung gereinigter Proteine	- 35 -
2.9 Immunologische Methoden	- 35 -
2.9.1 Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)	- 35 -
2.9.2 Westernblot-Analyse	- 37 -

2.9.3	Far-Westernblot-Analyse	- 37 -
2.10	Spezielle Methoden	- 38 -
2.10.1	Bestimmung von Zellkonzentrationen mittels Dunkelfeldmikroskopie	- 38 -
2.10.2	Herstellung von Borrelienzelllysaten	- 38 -
2.10.3	Plasminogen-Aktivierungs-Assay	- 38 -
2.10.4	Fibrinogen-Degradations-Assay	- 39 -
2.10.5	Immunfluoreszenz-Test	- 40 -
2.11	Molekularbiologische Methoden	- 42 -
2.11.1	Reklonierung des GlpQ-kodierenden Gens in den pQE-30 Xa Vektor	- 42 -
2.11.2	<i>In vitro</i> -Mutagenese	- 43 -
2.11.3	Agarose-Gelelektrophorese	- 44 -
2.11.4	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen mit Plasmiden	- 44 -
3	Ergebnisse	- 45 -
3.1	Reinheitsprüfung der affinitätschromatographisch isolierten Proteine	- 45 -
3.2	Untersuchung zum Bindungsverhalten gegenüber Plasminogen	- 46 -
3.3	Untersuchung der konzentrations-abhängigen Bindung von Plasminogen und Vlp15/16-N und GlpQ-C	- 47 -
3.4	Vergleichende Untersuchung zur ionischen Wechselwirkung und der Beteiligung von Lysinen an der Interaktion von Vlp15/16-N und GlpQ-C mit Plasminogen	- 48 -
3.5	Plasminogen-Aktivierungs-Assay	- 52 -
3.6	Fibrinogen-Degradations-Assay	- 54 -
3.7	Generierung von GlpQ-Mutanten mit einzelnen Lysin-Substitutionen	- 57 -
3.7.1	Reklonierung von GlpQ zur Gewinnung einer Variante mit einem N-terminalen His-tag	- 57 -
3.7.2	Deletion der Lysin-Reste in der Aminosäure-Sequenz	- 57 -
3.7.3	Substitution einzelner Lysin-Reste in GlpQ	- 58 -
3.7.4	Plasminogen-Bindungsverhalten der GlpQ-Varianten	- 59 -
3.8	Nachweis der Plasminogen-Bindung an intakten <i>Borrelia miyamotoi</i> -Zellen mit einem Immunfluoreszenz-Test	- 61 -
4	Diskussion	- 63 -
5	Zusammenfassung	- 71 -
5.1	Zusammenfassung	- 71 -
5.2	Summary	- 73 -
6	Literaturverzeichnis	- 75 -

Danksagung	_____	- 87 -
Lebenslauf	_____	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Schriftliche Erklärung	_____	- 88 -
Publikation der Ergebnisse	_____	- 89 -

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Zellmorphologie von <i>Borrelia miyamotoi</i> _____	- 11 -
Abbildung 1.2 Globale Verteilung der <i>B. miyamotoi</i> übertragenden Zecken _____	- 12 -
Abbildung 1.3 Funktionen von Plasminogen/Plasmin _____	- 19 -
Abbildung 3.1 Reinheitsprüfung der aufgereinigten Proteine _____	- 46 -
Abbildung 3.2 Nachweis von Plasminogen-bindenden Proteinen aus <i>B. miyamotoi</i> HT31 _____	- 47 -
Abbildung 3.3 Konzentration-sabhangige Bindung von Plasminogen an Vlp15/16-N und GlpQ-C _____	- 48 -
Abbildung 3.4 Einfluss elektrostatischer Wechselwirkungen auf die Bindung von Plasminogen an Vlp15/16-N und GlpQ-C _____	- 50 -
Abbildung 3.5 Beteiligung von Lysin-Resten von Vlp15/16-N und GlpQ-C bei der Plasminogen-Bindung _____	- 51 -
Abbildung 3.6 Aktivierung von gebundenen Plasminogen zu Plasmin _____	- 53 -
Abbildung 3.7 Degradation von Fibrinogen durch an Vlp15/16 und GlpQ gebundenes Plasmin _____	- 56 -
Abbildung 3.8 Nachweis der inserierten DNA nach Umklonierung _____	- 57 -
Abbildung 3.9 Proteinsequenz des His-getaggten GlpQ-Protein von <i>B. miyamotoi</i> LB-2001 (WP_020954631.1) _____	- 58 -
Abbildung 3.10 Nachweis der Lysin-substituierten GlpQ-Varianten und Reinheitsprüfung isolierter Proteine _____	- 59 -
Abbildung 3.11 Vergleichende Untersuchung zur Plasminogen-Bindung verschiedener GlpQ-Varianten _____	- 60 -
Abbildung 3.12 Plasminogenbindung von GlpQ aus <i>B. recurrentis</i> PAbJ _____	- 61 -
Abbildung 3.13 Nachweis der Bindung von Plasminogen an native <i>B. miyamotoi</i> -Zellen _____	- 62 -
Abbildung 4.1 GlpQ-Sequenzen verschiedener Borrelien-Stämme _____	- 64 -

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1	Verwendete E. coli-Stämme	- 21 -
Tabelle 2.2	Verwendete Borrelien-Stämme	- 21 -
Tabelle 2.3	Verwendete primäre Antikörper	- 21 -
Tabelle 2.4	Verwendete sekundäre Antikörper	- 22 -
Tabelle 2.5	Verwendete Restriktionsendonukleasen	- 22 -
Tabelle 2.6	DNA-Polymerasen	- 22 -
Tabelle 2.7	Weitere Proteine	- 22 -
Tabelle 2.8	Verwendete, gereinigte Borrelienproteine	- 23 -
Tabelle 2.9	Verwendete Reagenzienpackungen	- 23 -
Tabelle 2.10	Verwendete Größenstandards	- 23 -
Tabelle 2.11	Verwendete Oligonukleotide zur Generierung von Proteinvarianten	- 24 -
Tabelle 2.12	Verwendeter Oligonukleotide zur Sequenzierung	- 25 -
Tabelle 2.13	Verwendeter Expressionsvektor	- 25 -
Tabelle 2.14	Verwendete Chemikalien und Substanzen	- 25 -
Tabelle 2.15	Allgemeine Puffer	- 27 -
Tabelle 2.16	Puffer für die Proteinisolierung	- 27 -
Tabelle 2.17	Puffer für die TT-SDS-PAGE	- 29 -
Tabelle 2.18	Puffer für ELISA	- 29 -
Tabelle 2.19	Puffer für den Westernblot	- 30 -
Tabelle 2.20	Spezielle Utensilien	- 30 -
Tabelle 2.21	Geräte	- 30 -
Tabelle 2.22	Software	- 31 -
Tabelle 2.23	Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele	- 34 -
Tabelle 2.24	Lösungen für die Silbernitratfärbung	- 35 -
Tabelle 2.25	Zusammensetzung des Reaktionsansatzes des Plasminogen-Aktivierungs-Assays	- 39 -
Tabelle 2.26	Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für den Fibrinogen-Degradations-Assay	- 40 -
Tabelle 2.27	Glyoxal-Lösung	- 41 -
Tabelle 2.28	Allgemeiner Reaktionsansatz für die Gradienten-PCR	- 43 -
Tabelle 2.29	Bedingungen der Gradienten-PCR	- 43 -
Tabelle 2.30	Reaktionsansatz für die Hydrolyse mit DpnI	- 44 -
Tabelle 3.1	Zusammensetzung der Kontrollen des Fibrinogen-Degradations-Assays	- 55 -
Tabelle 4.1	Bindungseigenschaften Plasminogen-bindender Proteine verschiedener Bakterienspezies	- 65 -

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxidsulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BMD	Borrelia miyamotoi Disease
BSA	Bovine Serum Albumin
DAPI	Diamidin-2-phenylindol
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DPBS⁻⁻	DPBS ohne Ca ²⁺ , ohne Mg ²⁺
DPBS⁺⁺	DPBS mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fbg	Fibrinogen
GlpQ	Glycerophosphodiesterphosphodiesterase
GVB⁺⁺	Gelatine Veronal Buffer mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactopranosid
K_d	Dissoziationskonstante
LBS	Lysine binding site
LPS	Lipopolysaccharid
NK	Negativkontrolle
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
PBS	Phosphate buffered saline
PBS-T	PBS mit Tween 20
PK	Positivkontrolle
Plg	Plasminogen
pNA	para-Nitroanilin
S-2251	H-D-Valyl-L-Leucyl-L-Lysin-p-Nitroanilin-Dihydrochlorid
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TBS-T	TBS mit Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
tPA	Tissue plasminogen activator
TT	Tris/Tricin
TXA	Tranexamsäure
uPA	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator
Vlp	Variable large protein
Vmp	Variable major protein

Vsp	Variable small protein
YT	Yeast Tryptone
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Der Erreger *Borrelia miyamotoi*

1.1.1 Borrelien

Bakterien der Gattung *Borrelia* (benannt nach dem franz. Bakteriologen Amédée Borrel (1867–1936)) zählen zu der Familie der Spirochaetaceae.¹ Es handelt sich bei Borrelien um gramnegative Bakterien, deren Erscheinungsbild insbesondere durch ihre charakteristische Morphologie geprägt ist.¹ Diese zwischen 10 – 30 µm langen Spiralbakterien bewegen sich durch Rotation um ihre eigene Achse fort.^{1,2} Als Reservoirwirte der Borrelien dienen in erster Linie Nagetiere, allerdings kommen auch Rotwild sowie bestimmte Vogelarten in Betracht.^{1,2} Die Übertragung findet über verschiedene Ektoparasiten statt.² Die Gattung der Borrelien gliedert sich taxonomisch in die Borrelien des *Borrelia (B.) burgdorferi* sensu lato Komplexes und die Rückfallfieber-Borrelien. Während Rückfallfieber-Borrelien sowohl von Leder- und Schildzecken als auch Läusen übertragen werden können, beschränkt es sich bei den Vektoren des *Borrelia burgdorferi* sensu lato Komplexes in erster Linie auf Schildzecken.^{3,4} Das Krankheitsbild der Lyme-Borreliose wird durch Borrelien des *Borrelia burgdorferi* sensu lato Komplexes verursacht, wohingegen Rückfallfieber-Borrelien die Erreger des namensgebenden Rückfallfiebers sind.^{1,3}

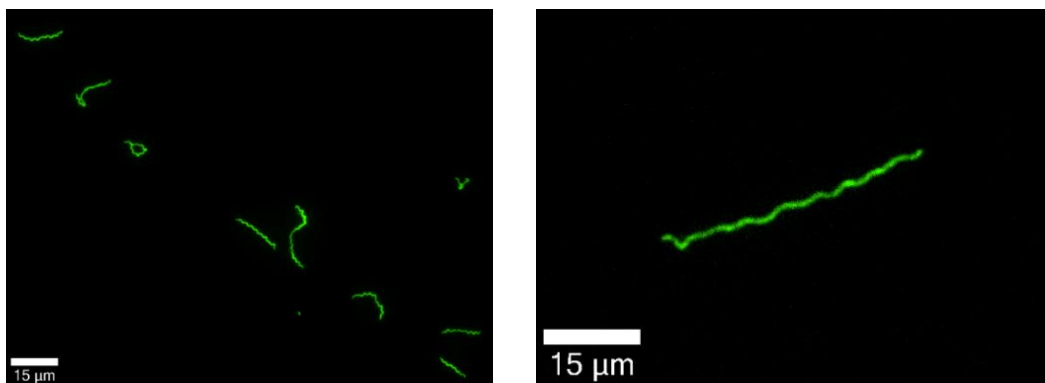


Abbildung 1.1 Zellmorphologie von *Borrelia miyamotoi*

Charakteristische, spiralförmige Morphologie von *B. miyamotoi* HT31 mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie. Übersichtsaufnahme (links), Nahaufnahme einer sich teilenden Borrelienzelle (rechts).

1.1.2 *Borrelia miyamotoi*

Wie bereits erwähnt, lassen sich Borrelien in die Gruppe des *B. burgdorferi* sensu lato Komplexes und die der Rückfallfieber-Borrelien klassifizieren.^{3,4} *B. miyamotoi* zählt zur Gruppe Rückfallfieber-Borrelien.⁵ Dieses Bakterium, welches erstmals im Jahr 1995 von Fukunaga et al. beschrieben wurde, erhielt seinen Namen nach Professor Kenji Miyamoto und wurde in *Ixodes persulcatus* Zecken nachgewiesen.⁶ Der eindeutige Nachweis des humanpathogenes Potentials von *B. miyamotoi* wurde jedoch erst 16 Jahre später im Jahr 2011 durch eine Fallserie aus Russland erbracht.⁷

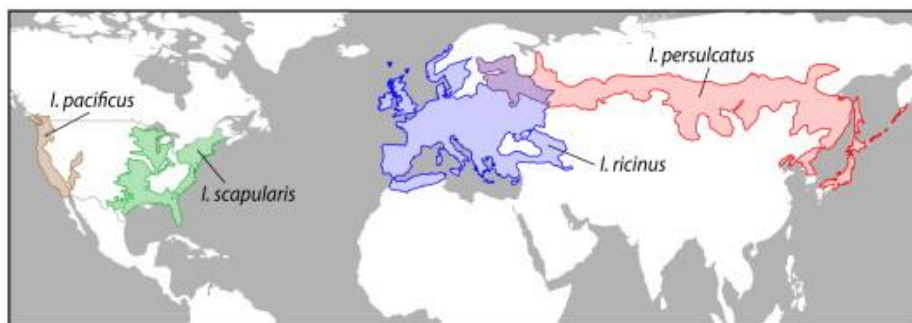


Abbildung 1.2 Globale Verteilung der *B. miyamotoi* übertragenden Zecken

Dargestellt ist das Vorkommen der verschiedenen Zeckenspezies, welche *B. miyamotoi* übertragen können. In Nordamerika handelt es sich dabei um *Ixodes pacificus* und *I. scapularis*, auf dem eurasischen Kontinent um *I. ricinus* und *I. persulcatus*. Abbildung entnommen aus Krause et al. 2015.⁸

Inzwischen ist bekannt, dass für *B. miyamotoi* auf der nördlichen Hemisphäre auch andere Vektoren als *Ixodes persulcatus* infrage kommen.⁸ So wird *B. miyamotoi* in Nordamerika durch *Ixodes pacificus* und *I. scapularis*, in Europa durch *I. ricinus* und in Eurasien durch *I. persulcatus* übertragen (Abbildung 1.2). Diese Zecken-Arten sind zugleich Überträger von Lyme-Borreliose verursachenden Borrelien des *B. burgdorferi* sensu lato Komplexes.⁸ Die Zecken können sich dabei prinzipiell auf zweierlei Weisen mit *B. miyamotoi* infizieren. Zum einen ist eine transovariable Übertragung von *B. miyamotoi* von einer Zecken-Generation auf die nächste möglich, was im Fall von *I. persulcatus* bereits bestätigt werden konnte.⁹ Da diese Art der Verbreitung vermutlich langfristig nicht zum Erhalt von *B. miyamotoi* ausreicht,^{10,11} können Zecken während des Saugaktes am infizierten Wirt die Bakterien aufnehmen. Dabei wurden bisher Nagetiere wie die Weißfußmaus (*Peromyscus leucopus*),^{11,12} aber auch Vögel¹³ als Reservoirwirte nachgewiesen.

Der Anteil der mit *B. miyamotoi* infizierten Zecken rangiert im Durchschnitt zwischen 1 – 2 %.^{3,5,14-17} Allerdings finden sich auch bestimmte Regionen mit besonders

hoher Inzidenz an infizierten Zecken. So wurde in Kalifornien in Napa County für *I. pacificus*-Zecken eine Infektionsrate von 15,4 % und in Kurgan (Russland) eine Infektionsrate von 16 % der *B. miyamotoi*-positiven Zecken (*I. persulcatus*) dokumentiert.^{7,14}

Übertragung und Pathogenese

Eine mit *B. miyamotoi* infizierte Zecke trägt den Erreger in ihren Speicheldrüsen und kann die Bakterien bereits beim Stechen auf den Wirt übertragen.¹⁸ Im Gegensatz dazu müssen die Erreger der Lyme-Borreliose zunächst aus dem Mitteldarm der Zecke in die Speicheldrüsen wandern, um dann in den Wirt übertragen werden zu können. Dies kann bis zu 48 Stunden in Anspruch nehmen.¹⁹⁻²¹ Zwar steigt auch im Fall von *B. miyamotoi* die Wahrscheinlichkeit für eine Infektion mit zunehmender Dauer des Saugaktes, allerdings findet bereits nach einer deutlich kürzeren Zeit (innerhalb von 24 Stunden) eine Übertragung statt.²² Die Wahrscheinlichkeit, dass sich ein Mensch durch eine mit *B. miyamotoi*-positiven Zecke infiziert, wird auf etwa 8,3 % geschätzt und ist somit vergleichbar mit – wenn nicht sogar etwas höher – als bei den Lyme-Borrelien.²³⁻²⁶ Allein in den Niederlanden wird von jährlich etwa 36.000 Personen ausgegangen, die von Zecken gestochen werden, welche mit *B. miyamotoi* infiziert sind.²⁷ Vor diesem Hintergrund ist davon auszugehen, dass die Häufigkeit der Infektion bisher weitestgehend unterschätzt wurde und eine Behandlung einer *B. miyamotoi*-Infektion nur selten in Erwägung gezogen wird.²⁸

B. miyamotoi verfügt über verschiedene Immunescape-Mechanismen, um nach Infektion im menschlichen Wirt dauerhaft zu persistieren. Zu den Immunescape-Mechanismen zählt z.B. die Bindung des Komplementregulators Faktor H an die Spirochätenoberfläche, wodurch die Komplementaktivierung unterbunden wird und so der Erreger der Komplement-vermittelten Lyse entgeht.²⁹⁻³¹ Zudem besitzt *B. miyamotoi* die Proteine FbpA und FbpB aus, welche die Komplementkomponenten C1r binden können. Für FbpA und FbpB konnte für einen Serum-sensitiven *B. burgdorferi*-Stamm eine Protektion vor Komplement-vermittelter Lyse gezeigt werden.³² Zudem scheint die Bindung von Vitronectin durch das Protein BOM1093 eine Rolle für die Serumresistenz von *B. miyamotoi* zu spielen.³³ Ein weiterer Mechanismus besteht in der Fähigkeit der Borrelien zur Antigenvariation und der Produktion von sogenannten „Variable Membrane Proteins (Vmp)“ auf der Zelloberfläche, welche eine zielgerichtete Immunantwort des Wirts

erschweren.³⁴ Zudem wurde bei *B. miyamotoi* ein Plasminogen-bindendes Protein, CbiA nachgewiesen.³⁵ Das an CbiA gebundene Plasminogen kann zu Plasmin aktiviert werden und trägt somit zur Degradierung der Komponenten der extrazellulären Matrix bei.³⁵ Die Bindung von Plasminogen könnte also die Penetration in tiefer liegende Gewebeschichten begünstigen und somit zur Dissemination des Erregers in extravaskuläre Gewebe beitragen.³⁵⁻³⁸ Darüber hinaus besitzt Plasmin eine Komplement-inhibierende Wirkung, indem es die Komplementkomponenten C3, C3b und C5 degradiert,³⁹ was letztlich zu Synergie-Effekten mit den zuvor beschriebenen Immunescape-Mechanismen von *B. miyamotoi* führen könnte. Nicht zuletzt könnte dieser Mechanismus auch bei der Überwindung der Blut-Hirn-Schranke in immunkomprimierten Patienten zum Tragen kommen, die aufgrund einer Infektion mit *B. miyamotoi* eine Meningoenzephalitis entwickelten.⁴⁰⁻⁴² Das Entkommen des Erregers in immunprivilegierten Nischen wie zum z.B. das ZNS könnte sich positiv auf die Persistenz im humanen Wirt auswirken.^{43,44}

Klinik

Die durch eine Infektion mit *B. miyamotoi* hervorgerufene Infektionskrankheit wird als „hard tick-borne relapsing fever (HTBRF)“ oder „*B. miyamotoi* disease (BMD)“ bezeichnet.^{45,46} Die Erkrankung ist durch Fieber, das intermittierend verlaufen kann, Kopfschmerzen, Fatigue, Übelkeit, Schüttelfrost sowie Myalgien und Arthralgien geprägt.^{7,30,47,48} Dabei treten die für Rückfallfieber-Borrelien sonst typischen intermittierenden, hohen Fieberschübe eher vereinzelt auf.^{5,7,49} In der Fallserie aus Russland wurde bei fünf der insgesamt 46 Patienten mit BMD von rezidivierenden Fieberschüben berichtet, welche im Schnitt 3,4 Tage andauerten und durch ein fieberfreies Intervall von 9 Tagen unterbrochen wurden.⁷ Hiervon erlitt ein Patient zwei Fieber-begleitete Rückfälle bevor er ins Krankenhaus eingeliefert wurde und für die restlichen vier Patienten konnte jeweils ein Rückfall vor einer antibiotischen Therapie verzeichnet werden. Es ist denkbar, dass durch die antibiotische Therapie weitere Fieber-Rückfälle verhindert wurden.⁷ Die Fieberintervalle hatten sich jeweils in Höhe und Dauer nicht signifikant voneinander unterschieden. Insgesamt lag das Fieber der 46 untersuchten Patienten mit BMD bei bis zu 39,5 °C.⁷

Besonders schwerwiegende Verläufe von BMD mit Beteiligung des ZNS und daraus resultierender Meningoenzephalitis sowie Gedächtnisproblemen und Gangunsicherheit waren bis zum Jahr 2018 nur bei immunsupprimierten Patienten beschrieben.⁴⁰⁻⁴² Jedoch

geht aus einem Fallbericht aus Schweden hervor, dass *B. miyamotoi* wohl auch in immunkompetenten Patienten das ZNS befallen kann.⁵⁰ Folglich solle BMD in Fällen von Fieber und neurologischer Symptome nach einem Zeckenstich sowohl in immunsupprimierten als auch immunkompetenten Patienten als Differentialdiagnose in Erwägung gezogen werden.⁵⁰

Diagnostik

Die diagnostischen Mittel, derer man sich zum Nachweis einer *B. miyamotoi*-Infektion bedienen kann, sind von der Dauer der Infektion abhängig.⁵ In der Akut-Phase der Erkrankung kann der Nachweis des Erregers im Blut oder im Liquor mittels Mikroskopie oder PCR-Verfahren erfolgen.⁵ Für den mikroskopischen Nachweis muss die Konzentration der Borrelien jedoch $\geq 10^4$ Zellen pro Milliliter betragen. Als Färbetechniken kommen die Giemsa- oder Wright-Färbung infrage sowie der „Dicke Tropfen“ wie bei der Malaria-Diagnostik.⁸ Dadurch kann eine Infektion auch bei einer geringeren Erregerkonzentration nachgewiesen werden.⁸ In der Dunkelfeldmikroskopie und Phasenkontrastmikroskopie können die Spirochäten zudem aufgrund ihrer charakteristischen Motilität nachgewiesen werden.⁸ Für den Nachweis mittels PCR dienen Oligonukleotide, die zur Amplifikation von Genfragmenten des 16S ribosomale RNA-Gens, des *flaB*- oder des *glpQ*-Gen von *B. miyamotoi* dienen.^{11,41,42,51} Da die Erreger-Konzentration mit dem vierten Tag der Infektion jedoch drastisch abnimmt, sind diese Verfahren ab diesem Zeitpunkt aufgrund der geringen Sensitivität nicht mehr erfolgversprechend.⁵² Es ist jedoch denkbar, dass die beiden Verfahren im späteren Verlauf der Erkrankung wieder von Bedeutung sein können,⁵ da es zu rezidivierenden Fieberschüben kommen kann und die Erregerkonzentration im Blut zunimmt.^{5,7,49} Zudem kann durch Konzentrierung der Blutproben die Sensitivität dieser Methoden gesteigert werden.⁵³

Ein serologisches Nachweisverfahren bietet den Vorteil, trotz einer geringen Erregerkonzentration eine Infektion nachweisen zu können, insofern Antikörper während des Krankheitsverlaufes gebildet wurden. Somit kann die *in vitro* Diagnostik sowohl während der akuten als auch nach einer überstandenen Infektion zum Tragen kommen.⁵⁴⁻⁵⁶ Hierfür bieten sich immunologische Tests (in Form von ELISA oder Western-Blot) an, bei denen Antikörper gegenüber GlpQ (Glycerophosphodiester phosphodiesterase) nachgewiesen werden. Dieses wird zwar von Rückfallfieber-Borrelien gebildet, jedoch

nicht von Lyme-Borrelien des *B. burgdorferi* sensu lato-Komplexes.⁵⁶ Somit kann zwischen einer Lyme-Borreliose und einer Infektion mit Rückfallfieber-Borrelien differenziert werden. Jedoch ist GIpQ nicht *B. miyamotoi* spezifisch und somit kann hierdurch keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden, mit welcher Rückfallfieber-Borrelienspezies oder anderen humanpathogenen Bakterien der Patient infiziert ist.⁵⁷ Allerdings stehen derzeit keine kommerziellen Antigen- bzw. Antikörpertests zur Verfügung.

Die Kultivierung von *B. miyamotoi* ist extrem anspruchsvoll und bedarf spezieller Flüssigmedien wie zum Beispiel einem sogenannten modifizierten Kelly-Pettenkofer-Medium (MKP),^{58,59} dem BSK-M-Medium⁶⁰ oder Medien, die mit einem Anteil von 50 % an humanem Serum versetzt sind.⁶¹ Eine wochenlange Kultivierung, gemessen an alternativen Optionen, ist für den klinischen Alltag ungeeignet und ist Speziallaboratorien vorbehalten.

Therapie

Die Therapie einer *B. miyamotoi*-Infektion orientiert sich an der der Lyme-Borreliose.⁵ Aus beschriebenen Fallserien geht hervor, dass zur Therapie Antibiotika wie Doxycyclin,^{7,47} Penicillin G,⁴¹ Ceftriaxon,^{7,40,42,62} und Minocyclin⁶² appliziert wurden. Doxycyclin wurde häufig bei Patienten mit einem unkomplizierten Verlauf für 7 bis 14 Tage (100 mg oral alle 12 Stunden) eingesetzt.^{7,41,54,55,63} Im Fall von schweren Verlaufsformen wie z.B. einer Meningoenzephalitis wurde intravenös Ceftriaxon (2 g einmal täglich) für zwei Wochen oder Penicillin G (24 Millionen U/Tag) für vier Wochen verabreicht.⁸ Als Alternative zu Doxycyclin und anderen Tetracyclinen, welche für Schwangere, stillende Mütter und Kinder kontraindiziert sind, kann auf Amoxicillin oder Cefuroxim zurückgegriffen werden.⁸ Azithromycin käme zur Behandlung zwar theoretisch infrage; jedoch haben sich Makrolide im Allgemeinen als weniger effektiv in der Behandlung von Borrelien-Infektionen gezeigt als Tetracycline und die meisten Beta-Laktam-Antibiotika.⁸ Aufgrund früherer Studien zur Therapie der Lyme-Borreliose ist davon auszugehen, dass *B. miyamotoi* eine Toleranz gegenüber Fluorchinolonen und Aminoglykosiden aufweist.^{8,64-66} Zudem konnte in *in vitro*-Untersuchungen eine Resistenz von *B. miyamotoi* gegenüber Amoxicillin im Vergleich zu *B. burgdorferi* sensu lato nachgewiesen werden.⁶⁷ Nichtsdestotrotz kam Amoxicillin bereits unter anderem in

Kombination mit anderen Antibiotika erfolgreich zum Einsatz,⁶⁸ sodass zur endgültigen Therapieempfehlung weiterführende Studien notwendig sind.⁶⁷

Eine ernst zu nehmende mögliche Komplikation der anti-mikrobiellen Therapie ist die Jarisch-Herxheimer-Reaktion, die nach dem Beginn der Antibiose einsetzen kann. Bei den mit *B. miyamotoi* infizierten Patienten aus Russland trat diese Form der Komplikation in 15 % der Fälle auf.⁷

Prävention

Für die präventiven Maßnahmen gelten die gleichen Empfehlungen wie für andere Zecken-übertragene Krankheitserreger wie zum Beispiel die der Lyme-Borreliose.⁸ So empfehlen die Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung sowie das Robert-Koch-Institut das Tragen von langer, geschlossener Kleidung solange man sich im hohen Gras oder Unterholz aufhält. Zudem könnten sogenannte Repellentien einen zusätzlichen, wenn auch zeitlich begrenzten Schutz vor den Zecken bieten. Zudem solle man den Körper nach dem Aufenthalt im Freien nach Zecken absuchen und diese möglichst zügig entfernen. Die präferierten Stichstellen der Zecken sind der Haaransatz, Ohren, Hals, Achseln, Ellenbeuge, Bauchnabel, Genitalbereich oder Kniekehle.⁶⁹⁻⁷¹

1.2 Die Proteine GlpQ und Vlp15/16 von *B. miyamotoi*

Eigenschaften des GlpQ-Proteins

Das GlpQ-Protein (Glycerophosphodiester Phosphodiesterase) kommt neben anderen Bakterienspezies, wie z. B. *E. coli* und *Haemophilus influenzae*, insbesondere bei Rückfallfieber-Borrelien vor, jedoch nicht bei Borrelien des *B. burgdorferi* sensu lato Komplexes, was eine Differenzierung für die Diagnostik beider Infektionskrankheiten ermöglicht (1.1.2).⁷² Da GlpQ bei der Hydrolyse von Phospholipiden beteiligt ist und somit auf ATP sparende Weise Glycerinaldehyd-3-phosphat für den Zellmetabolismus gewonnen werden kann, wird angenommen, dass die zusätzlich Energiegewinnung und die Bereitstellung von Glukose über die Gluconeogenese den Rückfallfieber-Borrelien einen Vorteil verschafft, der die höhere Erregerkonzentration im Blut erklären könnte.⁷² Je nach Bakterienspezies ist GlpQ in *E. coli* im Periplasma lokalisiert,⁷³ in *Haemophilus influenzae* auf der äußeren Membran⁷⁴ und in *Treponema pallidum* in der äußeren Membran⁷⁵ oder aber im periplasmatischen Raum.⁷⁶ Aufgrund der unterschiedlichen Lokalisation ist bisher ungeklärt, ob GlpQ unterschiedliche Funktionen innerhalb der

Bakterienzelle innehat und somit zu den sogenannten „Moonlighting-Proteinen“ gezählt werden könnte. Dabei handelt es sich um Proteine, welche mehr als eine Funktion ausüben, ohne dass dabei das ursprüngliche Protein durch Proteolyse oder posttranskriptionale Modifikation verändert wird. D. h., dass z. B. molekulare Veränderungen (Genfusionen oder eine Proteolyse) in mehrere Fragmente nicht mit der Multifunktionalität einhergehen.⁷⁷ So konnte für intrazelluläre Proteine bereits eine Plasminogenbindung auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden.⁷⁸ Dazu zählen Aspartase⁷⁹ von *H. influenzae*, DnaK von *Mycobacterium tuberculosis*⁸⁰ und *Neisseria meningitidis*⁸¹, Enolase⁸² von *B. burgdorferi* und GAPDH⁸³ und Endopeptidase O⁸⁴ von *Streptococcus pneumoniae*, welche als intrazelluläre Proteine auf der äußeren Membran Plasminogen binden. Da in ersten Untersuchungen eine Plasminogenbindung für GlpQ nachgewiesen werden konnte,⁸⁵ scheint GlpQ sich möglicherweise in die Gruppe multifunktionaler, Plasminogen-bindender Proteine einzureihen.

Das Vlp15/16-Protein von *B. miyamotoi*

Das Vlp15/16-Protein von *B. miyamotoi* gehört zu den sogenannten „Variable major proteins (Vmp)“, welche sich in die „Variable large proteins (Vlp)“ und die „Variable small proteins (Vsp)“ unterteilen lassen. Die monomeren Vlps besitzen eine molekulare Masse von etwa 40 kDa, wohingegen die monomeren Vsps eine molekulare Masse von etwa 20 kDa aufweisen.^{45,86,87} Beide Proteinfamilien werden von Genen, die auf linearen Plasmiden lokalisiert sind, codiert.⁸⁷ Mithilfe dieser immunogenen Oberflächenproteine ist es den Borrelien durch nicht-reziproken Gentransfer möglich, die Vmp-Proteine auf der Zelloberfläche zu variieren und dadurch verschiedene Serotypen auszubilden, welche dem Erreger ermöglichen, der Antikörperantwort des Wirts zu entgehen.⁸⁸⁻⁹¹ Da mehrere Serotypen in einer Borrelienpopulation vorkommen können und pro Bakterienzelle zu jedem Zeitpunkt der Infektion immer nur ein immunogenes Vmp-Protein exprimiert wird,⁸⁸ kann die überlebende Subpopulation erneute Fieberanstiege und somit das typische klinische Bild des Rückfallfiebers verursachen.^{92,93}

1.3 Plasminbindung als Pathogenitätsfaktor von Borrelien

Im fibrinolytischen System, dessen Aufgabe es ist, Fibringerinnsel aufzulösen, nimmt die Serinprotease Plasmin die zentrale Funktion ein.³⁸ Aufgrund ihres breiten Wirkungsspektrums als relativ unspezifische Serinprotease ist Plasmin an zahlreichen weiteren physiologischen wie auch pathologischen Prozessen beteiligt, wie zum Beispiel

der Zellmigration, Gewebs-Remodeling, Thrombolyse, Wundheilung und der Ausbreitung von Krebszellen.³⁸ Plasminogen als Vorstufe des Plasmins ist ein in der Leber hergestelltes Glykoprotein, welches mit einer Konzentration von etwa 2 μM im Plasma vorliegt.⁹⁴ Die Aktivierung zu Plasmin erfolgt durch die Proteolyse der Peptidbindung zwischen Arg₅₆₁-Val₅₆₂ durch das Enzym „tissue-type Plg activator (tPA)“ oder „urokinase-type Plg activator (uPA)“.³⁸ Aus der Proteolyse ergeben sich zwei, über eine Disulfidbrücke verbundene, Ketten. Die N-terminale α -Kette, die in ihren sogenannten „kringle domains“ die Lysin-Bindungsstellen beinhaltet, und die β -Kette, welche die katalytische Serin-Protease-Region enthält.³⁸ Die Aktivierung von Plasminogen wird durch „Serpine Plg inhibitor type 1“ (PAI-1) und PAI-2 inhibiert. PAI-2 wirkt dabei insbesondere auf uPA.⁹⁵⁻⁹⁷ Als direkter Inhibitor von aktiviertem Plasmin fungiert α 2-Antiplasmin, welches kovalent an die Kringle-Domänen bindet. Sobald Plasmin jedoch an einen Rezeptor bindet, ist es vor Inaktivierung durch α 2-Antiplasmin geschützt.⁹⁸⁻¹⁰⁰

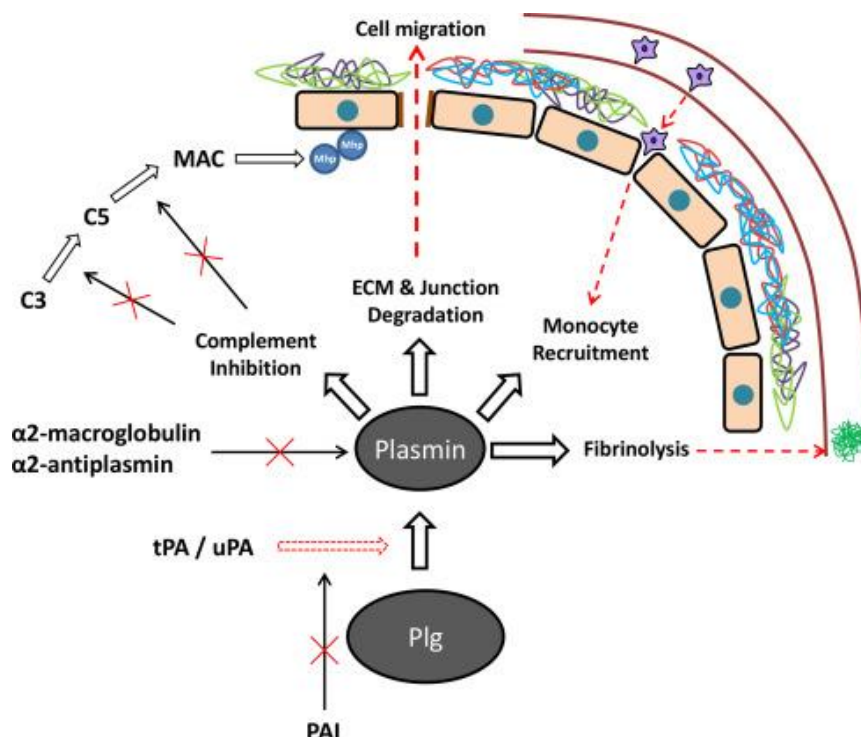


Abbildung 1.3 Funktionen von Plasminogen/Plasmin

Das Plasminogen wird mithilfe von tPA oder uPA zu Plasmin aktiviert, wohingegen PAI (Plasminogen activator inhibitors) der Aktivierung entgegenwirkt. Das Plasmin selbst wird wiederum von α 2-Macroglobulin und α 2-Antiplasmin inhibiert. Neben seiner Funktion in der Fibrinolyse kann Plasmin auch zur Spaltung von extrazellulären Matrixkomponenten (EZM-Komponenten) sowie der Komplementkomponenten C3 und C5 dienen. Die Bindung von Plasmin an mononukleäre Zellen führt zu einer erhöhten Expression an proinflammatorischen Zytokinen und ist daher an der Chemotaxis beteiligt. Abbildung entnommen aus Raymond und Djordjevic 2015.⁹⁹

Das breite Wirkungsspektrum von Plasmin nutzen verschiedene pathogene Bakterien zu ihrem eigenen Vorteil, um Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM) zu degradieren, zur Immunevasion sowie zur Dissemination des Erregers im infizierten Wirt.^{36,101-105} Darüber hinaus wirkt Plasmin auch indirekt durch die Aktivierung von Matrix-Metalloproteasen auf die EZM-Degradation ein.¹⁰⁶ Auch das Passieren der Blut-Hirn-Schranke und einer Infektion des ZNS, wie es für einige Borrelienspezies beschrieben ist, ließe sich durch Akquisition von Plasmin erklären.^{38,107} Für Borrelien konnte nachgewiesen werden, dass die Interaktion von Plasminogen über dessen Kringle-Domänen vorzugsweise mit Lysin-Reste des betreffenden bakteriellen Proteins mediiert wird.^{101,108-112} Da Borrelien über keine endogenen Plasminogenaktivatoren verfügen, sind sie auf die Akquisition von uPA oder tPA aus ihrer Umgebung angewiesen.^{101,109,111-113} Hierfür binden Borrelien möglicherweise auch uPA auf ihrer Zelloberfläche, um lokal eine erhöhte Konzentration von Plasminogen-Aktivatoren zu erzielen.¹¹³

1.4 Fragestellung

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit sollen zwei Proteine von *B. miyamotoi* auf ihre Eigenschaft, Plasminogen zu binden, detaillierter untersucht werden. Erste Daten lassen darauf schließen, dass das an der Oberfläche der Bakterienzelle exponierte, immundominante Protein Vlp15/16 und das für diagnostische Zwecke verwendete GlpQ-Protein (Glycerophosphodiester phosphodiesterase) in der Lage sind, Plasminogen zu binden.⁸⁵ Aufbauend auf diesen Daten soll die Interaktion von Vlp15/16 und GlpQ mit Plasminogen funktionell charakterisiert werden. Darüber hinaus soll untersucht werden, ob Plasminogen nach seiner Bindung zu Plasmin aktiviert und sein natürliches Substrat Fibrinogen degradieren kann. Zudem soll die Beteiligung von Lysin-Resten an der Bindung näher beleuchtet und die mit Plasminogen interagierende Bindungsstelle lokalisiert werden. Abschließend soll mittels Immunfluoreszenzmikroskopie die Bindung von Plasminogen an intakten Borrelienzellen nachgewiesen werden. Dies könnte die Hypothese, dass *B. miyamotoi* die Blut-Hirn-Schranke des Wirtes passieren kann, zusätzlich untermauern.

