

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

**Funktionelle Analysen zur Interaktion des ORF10 Proteins von
Borrelia recurrentis mit dem humanen Komplementsystem**

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

vorgelegt von
Eva Gerlach

aus Hanau

Frankfurt am Main, 2023

Dekan:	Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referent:	Prof. Dr. Peter Kraicz
Korreferent/in:	Prof. Dr. Josef Pfeilschifter
Tag der mündlichen Prüfung:	25.06.2024

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	9
Abbildungsverzeichnis	13
Tabellenverzeichnis	15
1 Einleitung und Zielsetzung.....	17
1.1 Borrelien und <i>Borrelia recurrentis</i>.....	17
1.1.1 Genetische Charakteristika von Borrelien.....	19
1.1.2 Wirtsspezifität und Transmission	21
1.1.3 Geographische Verbreitung	22
1.2 Die klinische Entität Rückfallfieber.....	23
1.2.1 Historie und Epidemiologie	23
1.2.2 Klinik, Therapie und Prognose.....	26
1.2.3 Jarisch-Herxheimer-Reaktion als Komplikation.....	28
1.2.4 Diagnostische Herausforderungen	29
1.2.5 Prophylaxe	30
1.3 Das Komplementsystem	31
1.3.1 Der klassische Weg des Komplementsystems.....	32
1.3.2 Der Lektin-Weg des Komplementsystems	33
1.3.3 Der alternative Weg des Komplementsystems.....	34
1.3.4 Der terminale Weg des Komplementsystems.....	35
1.3.5 Regulatoren des Komplementsystems.....	36
1.4 Immunevasions-Strategien von Rückfallfieber-Borrelien	37
1.5 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit	39
2 Material und Methoden.....	41
2.1 Bakterienstämme	41
2.1.1 Borrelienstämmen	41
2.1.2 <i>Escherichia coli</i> -Stämme.....	41
2.2 Starteroligonukleotide und Basisvektoren	42

2.2.1	Starteroligonukleotide.....	42
2.2.2	Vektoren	43
2.3	Antikörper.....	44
2.4	Proteine	45
2.5	Blutprodukte	47
2.5.1	Humanserum	47
2.5.2	Schaferythrozyten für hämolytische Assays.....	47
2.6	Reagenzienpackungen	48
2.7	Größenstandards.....	48
2.8	Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien	49
2.8.1	Chemikalien	49
2.8.2	Spezielle Materialien, Proteine, Substanzen und Puffer.....	52
2.8.3	Allgemeine Puffer und Lösungen	54
2.8.4	Geräte	55
2.8.5	Software	57
2.9	Medien.....	58
2.9.1	Kulturmedien	58
2.9.2	Antibiotika	58
2.10	Kultivierung und Zellzahlbestimmung von Mikroorganismen	59
2.10.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> -Zellen	59
2.10.2	Kultivierung von Borrelien.....	59
2.10.3	Bestimmung der optischen Dichte einer Bakterienkultur.....	59
2.10.4	Zellzahlbestimmung von Borrelienzellen und Erythrozyten	60
2.11	Molekularbiologische Methoden	60
2.11.1	Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion 60	
2.11.2	Aufreinigung von amplifizierten DNA-Fragmenten.....	63
2.11.3	Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese 63	