2 Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme

2.1.1 *Escherichia coli*

Tabelle 2.1 Verwendete *E. coli*-Stämme

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz, Quelle
NEB® 5-alpha Competent <i>E. coli</i> (High Efficiency)	fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17	New England Biolabs Inc., C2987H
BL21 (DE3) Competent <i>E. coli</i>	fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHIo ΔEcoRI- B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5	New England Biolabs Inc., C2527H

2.1.2 Borrelien

Tabelle 2.2 Verwendete Borrelien-Stämme

Bakterienstamm	Passage	Referenz, Quelle
<i>Borrelia miyamotoi</i> HT31	25 bis 46	Prof. Dr. Peter Kraicz ^{31,61}

2.2 Antikörper

Tabelle 2.3 Verwendete primäre Antikörper

Antikörper	Antigen	Eigenschaft	Referenz, Quelle
Anti-Fibrinogen	Fibrinogen	Polyklonal	Acris Antibodies, AP09017PU-N
Anti-Plasminogen	Plasminogen	Polyklonal	Acris Antibodies, R1598
Anti-His AK	Hexahistidin	Polyklonal	GE Healthcare, 27471001

Tabelle 2.4 Verwendete sekundäre Antikörper

Antikörper	Konjugat	Ursprung	Eigenschaft	Referenz, Quelle
Anti-Maus-Immunoglobulin	Meerrettichperoxidase	Kaninchen	Polyklonal	DAKO Cytomation, P0260
Anti-Ziege-Immunoglobulin	Meerrettichperoxidase	Kaninchen	Polyklonal	DAKO Cytomation, P0449

2.3 Proteine

Tabelle 2.5 Verwendete Restriktionsendonukleasen

Protein	Erkennungssequenz (5' → 3')	Referenz, Quelle
<i>Bam</i>HI	GGATCC	New England Biolabs Inc., R0136S
<i>Sal</i>I	GTCGAC	New England Biolabs Inc., R0138S
<i>Dpn</i>I	G[A-CH ₃]TC	New England Biolabs Inc., R0176S

Tabelle 2.6 DNA-Polymerasen

Protein	Referenz, Quelle
HiFi DNA-Polymerase	PCR Biosystems, PB10.41-02
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Invitrogen, 10342-020

Tabelle 2.7 Weitere Proteine

Protein	Referenz, Quelle
T4-DNA-Ligase	New England Bio Labs, M0202S
BSA	Sigma Aldrich, A7030
Purified BSA	New England Biolabs Inc., B9001S
Fibrinogen	Sigma Aldrich, F3879
Human Glu-Plasminogen	Heamatologic Technologies, HCPG-0130
uPA	Millipore, CC4000

Tabelle 2.8 Verwendete, gereinigte Borrelienproteine

Protein	Referenz
BBA70	Koenigs et al. 2013 ¹¹⁴
Vsp1	Prof. Joppe Hovius (AMC, Niederlande)
Vlp15/16-N	Schmidt et al., 2021
Vlp15/16-C	Prof. Joppe Hovius (AMC, Niederlande)
Vlp18-C	Prof. Joppe Hovius (AMC, Niederlande)
GlpQ	Prof. Joppe Hovius (AMC, Niederlande)
CbiA	Röttgerding et al., 2017; Nguyen et al. 2018 ^{29,35}
CspA	Hallström et al., 2013; Hammerschmidt et al., 2014 ^{115,116}

2.4 Verwendete Reagenzienpackungen

Tabelle 2.9 Verwendete Reagenzienpackungen

Name	Verwendung	Referenz, Quelle
MinElute Reaction Cleanup Kit	Reinigung von DNA	Qiagen, 28206
Micro BCA Protein Assay Kit	Bestimmung der Proteinkonzentration	Thermo Fischer Scientific, 23235
Monarch Plasmid Miniprep Kit	Isolierung von Plasmiden	New Englands Biolabs, #T1010L
QIAquick PCR Purification Kit	Reinigung von PCR-Amplifikaten	Qiagen, 28106

2.5 Größenstandards

Tabelle 2.10 Verwendete Größenstandards

Name	Verwendung	Referenz, Quelle
1 kBp DNA Ladder	Agarose-Gelelektrophorese	New England Biolabs Inc., N3232S
Precision Plus Protein Standards Dual Color	SDS-PAGE (Westernblot)	Bio-Rad, 161-0374
Precision Plus Protein Unstained Protein Standards	SDS-PAGE (Silbernitrat-Färbung)	Bio-Rad, 161-0363

2.6 Oligonukleotide und Vektoren

2.6.1 Oligonukleotide

Table 2.11 Verwendete Oligonukleotide zur Generierung von Proteinvarianten

Name	Sequenz (5' → 3')	Funktion	Referenz, Quelle
GlpQ_Bmiya Bam	GATATACATATGGCTGG ATCCTTTAAACAAGAAA TGGG	Umklonierung des His-Tag von GlpQ	Sigma- Aldrich
GlpQ_Bmiya Sal	GTGGTGGTCGACCTATT TTTTTATGAAATTCATTA CTGTG	Umklonierung des His-Tag von GlpQ	Sigma- Aldrich
GlpQ_K333- Stop_FP	GACACAGTAATGAATTT CATATAAAAATAGGTCG ACCTG	Insertion eines Stoppcodons an Position 333	Sigma- Aldrich
GlpQ_K333- Stop_RP	GCTGCAGGTCGACCTAT TTTATATGAAATTCATT ACTG	Insertion eines Stoppcodons an Position 333	Sigma- Aldrich
GlpQ_K333A_FP	GACACAGTAATGAATTT CATAGCAAATAGGTCG ACCTG	Aminosäure- substitution an Position 333 (Lysin → Alanin)	Sigma- Aldrich
GlpQ_K333A_RP	GCTGCAGGTCGACCTAT TTTGCTATGAAATTCAT TACTG	Aminosäure- substitution an Position 333 (Lysin → Alanin)	Sigma- Aldrich
GlpQ_K334A_FP	GACACAGTAATGAATTT CATAAAAGCATAGGTCG ACCTG	Aminosäure- substitution an Position 334 (Lysin → Alanin)	Sigma- Aldrich
GlpQ_K334A_RP	GCTGCAGGTCGACCTAT GCTTTTATGAAATTCAT TACTG	Aminosäure- substitution an Position 334 (Lysin → Alanin)	Sigma- Aldrich
GlpQ_K333A- K334A_FP	GACACAGTAATGAATTT CATAGCAGCATAGGTCG ACCTG	Aminosäure- substitution an Position 333-334 (Lysin → Alanin)	Sigma- Aldrich
GlpQ_K333A- K334A_RP	GCTGCAGGTCGACCTAT GCTGCTATGAAATTCAT TACTG	Aminosäure- substitution an Position 333-334 (Lysin → Alanin)	Sigma- Aldrich

Tabelle 2.12 Verwendeter Oligonukleotide zur Sequenzierung

Bezeichnung	Sequenz in 5' → 3'	Verwendungszweck
pQE_FP_30	CTGAGGTCATTACTGGATCTATC	Sequenzierung des pQE-Vektors

2.6.2 Expressionsvektor

Tabelle 2.13 Verwendeter Expressionsvektor

Name	Eigenschaft	Hersteller, Art.-Nr.
pQE-30 Xa	3,5 kb; Ampicillin-Resistenz	Qiagen, 33203

2.7 Chemikalien, Puffer, Materialien, Geräte und Software

Tabelle 2.14 Verwendete Chemikalien und Substanzen

Substanz	Referenz, Quelle
Aceton	Sigma-Aldrich, 32201
Acrylamid 2K	AppliChem, A1089,1000
Agarose	Roth, 3810.3
6-Aminohexansäure	Sigma-Aldrich, 07260
APS	Roth, 9592.2
Ampicillin	Roth, K029.1
Bisacrylamid 2K	AppliChem, A1096,0500
Blocking Buffer III BSA	AppliChem, A7252
BSK-H <i>Borrelia</i> Growth Medium ohne L-Glutamin	Bio&Sell, BS 2.12.OL.500
DMEM, High Glucose, GlutaMAX Supplement, Pyruvate	Gibco, 31966-021
DAPI	Calbiochem®, Nr.5087410001
DPBS ⁻	Gibco, 14190-094
DPBS ⁺⁺	Gibco, 14040-091
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem, A2948
EDTA	Honeywell, Fluka, 34549-1KG
Essigsäure	Fisher chemical, A/0400/PB17
Ethanol	Sigma-Aldrich, Nr. 32221-2.5L-M
Formaldehyd (36,5%)	Riedel de Haen, 33220
Gelatine	AppliChem, A1693,0500
Glutaraldehyd-Lösung (25%)	Sigma-Aldrich, G6257-100ML
Glycerol	Labo-Chem, LC-4522.2
Glyoxal-Lösung (40%)	Sigma-Aldrich, 128465-100G

HisPur™ Ni-NTA Resin	Thermo-Fisher-Scientific, 88221
Imidazol	Roth, 3899.2
IPTG	Roth, 2316,3
Kaliumhydroxid	AppliChem, A2180
Kaliumdihydrogenphosphat	AppliChem, A3095
LB-Agar	Roth, X969.1
Lysozym	Sigma-Aldrich, L6876
Magermilchpulver	Frema Reform, 0203 V03
β-Mercaptoethanol	AppliChem, A1108,0100
Methanol	Fisher Scientific UK, M/4000/PC17
Natriumacetat	Roth, 6773.1
Natriumazid	Sigma-Aldrich, 71289-506
Natriumbromid	AppliChem, A2404
Natriumcarbonat	Roth, 8563.1
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, 31434-1KG-M
Natriumdihydrogenphosphat	AppliChem, 131965.1210
Natriumhydrogenphosphat	AppliChem, A1046
Natriumhydroxid	VWR Chemicals, 31627.290
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	AppliChem, A1883.1000
Ortho-Phenylendiamin	Sigma-Aldrich, P5412-100TAB
Proteaseinhibitor Cocktail Tablets	Roche, 04693124001
S-2251	Sigma-Aldrich, V7127-5MG
Salzsäure	Sigma-Aldrich, Nr. 30721-1L
Schwefelsäure	Applichem, A1446,1000
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth, CN30.3
Silbernitrat	Sigma-Aldrich, 31630-25-G-R
Tranexamsäure	Sigma-Aldrich, 857653
TEMED	Roth, 2367.3
TMB	Mikrogen, MG-10038
Tricin	Roth, 6977.3
Tris	Sigma-Aldrich, T1503-1KG
2x YT	Roth, 6676.2
WashBufB für recomBlot (5x)	Mikrogen, MG-10012
Wasserstoffperoxid (30%)	Roth, 8070.2
T4-DNA-Ligase-Puffer	New England BioLabs, B0202A

Tabelle 2.15 Allgemeine Puffer

Name	Substanzen
PBS	10 mM Na ₂ HPO ₄ 1 mM NaH ₂ PO ₄ 150 mM NaCl pH 7,4 autoklaviert bei 121 °C, 20 min, 1 bar
TAE	40 mM Tris 1 mM EDTA pH 8,0 autoklaviert bei 121 °C, 1 bar für 20 min
TBS	50 mM Tris 200 mM NaCl pH 7,5 autoklaviert bei 121 °C, 1 bar für 20 min

Tabelle 2.16 Puffer für die Proteinisolierung

Name	Substanzen
Imidazolpuffer 20 mM	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 20 mM Imidazol 1 Tablette Proteaseinhibitor cocktail complete pH 8,0 sterilfiltriert (0,22 µm Porengröße), Lagerung bei -20 °C für maximal 3 Monate
Imidazolpuffer 50 mM	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 50 mM Imidazol 1 Tablette Proteaseinhibitor cocktail complete pH 8,0 sterilfiltriert (0,22 µm Porengröße), Lagerung bei -20 °C für maximal 3 Monate
Imidazolpuffer 75 mM	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 75 mM Imidazol 1 Tablette Proteaseinhibitor cocktail complete pH 8,0 sterilfiltriert (0,22 µm Porengröße), Lagerung bei -20 °C für maximal 3 Monate

Imidazolpuffer 100 mM	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 100 mM Imidazol 1/2 Tablette Proteaseinhibitor cocktail complete pH 8,0 sterilfiltriert (0,22 µm Porengröße), Lagerung bei -20 °C für maximal 3 Monate
Imidazolpuffer 150 mM	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 150 mM Imidazol 1/2 Tablette Proteaseinhibitor cocktail complete pH 8,0 sterilfiltriert (0,22 µm Porengröße), Lagerung bei -20 °C für maximal 3 Monate
Imidazolpuffer 200 mM	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 200 mM Imidazol 1/2 Tablette Proteaseinhibitor cocktail complete pH 8,0 sterilfiltriert (0,22 µm Porengröße), Lagerung bei -20 °C für maximal 3 Monate
Imidazolpuffer 250 mM	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 250 mM Imidazol 1/2 Tablette Proteaseinhibitor cocktail complete pH 8,0 sterilfiltriert (0,22 µm Porengröße), Lagerung bei -20 °C für maximal 3 Monate
Lysispuffer für His-getaggte Proteine	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 10 mM Imidazol 1 mg/ml Lysozym pH 8,0 sterilfiltriert (0,22 µm Porengröße)
Protein-Wasch-Puffer	50 mM Tris/HCl pH 8,0

Tabelle 2.17 Puffer für die TT-SDS-PAGE

Name	Substanzen
Acrylamid	Acrylamid/ Bisacrylamid (49,5 % T, 3 % C) 240 g Acrylamid 7,5 g Bisacrylamid Ad 500 ml Aqua bidest. sterilfiltriert (0,22 µm Porengröße)
Anodenpuffer	100 mM Tris/ HCl pH 8,9
Gelpuffer (3x)	3 M Tris 0,3 % (w/v) SDS pH 8,45 sterilfiltriert (0,22 µm Porengröße)
Kathodenpuffer	100 mM Tris 100 mM Tricin 0,1 % (w/v) SDS pH 8,25
TT-Inkubationspuffer (4x)	30 % (w/v) Glycerol 12 % (w/v) SDS 0,03 % (w/v) Servablau 6 % (v/v) β-Mercaptoethanol 150 mM Tris/ HCl pH 7,0 ad 10 ml Aqua bidest.

Tabelle 2.18 Puffer für ELISA

Name	Substanzen
Immobilisierungspuffer	0,05 M Na ₂ CO ₃ 0,02 % (w/v) Natriumazid pH 9,6 (mit Na ₂ CO ₃ eingestellt) sterilfiltriert (0,22 µm Porengröße)
Substratpuffer	0,1 M KH ₂ PO ₄ pH 6,0 (mit KOH eingestellt)
Stopplösung	430 ml H ₂ O 70 ml konzentrierte H ₂ SO ₄
ELISA-Waschpuffer	PBS 0,05 % (w/v) Tween 20

Tabelle 2.19 Puffer für den Westernblot

Puffer	Zusammensetzung
Anodenpuffer	300 mM Tris 100 mM Tricin pH 8,7-8,8
Kathodenpuffer	300 mM 6-Aminohexansäure 30 mM Tris pH 8,6-8,7
Blockierungspuffer	TBS + 0,1 % (v/v) Tween 20
Westernblot-Waschpuffer	TBS + 0,2 % (v/v) Tween 20

Tabelle 2.20 Spezielle Utensilien

Name	Funktion	Referenz, Quelle
Amersham Protran 0,2 NC	Membran für Westernblot	GE Healthcare, 10600001
Nunc Immuno Clear Standard Module Plate	ELISA	Nunc, 468667
Poly Prep Chromotography Columns	Affinitätschromatographiesäulen für die Proteinaufreinigung	BioRad, 731-1550
Vivaspin Turbo 15 (MW 5000)	Konzentration und Umpuffern von aufgereinigten Proteinen	Sartorius, VS15T02
Whatman Cellulose Chromatography Papers	Chromatographiepapier für Westernblots	GE Healthcare, 3030917
Glasstic Slides	Bestimmung von Zellkonzentrationen	Kova International, 87144E

Tabelle 2.21 Geräte

Art	Name	Hersteller
Blotgeräte	Blotgerät	Peqlab, LFT
Brutschränke	B 20 BBD 6620	Heraeus Thermo Scientific
Dispergierer	MICCRA D-9 Homogenizer – Disperser	Art Prozess- & Labortechnik
Elektrophoresekammern	Vertikale Kammer für SDS-PAGE Elektrophorese-Kammer Horizon11.14	Sigma-Aldrich Gibco-BRL
Digitale Dokumentationssysteme	Densitometer GS710 Geldokumentationssystem FAS V Geldokumentationssystem	BioRad Peqlab NIPPON Genetics
Magnetrührer	IKAMAG RET KMO 2 Basic MR 2002 MR Hei-Standard	IKA IKA Heidolph Heidolph

Mikroskope	Axio Imager M2	Zeiss
	Standard 25 mit Dunkelfeldkondensator	Zeiss
	Axiovert 40 CFL	Zeiss
	Telaval 31	Zeiss
Spannungsgeber	E443	Consort
	EV265	Consort
	E835	Consort
PCR Thermocycler	T 3000 Thermocycler	Biometra
	TProfessional Basic Gradient	Biometra
	Light Cycler 480 II	Roche
pH Meter	pH-Meter 654	Metrohm
Pipetten	Reference/ Research Plus	Eppendorf
	Pipetman Classic	Gilson
	Finnpipette Novus	Thermo Scientific
	Mehrkanalpipette	
Pipettierhilfen	Pipetboy acu	Integra Biosciences
	Easypet	Eppendorf
Schüttler	Novotron Incubator Shaker	Infors HAT
	Schüttler KL2	Bühler
	Vortexer VF2	IKA Labortechnik
	Minishaker MS2	IKA Labortechnik
	Themomixer comfort	Eppendorf
Sonifizierer mit Kühler	Sonifier B12 mit Becherresonator	Heinemann/ Branson
	Kühlgerät Multistar	Fryka
Spektralphotometer	PowerWave HAT	BioTek Instruments
	Ultraspec 3100 pro	Amersham
	Nanophotometer Pearl	Biosciences
		Implen
Sterilwerkbank	Herasafe HS12	Heraeus
Waagen	Feinwaage BP110S	Sartorius
	Analysenwaage 572	Kern
Wasserbäder	Schüttelwasserbad 1083	GFL
Zentrifugen	Multifuge X3 FR	Heraeus
	Centrifuge 5417 R	Eppendorf

Tabelle 2.22 Software

Name	Quelle, Referenz
CorelDraw X5	Corel Corporation
Gen 5.1.11	BioTek Instruments
Graphpad Prism 7	GraphPad Software
Quantity One 4.2.1	Bio-Rad
Visiview Imaging Software	Visitron Systems
CLC Sequence Viewer 8.0	CLC Bio

2.8 Proteinbiochemische Methoden

2.8.1 Produktion von rekombinanten Proteinen in *E. coli* und affinitätschromatographische Reinigung

Die für Bindungsstudien benötigten, rekombinanten Proteine wurden in *E. coli* produziert. Hierzu wurde zunächst eine 100 ml Übernachtskultur (ÜNK), bestehend aus 100 ml 2xYT-Medium, 100 µl Ampicillin (50 mg/ml) und 200 µl einer bestehenden *E. coli*-Kultur bzw. einer Kryokultur angesetzt und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln (180 rpm) inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde dann eine 1000 ml-Tageskultur angesetzt, indem 1000 ml 2xYT-Medium mit 1000 µl Ampicillin versetzt wurden. Durch Hinzugabe einer entsprechenden Menge ÜNK, wurde die Tageskultur auf eine optische Dichte von ca. 0,2 eingestellt. Die optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) bestimmt. Nun wurde die Tageskultur bei 37 °C und unter Schütteln (180 rpm) inkubiert, bis eine OD_{600} von 0,5 – 0,6 erreicht war. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Produktion der Proteine durch Hinzugabe von 400 µl 0,5 M IPTG induziert. Daran anschließend wurden die Kultur erneut für 4 h bei 21 °C und 80 rpm inkubiert. Schließlich wurde die Tageskultur in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und für 20 min bei 4 °C und $5000 \times g$ zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstands wurden die verbliebenen Zellsedimente bei -80 °C bis zur weiteren Aufarbeitung eingefroren.

Zur Aufarbeitung des benötigten Proteins wurde jedes Zellsediment in 2,4 ml Lysis-Puffer für His-tagged Proteine resuspendiert und die Suspensionen anschließend vereinigt. Nach einer Inkubationsphase von 30 min bei 4 °C erfolgte der Zellaufschluss mittels Dispergiertab. Hierzu wurde 20 s bei Stufe D-E dispergiert. Im Anschluss daran wurde die Suspension sechs Mal für 30 s durch Ultraschallbehandlung sonifiziert. Nach jedem Sonifizierungsschritt wurden die Zellysate für 30 s auf Eis gelagert und anschließend für 20 min bei 4 °C und $5000 \times g$ zentrifugiert. Die einzelnen Überstände wurden durch einen 0,45 µm Filter sterilfiltriert. Das Filtrat wurde nun mit Ni-NTA-Agarose versetzt (20 µl Agarose/ 1 ml Filtrat) und für 1 h bei 4 °C auf einer Schüttelwippe inkubiert. An die Inkubation schloss sich eine einminütige Zentrifugation bei 4 °C und $600 \times g$ an. Nun wurde der Überstand vorsichtig dekantiert und die Suspension auf Eis gelagert. Das Sediment wurde mit 20 ml Imidazolpuffer (20 mM) resuspendiert (1. Waschfraktion). Es wurde erneut bei $600 \times g$ für 1 min bei 4 °C zentrifugiert. Nach dem Abnehmen der Überstands wurde das Sediment in 10 ml Imidazolpuffer (20 mM) resuspendiert (2. Waschfraktion). Dieser Durchgang wurde ein weiteres Mal wiederholt (3. Waschfraktion). Im letzten Schritt wurde das Sediment nochmals in 8 ml

Imidazolpuffer (20 mM) gelöst. Anschließend wurde eine Chromatografie-Säule mit der Agarose-Suspension beladen. Nach Absetzen der Agarosepartikel wurden die His-getaggten Proteine durch steigende Imidazol-Konzentrationen eluiert. Die verschiedenen Fraktionen (3 x 50 mM, 2 x 75 mM, 1 x 100 mM, 1 x 150 mM, 1 x 200 mM und 1 x 250 mM) wurden aufgefangen und bei 4 °C gelagert. Um die Reinheit der eluierten Proteine in den einzelnen Fraktionen beurteilen zu können, wurden je 5 µl einer jeden Fraktion mit 15 µl PBS⁺⁺ und 6,8 µl 4 x TT-Inkubationspuffer versetzt. Alle Proben wurden für 5 min bei 95 °C erhitzt. Zusätzlich wurden 2 µl Precision Plus Protein Unstained Protein Standards (Marker) mit 18 µl PBS⁺⁺ und 6,8 µl 4 x TT-Inkubationspuffer versetzt. Anschließend wurden alle Proben und der Marker auf ein 10% TT-SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen (siehe Kapitel 2.8.3).

2.8.2 Produktion von rekombinanten Proteinen im kleinen Versuchsmaßstab

Um zu überprüfen, ob die rekombinanten Proteine in den *E. coli*-Zellen produziert werden oder ob sie möglicherweise toxisch für die Bakterienzellen sind, wurde zunächst eine Produktion der rekombinanten Proteine im kleinen Versuchsmaßstab (20 ml) durchgeführt.

Zunächst wurde eine Übernachtskultur (ÜNK) aus 5 ml 2x YT-Medium, 5 µl Ampicillin und 10 µl einer bestehenden Kultur angesetzt und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine 20-ml-Kultur angesetzt (versetzt mit 20 µl Ampicillin) und entsprechend viel Volumen aus der ÜNK überführt, um eine optische Dichte (OD₆₀₀) von 0,2 zu erhalten. Diese Zellkulturen wurden nun bei 37 °C und 180 rpm inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,5 – 0,6 gemessen wurde. Anschließend wurde zu den Kulturen jeweils 4 µl 0,5 M IPTG hinzugefügt, um die Proteinproduktion zu induzieren und die Kulturen für 3 h bei Raumtemperatur und 80 rpm auf einem Schüttler platziert. An die Inkubation anknüpfend wurden die Kulturen bei 5000 × g, 4 °C und 20 min sedimentiert und der Überstand verworfen. Die Zellsedimente wurden in 500 µl PBS⁺⁺ resuspendiert. Diese Suspension wurde sechs Mal für jeweils 30 s sonifiziert. Daraufhin wurden die Zellysate bei 5000 × g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde abgenommen und auf Eis gelagert. Das verbleibende Sediment wurde erneut in 500 µl PBS⁺⁺ resuspendiert und nochmals sechs Mal für jeweils 30 s sonifiziert. Anschließend wurden je 20 µl des Überstands und der Zellsedimente mit 6,8 µl TT-Inkubationspuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C erhitzt. Danach wurden die Proben auf ein 10 % TT-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und die Proteine über Nacht

separiert (s. Kapitel 2.8.3). Am nächsten Tag erfolgte ein Western-Blot. Hierbei wurden die Proteine, insofern sie von den Zellen exprimiert wurden, mithilfe eines Anti-His-Antikörpers auf der Membran detektiert. War das Ergebnis positiv, konnte das gewünschte Protein in einer großen Überexpression in größeren Mengen gewonnen werden.

2.8.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Eine SDS-PAGE wurde durchgeführt, um z. B. die Reinheit der gereinigten Proteine zu überprüfen.

Tabelle 2.23 Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele

Komponenten	Sammelgel	Trenngel
Acrylamid/ Bisacrylamid	0,67 ml	4 ml
Gelpuffer 3x konzentriert	2 ml	6,67
Glycerin	-	2 g (bei 100%)
Aqua. dest.	5,33 ml	7,33 ml
APS (10% w/v)	60 µl	100 µl
TEMED	6 µl	10 µl

Nachdem die Gelkammern zusammengesetzt und auf Dichtigkeit geprüft waren, wurde zunächst das Trenngel zwischen die Glasplatten eingefüllt und mit Ethanol überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels, wurde das überschichtete Ethanol entfernt und das Sammelgel hineingegossen und der Kamm für die Geltaschen eingeschoben. Nach vollständiger Auspolymerisierung konnte das SDS-Polyacrylamid-Gel verwendet bzw. bis zu einer Woche bei 4 °C gelagert werden.

2.8.4 Silbernitrat-Färbung von separierten Proteinen im SDS-Polyacrylamid-Gel

Um die im SDS-Polyacrylamid-Gel separierten Proteine zu detektieren, musste das SDS-Polyacrylamid-Gel zunächst aus der Gelkammer gelöst und das Sammelgel vom Trenngel abgetrennt werden. Anschließend wurde das Trenngel für 30 min in der Fixierlösung inkubiert. Nach dem Abgießen der Fixierlösung folgte die Zugabe der Inkubationslösung, in welcher das SDS-Polyacrylamid-Gel 30 min geschüttelt wurde. Im nächsten Schritt wurde das SDS-Polyacrylamid-Gel drei Mal für 5 min in Aqua dest. gewaschen. Daraufhin wurde das SDS-Polyacrylamid-Gel für weitere 20 min in der Silbernitratlösung inkubiert. Nach erneutem zweimaligen Waschen mit Aqua dest. für jeweils eine Minute wurde schließlich die Entwicklerlösung auf das Polyacrylamid gegeben. Darin inkubierte das Polyacrylamid-Gel unter Schütteln, bis eindeutige Signale sichtbar waren. Die

Reaktion wurde dann nach Abgießen der Entwicklerlösung mittels Stopplösung abgestoppt.

Tabelle 2.24 Lösungen für die Silbernitratfärbung

Lösung	Lösungen
Fixierlösung	100 ml Ethanol ($\geq 96\%$) 25 ml Essigsäure ad 250 ml Aqua dest.
Inkubationslösung	0,5 g Natriumthiosulfat 17 g Natriumacetat 1,25 ml Glutaraldehyd (25%) 75 ml Ethanol ad 250 ml Aqua dest.
Silbernitratlösung	625 mg Silbernitrat 350 μ l Formaldehyd (37%) ad 250 ml Aqua dest.
Entwicklerlösung	6,25 g Natriumcarbonat 175 μ l Formaldehyd (37%) ad 250 ml Aqua dest.
Stopplösung	50 mM EDTA (pH 8,0)

2.8.5 Konzentrierung und Konzentrationsbestimmung gereinigter Proteine

Die Proteinfraktionen mit dem höchsten Reinheitsgrad (s. Kapitel 2.8.1 und 2.8.4) wurden zusammengeführt und zur Volumenreduktion mittels Ultrafiltration (Vivaspin Turbo 15) bei 4 °C und 4000 x g zentrifugiert. Um restliches Imidazol aus der Proteinlösung zu entfernen, wurden insgesamt 30 ml 50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,5) hinzugegeben und die Proteinlösung anschließend mittels Zentrifugation auf ein Volumen von 0,5 ml konzentriert. Zur Konzentrationsbestimmung wurde das Micro BCA Protein Assay Kit verwendet. Hierbei wurde das Protein in verschiedenen Verdünnungen, eine Standardreihe und Aqua dest. als Leerwert auf eine Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wurde in jede Kavität 200 μ l Reagenz hinzugegeben. Daraufhin wurde die Mikrotiterplatte bei 37 °C für 30 min inkubiert. Darauffolgend wurde die Absorption im Spektralphotometer bei 562 nm gemessen und die Proteinkonzentration mithilfe des Standards berechnet.

2.9 Immunologische Methoden

2.9.1 Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)

Um das Bindungsverhalten der gereinigten Proteine gegenüber Plasminogen zu untersuchen, wurde das ELISA-Verfahren herangezogen. Hierfür wurden die zu

untersuchenden Proteine in einer Konzentration von 0,5 µg/100 µl Immobilisierungspuffer über Nacht bei 4 °C auf einer Mikrotiterplatte unter Schütteln inkubiert. Am Folgetag wurden die Kavitäten zunächst drei Mal mit 200 µl ELISA-Waschpuffer gewaschen und anschließend mit 200 µl ELISA-Blockingpuffer (0,2 % Gelatine in PBS⁺⁺), zur Minimierung unspezifischer Bindungen, für 1 h unter Schütteln bei Raumtemperatur geblockt. Nach drei Waschsritten mit jeweils 200 µl ELISA-Waschpuffer wurden 100 µl Plasminogen-Lösung (10 ng/µl verdünnt in PBS⁻) in die Kavitäten pipettiert und die Mikrotiterplatte für 1 h bei Raumtemperatur auf der Schüttelwippe inkubiert. Danach wurde erneut, wie zuvor beschrieben, mit 200 µl Waschpuffer gewaschen und der primäre Antikörper (polyklonaler Anti-Plasminogen-Antikörper (1:1000 in ELISA-Waschpuffer verdünnt)) hinzugegeben. Anschließend wurden die Kavitäten drei Mal mit jeweils 200 µl Waschpuffer gewaschen und 100 µl des sekundären Antikörpers (HRP-konjugierter Anti-Ziege-Antikörper, 1:2000 verdünnt in ELISA-Waschpuffer) appliziert und für eine weitere Stunde inkubiert. Nach erneutem Waschen der Kavitäten wurden 100 µl der Substratlösung pro Kavität pipettiert und die Reaktion nach 200 s durch Hinzugabe von 50 µl Stopplösung beendet. Die Mikrotiterplatte wurde dann bei 490 nm im Spektralphotometer gemessen.

2.9.1.1 Plasminogenbindungs-ELISA unter Verwendung von NaBr

Je nach Versuchsdurchführung, wurde Plasminogen in verschiedenen Puffern gelöst. Für die allgemeinen Bindungsversuche wurde Plasminogen in PBS⁻ gelöst. Um zu überprüfen, inwieweit elektrostatische Wechselwirkungen für die Protein-Plasminogen-Bindung relevant sind, wurde Plasminogen in Lösungen mit steigenden Konzentrationen an NaBr suspendiert (0 bis 1 M). Die übrigen Versuchsbedingungen entsprachen denen des Plasminogenbindungs-ELISA (siehe Kapitel 2.9.1).

2.9.1.2 Plasminogenbindungs-ELISA unter Verwendung von Tranexamsäure

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Bedeutung von Lysin-Resten für die Bindung untersucht. Hierzu wurde Plasminogen in unterschiedlich stark konzentrierten Tranexamsäure (TXA)-Lösungen gelöst (0 bis 50 mM). Die restlichen Versuchsbedingungen entsprachen denen des Plasminogenbindungs-ELISA (siehe Kapitel 2.9.1).

2.9.2 Westernblot-Analyse

Um den Reinheitsgrad der gereinigten His-getaggen Proteine mit einer weiteren Methode zu überprüfen, wurde eine Westernblot-Analyse durchgeführt. Zunächst wurden die zu untersuchenden Proteine in einem 10 % T/T-Polyarylamid-Gel separiert und die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Nach erfolgter SDS-PAGE wurde die Anode der Blot-Apparatur sowie drei Chromatographie-Papiere mit Anodenpuffer befeuchtet. Die Whatman-Papiere wurden übereinandergelegt und alle Luftblasen entfernt. Die Nitrocellulosemembran wurde zuerst in Aqua. dest. und daraufhin in Anodenpuffer getränkt und anschließend auf die Chromatographie-Papiere platziert. Danach wurde das T/T-Polyacrylamid-Gel, welches zuvor in Kathodenpuffer getaucht wurde, aufgelegt. Zum Schluss wurden drei Chromatographie-Papiere in Kathodenpuffer getränkt und luftblasenfrei über das Polyacrylamid-Gel angeordnet. Die Proteine wurden unter folgenden Einstellungen transferiert: Leistung: 50 W, Spannung 50 V, Stromstärke: 1 mA/cm², Dauer: 2 h. Danach wurde die Nitrocellulosemembran entnommen und für 30 min getrocknet. Die Membran wurde anschließend mithilfe des Reversible Protein Detection Kit angefärbt, um den Erfolg des Transfers zu überprüfen. Die Membran wurde mit 50 mM EDTA-Lösung (pH 8,0) entfärbt und ausgewählte Bereiche mit 5 % (w/v) Milchpulver in Blockierungspuffer für 1 h unter Schütteln inkubiert. Danach wurde die Membran vier Mal für 5 min in Blockierungspuffer gewaschen. Der entsprechende primäre Antikörper wurde in einer 1:1000 Verdünnung in recomBlot Washing Buffer B gelöst und für 1 h zur Inkubation hinzugegeben. Nachdem die Membran wiederholt vier Mal für 5 min in Westernblot-Waschpuffer geschwenkt wurde, wurde der sekundäre Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 in recomBlot Washing Buffer B hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 1 h bei Raumtemperatur wurde die Membran erneut vier Mal 5 min in Westernblot-Waschpuffer gewaschen. Abschließend wurde zur Detektion TMB hinzugegeben und die Reaktion durch Zugabe von Aqua dest. gestoppt.

2.9.3 Far-Westernblot-Analyse

Das durchgeführte Far-Westernblot-Verfahren unterscheidet sich von einem herkömmlichen Westernblot darin, dass nach dem Blockieren der Membran Plasminogen (20 µg/ml in PBS⁻) als Ligand hinzugegeben wurde. Nach einer Inkubation von einer Stunde bei Raumtemperatur wurde die Membran vier Mal für jeweils 5 min mit Westernblot-Waschpuffer gewaschen und anschließend wurde der polyklonale Anti-

Plasminogen-Antikörper (Verdünnung 1:1000) für 1 h hinzugegeben. Die folgenden Schritte entsprechen denen, die unter Kapitel 2.9.2 beschrieben wurden, identisch.

2.10 Spezielle Methoden

2.10.1 Bestimmung von Zellkonzentrationen mittels Dunkelfeldmikroskopie

Zur Bestimmung der Konzentration von Borrelienkulturen wurden mehrere Verdünnungen der entsprechenden Kultur in PBS⁺⁺ angesetzt (1:100; 1:1000; 1:2000). Daraufhin wurden 10 µl aus den Verdünnungen entnommen und in die Zählkammer gegeben. Nun wurden in neun Quadranten der Zählkammer die Anzahl der Zellen bestimmt und der Mittelwert folgendermaßen berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\mu\text{l}} = \frac{n1 + n2 + n3 + n4 + n5 + n6 + n7 + n8 + n9}{9} \times 90 (\text{Kammerfaktor}) \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

2.10.2 Herstellung von Borrelienzelllysaten

Zunächst wurde eine Borrelienkultur (in der mid- bis spät-logarithmische Wachstumsphase) bei 5000 × g und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand dekantiert und das Zellsediment in 1000 µl PBS⁺⁺ resuspendiert. Danach folgten drei Waschschriffe, bei denen die Zellen zunächst für 10 min bei 5000 × g und 4 °C zentrifugiert wurden und daraufhin erneut in 1000 µl PBS⁺⁺ resuspendiert wurden. Nach dem letzten Waschschriff wurde das Zellsediment in 200 µl PBS⁺⁺ gelöst. Nun wurde die Zellsuspension fünf Mal für 30 s bei 4 °C sonifiziert. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Micro BCA Protein Assay Kit verwendet und die Lysate anschließend bei -20 °C gelagert.

2.10.3 Plasminogen-Aktivierungs-Assay

Um nachzuweisen, dass das gebundene Plasminogen anschließend auch zu Serinprotease Plasmin aktiviert werden kann, wurde ein Plasminogen-Aktivierungs-Assay durchgeführt. Eine Schlüsselkomponente hierfür stellt das chromogene Substrat D-Val-Leu-Lys p-Nitroanilid-Dihydrochlorid (S-2251) dar. S-2251 fungiert als Substrat von Plasmin und kann nach proteolytischer Spaltung zu para-Nitroanilin (pNA) im Spektralphotometer bei 405 nm detektiert werden.

Zunächst wurden die zu untersuchenden Proteine in einer Konzentration von 5 ng/µl in 100 µl Immobilisierungspuffer angesetzt und über Nacht bei 4 °C auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Am nächsten Tag wurden die Kavitäten drei Mal mit jeweils 200 µl ELISA-Waschpuffer gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu

unterbinden, wurden 200 µl Blocking Buffer III BSA in die Kavitäten pipettiert und die Mikrotiterplatte für 2 h bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Hiernach wurde die Mikrotiterplatte erneut, wie zuvor beschrieben, gewaschen und anschließend Plasminogen (1 µg/100 µl PBS⁻) in die Kavitäten pipettiert. Ferner wurden zur Kontrolle auch Kavitäten ohne Hinzugabe von Plasminogen (- Plg) oder ohne uPA (-uPA) beschickt oder das Plasminogen in 50 mM TXA-Lösung gelöst (+TXA), welche die Bindung von Plasminogen inhibiert. Für den anschließenden Waschschrift wurde eine 1:1 Lösung aus Substratpuffer und PBS⁻ angesetzt. Hiermit wurde die Mikrotiterplatte erneut drei Mal mit je 200 µl gewaschen. Nachfolgend wurden 96 µl der Reaktionslösung in die Kavitäten gegeben und abschließend 4 µl uPA, welches in Aqua dest. gelöst wurde und in einer Konzentration von 2,5 µg/ml vorlag. Das hinzugegebene uPA fungierte als Aktivator des Plasminogens zu Plasmin. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte mit einer selbstklebenden Folie verschlossen, um ein Evaporieren der Flüssigkeit zu verhindern und für 24 h bei 37 °C im Spektralphotometer inkubiert und die Absorption alle 30 min bei 405 nm gemessen.

Tabelle 2.25 Zusammensetzung des Reaktionsansatzes des Plasminogen-Aktivierungs-Assays

Komponente	Puffer / Lösung
Substratpuffer	0,32 M Tris/HCl (pH 7,5) 1,77 M NaCl
Reaktionslösung	36 µl 50 mM Tris/HCl (pH 7,5) 30 µl 0,01% (v/v) Triton X-100 18 µl Substratpuffer 12 µl S2251-Substrat (2,5 mg/ml)

2.10.4 Fibrinogen-Degradations-Assay

Mittels eines sogenannten Fibrinogen-Degradations-Assay sollte überprüft werden, ob das gebundene und zu Plasmin aktivierte Plasminogen in der Lage ist, Fibrinogen als natürliches Substrat zu spalten.

Für den Versuch wurden zunächst die zu untersuchenden Proteine in einer Konzentration von 0,5 µg/100 µl über Nacht bei 4 °C unter Schütteln in einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Am Folgetag wurden die Kavitäten drei Mal mit 200 µl ELISA-Waschpuffer gewaschen. Im nächsten Schritt wurde mithilfe von 0,2 % (w/v) BSA in PBS⁻ für 2 h bei Raumtemperatur geblockt. Bevor Plasminogen hinzugegeben wurde, wurden die Kavitäten erneut drei Mal mit je 200 µl ELISA-Waschpuffer gewaschen. Das

Plasminogen wurde in 50 mM Tris/HCl (pH 7,5) gelöst und in einer Konzentration von 10 ng/ μ l in die Kavitäten pipettiert und die Mikrotiterplatte für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach wiederholtem Waschen wurde jeweils 100 μ l der Reaktionsansätze in die betreffenden Vertiefungen pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde mit einer Folie abgedichtet, um ein Verdunsten zu verhindern und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Zu ausgewählten Zeitpunkten wurden die jeweiligen Reaktionsansätze entnommen und 33 μ l TT-Inkubationspuffer hinzupipettiert, um eine weitere Proteolyse von Fibrinogen zu stoppen. Anschließend wurden die Reaktionsansätze für 5 min bei 95 °C erhitzt und auf ein 10 % TT-SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen oder bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Von den einzelnen Reaktionsansätzen wurden 30 μ l für die SDS-PAGE verwendet. Die im Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine wurden mittels Westernblot-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und die Fibrinogenfragmente mit einem Anti-Fibrinogen-Antikörper (1:1000) und die Antigen-Antikörper-Komplexe mit einem sekundären Antikörper (HRP-konjugierten Kaninchen Anti-Ziege Antikörper, 1:1000) detektiert.

Tabelle 2.26 Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für den Fibrinogen-Degradations-Assay

Reaktionsansatz pro Kavität	20 μ g/ml Fibrinogen 6,5 μ l uPA (2,5 μ g/ml) 93,5 μ l 50 mM Tris/HCl (pH7,5) Gesamtvolumen: 100 μ l
------------------------------------	---

2.10.5 Immunfluoreszenz-Test

Um die Plasminogen-Bindung an der intakten Borrelienzelle nachzuweisen, wurde ein Immunfluoreszenz-Test (IFT) mit vitalen *B. miyamotoi*-Zellen durchgeführt. Hierfür wurden die Borrelienzellen bei 5000 \times g und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Darauf folgten zwei Waschschrte mit 1000 μ l GVB⁺⁺. Nach jedem der Waschschrte, wurden die Zellen erneut für 10 min bei 14.000 rpm und 4 °C sedimentiert. Daran anschließend wurde die Zellkonzentration bestimmt (siehe Kapitel 2.10.1). Pro Versuchsansatz wurden 6 \times 10⁶ Zellen in 150 μ l GVB⁺⁺ verwendet. Bei einem Reaktionsansatz wurden 10 μ g gereinigtes Plasminogen (Endkonzentration= 66,7 ng/ μ l) hinzugegeben, bei einem weiteren 20 μ g Plasminogen (Endkonzentration= 133,3 ng/ μ l). Die beiden Reaktionsansätze wurden für 30 min bei 37 °C und 450 rpm im Thermomixer inkubiert. Darauffolgend wurden die Zellen erneut für 10 min bei 14.000 rpm und 4 °C sedimentiert. Anschließend wurden die Borrelienzellen zwei Mal in 100 μ l PBS⁺⁺/1% BSA (w/v) gewaschen und schließlich in

100 µl PBS⁺⁺/1% BSA (w/v) resuspendiert. Die Borrelienzellen wurden unverdünnt als auch in einer 1:20 Verdünnung (in PBS⁺⁺/ 1% BSA (w/v)) auf vorbereitete Objektträger aufgetragen. Zuvor wurden die Objektträger nacheinander mit Aceton, Methanol, Ethanol und Aqua dest. gereinigt. Pro Kavität wurden 12 µl der Reaktionsansätze pipettiert und verteilt. Die Objektträger wurden anschließend über Nacht getrocknet. Am Folgetag wurden die Objektträger zunächst für 10 min in einer Glyoxal-Lösung unter Schwenken fixiert und alle Glyoxal-Reste vollständig entfernt. Für die Detektion von membrangebundenem Plasminogen wurde der monoklonale Anti-Plasminogen-Antikörper 1:100 in PBS⁺⁺/ 1% BSA (w/v) und der polyklonale, Anti-Plasminogen-Antikörper 1:500 in PBS⁺⁺/ 1% BSA (w/v) verdünnt. Von den Antikörper-Lösungen wurden 15 µl pro Kavität aufgetragen und die Objektträger für 1 h in einer feuchten Kammer bei 33 °C inkubiert. Danach wurden die Objektträger drei Mal für 5 min in PBS⁺⁺ gewaschen. Anschließend wurden die sekundären, Alexa Fluor 488®-konjugierten Anti-Ziege-Antikörper (1:500 in PBS⁺⁺/1% BSA (w/v)) verdünnt und 20 µl in die entsprechenden Kavitäten pipettiert. Daraufhin wurden die Objektträger wie zuvor bei 33 °C in einer feuchten Kammer für 1 h inkubiert. Danach wurden die Objektträger wieder drei Mal mit PBS⁺⁺ für jeweils 5 min gewaschen, getrocknet und jede Aussparung mit 40 µl DAPI-Lösung (1:500) überschichtet. Die Objektträger wurden dann für 10 min bei 4 °C gelagert. Es folgte abermals ein dreimaliges Waschen der Objektträger in PBS⁺⁺. Schließlich wurden die Objektträger mit einem Deckglas versiegelt und bei 4 °C in Dunkelheit gelagert. Die Versuchsauswertung erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop Axio Imager M2 und einer Spot RT3 Kamera.

Tabelle 2.27 Glyoxal-Lösung

Komponente	Volumen
Aqua dest.	63,8 ml
Ethanol absolut	17,8 ml
Glyoxal (40 %, w/v)	7 ml
Essigsäure absolut	675 µl
	Gesamtvolumen: 90 ml
Der pH-Wert wurde mit 1M NaOH auf 5,0 eingestellt. Lagerung bei 4 °C	

2.11 Molekularbiologische Methoden

2.11.1 Reklonierung des GlpQ-kodierenden Gens in den pQE-30 Xa Vektor

Um Punktmutationen am C-terminalen Ende des GlpQ-kodierenden Gens einzufügen, musste ein GlpQ-Protein mit einem N-terminalen His-Tag generiert werden. Um PCR-Amplifikate zu erhalten, wurde eine Gradienten-PCR durchgeführt.

Substanz	Menge
10x Polymerase-Puffer	5 µl
Forward-Primer (100 pmol) (Tabelle 2.11)	1 µl
Reverse-Primer (100 pmol) (Tabelle 2.11)	1 µl
Taq-DNA-Polymerase (2,5 U)	0,5 µl
Template (pET21b-GlpQ)	100 ng
MgCl ₂	2,5 µl
dNTPs	1 µl
Aqua dest.	ad 50 µl

Bedingungen für die PCR

1.	95 °C – 5 min	} 24 x
2.	95 °C – 1 min	
3.	60 °C – 1 min	
4.	72 °C – 1 min	
5.	72 °C – 7 min	
6.	4 °C – Ende	

Die PCR-Amplifikate wurden anschließend mit dem QIAquick PCR Purification Kit gereinigt. Darauf folgte die Hydrolyse der Amplifikate.

Substanz	Volumen
Gereinigte PCR-Amplifikate	30 µl
10x CutSmart-Puffer	5 µl
Restriktionsendonuklease <i>Bam</i> HI	2 µl
Restriktionsendonuklease <i>Sal</i> I	2 µl
Aqua dest.	ad 50 µl

Der Restriktionsansatz wurde bei 37 °C und 350 rpm über Nacht inkubiert und anschließend mit dem MinElute Reaction Cleanup Kit gereinigt. Schließlich wurden die Ansätze in den vorbereiteten pQE-30 Xa-Vektor ligiert.

Substanz	Menge / Volumen
pQE-30 Xa BamHI/SalI	100 ng
Gereinigtes Amplifikat	3 µl
10x T4-DNA-Ligase-Puffer	2 µl
T4-DNA-Ligase	1 µl
Aqua dest.	ad 20 µl

Der Ligationsansatz wurde bei 16 °C und 350 rpm über Nacht inkubiert. Die Transformation erfolgte daraufhin wie unter 2.11.4 beschrieben.

2.11.2 *In vitro*-Mutagenese

Um die Relevanz einzelner Aminosäuren von GlpQ in Bezug auf die Bindung von Plasminogen näher zu untersuchen, wurden Aminosäuresubstitutionen durch gezielte Mutagenese im *glpQ*-Gen eingeführt. Als DNA-Matrize fungierte das neugenerierte Plasmid pQE-GlpQ (s. Kapitel 2.11.1).

Tabelle 2.28 Allgemeiner Reaktionsansatz für die Gradienten-PCR

Substanz	Menge / Volumen
5x PCR-Puffer	10 µl
Forward-Mutagenese Oligonukleotid	2 µl
Reverse-Mutagenese Oligonukleotid	2 µl
Hifi-Polymerase	0,5 µl
pQE-GlpQ_Bm	100 ng
Aqua dest.	ad 50 µl

Die PCR wurde als Gradienten PCR mit den Temperatur-Abstufungen von 50 °C, 55 °C und 60 °C durchgeführt.

Tabelle 2.29 Bedingungen der Gradienten-PCR

1.	95 °C – 5 min	} 24 x
2.	95 °C – 1 min	
3.	*°C – 1 min	
4.	72 °C – 5 min	
5.	72 °C – 7 min	
6.	4 °C – Ende	

*Temperatur-Gradient: 50 °C, 55 °C und 60 °C

Um die Matrizen-DNA zu fragmentieren, wurde nach erfolgter PCR eine Hydrolyse mit DpnI durchgeführt. Hierfür wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert.

Tabelle 2.30 Reaktionsansatz für die Hydrolyse mit DpnI

Substanz	Volumen
10x CutSmart-Puffer	10 µl
PCR-Ansatz	50 µl
DpnI (20.000 U/ml)	2 µl
Aqua bidest.	38 µl

Der Reaktionsansatz wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert.

Zur Überprüfung der PCR wurden die Reaktionsansätze nach erfolgter Hydrolyse auf ein 1 %-Agarose-Gel aufgetragen. Hierzu wurden 10 µl der Probe mit 2 µl Loading Dye und 0,5 µl Midori Green Direct versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei 180 V für 40 min.

2.11.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe, wurde die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Hierfür wurden abhängig von der Fragmentgröße 0,8 % oder 2 % Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde in 100 ml 1 x TAE-Puffer gelöst (w/v) und die Gele anschließend gegossen. Für die Elektrophorese wurden die Proben mit 6 × Ladepuffer (Gene Loading Dye Purple 6 ×, ohne SDS) und Midori Green Direct versetzt und auf das Agarosegel aufgetragen. Als Größenstandards wurden abhängig von der zu erwartenden Molekülgröße 7 µl des 100 Bp oder des 1 kBp Markers von New England Biolabs verwendet. Die Elektrophorese der DNA-Fragmente erfolgte für 1 h bei 140 V, 220 mA und 110 W.

2.11.4 Transformation von *E. coli*-Zellen mit Plasmiden

2.11.4.1 Transformation von NEB5-alpha und BL21 (DE3)-Zellen

Die jeweiligen kompetenten *E. coli*-Zellen wurden aus dem -80 °C Kühlschrank entnommen und für 10 min auf Eis aufgetaut. Daraufhin wurden 1 – 5 µl des gewünschten Plasmids zu den Zellen pipettiert und die Suspension kurz vermischt. Die Zellen wurden zunächst für 30 min auf Eis inkubiert, um anschließend für 30 s (NEB5-alpha) oder 10 s (BL21 (DE3)) bei 42 °C im Wasserbad inkubiert zu werden (Hitzeschock-Methode). Die Zellen sofort für 5 min auf Eis gelagert und dann 950 µl SOC-Medium hinzu pipettiert. Danach wurden die Zellen für 60 min bei 37 °C und 250 rpm im Thermomixer inkubiert. Schließlich wurden 2/10 und 8/10 der Zellsuspension auf LB-Agar-Platte ausplattiert,

welche zur Selektion Ampicillin (1:1000 verdünnt) enthielten. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

3 Ergebnisse

3.1 Reinheitsprüfung der affinitätschromatographisch isolierten Proteine

Die für die vergleichenden Untersuchungen benötigten Proteine wurden, wie unter 2.8.1 beschrieben, isoliert und nach der Bestimmung der Konzentration (2.8.5) hinsichtlich ihrer Reinheit überprüft. Dafür wurden jeweils 0,5 µg der gereinigten, His-getaggtten Proteine auf ein 10 %-TT-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und über Nacht separiert. Am nächsten Tag erfolgte die Färbung der Proteine mit Silbernitrat (2.8.4), um Verunreinigungen nachzuweisen (Abbildung 3.1). Darüber hinaus wurden die Proteine in gleicher Weise auf ein zweites 10 %-TT-Polyacrylamid-Gel aufgetragen, welches anschließend für eine Westernblot-Analyse (2.9.2) diente. Hierbei wurden die gereinigten Proteine mithilfe eines monoklonalen Anti-His₆ Antikörpers detektiert. In Abbildung 3.1 ist zu erkennen, dass die zu untersuchenden Proteine einen hohen Reinheitsgrad aufwiesen und einen His₆-Tag enthielten.

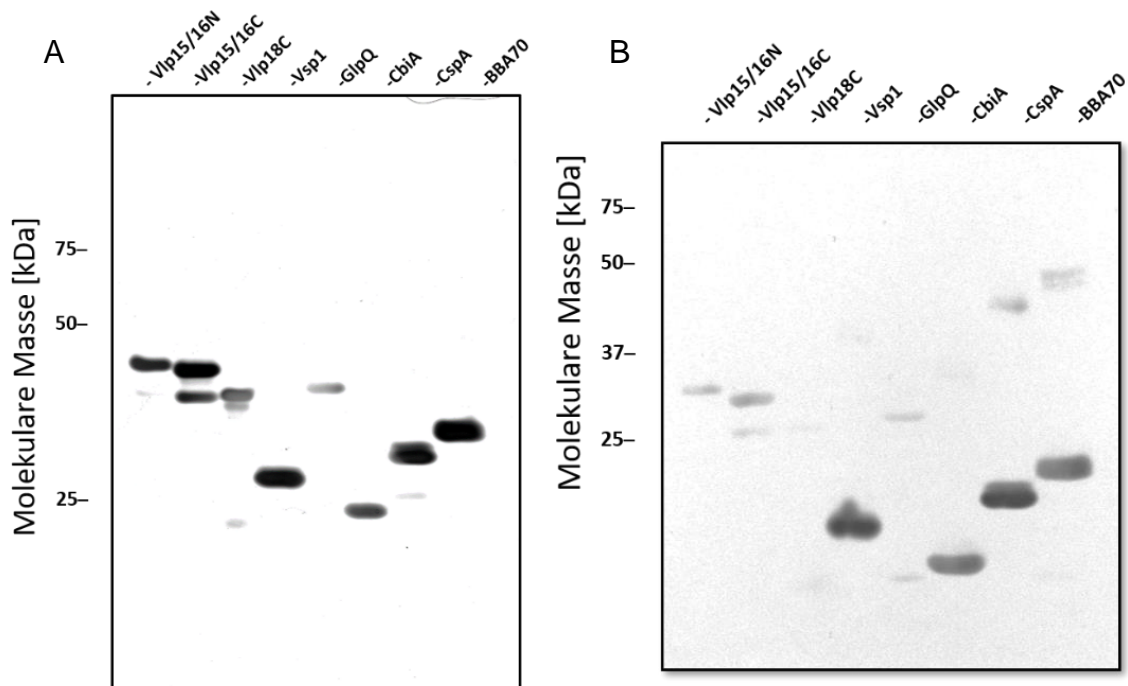


Abbildung 3.1 Reinheitsprüfung der aufgereinigten Proteine

In Abbildung A sind die gereinigten Proteine dargestellt, die zur Reinheitsprüfung mittels SDS-PAGE separiert und anschließend per Silbernitrat-Färbung visualisiert wurden. Hierfür wurden jeweils 500 ng der gereinigten Proteine aufgetragen. Als Marker wurde der Proteinstandard Precision Plus Protein Unstained Protein Standards (BioRad) verwendet.

In Abbildung B ist der Western-Blot mit den gleichen Proteinen dargestellt, um zusätzlich den His-Tag der gereinigten Proteine nachzuweisen. Hierfür wurden ebenfalls jeweils 500 ng der gereinigten Proteine aufgetragen. Zum Nachweis diente ein monoklonaler Anti-His₆-Antikörper (1:1000). Als Marker wurde der Proteinstandard Precision Plus Protein Dual Color Standards (BioRad) verwendet.

3.2 Untersuchung zum Bindungsverhalten gegenüber Plasminogen

Zu Beginn wurde eine Bindungsanalyse von verschiedenen Borrelienproteinen durchgeführt, um zu klären, welche der gereinigten Proteine in der Lage sind, Plasminogen zu binden.

Hierfür wurden jeweils 0,5 µg der gereinigten Proteine über Nacht auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Wie unter 2.9.1 beschrieben, wurde anschließend Plasminogen in einer Konzentration von 10 µg/ml hinzugegeben, und die Protein-Protein-Interaktion mithilfe eines Anti-Plasminogen Antikörpers bei 490 nm detektiert. BBA70 von *B. burgdorferi* fungierte als Positivkontrolle und BSA als Negativkontrolle.

Für Vlp15/16-N (His-Tag am N-Terminus) und GlpQ-C (His-Tag am C-Terminus) konnte eine signifikante Bindung von Plasminogen nachgewiesen werden (Abbildung

3.2). Vlp15/16-C (His-Tag am C-Terminus) und Vlp18-C hingegen zeigten keine Plasminogen-Bindung und wurden deshalb in den nachfolgenden Analysen nicht weiter untersucht. Da Vsp1 im Vergleich zu BSA ebenfalls keine Bindung aufwies, fungierte dieses Borrelienprotein in den folgenden Versuchen als Negativkontrolle. Wie bereits in früheren Untersuchungen beschrieben, zeigte BBA70 wie auch CbiA von *B. miyamotoi* und CspA von *B. burgdorferi* eine signifikante Bindung an Plasminogen.^{35,114,116}

Aufgrund dieses Ergebnisses wurde der Fokus für die weiteren Untersuchungen auf die Interaktion von Plasminogen mit Vlp15/16-N und GlpQ-C gelegt.

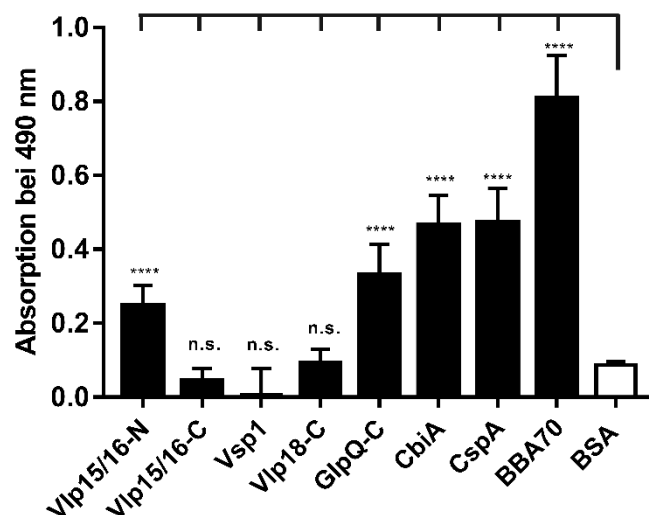


Abbildung 3.2 Nachweis von Plasminogen-bindenden Proteinen aus *B. miyamotoi* HT31

Die geführten Proteine wurden in einer Konzentration von 5 µg/ml immobilisiert. Nach Blockieren mit 0,2 % Gelatine erfolgte die Inkubation mit Plasminogen (10 µg/ml). Das gebundene Plasminogen wurde mittels polyklonalem Anti-Plasminogen Antikörper (1:1000) detektiert. Dem Ergebnis liegen Triplikate aus mindestens drei unabhängigen Versuchen zugrunde. Die statistische Analyse erfolgte mit einem einfaktoriellen ANOVA-Test mit multiplem Vergleich nach Bonferroni (Konfidenzintervall= 95%) .n.s.) nicht signifikant; *****) $p \leq 0.0001$.

3.3 Untersuchung der konzentrations-abhängigen Bindung von Plasminogen und Vlp15/16-N und GlpQ-C

Um die Interaktion von Vlp15/16-N und GlpQ-C mit Plasminogen näher zu charakterisieren, wurde die Stärke der Bindung in Abhängigkeit der Konzentration untersucht. Für diesen Test wurden ebenfalls 0,5 µg der gereinigten Proteine auf einer Mikrotiterplatte über Nacht immobilisiert und Plasminogen in steigenden

Konzentrationen (0 bis 2 μM) hinzugegeben. Der Nachweis der Bindung erfolgte wie in 3.2 beschrieben, durch einen polyklonalen, Anti-Plasminogen Antikörper.

Sowohl für Vlp15/16-N als auch für GlpQ-C konnte eine dosisabhängige Bindung nachgewiesen werden, welche ab einer Konzentration von etwa 2 μM Plasminogen eine Sättigung erreichte (Abbildung 3.3). Für Vlp15/16-N konnte eine Dissoziationskonstante K_d von $354 \text{ nM} \pm 62 \text{ nM}$ und für GlpQ-C von $413 \text{ nM} \pm 72 \text{ nM}$ errechnet werden. Die Dissoziationskonstanten wurden mittels linearer Regression bestimmt.

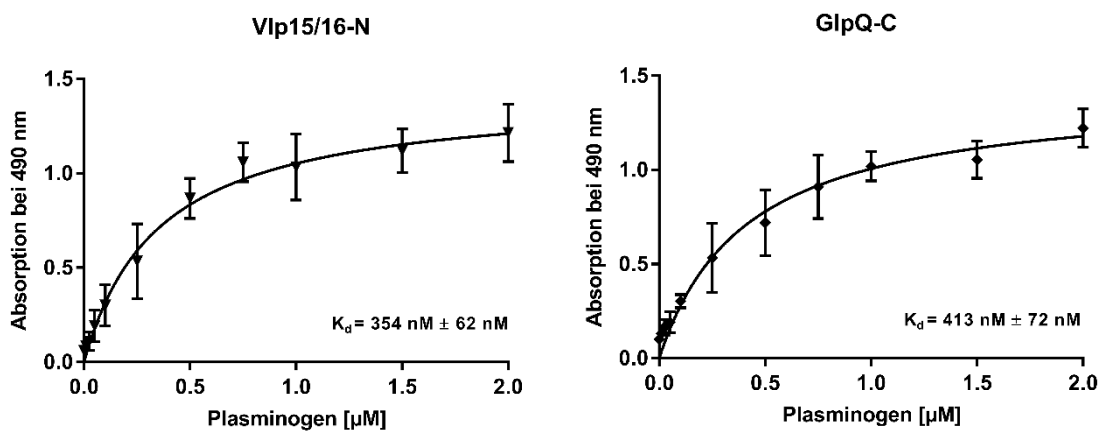


Abbildung 3.3 Konzentration-sabhängige Bindung von Plasminogen an Vlp15/16-N und GlpQ-C

Um die Konzentrations-abhängige Bindung von Plasminogen zu untersuchen, wurden Vlp15/16-N und GlpQ-C (jeweils 5 $\mu\text{g/ml}$) immobilisiert und mit steigenden Konzentrationen von Plasminogen versetzt. Die Bindungskurve und Dissoziationskonstanten wurden mithilfe nicht-linearer Regression im einfachen Bindungsmodell mit Graphpad Prism 7 ermittelt. Den Ergebnissen liegen Daten aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, jeweils als Triplika durchgeführt, zugrunde.

3.4 Vergleichende Untersuchung zur ionischen Wechselwirkung und der Beteiligung von Lysinen an der Interaktion von Vlp15/16-N und GlpQ-C mit Plasminogen

Da bereits in früheren Studien gezeigt wurde, dass ionische Wechselwirkungen sowie Lysin-Reste verschiedener bakterieller Proteine eine tragende Rolle für die Bindung von Plasminogen spielen können,^{101,108-112} wurde deren Einfluss auch für Vlp15/16-N und GlpQ-C analysiert. Hierzu wurde Natriumbromid (NaBr), welches die ionische Wechselwirkung von Plasminogen mit einem Liganden beeinflusst, sowie Tranexamsäure (TXA), die spezifisch die Lysin-abhängige Bindung von Plasminogen und dem interagierenden Protein inhibiert, verwendet. Wie unter 2.9.1 beschrieben,

wurden Lösungen mit steigenden Konzentrationen an NaBr- oder TXA hergestellt, welche Plasminogen (10 ng/ μ l) enthielten. Um den Einfluss dieser Parameter zu untersuchen, wurden Bindungs-ELISAs (2.9.1) wie folgt durchgeführt: Die zu untersuchenden Proteine wurden über Nacht immobilisiert und nach Wasch- und Blockierungsschritten mit Plasminogen in den entsprechenden NaBr- oder TXA-Lösungen inkubiert. Nach Hinzugabe des polyklonalen, Anti-Plasminogen Antikörpers wurden die Antigen-Antikörper-Komplexe bei 490 nm gemessen.

In den Versuchen mit NaBr zeigte sich für Vlp15/16-N keine signifikante Reduktion der Plasminogenbindung, wohingegen sich für GlpQ-C bereits ab einer Konzentration von 0,25 M NaBr eine signifikante Abnahme der gemessenen Absorptionswerte zeigte (Abbildung 3.4). Eine weitere Abnahme der Absorptionswerte ließ sich bei höheren Konzentrationen an NaBr (0,5 – 1,0 M) nicht feststellen. BBA70 zeigte vergleichbare Ergebnisse wie in früheren Studien.¹¹⁴ Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass bei GlpQ-C ionische Wechselwirkungen eine tragende Rolle für die Interaktion mit Plasminogen spielen, während die Daten bei Vlp15/16-N gegen eine solche Annahme sprechen. D. h., dass die Bindung von Plasminogen an Vlp15/16-N nicht über elektrostatische Wechselwirkungen erfolgt.

Die Daten zur Untersuchung mit TXA zeigen dagegen ein anderes Bild (Abbildung 3.5). Hier war es Vlp15/16-N, dessen Bindung von Plasminogen signifikant durch die Anwesenheit von TXA abnahm und dies bereits ab einer TXA-Konzentration von 0,5 mM. Für GlpQ-C zeigte sich zwar auch eine signifikante Abnahme, jedoch bedurfte es hierfür der 50-fachen Konzentration an TXA (25 mM). Insgesamt lässt sich daraus folgern, dass die Lysin-Reste bei der Bindung von Vlp15/16-N mit Plasminogen eine essenzielle Rolle spielen könnten. Beim GlpQ-C scheinen die Lysin-Reste zwar auch zur Bindung von Plasminogen beizutragen, allerdings sind vermutlich auch noch weitere Komponenten an der Bindung beteiligt.

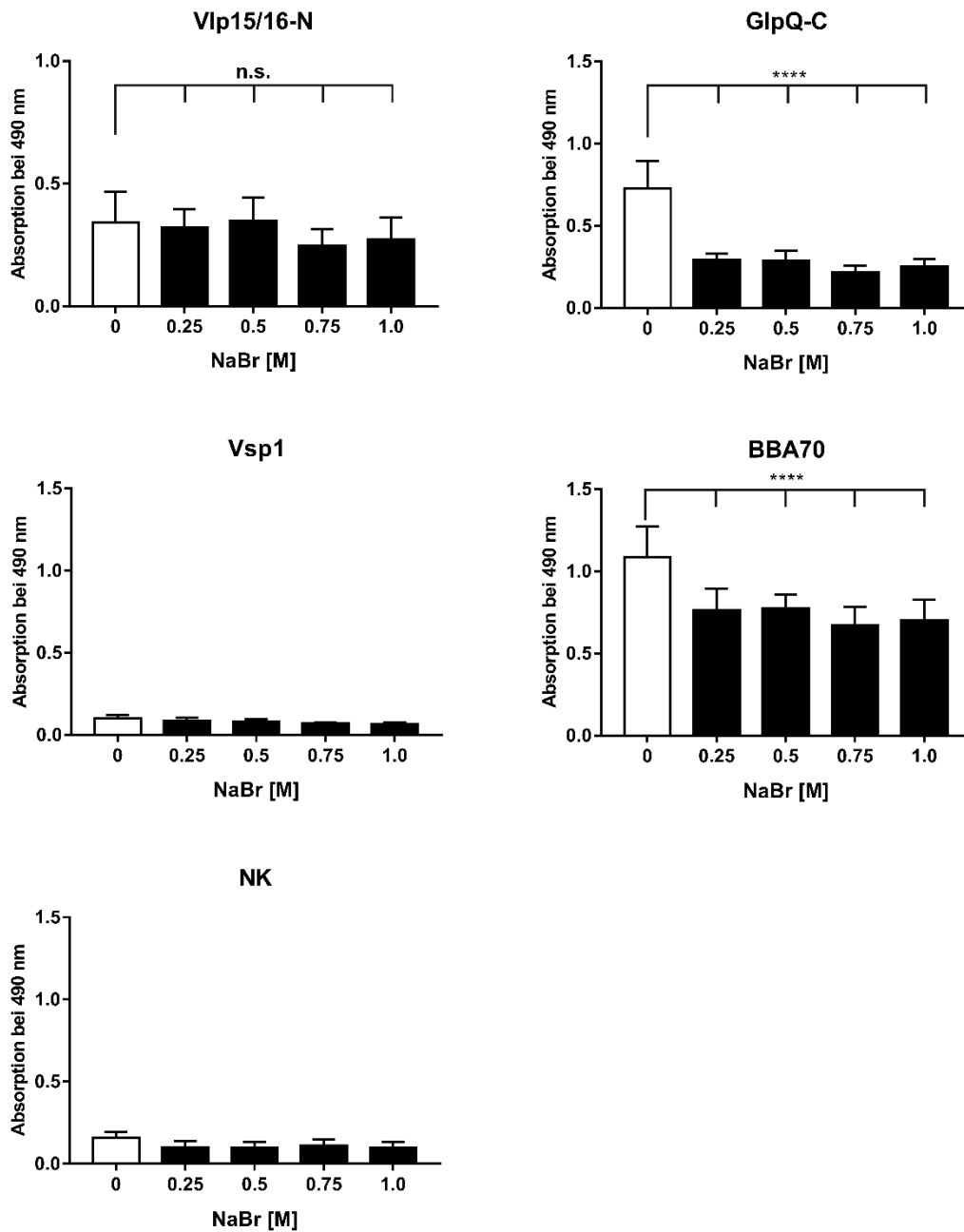


Abbildung 3.4 Einfluss elektrostatischer Wechselwirkungen auf die Bindung von Plasminogen an Vlp15/16-N und GlpQ-C

Zunächst wurden Vlp15/16-N, GlpQ-C sowie BBA70 (Positivkontrolle) und Vsp1 (Negativkontrolle) immobilisiert (jeweils 5 µg/ml). Der Reaktionsansatz NK (Negativkontrolle) enthielt kein Protein. Alle Reaktionsansätze wurden mit Plasminogen (10 µg/ml) in Gegenwart steigender NaBr-Konzentrationen versetzt. Das gebundene Plasminogen wurde mit einem polyklonalen Anti-Plasminogen Antikörper (1:1000) detektiert. Den Ergebnissen liegen mindestens drei unabhängige Experimente mit Triplikaten zugrunde. ****) $p \leq 0.0001$; n.s.) nicht signifikant. Die statistische Analyse erfolgte mit einem einfaktoriellem ANOVA-Test mit multiplem Vergleich nach Bonferroni (Konfidenzintervall = 95 %).