2.11.4	Hydrolyse von DNA mittels Restriktionsendonukleasen.....	64
2.11.5	Ligation von DNA-Fragmenten	64
2.11.6	Isolierung von Plasmid-DNA	65
2.11.7	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	65
2.11.8	Sequenzierung von Plasmid-DNA und PCR-Amplifikaten	65
2.11.9	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen.....	66
2.12	Proteinbiochemische Methoden	66
2.12.1	Separation von Proteinen in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	66
2.12.2	Transfer von Proteinen auf eine Nitrocellulosemembran (Western-Blot-Analyse) 68	
2.12.3	Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen mittels Silbernitrat 69	
2.12.4	Produktion rekombinant hergestellter Proteine in <i>E. coli</i> (kleiner Versuchsmaßstab)	71
2.12.5	Produktion und Reinigung rekombinant hergestellter Proteine aus <i>E. coli</i> -Zellen (großer Versuchsmaßstab)	72
2.12.6	Entsalzung und Konzentrierung von Protein-haltigen Lösungen.....	75
2.12.7	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Micro-BCA	75
2.13	Immunologische Methoden	76
2.13.1	Western-Blot-Analyse.....	76
2.13.2	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	77
2.13.3	Komplement-Aktivierungs-Assay (WiELISA).....	79
2.14	Spezielle Methoden.....	81
2.14.1	Hämolytischer Assay.....	81
2.14.2	Serumbakterizidie-Assay	82
3	Ergebnisse	83
3.1	Charakterisierung des ORF10-Proteins von <i>Borrelia recurrentis</i>.....	83
3.1.1	Überprüfung der ORF10-kodierenden Sequenz im Expressionsvektor pQE-30 Xa	83
3.1.2	Reinheitsüberprüfung der isolierten His ₆ -Fusionsproteine	83

3.2	Charakterisierung der Komplement-inhibitorischen Aktivität des ORF10-Proteins aus <i>B. recurrentis</i>	85
3.2.1	Nachweis der inhibierenden Eigenschaften des Proteins ORF10 auf die verschiedenen Komplementaktivierungswege	85
3.2.2	Untersuchung zur Interaktion von ORF10 mit Komponenten des klassischen und des Lektin-Weges des Komplementsystems.....	88
3.2.3	Untersuchung zur Interaktion von ORF10 mit Komponenten des alternativen Weges des Komplementsystems	94
3.2.4	Untersuchung zur Komplement-inhibierenden Eigenschaft von ORF10 auf den terminalen Weg des Komplementsystems	98
3.3	Untersuchung zur Bindung von generierten ORF10-Varianten an Komplementkomponenten	100
3.3.1	Herstellung substituierter bzw. deletierter Varianten von ORF10 durch <i>In-vitro</i> -Mutagenese	102
3.4	Untersuchungen zur Serumresistenz von ORF10-produzierenden Borrelienzellen gegenüber Humanserum	103
4	Diskussion	106
4.1	<i>Borrelia recurrentis</i>, der Erreger des Läuserückfallfiebers	106
4.2	Charakterisierung des ORF10-Proteins von <i>B. recurrentis</i>	107
4.2.1	Inhibitorische Wirkung von ORF10 auf die verschiedenen Wege des humanen Komplementsystems.....	107
4.2.2	Interaktion von ORF10 mit verschiedenen Komplementkomponenten 110	
4.2.3	Inhibitorischer Einfluss von ORF10 auf den terminalen Weg des Komplementsystems	115
4.2.4	Struktur-basierte Mutationen von ORF10 und deren Auswirkung auf die Komplementinteraktion	115
4.2.5	Untersuchungen zur Serumresistenzentstehung von Borrelien durch heterologe Produktion von ORF10.....	117
4.3	Ausblick	118

5	Zusammenfassung	119
6	Summary	120
7	Literaturverzeichnis	121
8	Danksagung	143
9	Schriftliche Erklärung	144

Abkürzungsverzeichnis

<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
A. bidest.	<i>aqua bidestillata</i> (zweifach destilliertes Wasser)
ANI	Average Nucleotide Identity
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AW	Alternativer Komplementweg
Å	Ångström
<i>B.</i>	<i>Borrelia</i>
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin (Rinderserumalbumin)
BSK-Medium	Barbour-Stoenner-Kelly-Medium
C1 – C9	Komplementkomponenten 1 – 9
C1-INH	C1-Esterase-Inhibitor
C4BP	C4b-binding protein
CFHR1	Complement Factor H-related protein 1
CihC	Complement inhibition via C4BP
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DPBS	Dulbecco's Phosphate-buffered Saline (Dulbeccos Phosphat-gepufferte Salzlösung)
DPBS ⁺⁺	DPBS mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺
E	Einheiten
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest)
FB	Faktor B