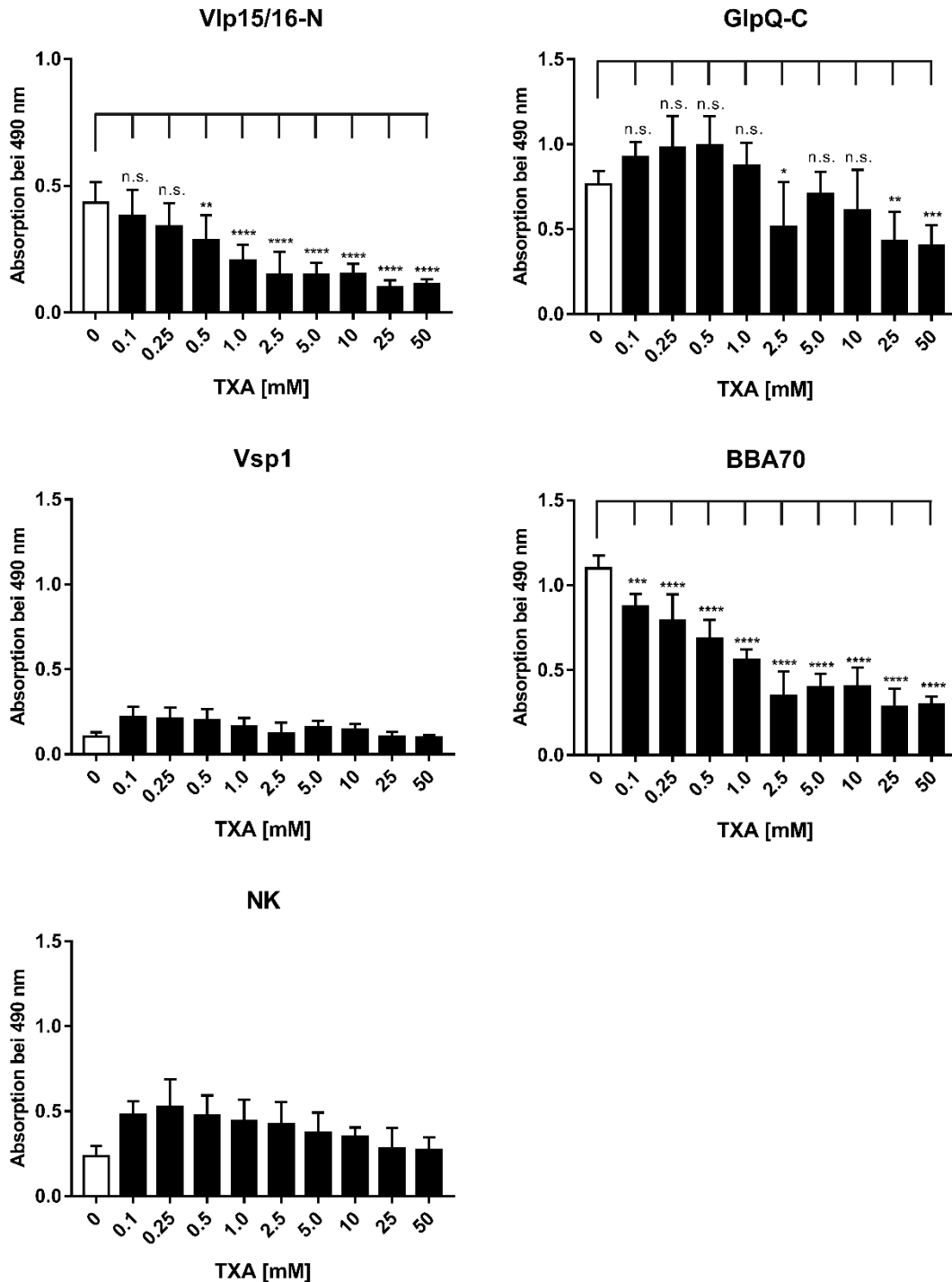


Abbildung 3.5 Beteiligung von Lysin-Resten von Vlp15/16-N und GlpQ-C bei der Plasminogen-Bindung

Zunächst wurden Vlp15/16-N, GlpQ-C sowie BBA70 (Positivkontrolle) und Vsp1 (Negativkontrolle) immobilisiert (jeweils 5 µg/ml). Der Reaktionsansatz NK (Negativkontrolle) enthielt kein Protein. Die Reaktionsansätze wurden mit Plasminogen (10 µg/ml) in Gegenwart steigender TXA-Konzentrationen inkubiert. Mithilfe eines polyklonalen Antikörpers (1:1000) wurde das gebundene Plasminogen detektiert. Die Daten basieren auf Triplikaten aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mit einem einfaktoriellem ANOVA-Test mit multiplem Vergleich nach Bonferroni (Konfidenzintervall=95%). *) $p \leq 0.033$; **) $p \leq 0.002$; ***) $p \leq 0.0002$; ****) $p \leq 0.0001$; n.s.) nicht signifikant.

3.5 Plasminogen-Aktivierungs-Assay

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Vlp15/16-N und GlpQ-C Plasminogen binden, sollte untersucht werden, ob sich das an die Proteine gebundene Plasminogen durch uPA zu Plasmin aktivieren lässt. Die Aktivierung zu Plasmin wurde mithilfe des chromogenen Substrats D-Val-Leu-Lys p-Nitroanilid Dihydrochlorid (S-2251) nachgewiesen, welches durch Plasmin gespalten wird. Aus der Spaltung geht das photometrisch messbare Produkt para-Nitroanilin (pNA) hervor, welches bei einer Wellenlänge von 405 nm detektiert werden kann. Dabei nimmt die gemessene Absorption proportional mit der Aktivität von Plasmin zu.

Für den Versuch wurden jeweils 0,5 µg der zu untersuchenden Proteine auf einer Mikrotiterplatte bei 4 °C über Nacht immobilisiert (2.10.3). Am nächsten Tag wurde, nachdem die freien Bindungsstellen blockiert worden waren, Plasminogen hinzugegeben und die Mikrotiterplatte für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die entsprechenden Reaktionsansätze (siehe Tabelle 2.25) pipettiert und die Mikrotiterplatte luftundurchlässig abgedichtet. Die Reaktionsansätze wurden bei 37 °C für 24 h im Spektralphotometer inkubiert und alle 30 min gemessen. Neben BBA70 und Vsp1 wurde auch gereinigtes Plasminogen auf der Mikrotiterplatte immobilisiert und diente als weitere Kontrolle. Zudem enthielten bestimmte Reaktionsansätze Plasminogen, welches in TXA (+TXA) gelöst war. Weitere Kontrollen wurden entweder ohne Plasminogen (-Plg) oder ohne uPA (-uPA) angesetzt (Abbildung 3.6).

Sowohl für Vlp15/16-N als auch für GlpQ-C konnte ein kontinuierlicher Anstieg der Absorptionswerte über die 24 h hinweg gemessen werden, woraus geschlossen werden kann, dass das gebundene Plasminogen zu Plasmin aktiviert wurde (Abbildung 3.6). Die Negativkontrollen ohne uPA (-uPA) beziehungsweise ohne Plasminogen (-Plg) zeigten, wie zu erwarten war, keinen oder einen nur minimalen Anstieg der Absorptionswerte. Auch in den Reaktionsansätzen mit TXA konnte nur eine geringfügige Aktivierung des Plasminogens nachgewiesen werden, was sich auf die inhibierende Wirkung durch TXA zurückführen lässt (Abbildung 3.6). Diese Ergebnisse zur Aktivierung von Plasminogen bestätigen die erhobenen Daten zum Einfluss von TXA auf die Bindung von Plasminogen und Vlp15/16-N und GlpQ-C (Abschnitt 3.4). Wie erwartet, ergab sich für die Reaktionsansätze mit BBA70 eine deutliche Plasminaktivierung, während bei den Reaktionsansätzen mit Vsp1 (Negativkontrolle) keine Aktivierung nachgewiesen werden

konnte. Die Reaktionsansätze mit immobilisierten Plasminogenen als Positivkontrolle zeigten ebenfalls eine starke Aktivierung zu Plasmin.¹¹⁴

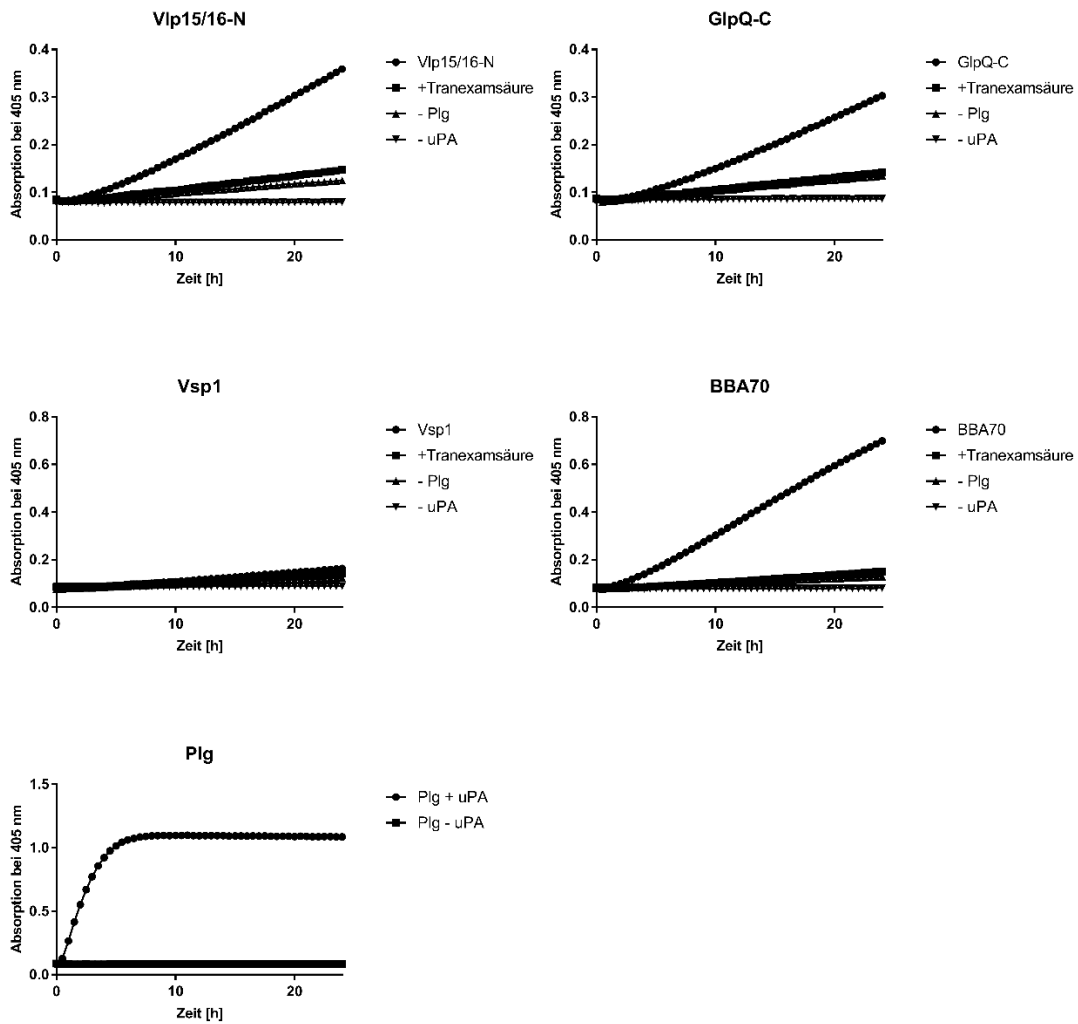


Abbildung 3.6 Aktivierung von gebundenen Plasminogenen zu Plasmin

Zur Untersuchung, ob das gebundene Plasminogen durch uPA zu Plasmin aktiviert werden kann, wurden die Proteine Vlp15/16-N, GlpQ-C, Vsp1 (Negativkontrolle), BBA70 (Positivkontrolle) sowie Plasminogen (Plg; Positivkontrolle) auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert (5 µg/ml). Nach Blockierung wurden die Reaktionsansätze mit Plasminogen (10 µg/ml) versetzt. Im Anschluss wurde das chromogene Substrat S-2251 und uPA hinzugegeben. In weiteren Kontrollansätzen wurde entweder TXA (+TXA; 50 mM) gelöst oder kein Plasminogen (-Plg) oder kein uPA (-uPA) hinzugefügt. Die Reaktionsansätze wurden schließlich für 24 h bei 37 °C inkubiert und es erfolgte alle 30 min eine Absorptionsmessung bei 405 nm. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus mindestens drei unabhängigen Versuchen, welche jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden.

3.6 Fibrinogen-Degradations-Assay

Aufgrund der erhobenen Daten zur Aktivierung von gebundenen Plasminogen zu Plasmin (Abschnitt 3.5), sollte mittels eines Fibrinogen-Degradations-Assays nachgewiesen werden, ob aktiviertes Plasmin in der Lage ist, Fibrinogen als physiologisches Substrat zu degradieren.

Zunächst wurden wie unter Kapitel 2.10.4 beschrieben, die zu untersuchenden Proteine (jeweils 0,5 µg) über Nacht auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Nach den verschiedenen Wasch- und Blockierungsschritten wurde Plasminogen hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 1 h wurde zur Aktivierung des gebundenen Plasminogens uPA sowie Fibrinogen hinzugeben. Die Mikrotiterplatte wurde abgedichtet und für insgesamt 2 h bei 37 °C inkubiert. Zu den festgelegten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und diese in 4x-TT-Inkubationspuffer gelöst, um die Reaktion zu terminieren. Alle Reaktionsansätze wurden anschließend mittels SDS-PAGE in einem 10 %-TT-Gel separiert und auf eine Nitrocellulosemembran (2.9.2) transferiert. Die Degradationsprodukte von Fibrinogen wurden mittels Westernblot-Analyse mit einem Anti-Fibrinogen-Antikörper visualisiert (2.10.4).

Zur Kontrolle wurde bei allen Analysen zudem gereinigtes Fibrinogen (Fbg) mit aufgetragen. Fibrinogen setzt sich aus drei Ketten zusammen, die als α -, β - und γ -Kette bezeichnet werden (Abbildung 3.7). Während der Inkubation wird zunächst die α -Kette degradiert und nachfolgend die β - und γ -Kette.¹¹⁷

Für Vlp15/16-N ließ sich nachweisen, dass sich nach etwa 60 Minuten eine beginnende Degradierung der α -Kette abzeichnete, die nach 120 Minuten deutlich nachweisbar war (Abbildung 3.7). Für den Reaktionsansatz mit TXA (+T) ergab sich eine geringfügig stärkeres Signal nach 2 h Inkubation, was sich durch die Inhibition der Plasminogenbindung durch TXA erklären ließe. Im Fall von GlpQ-C zeigte sich eine Degradierung der α -Kette nach etwa 40 Minuten. Nach einer Inkubationsdauer von 120 Minuten wurde die α -Kette größtenteils degradiert. Auch bei Vsp1 und BSA zeigte sich ebenfalls ein charakteristisches Degradierungsmuster von Fibrinogen. Bei BBA70 ließ sich bereits ab 10 Minuten eine deutliche Degradierung erkennen und nach 40 Minuten war die α - und β -Kette nahezu vollständig degradiert. Dies entspricht den Ergebnissen aus früheren Experimenten zu BBA70.¹¹⁴ Die Negativkontrolle (NK) und die Reaktionsansätze ohne Plasminogen (-Plg) sowie die Ansätze mit reinem Fibrinogen

zeigten keine Degradation. Demgegenüber kam es bei der Positivkontrolle zu einer vollständigen Spaltung des Fibrinogens. Die Kontrolle, in welcher ausschließlich Fibrinogen und uPA enthalten waren (Fbg + uPA), wies eine dezente Degradation der α -Kette auf (Abbildung 3.7).

Durch diesen Versuch ließ sich zeigen, dass an Vlp15/16-N und GlpQ-C gebundenes Plasminogen zu Plasmin aktiviert werden kann und dieses Fibrinogen degradiert.

Tabelle 3.1 Zusammensetzung der Kontrollen des Fibrinogen-Degradations-Assays

Kontrollen	Zusammensetzung des Reaktionsansatzes
Positivkontrolle	92,5 μ l Tris/HCl (pH 7,5) + 1 μ g Plg + 7,5 μ l uPA (2,5 μ g/ml) + 2 μ g Fibrinogen
Negativkontrolle	100 μ l Tris/HCl (pH 7,5) + 1 μ g Plg + 2 μ g Fibrinogen
Fibrinogen	2 μ g Fibrinogen in 100 μ l 50 mM Tris/HCl (pH 7,5)
+T	Plasminogen gelöst in 50 mM Tris/HCl-Lösung (pH 7,5) versetzt mit 50 mM TXA
-Plg	Reaktionsansatz ohne Plasminogen
Fbg + uPA	20 μ g/ml Fibrinogen + 6,5 μ l uPA (2,5 μ g/ml) + 93,5 μ l 50 mM Tris/HCl (pH7,5) Gesamtvolumen: 100 μ l

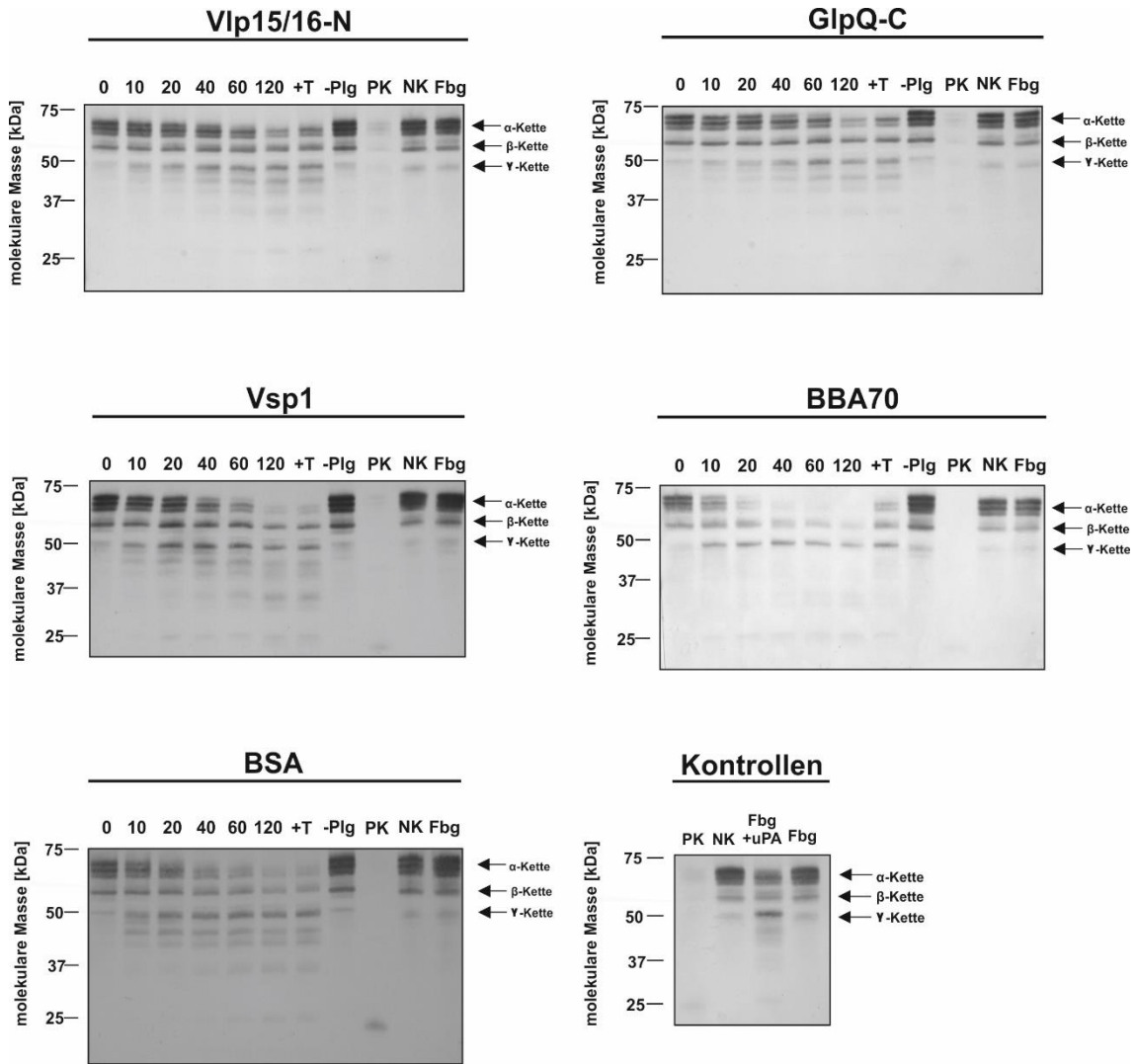


Abbildung 3.7 Degradation von Fibrinogen durch an Vlp15/16 und GlpQ gebundenes Plasmin

Für den Nachweis der Fibrinogendegradierung durch Vlp15/16-N und GlpQ-C gebundenes und aktiviertes Plasminogen wurden die zu untersuchenden Proteine immobilisiert (5 µg/ml). Nach Blockieren freier Bindungsstellen wurde das Plasminogen (10 µg/ml) hinzugegeben. Nach erfolgter Bindung wurden Fibrinogen und uPA hinzupipettiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und diese durch Zugabe von TT-Inkubationspuffer terminiert. In der Westernblot-Analyse wurden die Degradierungsprodukte des Fibrinogens mit einem polyklonalen anti-Fibrinogen-Antikörper (1:1000) detektiert. Den Ergebnissen liegen mindestens drei unabhängige Experimente zugrunde, von denen jeweils ein repräsentatives Ergebnis dargestellt ist.

3.7 Generierung von GlpQ-Mutanten mit einzelnen Lysin-Substitutionen

3.7.1 Reklonierung von GlpQ zur Gewinnung einer Variante mit einem N-terminalen His-tag

Um Mutationen in der Sequenz von GlpQ zu erzeugen, wurde zunächst eine GlpQ-Variante erzeugt, bei welcher der His-Tag am N-Terminus des Proteins positioniert ist, da sich die für eine potenzielle Plasminogenbindung infrage kommender Lysin-Reste am C-Terminus befinden. Die Umklonierung des GlpQ-kodierenden Gens in den pQE-30 Xa Vektor wurde, wie unter Abschnitt 2.11.1 beschrieben, durchgeführt.

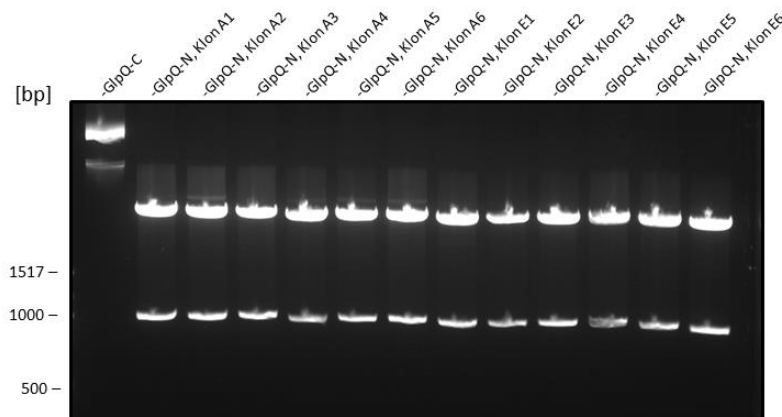


Abbildung 3.8 Nachweis der inserierten DNA nach Umklonierung

Der Abbildung ist zu entnehmen, dass nach erfolgter PCR das Insert zur Umklonierung von GlpQ-C mit dem C-terminalen His-tag zu GlpQ-N mit einem N-terminalen His-tag in allen Plasmiden enthalten war. Für den Nachweis wurden 10 μ l der Plasmide mit 2 μ l Loading Dye und 0,5 μ l Midori Green Direct versetzt und die Proben bei 180 V für 40 min aufgetrennt. Als Marker diente der 100 bp DNA Ladder-Marker. Die Plasmide der Kulturen A1-A6 wurden anschließend sequenziert.

3.7.2 Deletion der Lysin-Reste in der Aminosäure-Sequenz

Ausgehend von der DNA-Sequenz der GlpQ-N-Variante (siehe Abbildung 3.9) wurde zunächst mittels *in vitro*-Mutagenese (siehe Kapitel 2.11.2) ein Stoppkodon an Position 333 eingefügt, um eine Deletion der letzten beiden C-terminal lokalisierten Lysin-Reste zu erzeugen (unterstrichene Lysin-Reste in Abbildung 3.9). Nach Transformation des Plasmids in NEB5 α -Zellen (siehe Kapitel 2.11.4.1) und Selektion positiver Klone auf Ampicillin-haltigen Agarplatten, wurden die Plasmide isoliert und sequenziert. Von ausgewählten Klonen wurde anschließend eine Produktion der rekombinanten Proteine im kleinen Versuchsmaßstab (20 ml) durchgeführt. Die Zellen aus den entsprechenden Zellkulturen wurden lysiert und der Überstand und das Sediment getrennt auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Am Folgetag erfolgte der Transfer mittels Westernblot

auf eine Nitrocellulosemembran. Hierbei konnte die GlpQ-N-Variante sowohl im Überstand als auch im Sediment mittels Anti-His-Antikörpern nachgewiesen werden. Anschließend wurde die GlpQ-Variante affinitätschromatographisch gereinigt (siehe Kapitel 2.8.1). Da sich bei der Silbernitrat-Färbung (siehe Kapitel 2.8.4) geringste Mengen an Protein nachweisen ließen, wurde das Plasmid in *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen transformiert, da sich diese Zellen besser zur Proteinproduktion eignen. Es zeigten sich jedoch ebenfalls keine Signale in der Silbernitrat-Färbung. Obwohl die GlpQ-Variante in *E. coli* produziert wird und der His-tag nachgewiesen werden konnte, ließ sich dieses Protein aber nicht reinigen. Eine veränderte Proteinfaltung als Folge der Deletion könnte die Ursache dafür sein, dass der His-Tag in der nativen Konformation nicht in der Lage ist, an die NTA-Agarosepartikel zu binden.

```

HHHHHHGSGSGSGIEGRPYNGTGSFKQEMGSNKKSPLIHAHRGASGYLPEHTLE
AKAYAYALGADYLEQDIVLTKDNIPVIMHDPEIDTTTNVAQLFPDRARENGRY
YATDFTLTELKSLSLSERFDPENKKPIYPNRFPLNEYNFKIPTLEEEIKFIQGLNKS
TGRNVGIYPEIKKPFWHKQQGKDISKIVIEILNKYGYKSKEDKIYLQTFDFDELK
RIRKELGYQGKLIMLVGENDWNEAPTDYEYIKSEEGIAEVAKYSDGIGPWIPQIII
DGKITELTSLAHKYNIEVHPYTFRTDSLPSYVKNENELLDLLFNKAKVDGIFTDF
TDTVMNFIKK

```

Abbildung 3.9 Proteinsequenz des His-getaggen GlpQ-Protein von *B. miyamotoi* LB-2001 (WP_020954631.1)

Dargestellt ist die Proteinsequenz des GlpQ-Proteins von *B. miyamotoi* mit dem His-Tag am N-Terminus. Die Lysin-Reste des GlpQ sind grün hervorgehoben. Insgesamt enthält das GlpQ-Protein 32 Lysin-Reste.

Hellblau: Histidin-Tag, Grau: pQE-30 Xa-Vektorsequenz, Gelb: Faktor Xa-Erkennungsstelle, Unterstrichen: Lysine, welche substituiert wurden.

3.7.3 Substitution einzelner Lysin-Reste in GlpQ

Um die Relevanz einzelner Lysine für die Plasminogenbindung untersuchen zu können, wurde auf eine weitere Deletion verzichtet und stattdessen einzelne Lysin-Reste durch Alanin-Reste substituiert. Die einzelnen Aminosäureaustausche wurden ebenfalls per in vitro Mutagenese (siehe Kapitel 2.11.2) eingefügt. Es wurden insgesamt drei Varianten von GlpQ erzeugt, bei denen der Lysin-Rest entweder an Position 333, 334 oder beiden Positionen durch Alanin-Reste ersetzt wurde. Nach erfolgter in vitro Mutagenese und Hydrolyse des ursprünglichen Plasmides durch *DpnI* wurden die Reaktionsansätze in BL21 (DE3)-*E. coli*-Zellen transformiert (siehe Kapitel 2.11.4.1). Die Plasmid-tragenden Klone wurden auf Ampicillin-haltigen Agarplatten selektioniert und aus positiven Klonen Plasmide isoliert. Diese wurden sequenziert, um zu überprüfen, ob die Mutation an der

korrekten Position eingeführt wurde. Zur ersten Orientierung wurde von ausgewählten Klonen eine Produktion der rekombinanten Proteine im kleinen Versuchsmaßstab (20 ml) samt Westernblot-Analyse (siehe Kapitel 2.8.2) durchgeführt. Alle drei Proteinvarianten wurden in den *E. coli*-Zellen produziert, sodass anschließend von allen drei GlpQ-Varianten eine Produktion im großen Versuchsmaßstab durchgeführt und die Proteine gereinigt wurden (siehe Kapitel 2.8.1).

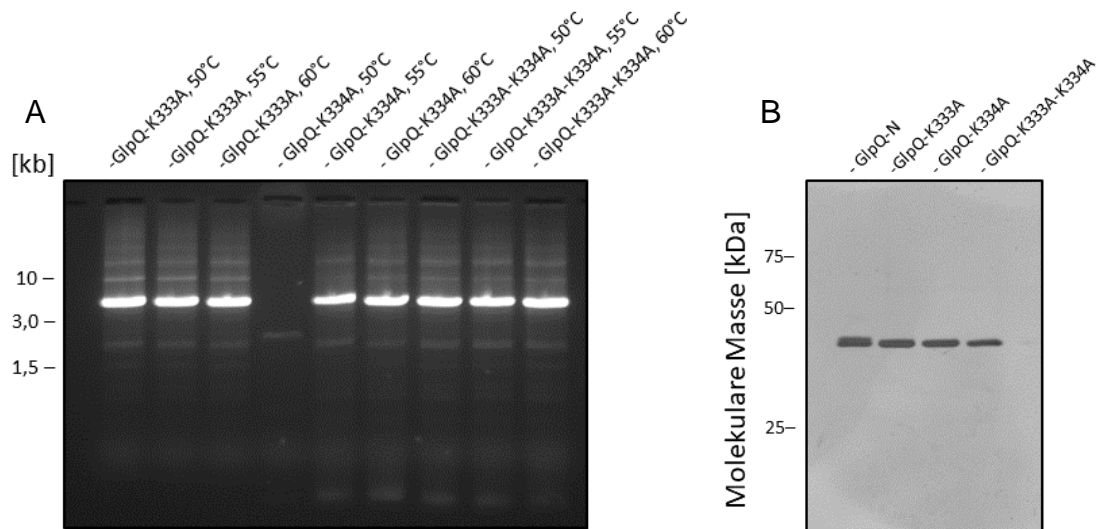


Abbildung 3.10 Nachweis der Lysin-substituierten GlpQ-Varianten und Reinheitsprüfung isolierter Proteine

In Abbildung A ist das Agarose-Gel dargestellt, mit welchem die Inserts im Plasmid zur Substitution der oben beschriebenen Lysin-Reste, nachgewiesen wurden. Bis auf den 50 °C Ansatz von GlpQ-K334A war die Insertion in allen Plasmiden erfolgreich. Für den Nachweis wurden 10 µl der Plasmide mit 2 µl Loading Dye und 0,5 µl Midor Green Direct versetzt und die Proben bei 180 V für 40 min in einem 1 % Agarosegel separiert. Als Marker diente ein 1 kb DNA Marker. Es wurde jeweils der 60 °C Ansatz zur Transformation verwendet.

In Abbildung B ist die SDS-PAGE nach Silbernitrat-Färbung dargestellt, mit deren Hilfe die Reinheit der isolierten GlpQ-Mutanten nachgewiesen wurde. Hierfür wurden jeweils 500 ng der gereinigten Proteine aufgetragen. Als Marker wurde der Precision Plus Protein Unstained Protein Standards von BioRad verwendet.

3.7.4 Plasminogen-Bindungsverhalten der GlpQ-Varianten

Um die Auswirkungen der Lysin-Substitutionen in den einzelnen GlpQ-Varianten in Hinsicht auf die Plasminogen-Bindung zu untersuchen, wurden Plasminogenbindungs-ELISA durchgeführt (Kapitel 2.9.1). Hierfür wurden 0,5 µg von GlpQ-N sowie jeweils 0,5 µg der GlpQ-Varianten (siehe Kapitel 3.7.3) auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert (Abbildung 3.11). Zum Vergleich eines weiteren GlpQ-Proteins aus Rückfallfieberborrelien wurde die Bindung des homologen GlpQ-Proteins aus *B. recurrentis* PAbJ in Bezug auf die Interaktion mit Plasminogen untersucht. Außerdem wurde BBA70 und Vsp1 als Positiv- und Negativkontrollen hinzugenommen (Abbildung 3.12).

Am nächsten Tag wurden die Kavitäten mehrfach gewaschen und freie Bindungsstellen mit 0,1 % Gelatine geblockt (2.9.1). Danach wurde Plasminogen in einer Konzentration von 10 ng/μl in die Kavitäten pipettiert und die Mikrotiterplatte für 1 h bei RT inkubiert. Die Bindung von Plasminogen erfolgte mittels eines polyklonalen Anti-Plasminogen-Antikörpers (1:1000).

Wie in Abbildung 3.11 dargestellt, zeigt die GlpQ-Variante, in der beide Lysin-Reste durch Alanin-Reste ersetzt wurden (GlpQ-K333A-334A), eine signifikante Reduktion in der Plasminogen-Bindung gegenüber dem unveränderten GlpQ-N Protein. Die Substitution des Lysin-Restes an Position 334 (GlpQ-K334A) führte ebenfalls zu einer Reduktion der Bindung, während die Substitution an Position 333 (GlpQ-K333A) eine Erhöhung der Bindung aufwies.

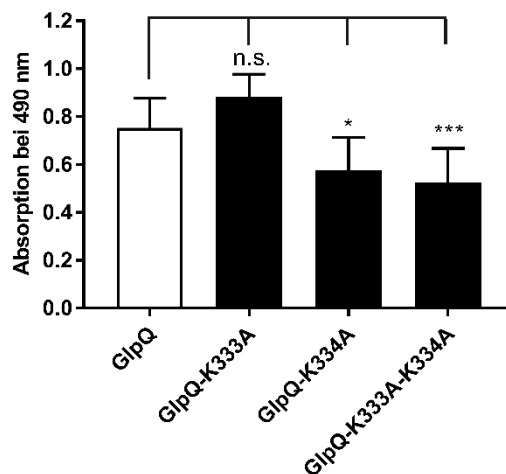


Abbildung 3.11 Vergleichende Untersuchung zur Plasminogen-Bindung verschiedener GlpQ-Varianten

Um die Auswirkungen von Substitutionen auf die Plasminogenbindung von GlpQ zu untersuchen, wurden die drei GlpQ-Varianten in einer Konzentration von 5 μg/ml immobilisiert. Nach Blockieren erfolgte die Inkubation mit Plasminogen (10 μg/ml). Das gebundene Plasminogen wurde mittels polyklonalem, anti-Plasminogen Antikörper (1:1000) detektiert. Dem Ergebnis liegen Triplikate aus mindestens drei unabhängigen Versuchen zugrunde. n.s.) nicht signifikant; ****) $p \leq 0.0001$ (Einfaktorieller ANOVA-Test mit multiplem Vergleich nach Bonferroni, Konfidenzintervall=95%).