FD	Faktor D
FH	Faktor H
FHL-1	Factor H-like protein-1
FI	Faktor I
FP	Forward Primer
g	Konstante der relativen Erdbeschleunigung ($g = 9,80655 \text{ m/s}^2$)
GVB ⁺⁺	Gelatin Veronal Buffer (Gelatine-Veronal-Puffer)
h	Stunden
HCl	Salzsäure
HcpA	Human complement regulator and plasminogen binding protein A
HEPES	Hydroxyethyl-Piperazin-Ethansulfonsäure
His ₆	Hexahistidin
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
JHR	Jarisch-Herxheimer-Reaktion
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KW	Klassischer Komplementweg
LPS	Lipopolysaccharid
LRS	Läuserückfallfieber
LW	Lektin-vermittelter Komplementweg
MAK	Membranangriffskomplex
MASP	MBL-assozierte Serinprotease
MBL	Mannose-bindendes Lektin
mg	Milligramm
min	Minuten
Mbp	Megabasenpaar

ng	Nanogramm
NHS	Normales Humanserum
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NK	Negativkontrolle
nm	Nanometer
<i>O.</i>	<i>Ornithodoros</i>
OD	Optische Dichte
ORF	Open Reading Frame
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PBS ⁺⁺	PBS mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pg	Pikogramm
pH	<i>potentia hydrogenii</i> (Potenzial des Wasserstoffs)
PK	Positivkontrolle
PRM	Pattern Recognition Molecule
RF	Rückfallfieber
RP	Reverse Primer
rpm	Revolutions per Minute (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunden
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-buffered saline (Tris-gepufferte Salzlösung)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TT	Tris-Tricin

TW	Terminaler Komplementweg
Tween20	Polysorbat 20
v/v	volume per volume (Volumen pro Volumen)
Vlp	variable large protein
Vmp	variable major protein
Vsp	variable small protein
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)
WiELISA	Komplement-Aktivierungs-Assay
YT-Medium	Yeast Extract Tryptone Medium (Hefeextrakt-Tripton-Medium)
ZRF	Zeckenrückfallfieber

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Charakteristische Zellmorphologie einer Borrelie in der Immunfluoreszenzmikroskopie	17
Abbildung 2: Morphologische Darstellung einer Spirochäte und der im Periplasma verankerten Flagellenbündel.....	18
Abbildung 3: Phylodendrogramm verschiedener Rückfallfieber-Borrelien.....	21
Abbildung 4: Geographische Verteilung afrikanischer Rückfallfieber-Borrelien	23
Abbildung 5: Klinische Manifestierungen einer LRF-Infektion bei einem äthiopischen Patienten	27
Abbildung 6: Mikroskopischer Nachweis von <i>B. recurrentis</i> in Blutausstrichen.....	30
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Aktivierung des klassischen Weges auf einer bakteriellen Oberfläche.....	33
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Aktivierung des Lektin-Weges auf einer bakteriellen Oberfläche.....	34
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Aktivierung des alternativen Weges auf einer bakteriellen Oberfläche.....	35
Abbildung 10: Charakteristischer Verlauf wiederholter Spirochätämien nach einer Infektion mit RF-Borrelien	38
Abbildung 11: Ausschnitt der Organisation der ORF-kodierenden Gene auf dem linearen Plasmid lp190 von <i>B. recurrentis</i>	40
Abbildung 12: Aminosäuresequenzvergleich des ORF10-Proteins des Referenzstammes <i>B. recurrentis</i> A1 mit dem für die Analysen verwendeten Vektor pQE-ORF10.....	83
Abbildung 13: Reinheitsüberprüfung der isolierten His ₆ -getaggten Proteine	84
Abbildung 14: Dosisabhängige Inhibition des klassischen Weges durch ORF10	86
Abbildung 15: Dosisabhängige Inhibition des alternativen Weges durch ORF10.....	87
Abbildung 16: Dosisabhängige Inhibition des Lektin-Weges durch ORF10	88
Abbildung 17: Nachweis der Bindung von ORF10 an verschiedene Komplementkomponenten des klassischen und des Lektin-Weges.....	90
Abbildung 18: Nachweis der Bindung von verschiedenen Borrelienproteinen an Komplementkomponenten des klassischen und des Lektin-Weges.....	92