Die Ergebnisse zur Bindung von Plasminogen an GlpQ von *B. recurrentis* PAbJ ergaben, dass dieses homologe Protein deutlich geringere Absorptionswerte im Vergleich zur Negativkontrolle Vsp1 aufwies (Abbildung 3.12). Das BBA70 verzeichnete in dieser Versuchsdurchführung wiederholt hohe Absorptionswerte wie schon in früheren Studien.¹¹⁴

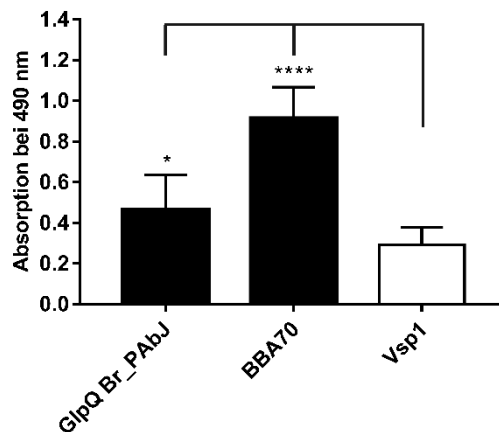


Abbildung 3.12 Plasminogenbindung von GlpQ aus *B. recurrentis* PAbJ

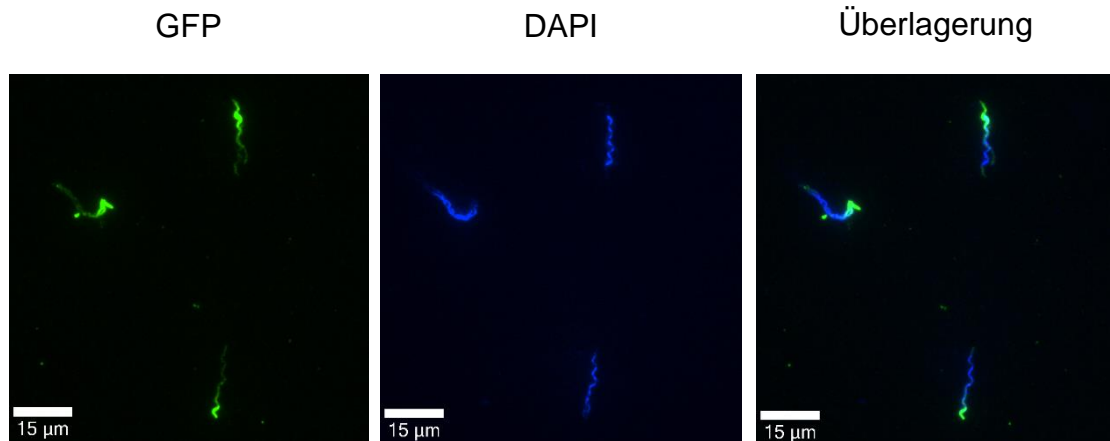
Die Bindung von Plasminogen an GlpQ aus *B. recurrentis* PAbJ wurde mittels Bindungs-ELISA ermittelt. Hierfür wurden GlpQ aus *B. recurrentis* PAbJ sowie BBA70 (Positivkontrolle) und Vsp1 (Negativkontrolle) (jeweils 5 µg/ml) immobilisiert, mit Plasminogen (10 µg/ml) inkubiert und die Reaktion mittels polyklonalem Anti-Plasminogen Antikörper (1:1000) detektiert. Dem Ergebnis liegen Triplikate aus mindestens drei unabhängigen Versuchen zugrunde. n.s.) nicht signifikant; ****) $p \leq 0.0001$ (Einfaktorieller ANOVA-Test mit multiplem Vergleich nach Bonferroni, Konfidenzintervall = 95 %).

3.8 Nachweis der Plasminogen-Bindung an intakten *Borrelia miyamotoi*-Zellen mit einem Immunfluoreszenz-Test

Zur Darstellung der Bindung von Plasminogen an intakten Borrelienzellen wurden Immunfluoreszenz-Tests (2.10.5) durchgeführt. Hierzu wurden *B. miyamotoi*-Zellen für 30 min bei 37 °C mit unterschiedlichen Konzentrationen an Plasminogen versetzt und im weiteren Verlauf auf Objektträgern fixiert. Das gebundene Plasminogen wurde anschließend durch einen polyklonalen Anti-Plasminogen-Antikörper (1:500) detektiert.

Wie in Abbildung 3.13 dargestellt, zeigten die Borrelienzellen eine partielle Fluoreszenz, was sich darauf zurückführen lässt, dass Plasminogen nur in bestimmten Arealen/Regionen an der Zelloberfläche gebunden wird. Nur wenige Zellen zeigten eine starke Fluoreszenz, die sich über die gesamte Zelle verteilte. Mit diesem Versuch konnte grundsätzlich nachgewiesen werden, dass native *B. miyamotoi*-Zellen in der Lage sind, Plasminogen an der Zelloberfläche zu binden.

Ausschnitt 1



Ausschnitt 2

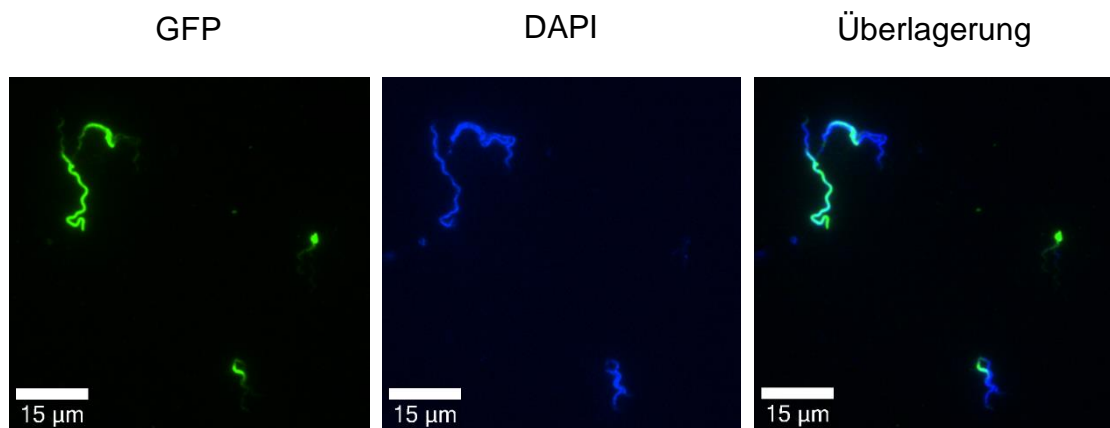


Abbildung 3.13 Nachweis der Bindung von Plasminogen an native *B. miyamotoi*-Zellen

Die in der Abbildung dargestellten *B. miyamotoi* HT31-Zellen wurden mit Plasminogen (133,3 ng/µl) inkubiert und auf Objektträgern fixiert. Anschließend wurde das Plasminogen mittels polyklonalen, Anti-Plasminogen-Antikörper (1:500) detektiert. Als sekundärer Antikörper diente der fluoreszierende Alexa Fluor 488®-Anti-Ziege Antikörper (1:500). Die Aufnahmen erfolgten mithilfe eines Axio Imager M2 Fluoreszenzmikroskops und einer Spot RT3 Kamera. Es wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt; dargestellt sind repräsentative Ausschnitte aus einem Versuch. Skalierungsbalken: 15 µm.

4 Diskussion

In Hinblick auf die zugrunde liegende Fragestellung lässt sich festhalten, dass im Rahmen dieser Arbeit mit Vlp15/16 und GlpQ zwei neue, Plasminogen-bindende Proteine von *B. miyamotoi* identifiziert werden konnten (siehe Kapitel 3.2). Funktionelle Analysen ergaben, dass das gebundene Plasminogen nicht nur zu Plasmin aktiviert werden konnte (siehe Kapitel 3.5), sondern darüber hinaus in der Lage war, das physiologische Substrat Fibrinogen zu degradieren (siehe Kapitel 3.6). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass vitale *B. miyamotoi*-Zellen, Plasminogen auf der äußeren Zellmembran binden können (siehe Kapitel 3.8).

Bei der weiterführenden Untersuchung wurde für beide Proteine eine konzentrationsabhängige Bindung von Plasminogen festgestellt. Die sich hieraus jeweils ergebende Dissoziationskonstante betrug für Vlp15/16 $K_d = 354 \text{ nM} \pm 62 \text{ nM}$ und für GlpQ $K_d = 413 \text{ nM} \pm 72 \text{ nM}$ (siehe Kapitel 3.3). Das Plasminogen-bindende Protein BBA70 von *B. burgdorferi* LW2 weist mit einer $K_d = 55.1 \text{ nM} \pm 10.3 \text{ nM}$ eine vergleichsweise höhere Bindungsaffinität auf, während das CbiA-Protein, welches ebenfalls aus *B. miyamotoi* stammt, eine vergleichbare Bindungsaffinität aufwies ($K_d = 347 \text{ nM} \pm 41 \text{ nM}$).^{35,114} Ab einer Konzentration von etwa $2 \mu\text{M}$ flacht die Bindungskurve für Vlp15/16 und GlpQ ab und es stellte sich eine Sättigung ein (siehe Kapitel 3.3). Dieses Bindungsverhalten konnte auch bei BBA70 und CbiA beobachtet werden, obgleich sich die Sättigung bei BBA70 – entsprechend dem niedrigeren K_d -Wert – früher einstellt.^{35,114} Da Plasminogen im menschlichen Plasma mit einer Konzentration von etwa $2 \mu\text{M}$ vorliegt,⁹⁴ ist also davon auszugehen, dass Vlp15/16 und GlpQ auch im Wirt dazu in der Lage sind, Plasminogen in ausreichenden Mengen zu binden. Die Bindungsdaten für das GlpQ-Protein von *B. recurrentis* (siehe Abbildung 3.12) lassen vermuten, dass dieses Protein schwächer mit Plasminogen interagiert als GlpQ von *B. miyamotoi*. Möglicherweise liegt die Ursache hierfür in der Aminosäuresequenz der beiden Proteine begründet (siehe Abbildung 4.1). Wie sich im weiteren Verlauf der Untersuchungen gezeigt hat, ist die C-terminale Region, in der bei GlpQ von *B. miyamotoi* die beiden letzten Lysine lokalisiert sind, relevant für die Plasminogen-Bindung (siehe Abbildung 3.11). Diese fehlen jedoch bei *B. recurrentis* Stamm A1, was wiederum die schwächere Bindung erklären könnte.

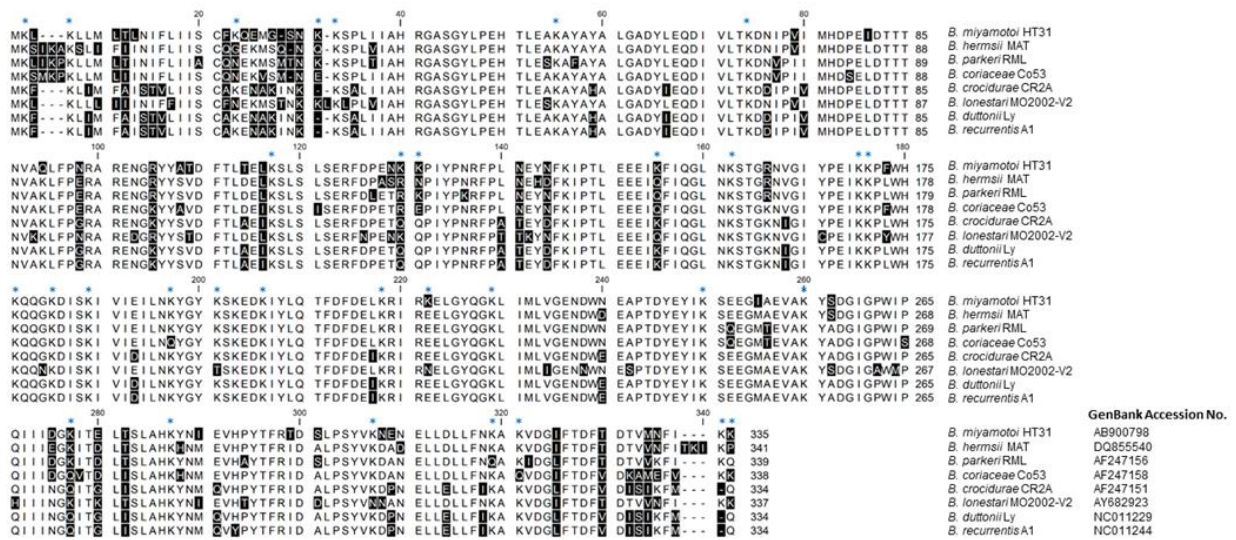


Abbildung 4.1 GlpQ-Sequenzen verschiedener Borrelien-Stämme

Aminosäure-Alignment von GlpQ-orthologen Proteinen verschiedener Rückfallfieber-Spirochäten. Aminosäurereste, die sich von der GlpQ-Sequenz des Stammes HT31 unterscheiden, sind mit schwarzen Kästen unterlegt, und die entsprechenden Lysinreste sind mit einem Sternchen gekennzeichnet. Das Alignment wurde mit dem CLC Sequence Viewer, Version 8.0 (QIAGEN, Aarhus A/S, Dänemark) erstellt.

Interessanterweise scheinen sich Vlp15/16 und GlpQ allerdings in ihrer Art und Weise Plasminogen zu binden, voneinander zu unterscheiden. Dies zeigte sich in vergleichenden Untersuchungen zur Protein-Protein Interaktion. Da für andere Borrelienproteine bereits gezeigt werden konnte, dass die Plasminogen-Bindung über Lysin-Reste vermittelt wird, wurde auch für Vlp15/16 und GlpQ die Bedeutung von Lysin-Resten und elektrostatischen Wechselwirkungen für die Interaktion beider Proteine untersucht.^{101,108-112} In den Bindungsanalysen mit NaBr und TXA reagierte Vlp15/16 lediglich auf die Anwesenheit des Lysin-Analogons TXA, was sich in einer verminderten Plasminogen-Bindung manifestierte. Im Fall von GlpQ hingegen zeigte sich in Gegenwart von NaBr und TXA eine reduzierte Plasminogen-Bindung (siehe Kapitel 3.4). BBA70 und CbiA zeigten bereits ab einer TXA-Konzentration von 0,1 mM einen signifikanten, inhibitorischen Einfluss auf die Bindung.^{35,114} Bei Vlp15/16 stellte sich eine vergleichbare Inhibition erst ab einer Konzentration von 1 mM TXA und bei GlpQ ab 50 mM TXA ein. In Gegenwart von NaBr konnte wie bereits für BBA70 und CbiA nachgewiesen, eine signifikante Inhibition für GlpQ beobachtet werden.^{35,114} Insgesamt deuten die erhobenen Ergebnisse darauf hin, dass für Vlp15/16 vor allem Lysin-Reste eine tragende Rolle bei der Bindung spielen, wohingegen bei GlpQ neben

Lysin-Resten auch elektrostatische Interaktionen beteiligt sind. Damit reihen sich Vlp15/16 und GlpQ in die Gruppe Plasminogen-bindender Proteine zahlreicher anderer Bakterienspezies ein, bei denen die Daten ebenfalls für eine Beteiligung von Lysin-Resten an der Bindung von Plasminogen sprechen (siehe Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1 Bindungseigenschaften Plasminogen-bindender Proteine verschiedener Bakterienspezies

Protein	Bakterien-Spezies	Inhibition der Plg-Bindung durch Lysin-Analoga	Inhibition der Plg-Bindung durch ionische Wechselwirkung	Plg-Bindungsstelle
CipA ¹¹⁸	<i>A. baumannii</i>	+	-	Bindung durch Lysin K369; Interaktion mit Kringle-Domäne 1 und 4
BBA70 ¹¹⁴	<i>B. burgdorferi</i>	+	+	α -Helix am C-Terminus; Interaktion mit Kringle-Domäne 4
Enolase ⁸²	<i>B. burgdorferi</i>	+	-	k.A.
Vlp15/16	<i>B. miyamotoi</i>	+	-	k.A.
GlpQ	<i>B. miyamotoi</i>	+	+	C-terminale Lysin-Reste an Position 333 und 334
CbiA ¹¹⁹	<i>B. miyamotoi</i>	+	+	C-terminalen Lysin-Reste nicht beteiligt
ORF7 ¹²⁰	<i>B. recurrentis</i>	+	+	N-Terminus vermutlich unbeteiligt
ORF9 ¹²⁰	<i>B. recurrentis</i>	+	+	k.A.
ORF10 ¹²⁰	<i>B. recurrentis</i>	+	-	k.A.
Pra 1 ¹²¹	<i>C. albicans</i>	+	+	k.A.
G-Fimbrien ¹²²	<i>E. coli</i>	+	k.A.	k.A.
Protein E ¹²³	<i>H. influenzae</i>	+	+	N-terminale Aminosäurereste 41–68
Typ 1 Fimbrien ¹²²	<i>Salmonella enterica serovar typhimurium</i>	+	k.A.	k.A.

Legende: „+“ = Inhibition vorhanden, „-“ = keine Inhibition, k.A. = keine Angabe

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde durch Substitution von Lysin-Resten deren Bedeutung für die Plasminogen-Bindung genauer untersucht. Wie sich in vorangegangenen Versuchen mit Vlp18 bestätigte, scheinen Veränderungen an Vlp-Proteinen nur sehr eingeschränkt möglich, weshalb sich der Fokus für diese Untersuchungen auf GlpQ beschränkte.⁸⁵ Da bei BBA70 aus *B. burgdorferi* und CipA aus *Acinetobacter baumannii* die am C-Terminus gelegenen Lysin-Reste als essenziell für die Interaktion mit Plasminogen identifiziert werden konnten, wurden auch im Fall von GlpQ die C-terminalen Lysin-Reste substituiert.^{114,118} Allerdings ließ sich keine GlpQ-Variante mit einer Deletion am C-Terminus generieren, die affinitätschromatographisch gereinigt werden konnte, obgleich eine Produktion in *E. coli* und der His-tag mittels Westernblot-Analyse nachgewiesen werden konnte. Eine mögliche Erklärung könnte in einer veränderten Proteinfaltung infolge der Deletion sein, so dass der His-Tag nicht frei zugänglich ist und daher nicht an die NTA-Agarosepartikel binden konnte.

Vor diesem Hintergrund wurde von einer weiteren Deletion am C-terminalen Ende des Proteins abgesehen und stattdessen eine Substitution der am C-Terminus lokalisierten Lysine durchgeführt, um die Relevanz der Lysine für die Plasminogenbindung zu untersuchen. Hierfür wurden mittels in vitro-Mutagenese an den Positionen 333, 334 oder beiden Positionen die Lysin-Reste durch Alanin-Reste ersetzt. Zum Vergleich sind in Abbildung 4.1 die Aminosäure-Sequenzen der GlpQ-Proteine verschiedener Borrelien-Stämme aufgeführt und die Lysin-Reste hervorgehoben. Nach der erfolgreichen Transformation konnten alle drei GlpQ-Varianten in *E. coli*-Zellen exprimiert und anschließend gereinigt werden. In den sich anschließenden Plasminogenbindungs-Versuchen zeigte sich für die Variante GlpQ-K333-334A, in der beide Lysin-Reste durch Alanin-Reste ersetzt wurden, eine signifikante Reduktion der Plasminogenbindung (Abbildung 3.11). Auch die Substitution an Position 334 (GlpQ-K334A) führte zu einer verminderten Bindungsfähigkeit, wohingegen die Variante GlpQ-K333A eine verstärkte Bindung zeigte. Die erhöhten Werte im Fall von GlpQ-K333A lassen sich am ehesten auf eine Strukturänderung im Protein zurückführen, welche eine erhöhte Bindung bedingt. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die C-terminalen Lysin-Reste direkt an der Interaktion mit Plasminogen beteiligt und der Lysin-Rest an Aminosäureposition 334 im Speziellen eine wichtige Rolle spielen könnte. Für das Plasminogen-bindende Protein BBA70 aus *B. burgdorferi* wurde die Bedeutung der am C-Terminus lokalisierten Lysin-Reste für die

Interaktion mit Plasminogen bereits verifiziert.¹¹⁴ Für dieses Protein konnte ebenfalls gezeigt werden, dass eine Deletion der Lysin-reichen Region am C-Terminus die Bindung von Plasminogen vollständig eliminiert.¹¹⁴ Demgegenüber hatte die Substitution der Lysine durch Alanin-Reste im Fall von CbiA aus *B. miyamotoi* keinen Einfluss auf die Plasminogen-Bindung.³⁵ Dies zeigt, dass die Bindung von Plasminogen nicht ausschließlich über Lysine erfolgen muss, sondern beispielsweise wie im Fall des M-Proteins der Gruppe A Streptokokken ebenfalls Arginin- und Histidin-Reste als bindende Aminosäuren infrage kommen.¹²⁴ Aufgrund der reduzierten Plasminogenbindung in den Versuchen mit dem Lysin-Analogon TXA (siehe Abbildung 3.5) und der signifikant verminderten Plasminogenbindung nach der Lysin-Substitution (siehe Abbildung 3.11) ist für GlpQ jedoch anzunehmen, dass Lysin-Reste zumindest zu einem Teil in der Interaktion mit Plasminogen beteiligt sind. Da die Plasminogenbindung durch die Substitutionen an den Stellen 333 und 334 jedoch nicht zu einem vollständigen Verlust der Bindung geführt haben, ist davon auszugehen, dass noch weitere Lysin-Reste an der Bindung beteiligt sind.

Neben der Charakterisierung der Bindungseigenschaften von Vlp15/16 und GlpQ für Plasminogen beinhaltete die Zielsetzung der Arbeit, die Protein-Plasminogen-Interaktion funktionell zu charakterisieren. Im ersten Schritt wurde untersucht, ob das an Vlp15/16 beziehungsweise GlpQ gebundene Plasminogen zu Plasmin aktiviert werden kann. Hierzu wurde die Aktivierung des gebundenen Plasminogens durch uPA mithilfe des chromogenen Substrats D-Val-Leu-Lys p-Nitroanilid Dihydrochlorid (S-2251) nachgewiesen. S-2251 wird durch Plasmin zu para-Nitroanilin (pNA) gespalten, welches photometrisch nachgewiesen werden kann und proportional mit der Aktivität von Plasmin zunimmt. Die Ergebnisse aus diesem Versuch zeigten für Vlp15/16 und GlpQ eine kontinuierliche Zunahme der Absorptionswerte für den gesamten Messzeitraum von 24 Stunden (siehe Abbildung 3.6). Daraus lässt sich folgern, dass das an die beiden Borrelienproteine gebundene Plasminogen durch uPA zu Plasmin aktiviert werden kann. Darüber hinaus ließen sich in den Reaktionsansätzen mit TXA nur dezente Anstiege in den Absorptionswerten messen, was den Einfluss von TXA auf die Plasminogenbindung mit Vlp15/16 und GlpQ bestätigte. Während das CbiA-Protein aus *B. miyamotoi* eine vergleichbare Aktivierungskurve des gebundenen Plasminogens aufweist, zeigte BBA70 einen deutlich steileren Anstieg der Plasminaktivität.^{35,114} Dies lässt sich am ehesten auf die Bindungsaffinitäten der Proteine zurückführen, welche bei CbiA mit

$K_d = 347 \text{ nM} \pm 41 \text{ nM}$ in einem vergleichbaren Bereich wie bei Vlp15/16 ($K_d = 354 \text{ nM} \pm 62 \text{ nM}$) und GlpQ ($K_d = 413 \text{ nM} \pm 72 \text{ nM}$) liegt.^{35,119} Demgegenüber bindet BBA70 mit einer K_d von $55.1 \text{ nM} \pm 10.3 \text{ nM}$ deutlich stärker Plasminogen, was wiederum die stärkere Plasmin-Aktivität erklärt.¹¹⁴

Aufbauend auf die erhobenen Daten zur Plasminogen-Aktivierung wurde mithilfe des Fibrinogen-Degradations-Assays untersucht, ob das gebundene Plasminogen nicht nur aktiviert werden kann, sondern darüber hinaus dazu in der Lage ist, Fibrinogen als physiologisches Substrat von Plasmin zu degradieren. Daraus könnte man im Hinblick auf die Pathogenese von *B. miyamotoi* Rückschlüsse ziehen, ob eine Penetration durch die EZM durch die Degradation der EZM-Komponenten prinzipiell gegeben ist. Zum Nachweis der Plasminaktivität wurde zu den Reaktionsansätzen Fibrinogen hinzugefügt, nachdem zuvor Plasminogen an Vlp15/16 beziehungsweise GlpQ binden konnte. Die Westernblot-Analyse zeigte deutlich, dass das an Vlp15/16 und GlpQ gebundene Plasmin Fibrinogen spalten kann. Allerdings zeigte das gebundene Plasmin bei beiden Proteinen eine vergleichsweise geringere proteolytische Aktivität als in Untersuchungen mit CspA und CbiA.^{35,116,125} Das BBA70-Protein, welches eine sehr starke Plasminogen-Bindung aufweist, zeigte wie in früheren Studien eine ausgeprägte Fibrinogen-Degradation.¹¹⁴ Trotz Optimierung der Versuchsparameter und der Verwendung verschiedener Chargen von uPA und Plasminogen zeigte sich eine partielle Degradation der α -Kette des Fibrinogens in den Reaktionsansätzen mit Vsp1 und BSA sowie in den Kontrollen, in welchen TXA hinzugefügt wurde oder Plasminogen nicht enthielten. Es ist daher anzunehmen, dass das Testsystem zum Nachweis der Fibrinogendegradation zu unspezifisch ist, um die Unterschiede, die mit dem chromogenen Substrat S-2251 gefunden wurden, ebenfalls nachzuweisen. Aufgrund der Aktivierbarkeit des gebundenen Plasminogen ist deshalb anzunehmen, dass auch *B. miyamotoi* in der Lage ist, die vaskulären Basalmembran und Komponenten der extrazellulären Matrix zu degradieren, um in tiefere Gewebsschichten vorzudringen, wie es bereits für *B. burgdorferi* beschrieben wurde.¹²⁶ Insbesondere die Ergebnisse der Immunfluoreszenzmikroskopie, die eine Bindung von Plasminogen an *B. miyamotoi* bestätigte, (siehe Abbildung 3.13) untermauern diese Annahme. Folglich wäre auch eine Überwindung der Blut-Hirn-Schranke durch *B. miyamotoi* denkbar, was bei der Entstehung einer Meningoenzephalitis zum Tragen kommen könnte, wie sie bereits beschrieben wurden.^{41,42}

In der Zusammenschau der erhobenen Ergebnisse zeigt sich, dass es sich bei Vlp15/16 und GlpQ um zwei neu-identifizierte Plasminogen-bindende Proteine handelt, die sich jedoch in ihrer Eigenschaft, Plasminogen zu binden, voneinander unterscheiden (siehe Abschnitt 3.4). Darüber hinaus konnte das gebundene Plasminogen zu Plasmin aktiviert werden und war dazu in der Lage, sein physiologisches Substrat Fibrinogen zu spalten (siehe Abschnitt 3.6). Das Prinzip, an der Zelloberfläche regulatorische Proteine und Enzyme aus dem Serum des Wirts zu binden und somit den Abwehrreaktionen zu entgehen, ist eine weit verbreitete Strategie von humanpathogenen Mikroorganismen.^{38,127,128} Für Borrelien stellt die Akquisition solcher Proteasen wie Plasminogen aus dem Serum des Wirts einen effektiven Mechanismus der Immunevasion dar.^{36,102,105} Dabei können Plasminogen-bindende Proteine in zwei Gruppen unterteilt werden. Erstere Gruppe umfasst Proteine, welche in der äußeren Membran der Zelle verankert sind und daher direkten Kontakt zur extrazellulären Umgebung haben. In die zweite Gruppe fallen mikrobielle Proteine, welche vornehmlich im Zytoplasma und /oder Periplasma verbleiben.¹²⁸ Zur Gruppe der membranständigen Proteine gehören beispielsweise CbiA von *B. miyamotoi*³⁵, BBA70, CspA, OspA und OspC der Lyme-Borrelien^{114,116,125,126,129}, Typ 1 Fimbrien von *E. coli* und *Salmonella enterica* serovar typhimurium¹²², das PE-Protein von *H. influenzae*¹²³ oder Pra1 von *C. albicans*¹²¹. Proteinen der zweiten Gruppe üben multiple Funktionen inner- oder außerhalb der Zelle aus, weshalb sie auch als „moonlighting proteins“ bezeichnet werden.^{130,131} Hierzu zählen beispielweise Enolase, Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, Fructose-1,6-bisphosphatase, DanK, sowie der Elongations-Faktor Ef-Tu verschiedener humanpathogener Bakterien.^{128,132} Vlp15/16 ließe sich demnach als membranständiges Protein der ersten Gruppe zuordnen, während GlpQ, welches an der Spaltung von Glycerol beteiligt ist, als potentiell „moonlighting protein“ in die zweite Gruppe einzuordnen wäre. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass GlpQ von *E. coli*, *Treponema pallidum* und *Borrelia hermsii* vermutlich im Periplasma vorkommt und an der Außenseite der Innenmembran beziehungsweise an der Innenseite der Außenmembran verankert ist und potentiell nicht mit Plasminogen in Kontakt kommt.^{72,73,76} Demgegenüber wird GlpQ von *H. influenzae* auf der Außenfläche exponiert.^{74,133} Es ist allerdings bekannt, dass intrazelluläre „moonlighting“-Proteine auch auf der Außenmembran zahlreicher Bakterien vorkommen können, wie z. B. Enolase, Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, Fructose-1,6-bisphosphatase und der Elongations-Faktor Ef-Tu.¹³⁴⁻¹⁴² Für *B. miyamotoi* ist die Lokalisation von GlpQ nicht

voll umfänglich geklärt und bedarf weiterer Untersuchungen. Diese könnten darüber Aufschluss liefern, ob GlpQ auch bei *B. miyamotoi* auf der Außenmembran exponiert wird. In diesem Fall würde die Funktion von GlpQ als Plasminogen-bindendes Protein im Kontext der Degradation extrazellulärer Matrix und somit der Dissemination von *B. miyamotoi* weiter untermauert werden.

5 Zusammenfassung

5.1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Proteine Vlp15/16 und GlpQ aus *B. miyamotoi* hinsichtlich ihrer Eigenschaft, mit Plasminogen zu interagieren, charakterisiert.

Da einige Fälle von ZNS-Beteiligungen bei *B. miyamotoi*-Infektionen berichtet wurden, ist anzunehmen, dass diese Borrelienspezies über molekulare Mechanismen zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke verfügt. Eine solche Strategie könnte die Bindung wirtseigener Proteasen wie z.B. Plasminogen sein, um Komponenten der extrazellulären Matrix zu degradieren und dadurch die Dissemination des Erregers zu erleichtern.

Während Vmps, zu welchen auch Vlp15/16 gehört, als membranständige Proteine durch Variation der antigenen Oberflächenmatrix zur Immunevasion des Erregers beitragen, ist GlpQ bei der Hydrolyse von Phospholipiden in den Zellstoffwechsel eingebunden. Trotz dieser unterschiedlichen Funktionen, die den beiden Proteinen zukommen, binden beide Moleküle Plasminogen. Die Eigenschaften dieser Interaktion wurden in dieser Arbeit im Detail untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass Vlp15/16 und GlpQ Plasminogen konzentrationsabhängig binden und die Dissoziationskonstanten (Vlp15/16: $K_d = 354 \text{ nM} \pm 62 \text{ nM}$; GlpQ: $K_d = 413 \text{ nM} \pm 72 \text{ nM}$) für beide Proteine im Bereich der Serumkonzentration von $2 \mu\text{M}$ liegen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass den beiden Proteinen unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen, Plasminogen zu binden. Während die erhobenen Daten für Vlp15/16 darauf hindeuten, dass Lysin-Reste essenziell für die Interaktion sind, scheinen bei GlpQ ionische Wechselwirkungen von Bedeutung zu sein.

Um die Beteiligung von C-terminal lokalisierten Lysin-Resten für die Plasminogen-Bindung von GlpQ nachzuweisen, wurden Varianten mit einzelnen Lysin-Substitutionen an zwei unterschiedlichen Positionen (333 und 334) sowie eine Variante mit einer Zweifach-Substitution (GlpQ-K333A-K334A) generiert. Die Bindungsanalysen ergaben, dass insbesondere der Lysin-Rest an Position 334 bei der Interaktion mit Plasminogen beteiligt ist.

Die funktionellen Analysen zeigten, dass das an Vlp15/16 beziehungsweise GlpQ gebundene Plasminogen zu Plasmin aktiviert werden konnte und darüber hinaus dazu in der Lage war, das physiologische Substrat Fibrinogen zu degradieren.

Abschließend wurde die Plasminogen-Bindung an nativen *B. miyamotoi*-Zellen mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie nachgewiesen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen Vlp15/16 und GlpQ als Plasminogen-bindende Proteine aus, mit deren Hilfe *B. miyamotoi* befähigt ist, Komponenten der extrazellulären Matrix zu degradieren und somit prinzipiell zur Dissemination des Erregers beizutragen.

5.2 Summary

In this study, Vlp15/16 and GlpQ of *B. miyamotoi* were characterized regarding their ability to interact with plasminogen.

As a few cases of CNS involvement have previously been reported for *B. miyamotoi* disease, it is reasonable to assume that *B. miyamotoi* developed strategies to cross the blood-brain barrier. One particular strategy involves acquisition of host proteases such as plasminogen to degrade components of the extracellular matrix to support dissemination of the pathogen.

Vmps including Vlp15/16 are membrane-bound proteins that contribute to immune evasion of the pathogen by varying the composition of the outer surface. In contrast, GlpQ participates in cellular metabolism and hydrolyses phospholipids. Despite their different functions, both proteins are capable to bind plasminogen. The nature of the protein-protein interaction were investigated in more detail in this work. The data showed that Vlp15/16 and GlpQ bound plasminogen in a concentration-dependent manner and that the dissociation constants (Vlp15/16: $K_d = 354 \text{ nM} \pm 62 \text{ nM}$; GlpQ: $K_d = 413 \text{ nM} \pm 72 \text{ nM}$) for both proteins were in the range of $2 \mu\text{M}$ which corresponds to the concentration of plasminogen in serum. Furthermore, it could be demonstrated that both proteins differentially interact with plasminogen. While lysine residues in Vlp15/16 are essential for plasminogen binding, ionic interactions appeared to play a role for the interaction plasminogen with GlpQ.

To demonstrate the involvement of C-terminal located lysine residues for plasminogen binding, GlpQ variants with single lysine substitutions at two different positions (333 and 334) and one variant with a double substitution (GlpQ- K333A-K334A) were generated. The data generated suggest that the lysine residue at position 334 is of relevance for the interaction with plasminogen.

Further functional analyses revealed that plasminogen bound to Vlp15/16 and GlpQ, respectively, could be activated to plasmin and was also capable of degrading its physiological substrate fibrinogen.

Finally, plasminogen binding to native *B. miyamotoi* cells could be detected by employing immunofluorescence microscopy.

In sum, the collected data revealed Vlp15/16 and GlpQ as novel plasminogen-binding proteins of *B. miyamotoi*. Interaction with plasminogen enables *B. miyamotoi* to degrade components of the extracellular matrix and, thus could contribute in the dissemination of the pathogen.