Abbildung 19: Vergleichende Untersuchungen zur konzentrationsabhängigen Bindung von C1q und C4b an ORF10	93
Abbildung 20: Nachweis der Bindung von ORF10 an verschiedene Komplementkomponenten des alternativen Weges	96
Abbildung 21: Vergleichende Untersuchung der konzentrationsabhängigen Bindung von C3 und C3b an ORF10	98
Abbildung 22: Untersuchung der inhibierenden Wirkung von ORF10 auf den terminalen Weg.....	100
Abbildung 23: Modellierte dreidimensionale Struktur des ORF10-Proteins von <i>B. recurrentis</i>	101
Abbildung 24: Vergleich der übereinandergelegten, dreidimensionalen Struktur von ORF10 mit ORF7	102
Abbildung 25: Western-Blot-Analyse der in <i>E. coli</i> produzierten ORF10-Varianten....	103
Abbildung 26: Nachweis von motilen Borrelienzellen in Anwesenheit von 25 % Humanserum mittels Dunkelfeldmikroskopie	105
Abbildung 27: Struktureller Vergleich der Modelle von ORF10, ORF7, CspA und BGA71	116

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Borrelienstämme	41
Tabelle 2: Verwendete <i>Escherichia (E.) coli</i> -Stämme zur Transformation	41
Tabelle 3: Bezeichnungen und Nukleotidsequenz der verwendeten Oligonukleotide..	42
Tabelle 4: Verwendete Vektoren.....	44
Tabelle 5: Verwendete primäre Antikörper	44
Tabelle 6: Verwendete sekundäre Antikörper	45
Tabelle 7: Verwendete Restriktionsendonukleasen	45
Tabelle 8: Verwendete Komplementkomponenten.....	45
Tabelle 9: Gereinigte Borrelienproteine.....	46
Tabelle 10: Sonstige verwendete Proteine	46
Tabelle 11: Verwendete Reagenzienpackungen	48
Tabelle 12: Verwendete Protein- und DNA-Größenstandards	48
Tabelle 13: Chemikalien	49
Tabelle 14: Übersicht der verwendeten speziellen Materialien, Substanzen und fertigen Puffer	52
Tabelle 15: Verwendete allgemeine Puffer und Lösungen	54
Tabelle 16: Verwendete Materialien und Geräte	55
Tabelle 17: Verwendete Software	57
Tabelle 18: Verwendete Medien zur Kultivierung von <i>E. coli</i> und Borrelien	58
Tabelle 19: Zur Selektion verwendete Antibiotika und deren verwendete Konzentration	59
Tabelle 20: PCR-Reaktionsansatz für die <i>Taq</i> -DNA-Polymerase	61
Tabelle 21: PCR-Bedingungen für die <i>Taq</i> -DNA-Polymerase	61
Tabelle 22: PCR-Reaktionsansatz für die HiFi-DNA-Polymerase	61
Tabelle 23: PCR-Bedingungen für die HiFi-DNA-Polymerase	62
Tabelle 24: PCR-Reaktionsansatz für die VeriFi™-DNA-Polymerase	62
Tabelle 25: PCR-Bedingungen für die VeriFi™-DNA-Polymerase	62
Tabelle 26: Zusammensetzung des Puffers für die Agarose-Gelelektrophorese.....	63
Tabelle 27: Ligationsansatz für das TOPO TA Cloning® Kit.....	64
Tabelle 28: Ligationsansatz für die T4-DNA-Ligase	65

Tabelle 29: Pufferzusammensetzung für die TT-SDS-Polyacrylamidgele.....	67
Tabelle 30: Zusammensetzung für ein 10 % TT-SDS-Polyacrylamidgel.....	67
Tabelle 31: Zusammensetzung der Puffer für die Probenvorbereitung und die TT-SDS-PAGE	68
Tabelle 32: Zusammensetzung der Puffer für die Western-Blot-Analyse.....	69
Tabelle 33: Zusammensetzung der Lösungen für die Silberfärbung.....	70
Tabelle 34: Puffer für die Proteinreinigung.....	73
Tabelle 35: Verwendete Puffer für die Western-Blot-Analyse.....	76
Tabelle 36: Verwendete Puffer für den Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	78
Tabelle 37: Zusammensetzung der verwendeten Puffer für den Komplement-Aktivierungs-Assay (WiELISA)	80
Tabelle 38: Zusammenfassung verschiedener Borrelienproteine und deren Inhibition der Komplementwege und ihrer Interaktion mit Komplementkomponenten	108
Tabelle 39: Selektive Auswahl diverser humanpathogene Erreger, deren Komplement-interagierende Proteine und Inhibition des Komplementsystems	109
Tabelle 40: Zusammenfassung der Ergebnisse zur Interaktion von ORF10 an untersuchte Komplementfaktoren	114

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Borrelien und *Borrelia recurrentis*

Bei Borrelien handelt es sich um helikal gewundene, Gram-negative Bakterien.¹ Der Name leitet sich vom französischen Mikrobiologen Amédée Borrel ab, der die Spirochäten 1907 beschrieb.² Zusammen mit den Leptospiren und den Treponemen gehören sie phylogenetisch zur Ordnung der *Spirochaetales*, welche sich in die Familie der *Spirochaetaceae* und in die Familie der *Borreliaceae* unterteilt.¹ Innerhalb der letztgenannten Familie lassen sich die Reptil-assoziierten Borrelien, die Erreger der Lyme-Borreliose sowie die Erreger des Rückfallfiebers (RF) unterscheiden.³

Borrelia (B.) recurrentis, der Erreger des Läuse Rückfallfiebers, unterscheidet sich in der Morphologie nicht von anderen Spirochäten, die ebenfalls RF verursachen. Die Morphologie zeichnet sich durch die spitz zulaufende Enden, eine Länge von 12 – 22 µm sowie einen Durchmesser von etwa 0,3 µm aus (s. Abbildung 1).⁴

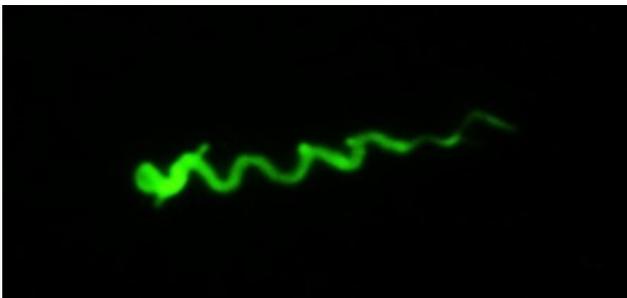


Abbildung 1: Charakteristische Zellmorphologie einer Borrelie in der Immunfluoreszenzmikroskopie

Dargestellt ist eine serumsensitive Zelle von *B. garinii* G1, einem Erreger der Lyme-Borreliose. Die Zellen wurden mit NHS inkubiert und auf der Oberfläche abgelagerte Komplementkomponenten mittels grün fluoreszierendem Alexa Fluor® 488 Antikörper (Verdünnung 1:500) markiert. Die Zelle ist gekennzeichnet durch die charakteristische, helikal gewundene Morphologie.

B. recurrentis besitzt, je nach Literaturangabe, 8 – 11^{4,5} oder 15 – 20, im Periplasma inserierte Flagellen⁶ und bewegt sich in Flüssigkeit mit einer durchschnittlichen Wellenlänge von 1,8 µm sowie einer Amplitude von 0,8 µm.⁴ Der protoplasmatische Zylinder besteht aus dem Zytoplasma, einer zytoplasmatischen Membran und einer Peptidoglykanschicht, welche von der äußeren Membran umschlossen wird (s. Abbildung 2).⁷ Zwischen der äußeren und der inneren Membran, vollständig im

periplasmatischen Raum, befinden sich die Flagellen. Die Interaktion der Geißeln mit dem elastischen protoplasmatischen Zylinder resultiert in der charakteristischen spiralförmigen Zellmorphologie; die Rotation der Flagellen bewirkt in einer flüssigen Umgebung, wie Blut oder Flüssigmedium, die wellenförmige Bewegung der Zellen. Diese wiederum erzeugt einen Schub und treibt die Zelle somit vorwärts.⁸