6 Literaturverzeichnis

1. Hunfeld K-P. Borrelien. In: Suerbaum S, Burchard G-D, Kaufmann SHE, Schulz TF, eds. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 8th ed. 2016. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016:367-374. *Springer-Lehrbuch*.
2. Hof H, Schlüter D. *Medizinische Mikrobiologie*. 7. überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart: Thieme; 2019.
3. Szekeres S, Lügner J, Fingerle V, Margos G, Földvári G. Prevalence of *Borrelia miyamotoi* and *Borrelia burgdorferi sensu lato* in questing ticks from a recreational coniferous forest of East Saxony, Germany. *Ticks Tick Borne Dis*. 2017;8(6):922-927. doi:10.1016/j.ttbdis.2017.08.002.
4. Bergström S, Normark J. Microbiological features distinguishing Lyme disease and relapsing fever spirochetes. *Wien Klin Wochenschr*. 2018;130(15-16):484-490. doi:10.1007/s00508-018-1368-2.
5. Cutler S, Vayssier-Taussat M, Estrada-Peña A, Potkonjak A, Mihalca AD, Zeller H. A new borrelia on the block: *Borrelia miyamotoi* - a human health risk? *Euro Surveill*. 2019;24(18). doi:10.2807/1560-7917.ES.2019.24.18.1800170.
6. Fukunaga M, Takahashi Y, Tsuruta Y, Matsushita O, Ralph D, McClelland M, Nakao M. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia miyamotoi* sp. nov., isolated from the ixodid tick *Ixodes persulcatus*, the vector for Lyme disease in Japan. *Int J Syst Bacteriol*. 1995;45(4):804-810. doi:10.1099/00207713-45-4-804.
7. Platonov AE, Karan LS, Kolyasnikova NM, Makhneva NA, Toporkova MG, Maleev VV, Fish D, Krause PJ. Humans infected with relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia. *Emerging Infect Dis*. 2011;17(10):1816-1823. doi:10.3201/eid1710.101474.
8. Krause PJ, Fish D, Narasimhan S, Barbour AG. *Borrelia miyamotoi* infection in nature and in humans. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21(7):631-639. doi:10.1016/j.cmi.2015.02.006.
9. Rollend L, Fish D, Childs JE. Transovarial transmission of *Borrelia* spirochetes by *Ixodes scapularis*: a summary of the literature and recent observations. *Ticks Tick Borne Dis*. 2013;4(1-2):46-51. doi:10.1016/j.ttbdis.2012.06.008.
10. Scoles GA, Papero M, Beati L, Fish D. A relapsing fever group spirochete transmitted by *Ixodes scapularis* ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2001;1(1):21-34. doi:10.1089/153036601750137624.
11. Barbour AG, Bunikis J, Travinsky B, Hoen AG, Diuk-Wasser MA, Fish D, Tsao JI. Niche partitioning of *Borrelia burgdorferi* and *Borrelia miyamotoi* in the same tick vector and mammalian reservoir species. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;81(6):1120-1131. doi:10.4269/ajtmh.2009.09-0208.
12. Bunikis J, Barbour AG. Third *Borrelia* species in white-footed mice. *Emerging Infect Dis*. 2005;11(7):1150-1151. doi:10.3201/eid1107.041355.
13. Hamer SA, Hickling GJ, Keith R, Sidge JL, Walker ED, Tsao JI. Associations of passerine birds, rabbits, and ticks with *Borrelia miyamotoi* and *Borrelia andersonii* in Michigan, U.S.A. *Parasit Vectors*. 2012;5:231. doi:10.1186/1756-3305-5-231.

14. Crowder CD, Carolan HE, Rounds MA, Honig V, Mothes B, Haag H, Nolte O, Luft BJ, Grubhoffer L, Ecker DJ, Schutzer SE, Eshoo MW. Prevalence of *Borrelia miyamotoi* in Ixodes ticks in Europe and the United States. *Emerging Infect Dis.* 2014;20(10):1678-1682. doi:10.3201/eid2010.131583.
15. Lynn GE, Graham CB, Horiuchi K, Eisen L, Johnson TL, Lane RS, Eisen RJ. Prevalence and geographic distribution of *Borrelia miyamotoi* in host-seeking *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) nymphs in Mendocino County, California. *J Med Entomol.* 2018;55(3):711-716. doi:10.1093/jme/tjx258.
16. Mun J, Eisen RJ, Eisen L, Lane RS. Detection of a *Borrelia miyamotoi sensu lato* relapsing-fever group spirochete from *Ixodes pacificus* in California. *J Med Entomol.* 2006;43(1):120-123. doi:10.1093/jmedent/43.1.120.
17. Wagemakers A, Jahfari S, Wever B de, Spanjaard L, Starink MV, Vries HJC de, Sprong H, Hovius JW. *Borrelia miyamotoi* in vectors and hosts in the Netherlands. *Ticks Tick Borne Dis.* 2017;8(3):370-374. doi:10.1016/j.ttbdis.2016.12.012.
18. Lynn GE, Breuner NE, Eisen L, Hojgaard A, Replogle AJ, Eisen RJ. An immunocompromised mouse model to infect *Ixodes scapularis* ticks with the relapsing fever spirochete, *Borrelia miyamotoi*. *Ticks Tick Borne Dis.* 2019;10(2):352-359. doi:10.1016/j.ttbdis.2018.11.017.
19. Boyle WK, Wilder HK, Lawrence AM, Lopez JE. Transmission dynamics of *Borrelia turicatae* from the arthropod vector. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(4):e2767. doi:10.1371/journal.pntd.0002767.
20. Piesman J, Mather TN, Sinsky RJ, Spielman A. Duration of tick attachment and *Borrelia burgdorferi* transmission. *J Clin Microbiol.* 1987;25(3):557-558.
21. Piesman J, Oliver JR, Sinsky RJ. Growth kinetics of the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*) in vector ticks (*Ixodes dammini*). *Am J Trop Med Hyg.* 1990;42(4):352-357. doi:10.4269/ajtmh.1990.42.352.
22. Breuner NE, Dolan MC, Replogle AJ, Sexton C, Hojgaard A, Boegler KA, Clark RJ, Eisen L. Transmission of *Borrelia miyamotoi sensu lato* relapsing fever group spirochetes in relation to duration of attachment by *Ixodes scapularis* nymphs. *Ticks Tick Borne Dis.* 2017;8(5):677-681. doi:10.1016/j.ttbdis.2017.03.008.
23. Sarkisyan DS, Platonov AE, Karan LS, Shipulin GA, Sprong H, Hovius JWR. Probability of spirochete *Borrelia miyamotoi* transmission from ticks to humans. *Emerging Infect Dis.* 2015;21(12):2273-2274. doi:10.3201/eid2112.151097.
24. Hofhuis A, Herremans T, Notermans DW, Sprong H, Fonville M, van der Giessen JWB, van Pelt W. A prospective study among patients presenting at the general practitioner with a tick bite or erythema migrans in the Netherlands. *PLoS ONE.* 2013;8(5):e64361. doi:10.1371/journal.pone.0064361.
25. Huegli D, Moret J, Rais O, Moosmann Y, Erard P, Malinverni R, Gern L. Prospective study on the incidence of infection by *Borrelia burgdorferi sensu lato* after a tick bite in a highly endemic area of Switzerland. *Ticks Tick Borne Dis.* 2011;2(3):129-136. doi:10.1016/j.ttbdis.2011.05.002.
26. Wagemakers A, Staarink PJ, Sprong H, Hovius JWR. *Borrelia miyamotoi*: a widespread tick-borne relapsing fever spirochete. *Trends Parasitol.* 2015;31(6):260-269. doi:10.1016/j.pt.2015.03.008.

27. Fonville M, Friesema IHM, Hengeveld PD, van Docters Leeuwen A, Jahfari S, Harms MG, van Vliet AJH, Hofhuis A, van Pelt W, Sprong H, van den Wijngaard CC. Human exposure to tickborne relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, the Netherlands. *Emerging Infect Dis.* 2014;20(7):1244-1245. doi:10.3201/eid2007.131525.
28. Sarkisyan DS, Maleev VV, Platonov AE, Platonova OV, Karan LS. Relapsing (recurrent) disease caused by *Borrelia miyamotoi*. *Ter Arkh.* 2015;87(11):18-25. doi:10.17116/terarkh2015871118-25.
29. Röttgerding F, Wagemakers A, Koetsveld J, Fingerle V, Kirschfink M, Hovius JW, Zipfel PF, Wallich R, Kraiczy P. Immune evasion of *Borrelia miyamotoi*: CbiA, a novel outer surface protein exhibiting complement binding and inactivating properties. *Sci Rep.* 2017;7(1):303. doi:10.1038/s41598-017-00412-4.
30. Stone BL, Brissette CA. Host immune evasion by Lyme and relapsing fever borreliae: Findings to lead future studies for *Borrelia miyamotoi*. *Front Immunol.* 2017;8:12. doi:10.3389/fimmu.2017.00012.
31. Teegler A, Herzberger P, Margos G, Fingerle V, Kraiczy P. The relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi* resists complement-mediated killing by human serum. *Ticks Tick Borne Dis.* 2014;5(6):898-901. doi:10.1016/j.ttbdis.2014.07.011.
32. Booth CE, Powell-Pierce AD, Skare JT, Garcia BL. *Borrelia miyamotoi* FbpA and FbpB are immunomodulatory outer surface lipoproteins with distinct structures and functions. *Front Immunol.* 2022;13:886733. doi:10.3389/fimmu.2022.886733.
33. Sato K, Kumagai Y, Sekizuka T, Kuroda M, Hayashi T, Takano A, Gaowa, Taylor KR, Ohnishi M, Kawabata H. Vitronectin binding protein, BOM1093, confers serum resistance on *Borrelia miyamotoi*. *Sci Rep.* 2021;11(1):5462. doi:10.1038/s41598-021-85069-w.
34. Barbour AG. Multiple and diverse vsp and vlp sequences in *Borrelia miyamotoi*, a Hard Tick-Borne zoonotic pathogen. *PLoS ONE.* 2016;11(1):e0146283. doi:10.1371/journal.pone.0146283.
35. Nguyen NTT, Röttgerding F, Devraj G, Lin Y-P, Koenigs A, Kraiczy P. The complement binding and inhibitory protein CbiA of *Borrelia miyamotoi* degrades extracellular matrix components by interacting with plasmin(ogen). *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:23. doi:10.3389/fcimb.2018.00023.
36. Coleman JL, Gebbia JA, Piesman J, Degen JL, Bugge TH, Benach JL. Plasminogen is required for efficient dissemination of *B. burgdorferi* in ticks and for enhancement of spirochetemia in mice. *Cell.* 1997;89(7):1111-1119. doi:10.1016/S0092-8674(00)80298-6.
37. Gebbia JA, Monco JC, Degen JL, Bugge TH, Benach JL. The plasminogen activation system enhances brain and heart invasion in murine relapsing fever borreliosis. *J Clin Invest.* 1999;103(1):81-87. doi:10.1172/JCI5171.
38. Vieira ML, Nascimento ALTO. Interaction of spirochetes with the host fibrinolytic system and potential roles in pathogenesis. *Crit Rev Microbiol.* 2016;42(4):573-587. doi:10.3109/1040841X.2014.972336.
39. Barthel D, Schindler S, Zipfel PF. Plasminogen is a complement inhibitor. *J Biol Chem.* 2012;287(22):18831-18842. doi:10.1074/jbc.M111.323287.

40. Boden K, Lobenstein S, Hermann B, Margos G, Fingerle V. *Borrelia miyamotoi*-associated neuroborreliosis in immunocompromised person. *Emerging Infect Dis.* 2016;22(9):1617-1620. doi:10.3201/eid2209.152034.
41. Gugliotta JL, Goethert HK, Berardi VP, Telford SR. Meningoencephalitis from *Borrelia miyamotoi* in an immunocompromised patient. *N Engl J Med.* 2013;368(3):240-245. doi:10.1056/NEJMoa1209039.
42. Hovius JWR, Wever B de, Sohne M, Brouwer MC, Coumou J, Wagemakers A, Oei A, Knol H, Narasimhan S, Hodiament CJ, Jahfari S, Pals ST, Horlings HM, Fikrig E, Sprong H, van Oers MHJ. A case of meningoencephalitis by the relapsing fever spirochaete *Borrelia miyamotoi* in Europe. *The Lancet.* 2013;382(9892):658. doi:10.1016/S0140-6736(13)61644-X.
43. Andersson M, Nordstrand A, Shamaei-Tousi A, Jansson A, Bergström S, Guo BP. In situ immune response in brain and kidney during early relapsing fever borreliosis. *J Neuroimmunol.* 2007;183(1-2):26-32. doi:10.1016/j.jneuroim.2006.11.004.
44. Larsson C, Andersson M, Pelkonen J, Guo BP, Nordstrand A, Bergström S. Persistent brain infection and disease reactivation in relapsing fever borreliosis. *Microbes Infect.* 2006;8(8):2213-2219. doi:10.1016/j.micinf.2006.04.007.
45. Talagrand-Reboul E, Boyer PH, Bergström S, Vial L, Boulanger N. Relapsing fevers: Neglected tick-borne diseases. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:98. doi:10.3389/fcimb.2018.00098.
46. Telford SR, Goethert HK, Molloy PJ, Berardi VP, Chowdri HR, Gugliotta JL, Lepore TJ. *Borrelia miyamotoi* disease: Neither Lyme disease nor relapsing fever. *Clin Lab Med.* 2015;35(4):867-882. doi:10.1016/j.cll.2015.08.002.
47. Molloy PJ, Telford SR, Chowdri HR, Lepore TJ, Gugliotta JL, Weeks KE, Hewins ME, Goethert HK, Berardi VP. *Borrelia miyamotoi* disease in the Northeastern United States: A case series. *Ann Intern Med.* 2015;163(2):91-98. doi:10.7326/M15-0333.
48. Jobe DA, Lovrich SD, Oldenburg DG, Kowalski TJ, Callister SM. *Borrelia miyamotoi* infection in patients from Upper Midwestern United States, 2014-2015. *Emerging Infect Dis.* 2016;22(8):1471-1473. doi:10.3201/eid2208.151878.
49. Krause PJ, Schwab J, Narasimhan S, Brancato J, Xu G, Rich SM. Hard Tick relapsing fever caused by *Borrelia miyamotoi* in a child. *Pediatr Infect Dis J.* 2016;35(12):1352-1354. doi:10.1097/INF.0000000000001330.
50. Henningsson AJ, Asgeirsson H, Hammas B, Karlsson E, Parke Å, Hoornstra D, Wilhelmsson P, Hovius JW. Two cases of *Borrelia miyamotoi* meningitis, Sweden, 2018. *Emerging Infect Dis.* 2019;25(10):1965-1968. doi:10.3201/eid2510.190416.
51. Richter D, Schlee DB, Matuschka F-R. Relapsing fever-like spirochetes infecting European vector tick of Lyme disease agent. *Emerging Infect Dis.* 2003;9(6):697-701. doi:10.3201/eid0906.020459.
52. Karan L, Makenov M, Kolyasnikova N, Stukolova O, Toporkova M, Olenkova O. Dynamics of spirochetemia and early PCR detection of *Borrelia miyamotoi*. *Emerging Infect Dis.* 2018;24(5):860-867. doi:10.3201/eid2405.170829.

53. Larsson C, Bergström S. A novel and simple method for laboratory diagnosis of relapsing fever borreliosis. *Open Microbiol J.* 2008;2:10-12. doi:10.2174/1874285800802010010.
54. Krause PJ, Narasimhan S, Wormser GP, Barbour AG, Platonov AE, Brancato J, Lepore T, Dardick K, Mamula M, Rollend L, Steeves TK, Diuk-Wasser M, Usmani-Brown S, Williamson P, Sarksyian DS, Fikrig E, Fish D. *Borrelia miyamotoi sensu lato* seroreactivity and seroprevalence in the northeastern United States. *Emerging Infect Dis.* 2014;20(7):1183-1190. doi:10.3201/eid2007.131587.
55. Krause PJ, Narasimhan S, Wormser GP, Rollend L, Fikrig E, Lepore T, Barbour A, Fish D. Human *Borrelia miyamotoi* infection in the United States. *N Engl J Med.* 2013;368(3):291-293. doi:10.1056/NEJMc1215469.
56. Schwan TG, Schrupf ME, Hinnebusch BJ, Anderson DE, Konkel ME. GlpQ: an antigen for serological discrimination between relapsing fever and Lyme borreliosis. *J Clin Microbiol.* 1996;34(10):2483-2492.
57. Krause PJ, Carroll M, Fedorova N, Brancato J, Dumouchel C, Akosa F, Narasimhan S, Fikrig E, Lane RS. Human *Borrelia miyamotoi* infection in California: Serodiagnosis is complicated by multiple endemic borrelia species. *PLoS ONE.* 2018;13(2):e0191725. doi:10.1371/journal.pone.0191725.
58. Koetsveld J, Kolyasnikova NM, Wagemakers A, Toporkova MG, Sarksyian DS, Oei A, Platonov AE, Hovius JW. Development and optimization of an in vitro cultivation protocol allows for isolation of *Borrelia miyamotoi* from patients with hard tick-borne relapsing fever. *Clin Microbiol Infect.* 2017;23(7):480-484. doi:10.1016/j.cmi.2017.01.009.
59. Wagemakers A, Oei A, Fikrig MM, Miellet WR, Hovius JW. The relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi* is cultivable in a modified Kelly-Pettenkofer medium, and is resistant to human complement. *Parasit Vectors.* 2014;7:418. doi:10.1186/1756-3305-7-418.
60. Takano A, Toyomane K, Konnai S, Ohashi K, Nakao M, Ito T, Andoh M, Maeda K, Watarai M, Sato K, Kawabata H. Tick surveillance for relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi* in Hokkaido, Japan. *PLoS ONE.* 2014;9(8):e104532. doi:10.1371/journal.pone.0104532.
61. Margos G, Stockmeier S, Hizo-Teufel C, Hepner S, Fish D, Dautel H, Sing A, Dzaferovic E, Rieger M, Jungnick S, Binder K, Straubinger RK, Fingerle V. Long-term in vitro cultivation of *Borrelia miyamotoi*. *Ticks Tick Borne Dis.* 2015;6(2):181-184. doi:10.1016/j.ttbdis.2014.12.001.
62. Sato K, Takano A, Konnai S, Nakao M, Ito T, Koyama K, Kaneko M, Ohnishi M, Kawabata H. Human infections with *Borrelia miyamotoi*, Japan. *Emerging Infect Dis.* 2014;20(8):1391-1393. doi:10.3201/eid2008.131761.
63. Chowdri HR, Gugliotta JL, Berardi VP, Goethert HK, Molloy PJ, Sterling SL, Telford SR. *Borrelia miyamotoi* infection presenting as human granulocytic anaplasmosis: a case report. *Ann Intern Med.* 2013;159(1):21-27. doi:10.7326/0003-4819-159-1-201307020-00005.
64. Kraiczy P, Weigand J, Wichelhaus TA, Heisig P, Backes H, Schäfer V, Acker G, Brade V, Hunfeld KP. In vitro activities of fluoroquinolones against the spirochete

- Borrelia burgdorferi*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(9):2486-2494. doi:10.1128/AAC.45.9.2486-2494.2001.
65. Hunfeld K-P, Kraiczy P, Kekoukh E, Schäfer V, Brade V. Standardised in vitro susceptibility testing of *Borrelia burgdorferi* against well-known and newly developed antimicrobial agents — Possible implications for new therapeutic approaches to Lyme disease. *Int J Med Microbiol*. 2002;291:125-137. doi:10.1016/s1438-4221(02)80024-8.
 66. Hunfeld K-P, Kraiczy P, Wichelhaus T, Schäfer V, Brade V. Colorimetric in vitro susceptibility testing of penicillins, cephalosporins, macrolides, streptogramins, tetracyclines, and aminoglycosides against *Borrelia burgdorferi* isolates. *Int J Antimicrob Agents*. 2000;15(1):11-17. doi:10.1016/s0924-8579(00)00116-3.
 67. Koetsveld J, Draga ROP, Wagemakers A, Manger A, Oei A, Visser CE, Hovius JW. In vitro susceptibility of the relapsing-fever spirochete *Borrelia miyamotoi* to antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(9). doi:10.1128/AAC.00535-17.
 68. Yamano K, Ito T, Kiyonagi K, Yamazaki H, Sugawara M, Saito T, Ohashi N, Zamoto-Niikura A, Sato K, Kawabata H. Case report: Clinical features of a case of suspected *Borrelia miyamotoi* disease in Hokkaido, Japan. *Am J Trop Med Hyg*. 2017;97(1):84-87. doi:10.4269/ajtmh.16-0699.
 69. BZgA: Zecken werden wieder aktiv. <https://www.bzga.de/presse/pressemitteilungen/2018-03-16-zecken-werden-wieder-aktiv/>. Updated April 17, 2020. Accessed April 17, 2020.
 70. RKI - FSME - Antworten auf häufig gestellte Fragen zu Zecken, Zeckenstich, Infektion. <https://www.rki.de/SharedDocs/FAQ/FSME/Zecken/Zecken.html>. Updated April 17, 2020. Accessed April 17, 2020.
 71. Zecken bei Kindern | kindergesundheit-info.de. <https://www.kindergesundheit-info.de/themen/krankes-kind/zeckenschutz0/>. Updated April 17, 2020. Accessed April 17, 2020.
 72. Schwan TG, Battisti JM, Porcella SF, Raffel SJ, Schrupf ME, Fischer ER, Carroll JA, Stewart PE, Rosa P, Somerville GA. Glycerol-3-phosphate acquisition in spirochetes: distribution and biological activity of glycerophosphodiester phosphodiesterase (GlpQ) among *Borrelia* species. *J Bacteriol*. 2003;185(4):1346-1356. doi:10.1128/jb.185.4.1346-1356.2003.
 73. Larson TJ, Ehrmann M, Boos W. Periplasmic glycerophosphodiester phosphodiesterase of *Escherichia coli*, a new enzyme of the glp regulon. *J Biol Chem*. 1983;258(9):5428-5432.
 74. Janson H, Hedén LO, Forsgren A. Protein D, the immunoglobulin D-binding protein of *Haemophilus influenzae*, is a lipoprotein. *Infect Immun*. 1992;60(4):1336-1342.
 75. Cameron CE, Castro C, Lukehart SA, van Voorhis WC. Function and protective capacity of *Treponema pallidum subsp. pallidum* glycerophosphodiester phosphodiesterase. *Infect Immun*. 1998;66(12):5763-5770.
 76. Shevchenko DV, Sellati TJ, Cox DL, Shevchenko OV, Robinson EJ, Radolf JD. Membrane topology and cellular location of the *Treponema pallidum*

- glycerophosphodiester phosphodiesterase (GlpQ) ortholog. *Infect Immun.* 1999;67(5):2266-2276.
77. Jeffery CJ. Protein moonlighting: what is it, and why is it important? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2018;373(1738). doi:10.1098/rstb.2016.0523.
 78. Jeffery C. Intracellular proteins moonlighting as bacterial adhesion factors. *AIMS Microbiol.* 2018;4(2):362-376. doi:10.3934/microbiol.2018.2.362.
 79. Sjöström I, Gröndahl H, Falk G, Kronvall G, Ullberg M. Purification and characterisation of a plasminogen-binding protein from *Haemophilus influenzae*. Sequence determination reveals identity with aspartase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* 1997;1324(2):182-190. doi:10.1016/S0005-2736(96)00218-0.
 80. Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T.* 2015;40(4):277-283.
 81. Knaust A, Weber MVR, Hammerschmidt S, Bergmann S, Frosch M, Kurzai O. Cytosolic proteins contribute to surface plasminogen recruitment of *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol.* 2007;189(8):3246-3255. doi:10.1128/JB.01966-06.
 82. Floden AM, Watt JA, Brissette CA. *Borrelia burgdorferi* enolase is a surface-exposed plasminogen binding protein. *PLoS ONE.* 2011;6(11):e27502. doi:10.1371/journal.pone.0027502.
 83. Bergmann S, Rohde M, Hammerschmidt S. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus pneumoniae* is a surface-displayed plasminogen-binding protein. *Infect Immun.* 2004;72(4):2416-2419. doi:10.1128/iai.72.4.2416-2419.2004.
 84. Agarwal V, Kuchipudi A, Fulde M, Riesbeck K, Bergmann S, Blom AM. *Streptococcus pneumoniae* endopeptidase O (PepO) is a multifunctional plasminogen- and fibronectin-binding protein, facilitating evasion of innate immunity and invasion of host cells. *J Biol Chem.* 2013;288(10):6849-6863. doi:10.1074/jbc.M112.405530.
 85. Berg TK. Analyse der Komplement-Inhibition und Plasminogen-Interaktion des OspC-Proteins von *Borrelia burgdorferi* und der Vlp-Proteine von *Borrelia miyamotoi*. [Bachelor's Thesis]. Frankfurt am Main: Johann-Wolfgang-Goethe Universität; 2018.
 86. Cadavid D, Pennington PM, Kerentseva TA, Bergström S, Barbour AG. Immunologic and genetic analyses of VmpA of a neurotropic strain of *Borrelia turicatae*. *Infect Immun.* 1997;65(8):3352-3360.
 87. Hinnebusch BJ, Barbour AG, Restrepo BI, Schwan TG. Population structure of the relapsing fever spirochete *Borrelia hermsii* as indicated by polymorphism of two multigene families that encode immunogenic outer surface lipoproteins. *Infect Immun.* 1998;66(2):432-440.
 88. Wagemakers A, Koetsveld J, Narasimhan S, Wickel M, Deponte K, Bleijlevens B, Jahfari S, Sprong H, Karan LS, Sarksyan DS, van der Poll T, Bockenstedt LK, Bins AD, Platonov AE, Fikrig E, Hovius JW. Variable major proteins as targets for specific antibodies against *Borrelia miyamotoi*. *J Immunol.* 2016;196(10):4185-4195. doi:10.4049/jimmunol.1600014.

89. Meier J, Simon M, Barbour A. Antigenic variation is associated with DNA rearrangements in a relapsing fever borrelia. *Cell*. 1985;41(2):403-409. doi:10.1016/S0092-8674(85)80013-1.
90. Barbour AG, Dai Q, Restrepo BI, Stoenner HG, Frank SA. Pathogen escape from host immunity by a genome program for antigenic variation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(48):18290-18295. doi:10.1073/pnas.0605302103.
91. Barbour AG, Bundoc V. In vitro and in vivo neutralization of the relapsing fever agent *Borrelia hermsii* with serotype-specific immunoglobulin M antibodies. *Infect Immun*. 2001;69(2):1009-1015. doi:10.1128/IAI.69.2.1009-1015.2001.
92. Stoenner HG, Dodd T, Larsen C. Antigenic variation of *Borrelia hermsii*. *J Exp Med*. 1982;156(5):1297-1311. doi:10.1084/jem.156.5.1297.
93. Raffel SJ, Battisti JM, Fischer RJ, Schwan TG. Inactivation of genes for antigenic variation in the relapsing fever spirochete *Borrelia hermsii* reduces infectivity in mice and transmission by ticks. *PLoS Pathog*. 2014;10(4):e1004056. doi:10.1371/journal.ppat.1004056.
94. Lijnen HR. Elements of the fibrinolytic system. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;936:226-236. doi:10.1111/j.1749-6632.2001.tb03511.x.
95. Boncela J, Przygodzka P, Papiewska-Pajak I, Wyroba E, Osinska M, Cierniewski CS. Plasminogen activator inhibitor type 1 interacts with alpha3 subunit of proteasome and modulates its activity. *J Biol Chem*. 2011;286(8):6820-6831. doi:10.1074/jbc.M110.173781.
96. Lin Z, Jiang L, Yuan C, Jensen JK, Zhang X, Luo Z, Furie BC, Furie B, Andreasen PA, Huang M. Structural basis for recognition of urokinase-type plasminogen activator by plasminogen activator inhibitor-1. *J Biol Chem*. 2011;286(9):7027-7032. doi:10.1074/jbc.M110.204537.
97. Lobov S, Croucher DR, Saunders DN, Ranson M. Plasminogen activator inhibitor type 2 inhibits cell surface associated tissue plasminogen activator in vitro: potential receptor interactions. *Thromb Haemost*. 2008;100(2):319-329.
98. Schneider M, Nesheim M. A study of the protection of plasmin from antiplasmin inhibition within an intact fibrin clot during the course of clot lysis. *J Biol Chem*. 2004;279(14):13333-13339. doi:10.1074/jbc.M313164200.
99. Lee AY, Fredenburgh JC, Stewart RJ, Rischke JA, Weitz JI. Like fibrin, (DD)E, the major degradation product of crosslinked fibrin, protects plasmin from inhibition by alpha2-antiplasmin. *Thromb Haemost*. 2001;85(3):502-508.
100. Collen D, Lijnen HR. Thrombolytic agents. *Thromb Haemost*. 2005;93(4):627-630. doi:10.1160/TH04-11-0724.
101. Vieira ML, Vasconcellos SA, Gonçalves AP, Morais ZM de, Nascimento ALTO. Plasminogen acquisition and activation at the surface of leptospira species lead to fibronectin degradation. *Infect Immun*. 2009;77(9):4092-4101. doi:10.1128/IAI.00353-09.
102. Nordstrand A, Shamaei-Tousi A, Ny A, Bergström S. Delayed invasion of the kidney and brain by *Borrelia crocidurae* in plasminogen-deficient mice. *Infect Immun*. 2001;69(9):5832-5839. doi:10.1128/iai.69.9.5832-5839.2001.

103. Lähteenmäki K, Kuusela P, Korhonen TK. Bacterial plasminogen activators and receptors. *FEMS Microbiol Rev.* 2001;25(5):531-552. doi:10.1111/j.1574-6976.2001.tb00590.x.
104. Haile WB, Coleman JL, Benach JL. Reciprocal upregulation of urokinase plasminogen activator and its inhibitor, PAI-2, by *Borrelia burgdorferi* affects bacterial penetration and host-inflammatory response. *Cell Microbiol.* 2006;8(8):1349-1360. doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00717.x.
105. Coleman JL, Roemer EJ, Benach JL. Plasmin-coated *Borrelia Burgdorferi* degrades soluble and insoluble components of the mammalian extracellular matrix. *Infect Immun.* 1999;67(8):3929-3936.
106. Ra H-J, Parks WC. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biol.* 2007;26(8):587-596. doi:10.1016/j.matbio.2007.07.001.
107. Grab DJ, Perides G, Dumler JS, Kim KJ, Park J, Kim YV, Nikolskaia O, Choi KS, Stins MF, Kim KS. *Borrelia burgdorferi*, host-derived proteases, and the blood-brain barrier. *Infect Immun.* 2005;73(2):1014-1022. doi:10.1128/IAI.73.2.1014-1022.2005.
108. Vieira ML, Atzingen MV, Oliveira TR, Oliveira R, Andrade DM, Vasconcellos SA, Nascimento ALTO. In vitro identification of novel plasminogen-binding receptors of the pathogen *Leptospira interrogans*. *PLoS ONE.* 2010;5(6):e11259. doi:10.1371/journal.pone.0011259.
109. Verma A, Brissette CA, Bowman AA, Shah ST, Zipfel PF, Stevenson B. Leptospiral endostatin-like protein A is a bacterial cell surface receptor for human plasminogen. *Infect Immun.* 2010;78(5):2053-2059. doi:10.1128/IAI.01282-09.
110. Miles LA, Hawley SB, Baik N, Andronicos NM, Castellino FJ, Parmer RJ. Plasminogen receptors: the sine qua non of cell surface plasminogen activation. *Front Biosci.* 2005;10:1754-1762.
111. Hu LT, Perides G, Noring R, Klempner MS. Binding of human plasminogen to *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun.* 1995;63(9):3491-3496.
112. Coleman JL, Sellati TJ, Testa JE, Kew RR, Furie MB, Benach JL. *Borrelia burgdorferi* binds plasminogen, resulting in enhanced penetration of endothelial monolayers. *Infect Immun.* 1995;63(7):2478-2484.
113. Klempner MS, Noring R, Epstein MP, McCloud B, Rogers RA. Binding of human urokinase type plasminogen activator and plasminogen to *Borrelia* species. *J Infect Dis.* 1996;174(1):97-104. doi:10.1093/infdis/174.1.97.
114. Koenigs A, Hammerschmidt C, Jutras BL, Pogoryelov D, Barthel D, Skerka C, Kugelstadt D, Wallich R, Stevenson B, Zipfel PF, Kraiczy P. BBA70 of *Borrelia burgdorferi* is a novel plasminogen-binding protein. *J Biol Chem.* 2013;288(35):25229-25243. doi:10.1074/jbc.M112.413872.
115. Hallström T, Siegel C, Mörgelin M, Kraiczy P, Skerka C, Zipfel PF. CspA from *Borrelia burgdorferi* inhibits the terminal complement pathway. *mBio.* 2013;4(4). doi:10.1128/mBio.00481-13.
116. Hammerschmidt C, Koenigs A, Siegel C, Hallström T, Skerka C, Wallich R, Zipfel PF, Kraiczy P. Versatile roles of CspA orthologs in complement inactivation

- of serum-resistant Lyme disease spirochetes. *Infect Immun.* 2014;82(1):380-392. doi:10.1128/IAI.01094-13.
117. Ferguson EW, Fretto LJ, McKee PA. A re-examination of the cleavage of fibrinogen and fibrin by plasmin. *Journal of Biological Chemistry.* 1975;250(18):7210-7218. doi:10.1016/S0021-9258(19)40930-7.
 118. Koenigs A, Stahl J, Averhoff B, Göttig S, Wichelhaus TA, Wallich R, Zipfel PF, Kraiczky P. CipA of *Acinetobacter baumannii* is a novel plasminogen binding and complement inhibitory protein. *J Infect Dis.* 2016;213(9):1388-1399. doi:10.1093/infdis/jiv601.
 119. Nguyen NTT. Interaktion von *Borrelia miyamotoi* mit Plasminogen. [Dissertation]. Frankfurt am Main; 2018.
 120. Amborn M. Funktionelle Charakterisierung von Plasminogen-bindenden Proteinen von *Borrelia recurrentis*, dem Erreger des Läuserückfallfiebers. [Dissertation]. Frankfurt am Main: Johann-Wolfgang-Goethe Universität; 2022.
 121. Luo S, Poltermann S, Kunert A, Rupp S, Zipfel PF. Immune evasion of the human pathogenic yeast *Candida albicans*: Pra1 is a Factor H, FHL-1 and plasminogen binding surface protein. *Mol Immunol.* 2009;47(2-3):541-550. doi:10.1016/j.molimm.2009.07.017.
 122. Kukkonen M, Saarela S, Lähteenmäki K, Hynönen U, Westerlund-Wikström B, Rhen M, Korhonen TK. Identification of two laminin-binding fimbriae, the type 1 fimbria of *Salmonella enterica* serovar typhimurium and the G fimbria of *Escherichia coli*, as plasminogen receptors. *Infect Immun.* 1998;66(10):4965-4970. doi:10.1128/IAI.66.10.4965-4970.1998.
 123. Barthel D, Singh B, Riesbeck K, Zipfel PF. *Haemophilus influenzae* uses the surface protein E to acquire human plasminogen and to evade innate immunity. *J Immunol.* 2012;188(1):379-385. doi:10.4049/jimmunol.1101927.
 124. Sanderson-Smith ML, Walker MJ, Ranson M. The maintenance of high affinity plasminogen binding by group A streptococcal plasminogen-binding M-like protein is mediated by arginine and histidine residues within the a1 and a2 repeat domains. *Journal of Biological Chemistry.* 2006;281(36):25965-25971. doi:10.1074/jbc.M603846200.
 125. Hallström T, Haupt K, Kraiczky P, Hortschansky P, Wallich R, Skerka C, Zipfel PF. Complement regulator-acquiring surface protein 1 of *Borrelia burgdorferi* binds to human bone morphogenic protein 2, several extracellular matrix proteins, and plasminogen. *J Infect Dis.* 2010;202(3):490-498. doi:10.1086/653825.
 126. Fuchs H, Wallich R, Simon MM, Kramer MD. The outer surface protein A of the spirochete *Borrelia burgdorferi* is a plasmin(ogen) receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(26):12594-12598. doi:10.1073/pnas.91.26.12594.
 127. Ermert D, Ram S, Laabei M. The hijackers guide to escaping complement: Lessons learned from pathogens. *Mol Immunol.* 2019;114:49-61. doi:10.1016/j.molimm.2019.07.018.
 128. Ayón-Núñez DA, Frago G, Bobes RJ, Laclette JP. Plasminogen-binding proteins as an evasion mechanism of the host's innate immunity in infectious diseases. *Biosci Rep.* 2018;38(5). doi:10.1042/BSR20180705.

129. Önder Ö, Humphrey PT, McOmber B, Korobova F, Francella N, Greenbaum DC, Brisson D. OspC is potent plasminogen receptor on surface of *Borrelia burgdorferi*. *J Biol Chem*. 2012;287(20):16860-16868. doi:10.1074/jbc.M111.290775.
130. Wistow G, Piatigorsky J. Recruitment of enzymes as lens structural proteins. *Science*. 1987;236(4808):1554-1556. doi:10.1126/science.3589669.
131. Jeffery CJ. Multitalented actors inside and outside the cell: recent discoveries add to the number of moonlighting proteins. *Biochemical Society transactions*. 2019;47(6):1941-1948. doi:10.1042/BST20190798.
132. Huberts DHEW, van der Klei IJ. Moonlighting proteins: an intriguing mode of multitasking. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1803(4):520-525. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.01.022.
133. Munson RS, Sasaki K. Protein D, a putative immunoglobulin D-binding protein produced by *Haemophilus influenzae*, is glycerophosphodiester phosphodiesterase. *J Bacteriol*. 1993;175(14):4569-4571. doi:10.1128/jb.175.14.4569-4571.1993.
134. Wang W, Jeffery CJ. An analysis of surface proteomics results reveals novel candidates for intracellular/surface moonlighting proteins in bacteria. *Mol Biosyst*. 2016;12(5):1420-1431. doi:10.1039/c5mb00550g.
135. Dallo SF, Kannan TR, Blaylock MW, Baseman JB. Elongation factor Tu and E1 beta subunit of pyruvate dehydrogenase complex act as fibronectin binding proteins in *Mycoplasma pneumoniae*. *Mol Microbiol*. 2002;46(4):1041-1051. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.03207.x.
136. Castaldo C, Vastano V, Siciliano RA, Candela M, Vici M, Muscariello L, Marasco R, Sacco M. Surface displaced alpha-enolase of *Lactobacillus plantarum* is a fibronectin binding protein. *Microb Cell Fact*. 2009;8:14. doi:10.1186/1475-2859-8-14.
137. Glenting J, Beck HC, Vrang A, Riemann H, Ravn P, Hansen AM, Antonsson M, Ahrné S, Israelsen H, Madsen S. Anchorless surface associated glycolytic enzymes from *Lactobacillus plantarum* 299v bind to epithelial cells and extracellular matrix proteins. *Microbiol Res*. 2013;168(5):245-253. doi:10.1016/j.micres.2013.01.003.
138. Granato D, Bergonzelli GE, Pridmore RD, Marvin L, Rouvet M, Corthésy-Theulaz IE. Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins. *Infect Immun*. 2004;72(4):2160-2169. doi:10.1128/IAI.72.4.2160-2169.2004.
139. Kunert A, Losse J, Gruszyn C, Hühn M, Kaendler K, Mikkat S, Volke D, Hoffmann R, Jokiranta TS, Seeberger H, Moellmann U, Hellwage J, Zipfel PF. Immune evasion of the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*: elongation factor Tuf is a factor H and plasminogen binding protein. *J Immunol*. 2007;179(5):2979-2988. doi:10.4049/jimmunol.179.5.2979.
140. Pancholi V, Fischetti VA. A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase with multiple binding activity. *J Exp Med*. 1992;176(2):415-426. doi:10.1084/jem.176.2.415.