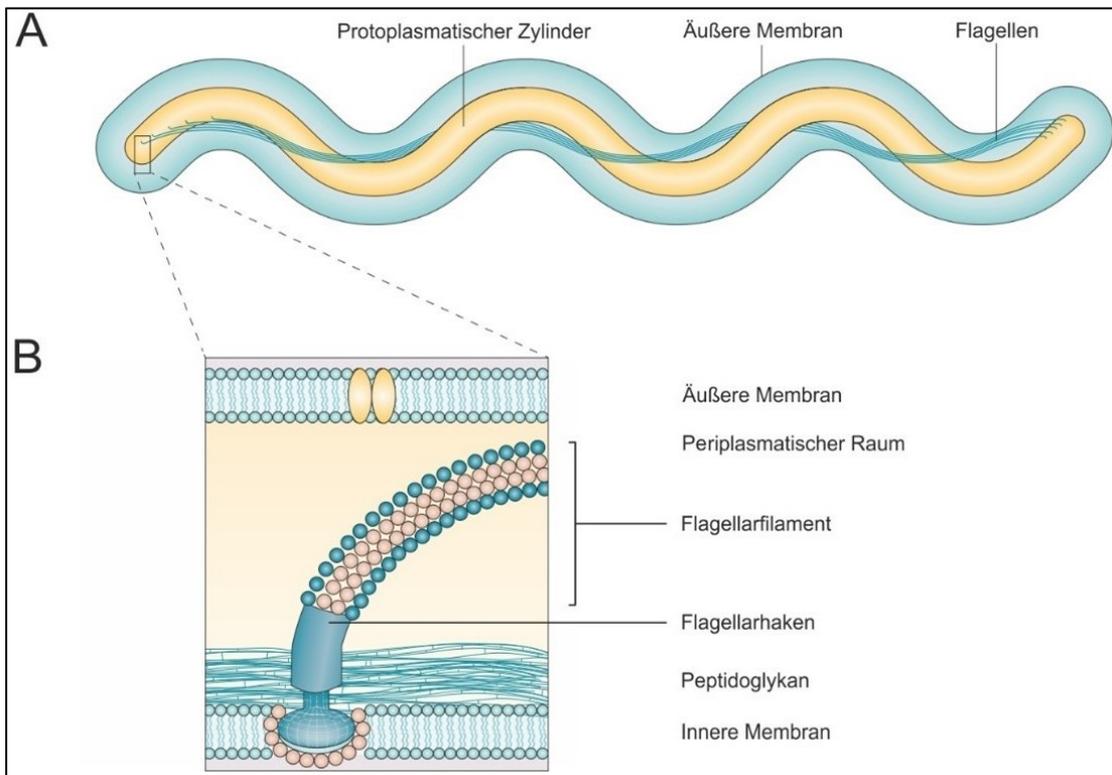


Abbildung 2: Morphologische Darstellung einer Spirochäte und der im Periplasma verankerten Flagellenbündel

(A) Die im Periplasma inserierten Flagellen drehen sich um den protoplasmatischen Zylinder. Die Rotation der Geißeln führt zu einer Korkenzieher-artigen Bewegung des gesamten Bakteriums, wodurch es sich fortbewegen kann. Jede Flagelle ist hierbei subterminal an einem einzelnen Zellpol verankert und kann sich mit anderen Flagellen des Gegenpols in der Zellmitte überlappen. (B) Schematische Darstellung der flagellären Verankerung in der inneren Membran mit den umgebenden Strukturen (entnommen aus Fraser, 2016⁸; modifiziert nach Röttgerding, 2023⁹).