141. Pancholi V, Fischetti VA. alpha-enolase, a novel strong plasmin(ogen) binding protein on the surface of pathogenic streptococci. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(23):14503-14515. doi:10.1074/jbc.273.23.14503.
142. Schaumburg J, Diekmann O, Hagendorff P, Bergmann S, Rohde M, Hammerschmidt S, Jänsch L, Wehland J, Kärst U. The cell wall subproteome of *Listeria monocytogenes*. *Proteomics*. 2004;4(10):2991-3006. doi:10.1002/pmic.200400928.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Peter Kraiczky für die einzigartige Betreuung meiner Doktorarbeit. Die großartige Arbeitsatmosphäre und das Gefühl, dass die Tür bei Fragen und Problemen stets offensteht, haben maßgeblich zum Erfolg dieses Projekts beigetragen.

Darüber hinaus danke ich Herrn Prof. Dr. Volkhard A. J. Kempf, dem Leiter des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene des Universitätsklinikums Frankfurt am Main, für die Ermöglichung meiner Promotion in seinem Institut.

Vielen Dank an die Mitarbeiter der Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Kempf, Prof. Dr. Dr. Wichelhaus und Dr. Göttig für die angenehme Zusammenarbeit.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Eva Gerlach und Valerie Sürth für die vielen Ratschläge und die tolle Einarbeitung bedanken sowie bei Florian Röttgerding, welcher durch seine Geduld und Expertise unzählige Versuche gerettet hat.

Mein ausdrücklicher Dank gilt meinem Partner in Crime Martin Amborn, durch den die guten Tage im Labor mehr Spaß gemacht haben und die schlechten Tage leidlicher wurden.

Unübertroffen gilt mein Dank meinen Eltern und meiner Schwester für all die Unterstützung und Hingabe zu jeder Zeit.

Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Vergleichende Analysen zur Interaktion von Plasminogen mit dem Vlp15/16 und GlpQ Protein von *Borrelia miyamotoi*

am Zentrum der Hygiene im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Peter Kraiczy ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Vorliegende Ergebnisse der Arbeit wurden (oder werden) in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Frederik L Schmidt, Valerie Sürth, Tim K Berg, Yi-Pin Lin, Joppe W Hovius, and Peter Kraiczy, Interaction between *Borrelia miyamotoi* variable major proteins Vlp15/16 and Vlp18 with plasminogen and complement. Scientific Reports. 2021 Mar 2;11(1):4964. doi: 10.1038/s41598-021-84533-x

(Ort, Datum)

(Unterschrift)

Publikation der Ergebnisse



OPEN

Interaction between *Borrelia miyamotoi* variable major proteins Vlp15/16 and Vlp18 with plasminogen and complement

Frederik L. Schmidt^{1,5}, Valerie Sürth^{1,5}, Tim K. Berg^{1,5}, Yi-Pin Lin^{2,3}, Joppe W. Hovius⁴ & Peter Kraiczy¹✉

Borrelia miyamotoi, a relapsing fever spirochete transmitted by Ixodid ticks causes *B. miyamotoi* disease (BMD). To evade the human host's immune response, relapsing fever borreliae, including *B. miyamotoi*, produce distinct variable major proteins. Here, we investigated Vsp1, Vlp15/16, and Vlp18 all of which are currently being evaluated as antigens for the serodiagnosis of BMD. Comparative analyses identified Vlp15/16 but not Vsp1 and Vlp18 as a plasminogen-interacting protein of *B. miyamotoi*. Furthermore, Vlp15/16 bound plasminogen in a dose-dependent fashion with high affinity. Binding of plasminogen to Vlp15/16 was significantly inhibited by the lysine analog tranexamic acid suggesting that the protein-protein interaction is mediated by lysine residues. By contrast, ionic strength did not have an effect on binding of plasminogen to Vlp15/16. Of relevance, plasminogen bound to the borrelial protein cleaved the chromogenic substrate S-2251 upon conversion by urokinase-type plasminogen activator (uPa), demonstrating it retained its physiological activity. Interestingly, further analyses revealed a complement inhibitory activity of Vlp15/16 and Vlp18 on the alternative pathway by a Factor H-independent mechanism. More importantly, both borrelial proteins protect serum sensitive *Borrelia garinii* cells from complement-mediated lysis suggesting multiple roles of these two variable major proteins in immune evasion of *B. miyamotoi*.

Borrelia (B.) miyamotoi is a vector-borne human pathogenic spirochete transmitted by ixodid ticks and causes the so-called hard tick-borne relapsing fever (HTBRF) or *B. miyamotoi* disease (BMD)^{1–3}. Initially isolated from *Ixodes persulcatus* in Hokkaido⁴, *B. miyamotoi* has also been detected in other *Ixodes (I.)* species such as *I. ricinus*, *I. persulcatus*, *I. scapularis*, and *I. pacificus*^{4–8}. These ticks also carry other tick-borne pathogens, including, but not limited to Lyme Disease (LD) spirochetes, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Babesia microti*, raising a concern of multiple tick-borne pathogens that can be transmitted next to or simultaneously with *B. miyamotoi*⁹. Upon infection, *B. miyamotoi* may hematogenously spread to distant tissues and causes acute high-grade fever accompanied with headache, fatigue, myalgia, arthralgia, chills, and nausea^{10–13}. Compared to relapsing fever caused by *B. duttonii*, the soft ticks-transmitted relapsing fever, *B. miyamotoi* infection only occasionally triggers numerous episodes of recurrent high fever^{10,14–18}. In addition, a detailed comparative sequence analyses revealed that *B. miyamotoi* identified in ticks collected from an individual region exhibit a very low sequence variability. In contrast, sequences obtained from ticks collected from different geographical regions with distinct *Ixodes* tick species as vectors showed considerable diversity, allowing the classification of *B. miyamotoi* into at least three separate clades^{8,19–23}.

Multiple episodes of recurrent high fever, the hallmark presentation of relapsing fever, are thought to be caused by the humoral immune responses to spirochete surface antigens²⁴, the decrease and resurgence of *Borrelia* populations, including *B. miyamotoi*, producing antigenically variant surface proteins^{11,25–27}. This system consists of polymorphic genes encoding for immunodominant variable major proteins (VmPs), which are dispersed as silent promoter-less *vmp* gene cassettes on archival linear plasmids^{25,26}. By a nonreciprocal gene transfer of a

¹Institute of Medical Microbiology and Infection Control, University Hospital of Frankfurt, Goethe University, Frankfurt, Germany. ²Division of Infectious Diseases, Wadsworth Center, New York State Department of Health, Albany, NY, USA. ³Department of Biomedical Science, State University of New York at Albany, Albany, NY, USA. ⁴Center for Experimental and Molecular Medicine, Academic Medical Center, Amsterdam Infection and Immunity Institute, Amsterdam, The Netherlands. ⁵These authors contributed equally: Frederik L. Schmidt, Valerie Sürth and Tim K. Berg ✉email: Kraiczy@em.uni-frankfurt.de

silent *vmp* cassette into the single *vmp* expression site, antigenically diverse Vmps are sequentially produced by a single bacterial cell. Based on the molecular mass, Vmps are divided into two families: the variable small proteins (Vsp) of ~20 kDa and variable large proteins (Vlp) of ~40 kDa whereas at least 19 *vsp* and *vlp* sequences have been identified in *B. miyamotoi* LB-2001 of which six encode for a full signal peptide, and 38 *vlp* as well as 10 *vsp* genes have been identified in strain Izh-4^{23,25}. A recent study investigating the role of Vmp's in *B. miyamotoi* pathogenesis demonstrated that anti-Vsp1 IgG antibodies were able to efficiently eliminated Vsp1 producing spirochetes by a complement-dependent mechanism from the bloodstream of C3H/HeN mice²⁷. Moreover, this study also revealed that patients elicited robust antibody responses to several Vmps including Vsp1, Vlp15/16, and Vlp18 suggesting that the humoral immune response, even transiently, can induce clearance of the infection. Interestingly, Vmps of *B. hermsii* bind to extracellular-matrix glycosaminoglycans (GAGs) such as heparin and chondroitin sulfate^{28,29}, and thus appear to be associated with spirochete adhesion.

In addition to humoral immune responses, other host systems are exploited by RF borreliae to promote dissemination^{30,31}. One of these systems is the fibrinolytic pathway, which requires the presence of plasminogen. Previously, it was suspected that recruitment of host-derived plasminogen is a potential strategy for *Borrelia* invasion and may facilitate spirochete's dissemination and migration into extravascular tissues by utilizing the proteolytic activity of plasmin^{32–34}. Plasminogen is synthesized in the liver as an inactive proenzyme and circulates in the bloodstream (~2.4 μM) and many extravascular fluids. This protein consists of a N-terminal pre-activation peptide, five lysine-binding, disulfide-bonded kringle domains (K1-K5) and a C-terminal serine protease domain³⁵. Proteolytic cleavage of plasminogen by urokinase-type plasminogen activator (uPA) or endogenous tissue-type plasminogen activator (tPA) results in the conversion of this protein to its active version, plasmin³⁶. Owing to its broad substrate specificity, plasmin also degrades many components of the extracellular matrix, matrix metalloproteases and complement components³⁷.

Another host system that RF borreliae modulate is complement, the first line of host immune defence^{38,39}. Like a well-organized network consisting of membrane-bound and fluid-phase molecules, this system is tightly controlled by diverse regulators and inhibitors to avoid destruction of host cells. The complement cascade can be activated by three distinct routes, the alternative (AP), the classical (CP), and the lectin pathway (LP). Independent of the route of activation, highly reactive C3b molecules affixed to the microbial surface are generated by the so-called C3 convertases to flag and prepare invading microorganisms for opsonophagocytosis. Upon progression, binding of C3b to the C3 convertases of the AP or CP/LP result in the formation of the C5 convertases that cleave C5 into C5b and C5a. C5b attached to the foreign surface initiates the terminal sequence in which C6, C7, C8, and several molecules of C9 are assembled together to form the C5b-9 complex or membrane attack complex (MAC). Concerning regulation of the AP, Factor H (FH) plays a crucial role to prevent excessive and an uncontrolled complement activation on self surfaces^{40,41}. By serving as cofactor for Factor I (FI), FH either inactivates surface-bound C3b or accelerate the dissociation of the C3 convertase of the AP from the foreign surface (decay-accelerating activity) and thereby completely terminate all down streaming activation processes. As a cofactor for FH and the C4b binding protein, FI controls all three pathways due to its proteolytic cleavage activity to C3b and C4b.

A sophisticated strategy developed by RF borreliae, including *B. miyamotoi*, to escape complement and fibrinolytic pathway is to produce several outer surface proteins that bind to complement inhibitors or plasminogen^{42–47}. Such binding down-regulates complement-mediated killing and activates plasminogen-mediated ECM component degradation, which is thought to confer efficient dissemination. In light of the severe manifestations caused by *B. miyamotoi* in some patients and the tropism to neural tissues, we aimed at investigating the molecular mechanism utilized by *B. miyamotoi* to traverse endothelial barriers to reach deeper tissues by interacting with host-derived plasminogen. In this study, we aimed to functionally characterize Vsp1, Vlp15/16, and Vlp18 of *B. miyamotoi* concerning their potential to bind to host plasminogen and to display complement-inhibitory activities.

Results

Identification of potential plasminogen-binding proteins of *B. miyamotoi* HT31. CbiA has previously been identified as a multifunctional outer surface protein of *B. miyamotoi* HT31 exhibiting complement and plasminogen binding properties and thereby promoting resistance to complement-mediated killing and enabling spirochetes to degrade extracellular matrix proteins^{43,46}. In the present study, we set out to examine if there are additional plasminogen-binding proteins of *B. miyamotoi* by selecting three variable major proteins including Vsp1, Vlp15/16, and Vlp18 previously evaluated as promising candidates for the serodiagnosis of BMD^{27,48} due to their structural relatedness to OspC of *B. burgdorferi* known to bind plasminogen⁴⁹.

Initially, binding of plasminogen to Vsp1, Vlp15/16, and Vlp18 was assessed by ELISA. In addition, three proteins previously identified as plasminogen-interacting molecules were used as positive controls namely CbiA of *B. miyamotoi* HT31 as well as CspA and BBA70 of *B. burgdorferi* LW2^{46,50,51} while bovine serum albumin (BSA) served as negative control. To detect binding of plasminogen, purified His₆-tagged borrelial proteins were immobilized on microtiter plates (5 μg/ml each) and the protein–protein interaction was then assessed by using a polyclonal anti-plasminogen antibody. As shown in Fig. 1A, Vlp15/16 as well as the borrelial control proteins CbiA, CspA, and BBA70 significantly bound plasminogen by ELISA. In contrast Vsp1, Vlp18, and BSA did not bind to the host protein. Additional analysis disclosed a dose-dependent binding of Vlp15/16 to plasminogen whereby the interactions revealed a strong affinity in the nanomolar range with a calculated dissociation constant of $K_d = 354 \text{ nM} (\pm 62 \text{ nM})$ (Fig. 1B).

Influence of ionic strength on the binding of plasminogen to Vlp15/16. Having demonstrated binding of Vlp15/16 to plasminogen, we sought to characterize the nature of the protein–protein interaction

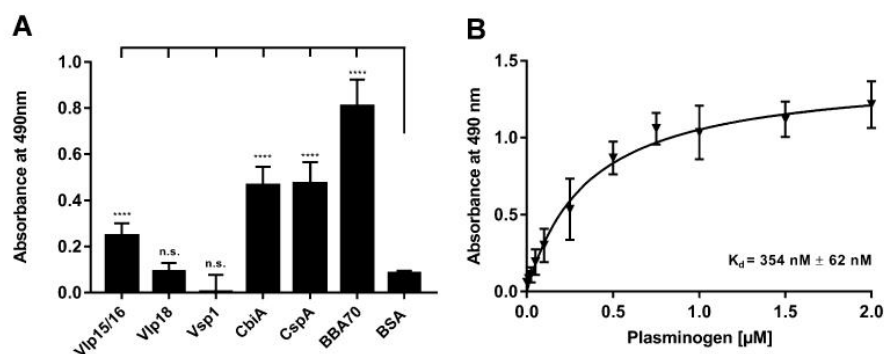


Figure 1. Identification of plasminogen-binding proteins in *B. miyamotoi*. (A) Binding of plasminogen to recombinant proteins by ELISA. Vlp15/16, Vlp18, Vsp1, CbiA, CspA, BBA70, and BSA (5 μg/ml each) immobilized were incubated with 10 μg/ml plasminogen. Bound plasminogen was detected using a polyclonal antibody. (B) Dose-dependent binding of plasminogen to Vlp15/16. Vlp15/16 (5 μg/ml) were immobilized and incubated with increasing concentrations of plasminogen. Binding curve and dissociation constant were approximated via non-linear regression, using a one-site, specific binding model using GraphPad Prism version 7. Data represent means and standard deviation of at least three different experiments, each conducted in triplicate. **** $p \leq 0.0001$, n.s., no statistical significance, one-way ANOVA with post-hoc Bonferroni multiple comparison test (confidence interval = 95%).

in more depth. To this end, an ELISA with NaBr was conducted known to adversely affect electro-static interactions between interacting proteins⁵². Vlp15/16, Vsp1 (negative control), and BBA70 (positive control) were immobilized and subsequently incubated with a mixture containing plasminogen and increasing concentrations of NaBr. Of note, NaBr was used instead of NaCl because chloride anions are known to alter the conformation of plasminogen⁵² and thus, may influence the accessibility of plasminogen to a potential ligand. Binding of plasminogen to Vlp15/16 remained completely unaffected even at the highest concentration applied (1 M) (Fig. 2). As expected, increasing concentrations of NaBr affected the BBA70-plasminogen interaction⁵¹ but did not influence the interaction of Vsp1 with plasminogen. These findings suggested that electrostatic forces do not play a role in the nature of the interaction of Vlp15/16 to plasminogen.

Roles of lysine residue for the binding of plasminogen to Vlp15/16. To further assess the involvement of lysine residues in the interaction of plasminogen with Vlp15/16, additional binding assays were performed by using tranexamic acid as a lysine analog⁵³. Lysine-binding sites located within the five kringle domains, in particular kringle domain 1, are mainly involved in the interaction of plasminogen with components of the ECM, host proteins and receptors as well as diverse bacterial proteins^{54–56}. Vlp15/16, Vsp1, and BBA70 were incubated with plasminogen dissolved in increasing concentrations of tranexamic acid and binding was detected using a specific anti-plasminogen antibody. Concerning the Vlp15/16-plasminogen interaction, increasing concentrations of tranexamic acid significantly reduced the binding of the host protein in a dose-dependent manner, suggesting that lysine residues mediate binding of plasminogen to Vlp15/16 (Fig. 3A). As previously shown, binding of BBA70 to plasminogen was readily affected in the presence of merely 0.1 mM tranexamic acid (Fig. 3B)⁵¹. As expected, the absorbance values did not change when Vsp1 as an additional protein was employed (Fig. 3C).

Plasminogen bound to Vlp15/16 is converted to plasmin. Plasminogen, an active precursor of the serine protease plasmin, circulate in human blood as and is activated by tissue-type (tPA) or urokinase-type plasminogen activator (uPA)³⁶. Independent from the activator, the cleavage site of plasminogen bound to a ligand (e.g. fibrinogen or a protein of bacterial origin) needs to be accessible to maintain its proteolytic function as serine protease. To demonstrate whether plasminogen bound to Vlp15/16 and BBA70 is converted to plasmin, proteins were first immobilized to microtiter plates. As negative control proteins, Vsp1 and BSA were also included. Following incubation with plasminogen, uPA was added to the reactions together with the plasmin-specific chromogenic substrate D-Val-Leu-Lys-p-nitroanilide dihydrochloride (S-2251) and cleavage of the molecule was monitored for a period of 24 h. As demonstrated in Fig. 4A, reactions with purified plasminogen revealed a strong proteolytic activity to S-2251 after conversion of plasminogen to plasmin in the presence of uPA, while no cleavage occurred when uPA was omitted from the reaction mixture. Furthermore, degradation of S-2251 was also detected when plasminogen was bound to Vlp15/16 indicating that bound plasminogen was converted to plasmin (Fig. 4B). By employing BBA70, known to exhibit a strong affinity to plasminogen, a clear signal was monitored after 24 h of incubation (Fig. 4C). In contrast, additional control reactions containing Vsp1 did not result in degradation of the chromogenic substrate (Fig. 4D). As expected, no cleavage of the chromogenic substrate was observed in the presence of tranexamic acid (preventing binding to plasminogen) or when plasminogen or uPA were omitted from the reactions. These findings indicate that plasminogen is readily accessible to uPA and converted to active plasmin upon binding to Vlp15/16 and BBA70.

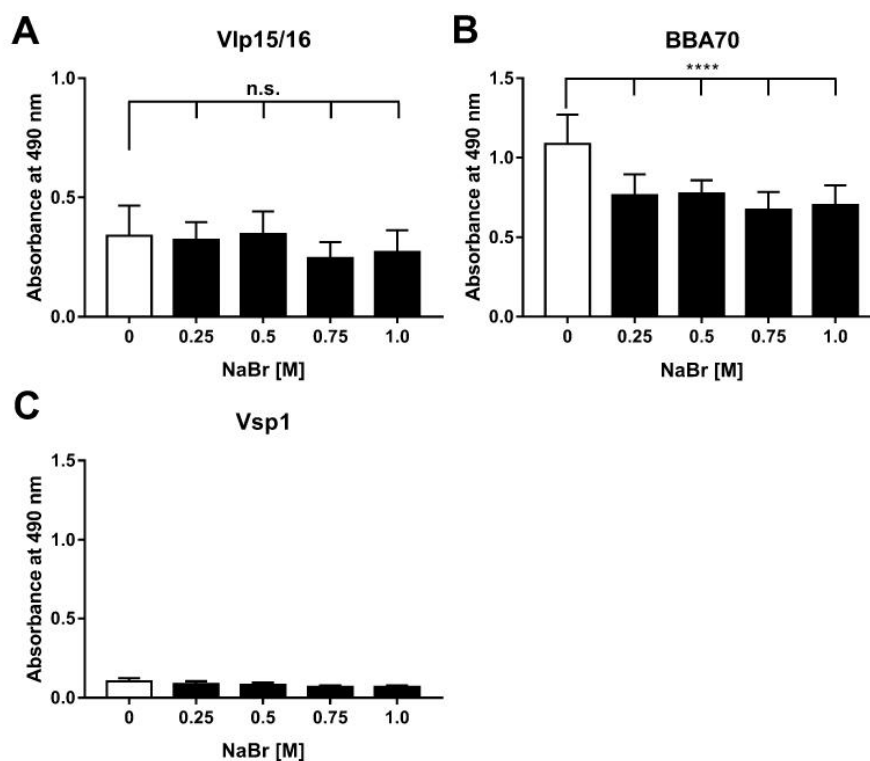


Figure 2. Influence of plasminogen binding by ionic strength. To determine influence of ionic strength on the plasminogen binding, Vlp15/16, BBA70 (positive control), and Vsp1 (negative control) (5 μ g/ml each) were immobilized and incubated with plasminogen in the presence of increasing concentrations of NaBr. Bound plasminogen was detected using a polyclonal antibody (1:1000). Data represent means and standard deviation of at least three independent experiments, each conducted in triplicate. **** $p \leq 0.0001$, one-way ANOVA with post-hoc Bonferroni multiple comparison test (confidence interval = 95%). n.s., no statistical significance.

Vlp15/16 and Vlp18 of *B. miyamotoi* inhibit activation of the alternative pathway by a FH-independent mechanism. Diverse bacterial plasminogen-binding proteins as well as plasmin(ogen) play a role in inactivating complement^{33,47,57,58}. We thus aimed to examine the ability of all three variable major proteins (Vlp15/16, Vlp18, and Vsp1) in inhibiting the activation of complement cascades. Microtiter plates prepared with either IgM, mannan or LPS for initiating activation of the CP, LP, and AP, respectively, were incubated with the respective purified proteins previously treated with NHS. These proteins included Vlp15/16 as well as the C-terminal fragment of BBK32 (BBK32-205) and CspA from *B. burgdorferi* as the control proteins for the CP and AP, respectively (Fig. 5). Following incubation with the NHS-treated reactions, the generation of the MAC was measured by applying a neoepitope-specific antibody as described previously⁵⁹. As shown in Fig. 5A, among the borrelial proteins investigated, only Vlp18 inhibited the CP to some extent while none of the three *B. miyamotoi* proteins affected activation of the LP (Fig. 5B). Concerning the AP, Vlp15/16 and Vlp18 significantly inhibited activation of this pathway similar to CspA in a dose-dependent manner (Fig. 5C,D). However, Vsp1 appeared to slightly affected activation of the AP. BSA used as an additional control did not influence complement activation to at least 2 μ M. These findings indicate that Vmp's are able to interact with complement in different ways by influencing activation of the CP to some extent (Vlp18) or strongly affected the AP (Vlp15/16 and Vlp18).

Having demonstrated AP inactivation capacity of Vlp15/16 and Vlp18, we next assessed binding of FH, C3b, and Factor B (FB) to these *B. miyamotoi* proteins. CspA was used as a control protein known to be the key FH-binding protein of *B. burgdorferi*⁶⁰ and as a further control, CbiA was utilized known to bind C3b⁴³. Microtiter plates were coated with the purified proteins and binding of FH, C3b, C5, and FB was detected by specific polyclonal antibodies. Except CspA, none of the proteins analysed bound to the key regulator of the AP (Fig. 5E) as well as C3b, C5, and FB (Fig. 5F,G,H) indicating that Vlp15/16 and Vlp18 neither terminate AP activation by a FH dependent mechanism nor by direct binding to the central component C3b. To assess the functional role of Vlp15/16 and Vlp18 for serum resistance of *B. miyamotoi*, a serum bactericidal assay with serum sensitive *B. garinii* cells as surrogate were conducted. As depicted in Fig. 5I, both proteins protected spirochetes from bacteriolysis to up to 45% compared to cells treated with 50% NHS. Complement inhibition was observed when CspA was assayed under the same conditions and incubation with heat-inactivated NHS did not influence viability of

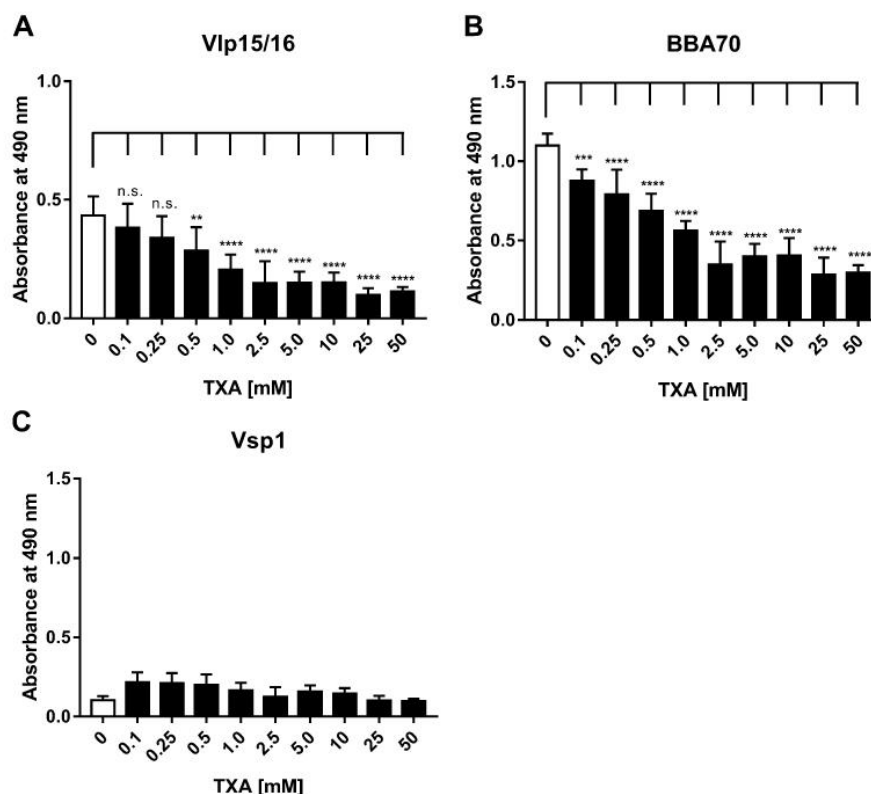


Figure 3. Involvement of lysine residues in the interaction of Vlp15/16 with plasminogen. To determine involvement of lysine residues increasing concentrations of the lysine analog tranexamic acid (TXA), Vlp15/16, BBA70, and Vsp1 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ each) were immobilized and incubated with plasminogen in the presence of increasing concentrations of tranexamic acid. Bound plasminogen was detected by a polyclonal antibody (1:1000). Three independent experiments were conducted in triplicate and graphs represent means \pm SEM. * $p \leq 0.033$; ** $p \leq 0.002$; *** $p \leq 0.0002$; **** $p \leq 0.0001$; n.s., no statistical significance, one-way ANOVA with post-hoc Bonferroni multiple comparison test (confidence interval = 95%).

the spirochetes over the whole incubation period. Complement was still active when NHS was pre-incubated with 4 μM of BSA or with Tris/HCl as buffer control indicating that complement activation was attenuated by Vlp15/16 and Vlp18, respectively.

Discussion

In this study, we identified Vlp15/16 as a novel ligand for the host-derived serine protease plasminogen. Our functional characterization revealed, that Vlp15/16 displayed a strong affinity for plasminogen and that the nature of the interaction is partially mediated by lysine residues but not influenced by ionic strength. Furthermore, plasminogen bound to Vlp15/16 was converted to active plasmin in the presence of uPA⁶¹. Moreover, our comparative analysis also discloses that Vlp15/16 and Vlp18 exhibit complement inhibitory capacity on the CP and AP. In summary, the plasminogen binding properties of Vlp15/16 as well as the complement inhibitory activity of Vlp15/16 and Vlp18 associated with their immune evasion properties may enable *B. miyamotoi* to overcome innate as well as adaptive immunity and may promote spirochetes dissemination.

A common strategy of invading pathogens to combat and evade host responses is to camouflage themselves with potent proteolytic enzymes, regulators, and inhibitors continuously circulating in the blood often as inactive precursors or zymogens^{30,33,62}. Moreover, the recruitment of host-derived proteases such as plasminogen endows pathogens lacking such powerful enzymes with a broad-spectrum proteolytic activity (e.g. *Borrelia* species) and may increase the invasiveness of those bacteria that are categorically equipped with diverse proteases (e.g. *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*)^{63–65}. Generally, plasminogen-binding proteins can be grouped into two main categories: first, proteins which are anchored in the outer membrane and exposed to the external environment and second, molecules that reside in the cytoplasm or periplasm⁶². Here, we identified an additional plasminogen-interacting protein of *B. miyamotoi*, Vlp15/16, which can be grouped as a typical category 1 outer surface protein exhibiting crucial function in immune evasion (Fig. 1). Independent of their localization (cellular or membrane-associated) bacterial proteins characterized so far display, which a strong affinity to plasminogen, e.g. CbiA (347 nM) of *B. miyamotoi*, enolase (23 nM) and BBA70 (125 nM) of *B.*

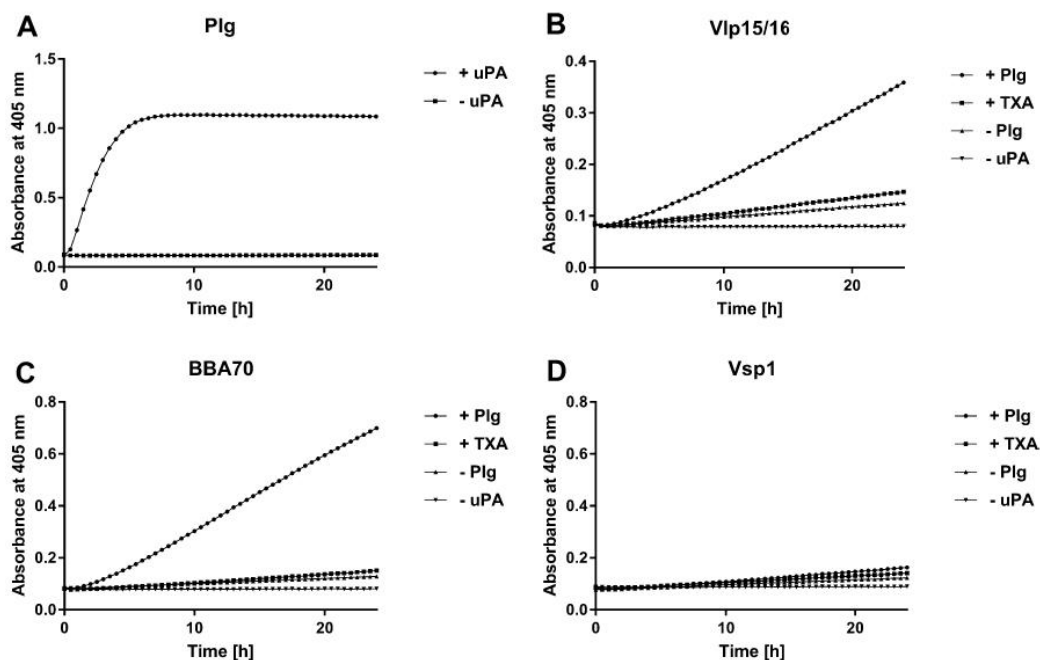


Figure 4. Plasminogen is converted to plasmin by uPA when bound to Vlp15/16. Microtiter plates were either coated with 5 $\mu\text{g/ml}$ of plasminogen (Plg) (A) or with 5 $\mu\text{g/ml}$ of purified Vlp15/16 (B), BBA70 (C) or Vsp1 (D). The plasminogen-coated wells were then incubated with (filled circle) or without uPA (filled square). The immobilized borrelial proteins were subsequently incubated with 10 $\mu\text{g/ml}$ plasminogen. Following incubation uPA and the chromogenic substrate D-Val-Leu-Lys-p-nitroanilide dihydrochloride (S-2251) was added (filled circle). Control reactions included 50 mM of the lysine analog tranexamic acid (T) (filled square) or omitted plasminogen (filled triangle) or uPA (filled inverted triangle), respectively. Microtiter plates were incubated at RT for 24 h and absorbance at 405 nm was measured at 30 min intervals. At least three independent experiments were conducted, each in triplicate. Data shown are from a representative experiment.

burgdorferi; CipA (36 nM) and Ef-Tu (57 nM) of *Acinetobacter baumannii*; enolase (360 nM) of *Mycobacterium tuberculosis*^{46,51,66–69}.

In nature, the interaction of plasmin is mediated via the lysine-binding sites within the kringle domains K1, K2, K4, and K5, lysine and/or arginine residues in the respective ligand, e.g. fibrin^{70–72} or diverse bacterial proteins^{46,51,67,68,73–77}. Especially, C-terminal lysine residues or lysine-rich motifs have been identified as essential determinants for the plasminogen-protein interaction as previously demonstrated for enolase of *S. pneumoniae*, CipA of *A. baumannii*, ErpP and BBA70 of *B. burgdorferi*^{51,67,75,76}. The Vlp15/16 protein contains a single lysine residue at the C-terminus and several clusters of lysines all of which are randomly distributed over the whole molecule as also shown among Vlp15/16 orthologs of *B. miyamotoi* (Supplementary Figs. 1 and 2). However, substitution of the C-terminal lysine residues by alanine using in vitro mutagenesis was unsuccessful, thus we did not further narrow down the structural determinants responsible for the Vlp15/16-plasminogen interaction. The lysine analog tranexamic acid was initially used to identify the high affinity binding sites in the five kringle domains of plasminogen⁷⁰. As mentioned, our analyses support the notion that lysine residues are more relevant for the Vlp15/16-plasminogen interaction as previously shown for BBA70 (Fig. 3). Such an impact of tranexamic acid on the interaction with plasminogen has previously been observed for CspA of *B. burgdorferi* as well as for HcpA of *B. recurrentis* and BhCRASP-1 of *B. hermsii*^{42,45,77}. The noticeable effect of tranexamic acid revealed that the interaction of plasminogen with Vlp15/16 is preferentially mediated by lysine residues rather than other factors, e.g. electrostatic forces. As clearly shown, NaBr had a negligible effect on Vlp15/16 binding even at the highest concentration utilized (1.0 M) (Fig. 2). These findings indicate that binding of plasminogen to Vlp15/16 depends on hydrophobic interaction as also demonstrated for the Lpp protein of *Escherichia coli*, CbiA of *B. miyamotoi*, and BBA70 of *B. burgdorferi*^{46,51,78} or complement regulator C4BP⁷⁹.

Accessibility of plasminogen to the plasminogen activators uPA or tPA is a prerequisite for the conversion to proteolytic active plasmin. Here we demonstrated that plasmin promotes degradation of the chromogenic substrate D-Val-Leu-Lys-p-nitroanilide dihydrochloride (S-2251) upon binding to Vlp15/16 in the presence of uPA (Fig. 4). Furthermore, cleavage of the chromogenic substrate was either completely or at nearly abrogated in control reactions in which uPA was omitted or when tranexamic acid was added suggesting that plasminogen bound to its ligands is fully accessible.