Die Zusammensetzung ihrer Membran unterscheidet Borrelien von anderen Gram-negativen Bakterien: Diese besteht aus 12 – 50 % Lipiden, 45 – 62 % Proteinen und 3 – 4 % Kohlenhydraten.¹⁰ Die äußere Membran enthält eine große Anzahl von Lipoproteinen,⁵ die auf der Zelloberfläche exponiert sind und eine wichtige Rolle bei der Interaktion von Erreger und Wirt spielen. Lipoproteine sind insbesondere für die

Pathogenität, die Dissemination des Erregers und die Abwehr gegenüber der angeborenen Immunantwort von Bedeutung.¹¹

1.1.1 Genetische Charakteristika von Borrelien

Während nahezu alle Bakterien ein zirkuläres Chromosom aufweisen, zeichnen sich Borrelien durch eine segmentierte Struktur ihres Genoms aus, welches aus einem ca. 1 Mbp großen linearen Chromosom sowie diversen linearen und zirkulären Plasmiden besteht, die zusammen ca. 0,7 Mbp ausmachen.¹² Borrelien nehmen durch ihr lineares Chromosom eine Sonderstellung innerhalb der Spirochäten ein, da Treponemen und Leptospiren 1 – 2 zirkuläre Genome aufweisen.^{13,14}

RF-Borrelien weisen mit einer Größe von 1 – 1,5 Mbp ein deutlich kleineres Genom auf als andere humanpathogene Bakterien.¹⁵ Die Reduzierung des Genoms, wie sie sich bei RF-Borrelien beobachten lässt, geht mit einer degenerierten, parasitären Lebensweise einher.¹⁶ Sie weisen eine außerordentliche Adaption an ihren Vektor und Wirt auf. Aus diesem Grund determinieren viele Gene für die Wirtsspezifität, während Gene, die für essenzielle Enzyme kodieren oder für die Synthese von Aminosäuren, Fettsäuren, diversen Kofaktoren sowie Nukleotiden notwendig sind, im RF-Borreliengenom nicht vorhanden sind.^{17,18}

B. recurrentis weist neben *B. duttonii* unter den verschiedenen Borrelienspezies das am einfachsten strukturierte Genom auf, welches aus einem linearen Chromosom, sieben linearen Plasmiden und 990 kodierenden Genen besteht. Dies lässt auf eine eingeschränkte genetische Variabilität schließen.¹⁹ Bioinformatische Analysen lassen vermuten, dass sich *B. recurrentis* durch permanente Gendeletionen aus *B. duttonii* entwickelt hat.²⁰ Warum *B. recurrentis* ausschließlich auf die Kleider- bzw. Körperlaus (*Pediculus humanus humanus* bzw. *corporis*) als Vektor und den Menschen als Wirt spezialisiert ist, ist nach wie vor ungeklärt.^{21,22} Wegen der hohen Sequenzidentität von 99 % sind diese beiden Borrelienspezies genetisch sehr schwer voneinander zu differenzieren.²³ Durch Genomanalysen ließ sich letztlich feststellen, dass die Chromosomen von *B. recurrentis* und *B. duttonii* fast vollständig kollinear sind.²⁴ In

dieser Analyse zeigte sich auch, dass alle Plasmide von *B. recurrentis* einen Gegenpart in *B. duttonii* besitzen.²¹

Genetische Untersuchungen haben gezeigt, dass die in Afrika endemischen Borrelienspezies *B. duttonii* und *B. crocidurae*, beides Erreger des in Ost- und Westafrika vorkommenden Zeckenrückfallfiebers,²⁵ eine Übereinstimmung ihres Genoms von 99 % im Vergleich zu *B. recurrentis* aufweisen. Aufgrund dieser Analysen wurde spekuliert, dass diese drei Spezies „Ökotypen“ der Genospezies *B. africana* darstellen²⁶ und sich phylogenetisch erst kürzlich an verschiedene Wirte adaptiert haben (s. Abbildung 3).^{24,27}

Ein Phylogendrogramm mit dem Verwandtschaftsgrad, den Vektoren und Wirten von RF-Borrelien sowie den am häufigsten vorkommenden Lyme-Borrelienspezies zeigt Abbildung 3. Auffällig hierbei ist, dass *B. recurrentis* und *B. duttonii* die einzigen beiden Borrelienspezies darstellen, die sich auf den Menschen als einzigen Wirt spezialisiert haben.