Pathogenic bacteria developed numerous artful strategies to escape from recognition and elimination by the human complement system^{30,31,39}. Here we show that both, Vlp15/16 and Vlp18 inhibited the AP, and Vlp18 also affected the CP to some extent. Unexpectedly, activation of the AP was inhibited by both Vmp's independently

from the interaction with complement regulator FH known to be a common immune evasion mechanism utilized by diverse bacteria including LD borreliae and relapsing fever spirochetes (Fig. 5D,E)^{11,80}. *S. aureus* has developed a sophisticated strategy to inhibit AP activation. At least four bacterial proteins from *S. aureus* including Efb, Ehp, Sbi, and SCIN have previously been described to interact with either the C3b thioester domain (TED) [Efb, Ecb (also known as Ehp), and Sbi] or the C3 convertases of the AP and CP (SCIN) and thereby efficiently counteract the bactericidal effects of complement^{81–84}. Our findings suggest that Vlp15/16 and Vlp18 might strike similar targets to combat AP activation like the staphylococcal protein SCIN⁸¹ as both molecules did not interact with C3b, C5 or FB (Fig. 5F,G,H). Additional analyses revealed that plasminogen bound to Vlp15/16 did not recruit C3b, C3, C5 or FB as a potential mechanism to target complement (Supplementary Fig. 3). Thus, further studies are required to disclose whether Vmp's (Vlp15/16) of *B. miyamotoi* as well as other RF borreliae inhibit the complement cascade at the level of C3 activation and amplification by affecting the formation of the C3 convertase. The data presented herein also revealed that purified Vlp15/16 and Vlp18 are able to protect serum sensitive *B. garinii* cells from complement-mediated lysis by up to 45% (Fig. 5I) indicating that both proteins participate in serum resistance and play a role in immune evasion of *B. miyamotoi*. Furthermore, a recent study showed that a *vmp*-deficient relapsing fever borreliae triggered bacteraemia in SCID mice at levels 28-fold lower than the parental wild-type spirochete⁸⁵. This result raises a possibility that Vmp contributes to spirochete survival in the host bloodstream by evading a response independent of adaptive immunity, which is, in fact, supported by our finding of complement evasion and plasminogen binding conferred by this protein.

In summary, we here describe additional roles of variable major proteins Vlp15/16 and Vlp18 involved in immune evasion. Overall, elucidating the complex interplay of these multifactorial proteins *in vivo* will certainly prove to be an important step towards understanding the pathogenic processes triggered by the relapsing fever spirochete *B. miyamotoi*.

Material and methods

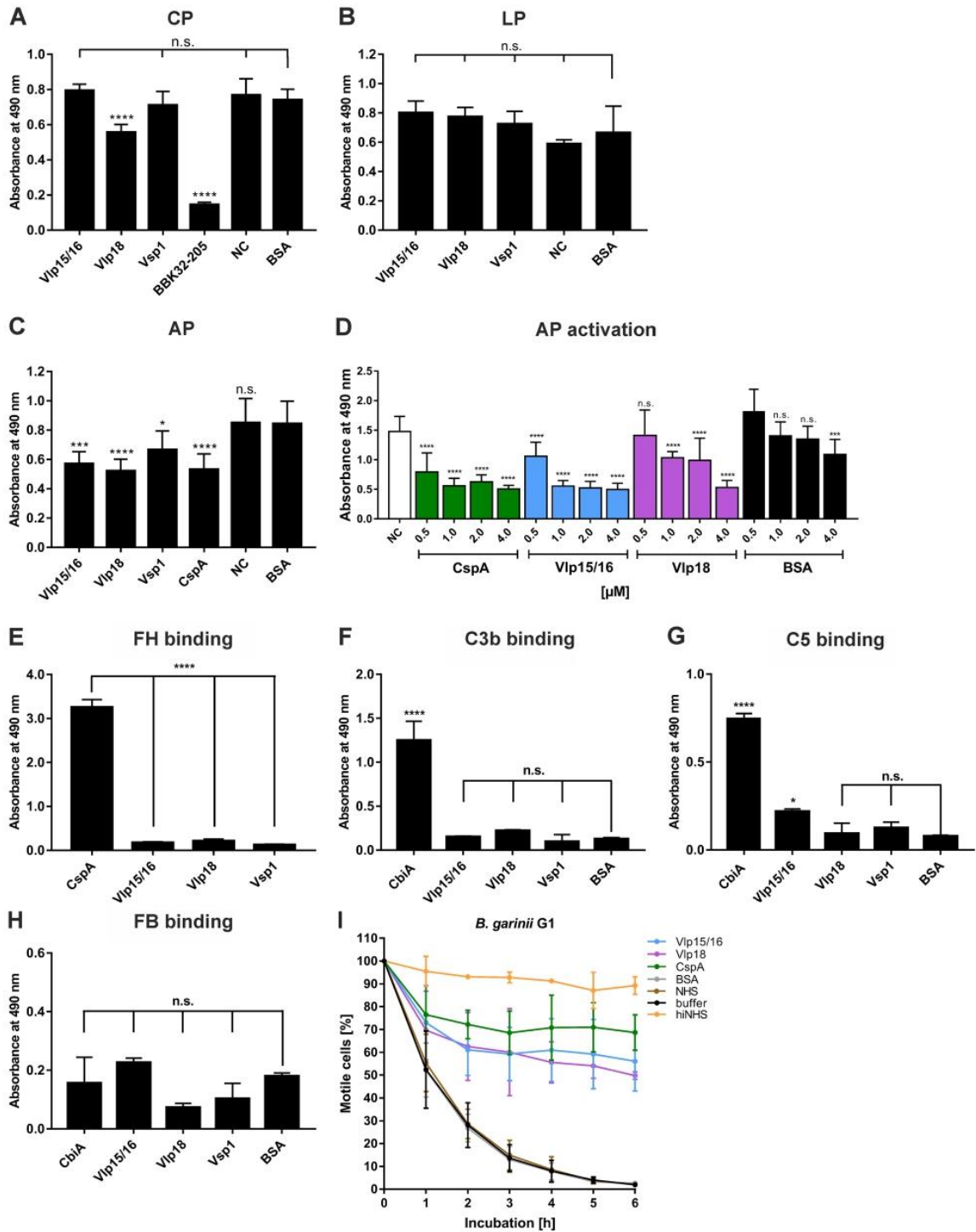
Bacterial strains and culture conditions. *B. miyamotoi* HT31 was cultivated at 33 °C in a modified Kelly-Pettenkofer medium supplemented with 40% fetal calf serum as previously described⁸⁶. *B. garinii* G1 was cultured until mid-exponential phase (5×10^7 cells per ml) at 33 °C in Barbour-Stoenner-Kelly (BSK-H) medium (Bio&SELL, Feucht, Germany). For production of hexahistidine (His₆)-tagged proteins, *Escherichia coli* BL21 (DE3) cells (New England Biolabs, Frankfurt, Germany) grown in yeast tryptone (YT) broth at 37 °C were utilized.

Human serum, proteins, and antibodies. Human serum (NHS) was collected from healthy blood donors as described previously⁵⁰. Human glu-plasminogen was purchased from Haematologic Technologies (Essex Junction, VT, USA) and urokinase plasminogen activator (uPA) (Merck, Darmstadt, Germany) were used for the activation of plasminogen to plasmin. The chromogenic substrate S-2251 (D-Val-Leu-Lys *p*-nitroanilide dihydrochloride) were from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Factor H, Factor B, C3b, and C5 were purchased from Complement Technology (Tyler, TX, USA). Polyclonal anti-plasminogen antibody was purchased from Acris Antibodies (Herford, Germany), and the monoclonal anti-plasminogen antibody (clone 10-V-1) was from Calbiochem, Merck, Darmstadt, Germany). The polyclonal anti-FH and anti-C3 antibody were obtained from Merck Biosciences (Bad Soden, Germany) and the polyclonal anti-C5, anti-Factor B antibody as well as the neopeptide-specific monoclonal anti-C5b-9 antibody was from Quidel (San Diego, CA, USA). The mouse anti-His₆ antiserum was obtained from Novagen (Merck Darmstadt, Germany) and Qiagen (Hilden, Germany) and the horseradish peroxidase (HRP)-conjugated immunoglobulins were purchased from Dako (Hamburg, Germany).

Generation of His₆-tagged proteins. The generation of His₆-tagged CspA and BBA70 from *B. burgdorferi* LW2 as well as CbiA from *B. miyamotoi* HT31, and the cloning of the Vsp1, Vlp15/16, and Vlp18 encoding genes of *B. miyamotoi* HT31 has been previously described^{27,43,48,50,51}. To generate recombinant proteins carrying the identical hexahistidine tag at the N-terminus, the Vsp1, Vlp15/16, and Vlp18, respectively, encoding genes without the N-terminal signal sequence were re-cloned into pQE-30 Xa (Supplementary Table 1). For control purposes, a variant of the BBK32 protein encompassing amino acids 205 to 354 required for binding of complement C1r to maintain its inhibitory activity on the CP⁸⁷ was also constructed. First, a DNA fragment encoding amino acid residues 21 to 354 of BBK32 of *B. burgdorferi* B31 was PCR-amplified from the pMalc-BBK32 vector using oligonucleotides BBK32 Bam_FP and BBK32 Hind_RP (Supplementary Table 1). After digestion, the DNA fragment was sub-cloned into pQE-30 Xa. To generate a truncated variant of BBK32, the generating vector pQE-BBK32 was used as template for amplifying a DNA fragment encoding residues 205 to 354 using oligonucleotides BBK32-205 BamHI and BBK32 Hind_RP. DNA fragments digested were then sub-cloned into pQE-30 Xa. Plasmids from selected clones were then purified and sequenced to ensure that the genes are cloned in frame and no random mutations have been introduced. The production of recombinant proteins in *E. coli* BL21(DE3) and their purification by affinity chromatography have previously been described⁴⁶.

SDS-PAGE, Western blotting, and silver staining. For separation of purified proteins, 10% Tris/Tri-cine SDS gels have been used⁴⁶. Visualization of recombinant proteins by Western blotting applying anti-His antibodies and silver staining (Supplementary Fig. 4) were performed as described previously⁴⁶.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). To assess binding of plasminogen or FH, 96-well microtiter plates (MaxiSorp, Nunc) were coated with recombinant proteins or BSA (5 µg/ml) in 100 µl PBS at 4 °C overnight with gentle agitation as described recently^{46,59}. Briefly, following blocking 100 µl plasminogen



◀**Figure 5.** Vlp15/16 and Vlp18 inhibit complement activation independently from binding to FH and protect serum sensitive *B. garinii* from complement-mediated lysis. Assessment of the inhibitory capacity of Vmp's on complement activation by an ELISA-based assay. Microtiter plates immobilized with IgM (CP) (A), mannan (LP) (B), and LPS (AP) (C) were incubated with NHS pre-incubated with the purified proteins or BSA (10 µg each). Formation of the MAC was detected by a monoclonal anti-C5b-9 antibody. Dose-dependent inactivation of the AP (D). Microtiter plates immobilized with LPS and after blocking, wells were incubated with NHS pre-incubated with increasing concentrations of the borrelial proteins or BSA. Formation of the MAC was detected by a monoclonal anti-C5b-9 antibody. Binding of recombinant borrelial proteins to FH (E), C3b (F), C5 (G), and Factor B (FB) (H). Microtiter plates were coated with recombinant proteins, incubated with purified FH, C3b, and FB, respectively, and antigen-antibody complexes were detected using specific antisera. All experiments were performed at least three times, with each individual test carried out in triplicate. * $p \leq 0.033$; *** $p \leq .0002$; **** $p \leq 0.0001$, one-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test (confidence interval=95%). n.s., no statistical significance; NC, negative control. Protection of serum sensitive *B. garinii* by Vlp15/16 and Vlp18 (I). NHS pre-incubated with 4 µM of the respective proteins was added to 1×10^8 spirochetes and viability and motility of borrelial cells were determined at 0, 1, 2, 3, 4, 5, and 6 h of incubation. At least three independent experiments were conducted and \pm SEM were calculated.

(10 µg/ml) or complement components FH, C3b, C5, and FB (5 µg/ml each) were added and the plates were incubated at room temperature for 1 h. The wells were subsequently washed and incubated for 1 h at room temperature with a polyclonal antiserum (1:1000) raised against human plasminogen or FH, C3b, C5, and FB respectively. After incubation with an HRP-conjugated anti-goat antiserum (1:2000), the plates were washed and developed with *o*-phenylenediamine (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) and the absorbance was read at 490 nm (PowerWave HT, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA).

To determine dose-dependent binding of plasminogen and to calculate the dissociation constants, Vlp15/16, Vsp1, and BBA70 coated to the wells were incubated with increasing amounts of plasminogen (0 to 20 µM). In the presence of increasing concentrations of the lysine analog tranexamic acid (0 to 50 mM) or NaBr (0 to 1000 mM), plasminogen was added to the wells coated with either Vlp15/16, Vsp1 or BBA70 to determine the role of lysine residues and the effect of ionic strength on plasminogen binding as described previously⁴⁶.

Plasmin(ogen) activation assay. To analyse conversion of protein-bound plasminogen to active plasmin, cleavage of the chromogenic substrate D-Val-Leu-Lys-*p*-nitroanilide dihydrochloride was assayed as described previously^{46,51}. In brief, microtiter plates coated with 100 µl of His₆-tagged proteins or BSA (5 µg/ml each) in PBS were incubated with 10 µg/ml of glu-plasminogen for 1 h at room temperature. Following three wash steps, wells were incubated with a reaction mixture containing 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 300 mM NaCl, 0.003% Triton X-100, and 0.3 mg/ml S-2251. Finally, 4 µl of 2.5 µg/ml urokinase plasminogen activator (uPA) were added to each well to activate protein-bound plasminogen to plasmin. Plates were then sealed and placed in an ELISA reader and incubated at 37 °C for 24 h. The absorbance was measured every 30 min at 405 nm. Reaction mixtures containing 50 mM tranexamic acid or in which plasminogen or uPA were omitted served as controls.

Complement inactivation assay. The inhibitory capacity of borrelial proteins on the CP, LP or the AP was analysed by a microtiter-based approach as described previously⁵⁹. Briefly, microtiter plates were coated with either human IgM (30 ng/ml) (Merck, Darmstadt, Germany) for the CP, mannan (1 µg/ml) (Merck, Darmstadt, Germany) for the LP or LPS (100 ng/ml) (Hycult Biotech, Beutelsbach, Germany), for the AP at 4 °C overnight. Following blocking, NHS (1% for the CP, 2% for the LP, and 15% for the AP) pre-incubated with His₆-tagged proteins (10 µg each or increasing concentrations thereof) were added to initiate complement activation. Formation of the MAC was detected by using an anti-C5b-9 antibody (1:500) (Quidel, Athens, USA) and antigen-antibody complexes were visualized by applying HRP-conjugated anti-mouse immunoglobulins (1:1000). The reactions were developed by adding *o*-phenylenediamine (Merck, Darmstadt, Germany) and measuring the absorbance at 490 nm.

Serum bactericidal assay. Protection from complement-mediated lysis mediated by recombinant proteins was assessed by pre-incubation of 50 µl human serum with 4 µM of either Vlp15/16, Vlp18, CspA or BSA for 15 min at 37 °C with gentle agitation. The pre-incubated serum samples were then adjusted to 100 µl with BSK-H medium. As additional reaction mixtures, native NHS (not pre-treated), heat-inactivated NHS and a Tris/HCl-buffer control were also included. In parallel, 1×10^8 spirochetes of serum sensitive *B. garinii* strain G1 were sedimented by centrifugation and resuspended in the pre-treated serum samples as well as the controls. All reaction mixtures were then incubated for 6 h at 37 °C with gentle agitation. The percentage of motile and viable cells was determined by dark field microscopy at every hour as described previously⁵⁹. Spirochetes in nine microscopy fields were counted by using Glasstic slides 10 (KOVA International Inc., CA, USA). Each test was performed three times and \pm SEM was determined by using GraphPad Prism version 7.

Sequence analysis. Vectors constructed were purified and sequenced by using a commercial sequencing service (Eurofins Genomics, Germany GmbH, Ebersberg, Germany). For bioinformatic analyses, the CLC sequence Viewer 8.0 (QIAGEN Aarhus A/S, Denmark) was utilized.

Statistical analysis. The data collected represent means from at least three independent experiments, and error bars indicate SD. For statistical analyses, one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison post-hoc test (95% confidence interval) were conducted by applying GraphPad Prism version 7.

Ethics statement. Collection of blood samples and consent documents were approved by the ethics committee at the University Hospital of Frankfurt (control number 160/10 and 222/14), Goethe University of Frankfurt am Main. All healthy blood donors provided written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki.

Data availability

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 4 December 2020; Accepted: 17 February 2021

Published online: 02 March 2021

References

- Krause, P. J. & Barbour, A. G. *Borrelia miyamotoi*: The newest infection brought to us by deer ticks. *Ann. Intern. Med.* **163**, 141–142. <https://doi.org/10.7326/M15-1219> (2015).
- Telford, S. R. 3rd. *et al.* *Borrelia miyamotoi* disease: Neither Lyme disease nor relapsing fever. *Clin. Lab. Med.* **35**, 867–882. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2015.08.002> (2015).
- Wagemakers, A., Staarink, P. J., Sprong, H. & Hovius, J. W. *Borrelia miyamotoi*: A widespread tick-borne relapsing fever spirochete. *Trends Parasitol.* **31**, 260–269. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.03.008> (2015).
- Fukunaga, M. *et al.* Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia miyamotoi* sp. nov., isolated from the ixodid tick *Ixodes persulcatus*, the vector for Lyme disease in Japan. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**, 804–810 (1995).
- Scoles, G. A., Papero, M., Beati, L. & Fish, D. A relapsing fever group spirochete transmitted by *Ixodes scapularis* ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **1**, 21–34 (2001).
- Barbour, A. G. *et al.* Niche partitioning of *Borrelia burgdorferi* and *Borrelia miyamotoi* in the same tick vector and mammalian reservoir species. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **81**, 1120–1131. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.09-0208> (2009).
- Richter, D., Schlee, D. B. & Matuschka, F. R. Relapsing fever-like spirochetes infecting European vector tick of Lyme disease agent. *Emerg. Infect. Dis.* **9**, 697–701. <https://doi.org/10.3201/eid0906.020459> (2003).
- Kuleshov, K. V., Hoonstra, D., Sprong, H., Platonov, A. E. & Hovius, J. W. Draft whole-genome sequences of two Western European *Borrelia miyamotoi* isolates. *Microbiol. Resour. Announc.* <https://doi.org/10.1128/MRA.01314-19> (2019).
- Azagi, T., Hoonstra, D., Kremer, K., Hovius, J. W. R. & Sprong, H. Evaluation of disease causality of rare *Ixodes ricinus*-borne infections in Europe. *Pathogens* <https://doi.org/10.3390/pathogens9020150> (2020).
- Platonov, A. E. *et al.* Humans infected with relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* **17**, 1816–1823. <https://doi.org/10.3201/eid1710.101474> (2011).
- Stone, B. L. & Brissette, C. A. Host immune evasion by Lyme and relapsing fever borreliae: Findings to lead future studies for *Borrelia miyamotoi*. *Front. Immunol.* **8**, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00012> (2017).
- Molloy, P. J. *et al.* *Borrelia miyamotoi* disease in the northeastern United States: A case series. *Ann. Intern. Med.* **163**, 91–98. <https://doi.org/10.7326/M15-0333> (2015).
- Jobe, D. A., Lovrich, S. D., Oldenburg, D. G., Kowalski, T. J. & Callister, S. M. *Borrelia miyamotoi* infection in patients from upper midwestern United States, 2014–2015. *Emerg. Infect. Dis.* **22**, 1471–1473. <https://doi.org/10.3201/eid2208.151878> (2016).
- Gugliotta, J. L., Goethert, H. K., Berardi, V. P. & Telford, S. R. 3rd. Meningoencephalitis from *Borrelia miyamotoi* in an immunocompromised patient. *N. Engl. J. Med.* **368**, 240–245. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1209039> (2013).
- Boden, K., Lobenstein, S., Hermann, B., Margos, G. & Fingerle, V. *Borrelia miyamotoi*-associated neuroborreliosis in immunocompromised person. *Emerg. Infect. Dis.* **22**, 1617–1620. <https://doi.org/10.3201/eid2209.152034> (2016).
- Hovius, J. W. *et al.* A case of meningoencephalitis by the relapsing fever spirochaete *Borrelia miyamotoi* in Europe. *Lancet* **382**, 658. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61644-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61644-X) (2013).
- Yamano, K. *et al.* Case report: clinical features of a case of suspected *Borrelia miyamotoi* disease in Hokkaido, Japan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **97**, 84–87. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0699> (2017).
- Henningsson, A. J. *et al.* Two cases of *Borrelia miyamotoi* meningitis, Sweden, 2018. *Emerg. Infect. Dis.* **25**, 1965–1968. <https://doi.org/10.3201/eid2510.190416> (2019).
- Takano, A. *et al.* Tick surveillance for relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi* in Hokkaido, Japan. *PLoS ONE* **9**, e104532. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104532> (2014).
- Bunikis, J. *et al.* Typing of *Borrelia* relapsing fever group strains. *Emerg. Infect. Dis.* **10**, 1661–1664. <https://doi.org/10.3201/eid1009.040236> (2004).
- Barbour, A. G. Phylogeny of a relapsing fever *Borrelia* species transmitted by the hard tick *Ixodes scapularis*. *Infect. Genet. Evol.* **27**, 551–558. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.04.022> (2014).
- Mukhacheva, T. A., Salikhova, I. I. & Kovalev, S. Y. Multilocus spacer analysis revealed highly homogeneous genetic background of Asian type of *Borrelia miyamotoi*. *Infect. Genet. Evol.* **31**, 257–262. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.02.009> (2015).
- Kuleshov, K. V. *et al.* Whole genome sequencing of *Borrelia miyamotoi* isolate Izh-4: reference for a complex bacterial genome. *BMC Genom.* **21**, 16. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6388-4> (2020).
- Barbour, A. G., Carter, C. J. & Sohaskey, C. D. Surface protein variation by expression site switching in the relapsing fever agent *Borrelia hermsii*. *Infect. Immun.* **68**, 7114–7121. <https://doi.org/10.1128/iai.68.12.7114-7121.2000> (2000).
- Barbour, A. G. Multiple and diverse *vsp* and *vlp* sequences in *Borrelia miyamotoi*, a hard tick-borne zoonotic pathogen. *PLoS ONE* **11**, e0146283. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146283> (2016).
- Barbour, A. G. & Restrepo, B. I. Antigenic variation in vector-borne pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* **6**, 449–457. <https://doi.org/10.3201/eid0605.000502> (2000).
- Wagemakers, A. *et al.* Variable major proteins as targets for specific antibodies against *Borrelia miyamotoi*. *J. Immunol.* **196**, 4185–4195. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600014> (2016).
- Thomas, D. D., Cadavid, D. & Barbour, A. G. Differential association of *Borrelia* species with cultured neural cells. *J. Infect. Dis.* **169**, 445–448. <https://doi.org/10.1093/infdis/169.2.445> (1994).
- Magoun, L. *et al.* Variable small protein (Vsp)-dependent and Vsp-independent pathways for glycosaminoglycan recognition by relapsing fever spirochaetes. *Mol. Microbiol.* **36**, 886–897. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01906.x> (2000).
- Ermert, D., Ram, S. & Laabei, M. The hijackers guide to escaping complement: Lessons learned from pathogens. *Mol. Immunol.* **114**, 49–61. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.07.018> (2019).
- Hovingh, E. S., van den Broek, B. & Jongerius, I. Hijacking complement regulatory proteins for bacterial immune evasion. *Front. Microbiol.* **7**, 2004. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02004> (2016).
- Gebbia, J. A., Monco, J. C., Degen, J. L., Bugge, T. H. & Benach, J. L. The plasminogen activation system enhances brain and heart invasion in murine relapsing fever borreliosis. *J. Clin. Investig.* **103**, 81–87. <https://doi.org/10.1172/JCI5171> (1999).

33. Vieira, M. L. & Nascimento, A. L. Interaction of spirochetes with the host fibrinolytic system and potential roles in pathogenesis. *Crit. Rev. Microbiol.* **42**, 573–587. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.972336> (2016).
34. Coleman, J. L. *et al.* Plasminogen is required for efficient dissemination of *Borrelia burgdorferi* in ticks and for enhancement of spirochetemia in mice. *Cell* **89**, 1111–1119 (1997).
35. Ponting, C. P., Marshall, J. M. & Cederholm-Williams, S. A. Plasminogen: A structural review. *Blood Coag. Fibrinol.* **3**, 605–614 (1992).
36. Dano, K. *et al.* Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv. Cancer Res.* **44**, 139–266 (1985).
37. Barthel, D., Schindler, S. & Zipfel, P. F. Plasminogen is a complement inhibitor. *J. Biol. Chem.* **287**, 18831–18842. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.323287> (2012).
38. Merle, N. S., Church, S. E., Fremeaux-Bacchi, V. & Roumenina, L. T. Complement system part I: molecular mechanisms of activation and regulation. *Front. Immunol.* **6**, 262. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00262> (2015).
39. Lambris, J. D., Ricklin, D. & Geisbrecht, B. V. Complement evasion by human pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 132–142. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1824> (2008).
40. Zipfel, P. F. & Skerka, C. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 729–740 (2009).
41. Ferreira, V. P., Pangburn, M. K. & Cortes, C. Complement control protein factor H: The good, the bad, and the inadequate. *Mol. Immunol.* **47**, 2187–2197 (2010).
42. Rossmann, E. *et al.* Dual binding specificity of a *Borrelia hermsii*-associated complement regulator-acquiring surface protein for factor H and plasminogen discloses a putative virulence factor of relapsing fever spirochetes. *J. Immunol.* **178**, 7292–7301 (2007).
43. Röttgerding, F. *et al.* Immune evasion of *Borrelia miyamotoi*: CbiA, a novel outer surface protein exhibiting complement binding and inactivating properties. *Sci. Rep.* **7**, 303. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00412-4> (2017).
44. Schott, M., Grosskinsky, S., Brenner, C., Kraiczky, P. & Wallich, R. Molecular characterization of the interaction of *Borrelia parkeri* and *Borrelia turicatae* with human complement regulators. *Infect. Immun.* **78**, 2199–2208 (2010).
45. Grosskinsky, S. *et al.* *Borrelia recurrentis* employs a novel multifunctional surface protein with anti-complement, anti-opsonic and invasive potential to escape innate immunity. *PLoS ONE* **4**, e4858. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004858> (2009).
46. Nguyen, N. T. T. *et al.* The complement binding and inhibitory protein CbiA of *Borrelia miyamotoi* degrades extracellular matrix components by interacting with plasmin(ogen). *Front. Cell Infect. Microbiol.* **8**, 23. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00023> (2018).
47. Röttgerding, F. & Kraiczky, P. Immune evasion strategies of relapsing fever spirochetes. *Front. Immunol.* **11**, 1560. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01560> (2020).
48. Koetsveld, J. *et al.* Serodiagnosis of *Borrelia miyamotoi* disease by measuring antibodies against GlpQ and variable major proteins. *Clin. Microbiol. Infect.* **24**, e1331–e1337. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.03.009> (2018).
49. Lawson, C. L., Yung, B. H., Barbour, A. G. & Zuckert, W. R. Crystal structure of neurotropism-associated variable surface protein 1 (Vsp1) of *Borrelia turicatae*. *J. Bacteriol.* **188**, 4522–4530. <https://doi.org/10.1128/JB.00028-06> (2006).
50. Hammerschmidt, C. *et al.* Versatile roles of CspA orthologs in complement inactivation of serum-resistant Lyme disease spirochetes. *Infect. Immun.* **82**, 380–392. <https://doi.org/10.1128/IAI.01094-13> (2014).
51. Koenigs, A. *et al.* BBA70 of *Borrelia burgdorferi* is a novel plasminogen-binding protein. *J. Biol. Chem.* **288**, 25229–25243. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.413872> (2013).
52. Urano, T., Chibber, B. A. & Castellino, F. J. The reciprocal effects of epsilon-aminohexanoic acid and chloride ion on the activation of human [Glu1]plasminogen by human urokinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 4031–4034 (1987).
53. Anonick, P. K., Vasudevan, J. & Gonias, S. L. Antifibrinolytic activities of alpha-N-acetyl-L-lysine methyl ester, epsilon-aminocaproic acid, and tranexamic acid. Importance of kringle interactions and active site inhibition. *Arterioscler. Thromb.* **12**, 708–716. <https://doi.org/10.1161/01.atv.12.6.708> (1992).
54. Lähteenmaki, K., Kuusela, P. & Korhonen, T. K. Bacterial plasminogen activators and receptors. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**, 531–552 (2001).
55. Angles-Cano, E. Overview on fibrinolysis: Plasminogen activation pathways on fibrin and cell surfaces. *Chem. Phys. Lipid.* **67–68**, 353–362 (1994).
56. Lerch, P. G., Rickli, E. E., Lergier, W. & Gillissen, D. Localization of individual lysine-binding regions in human plasminogen and investigations on their complex-forming properties. *Eur. J. Biochem.* **107**, 7–13 (1980).
57. Koch, T. K. *et al.* *Staphylococcus aureus* proteins Sbi and Efb recruit human plasmin to degrade complement C3 and C3b. *PLoS ONE* **7**, e47638. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047638> (2012).
58. Barthel, D., Singh, B., Riesbeck, K. & Zipfel, P. F. *Haemophilus influenzae* uses the surface protein E to acquire human plasminogen and to evade innate immunity. *J. Immunol.* **188**, 379–385. <https://doi.org/10.1049/jimmunol.1101927> (2012).
59. Walter, L. *et al.* Elucidating the immune evasion mechanisms of *Borrelia mayonii*, the causative agent of Lyme disease. *Front. Immunol.* **10**, 2722. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02722> (2019).
60. Kraiczky, P. *et al.* 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308343200> (2004).
61. Bhattacharya, S., Ploplis, V. A. & Castellino, F. J. Bacterial plasminogen receptors utilize host plasminogen system for effective invasion and dissemination. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, 482096. <https://doi.org/10.1155/2012/482096> (2012).
62. Ayón-Núñez, D. A., Fragoso, G., Bobes, R. J. & Lactette, J. P. Plasminogen-binding proteins as an evasion mechanism of the host's innate immunity in infectious diseases. *Biosci. Rep.* <https://doi.org/10.1042/BSR20180705> (2018).
63. Höfs, S., Mogavero, S. & Hube, B. Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. *J. Microbiol.* **54**, 149–169. <https://doi.org/10.1007/s12275-016-5514-0> (2016).
64. Laabei, M. & Ermert, D. Catch me if you can: *Streptococcus pyogenes* complement evasion strategies. *J. Innate Immun.* **11**, 3–12. <https://doi.org/10.1159/000492944> (2019).
65. de Jong, N. W. M., van Kessel, K. P. M. & van Strijp, J. A. G. Immune evasion by *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Spectr.* <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0061-2019> (2019).
66. Floden, A. M., Watt, J. A. & Brissette, C. A. *Borrelia burgdorferi* enolase is a surface-exposed plasminogen binding protein. *PLoS ONE* **6**, e27502. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027502> (2011).
67. Koenigs, A. *et al.* CipA of *Acinetobacter baumannii* is a novel plasminogen binding and complement inhibitory protein. *J. Infect. Dis.* **213**, 1388–1399. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv601> (2016).
68. Koenigs, A., Zipfel, P. F. & Kraiczky, P. Translation elongation factor Tuf of *Acinetobacter baumannii* is a plasminogen-binding protein. *PLoS ONE* **10**, e0134418. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134418> (2015).
69. Rahi, A. *et al.* Enolase of *Mycobacterium tuberculosis* is a surface exposed plasminogen binding protein. *Biochem. Biophys. Acta.* **3355–3364**, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.08.018> (1861).
70. Marti, D. N. *et al.* Ligand preferences of kringle 2 and homologous domains of human plasminogen: Canvassing weak, intermediate, and high-affinity binding sites by 1H-NMR. *Biochemistry* **36**, 11591–11604. <https://doi.org/10.1021/bi971316v> (1997).
71. Vali, Z. & Pathy, L. The fibrin-binding site of human plasminogen. Arginines 32 and 34 are essential for fibrin affinity of the kringle 1 domain. *J. Biol. Chem.* **259**, 13690–13694 (1984).
72. Wiman, B., Lijnen, H. R. & Collen, D. On the specific interaction between the lysine-binding sites in plasmin and complementary sites in alpha2-antiplasmin and in fibrinogen. *Biochem. Biophys. Acta.* **579**, 142–154 (1979).

73. Wistedt, A. C. *et al.* Kringle 2 mediates high affinity binding of plasminogen to an internal sequence in streptococcal surface protein PAM. *J. Biol. Chem.* **273**, 24420–24424. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.38.24420> (1998).
74. Lijnen, H. R., De Cock, F., Van Hoef, B., Schlott, B. & Collen, D. Characterization of the interaction between plasminogen and staphylokinase. *Eur. J. Biochem.* **224**, 143–149. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb20005.x> (1994).
75. Bergmann, S., Rohde, M., Chhatwal, G. S. & Hammerschmidt, S. alpha-Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Mol. Microbiol.* **40**, 1273–1287 (2001).
76. Brissette, C. A. *et al.* *Borrelia burgdorferi* infection-associated surface proteins ErpP, ErpA, and ErpC bind human plasminogen. *Infect. Immun.* **77**, 300–306. <https://doi.org/10.1128/IAI.01133-08> (2009).
77. Hallström, T. *et al.* Complement regulator-acquiring surface protein 1 of *Borrelia burgdorferi* binds to human bone morphogenic protein 2, several extracellular matrix proteins, and plasminogen. *J. Infect. Dis.* **202**, 490–498 (2010).
78. Gonzalez, T., Gaultney, R. A., Floden, A. M. & Brissette, C. A. *Escherichia coli* lipoprotein binds human plasminogen via an intramolecular domain. *Front. Microbiol.* **6**, 1095. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01095> (2015).
79. Agarwal, V., Talens, S., Grandits, A. M. & Blom, A. M. A Novel Interaction between complement inhibitor C4b-binding protein and plasminogen that enhances plasminogen activation. *J. Biol. Chem.* **290**, 18333–18342. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.619494> (2015).
80. Kraiczy, P. Hide and seek: How Lyme disease spirochetes overcome complement attack. *Front. Immunol.* **7**, 385. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00385> (2016).
81. Rooijakkers, S. H. *et al.* Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases. *Nat. Immunol.* **6**, 920–927 (2005).
82. Hammel, M. *et al.* A structural basis for complement inhibition by *Staphylococcus aureus*. *Nat. Immunol.* **8**, 430–437. <https://doi.org/10.1038/ni1450> (2007).
83. Hammel, M. *et al.* Characterization of Ehp, a secreted complement inhibitory protein from *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **282**, 30051–30061. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704247200> (2007).
84. Jongerius, I. *et al.* Staphylococcal complement evasion by various convertase-blocking molecules. *J. Exp. Med.* **204**, 2461–2471. <https://doi.org/10.1084/jem.20070818> (2007).
85. Raffel, S. J., Battisti, J. M., Fischer, R. J. & Schwan, T. G. Inactivation of genes for antigenic variation in the relapsing fever spirochete *Borrelia hermsii* reduces infectivity in mice and transmission by ticks. *PLoS Pathog.* **10**, e1004056. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004056> (2014).
86. Margos, G. *et al.* Long-term in vitro cultivation of *Borrelia miyamotoi*. *Ticks. Tick. Borne Dis.* **6**, 181–184. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.12.001> (2015).
87. Garcia, B. L., Zhi, H., Wäger, B., Hook, M. & Skare, J. T. *Borrelia burgdorferi* BBK32 inhibits the classical pathway by blocking activation of the C1 complement complex. *PLoS Pathog.* **12**, e1005404. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005404> (2016).

Acknowledgements

We thank Christina Seel for technical assistance and Arno Koenigs for critical review and language editing of the manuscript. This work forms part of the doctoral thesis of FLS and the bachelor thesis of TKB. This work was supported by the LOEWE Center DRUID (Novel Drug Targets against Poverty-Related and Neglected Tropical Infectious Diseases), project C3 and NIH-R01AI121401 to PK, NSF-IOS1755286 and NIH-R21AI144891 (YPL). JWH was supported by a grant from ZonMw (project number 522003007, Ticking on Pandora's box) and a grant from the EU Interreg North Sea Region program, as part of the NorthTick project. None of the funding agencies had participation in the decision of the study, data collection and analysis, or submission of this work for publications.

Author contributions

FLS., designed and performed experiments, analysed the data, and prepared Figs. 1B, 2, 3 and 4, VS., designed and performed the complement experiments, analysed the data, and prepared Fig. 5 and Supplementary Fig. 3, T.K.B. designed and performed experiments, analysed the data, and prepared Fig. 1A, Y.P.L. provided reagents, analysed the data, and wrote the paper, J.W.R.H. provided reagents, analysed the data, and wrote the paper, P.K. designed and coordinated the research, performed experiments, analyzed data, prepared Supplementary Figs. 1, 2 and 4, and wrote the main text. All authors reviewed and approved the manuscript.

Funding

Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84533-x>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to P.K.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021