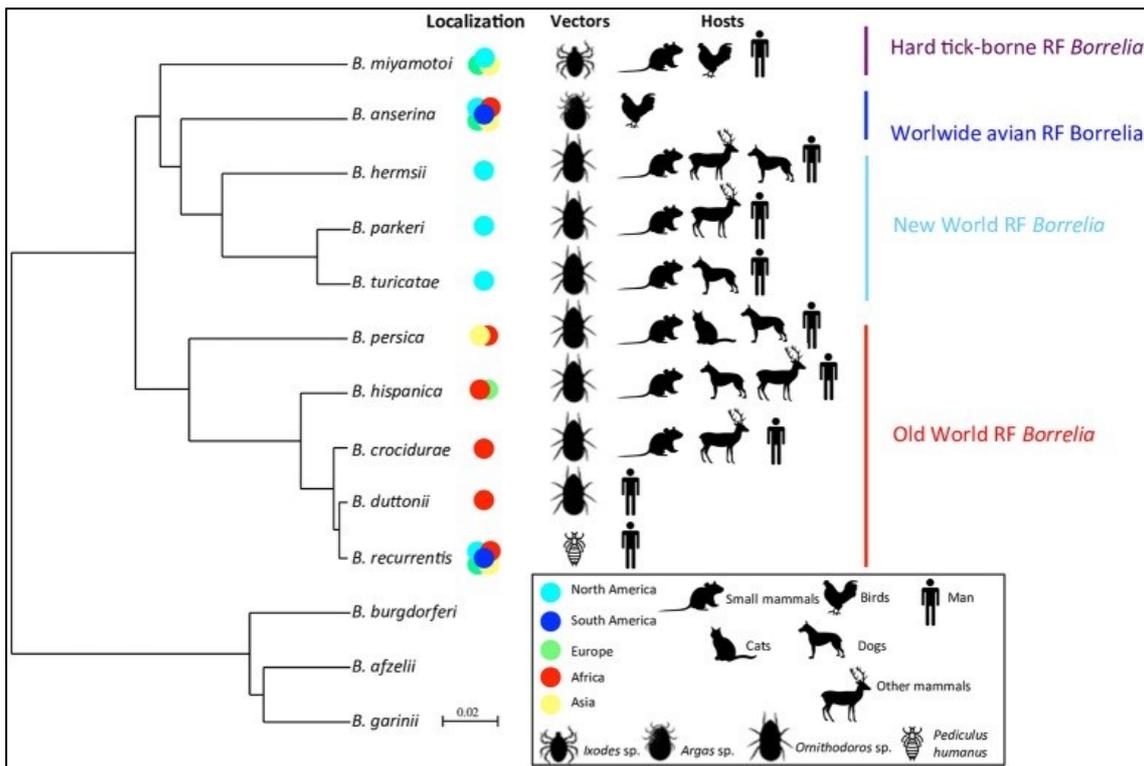


Abbildung 3: Phylogendrogramm verschiedener Rückfallfieber-Borrelien

Die Erstellung erfolgte durch den paarweisen Vergleich der sog. „average nucleotide identity“ (ANI) zweier Genomsequenzen verschiedener Borrelienspezies (entnommen aus Gupta *et al.*, 2013¹⁸; Elbir *et al.*, 2014²⁶), wobei die drei am häufigsten vorkommenden humanpathogenen Lyme-Borrelienspezies mit in die Analyse eingeschlossen wurden. Dargestellt sind der Vektor, der Wirt sowie die geographische Verbreitung von RF-Borrelien (entnommen aus Talagrand-Reboul *et al.*, 2018¹⁵).

1.1.2 Wirtsspezifität und Transmission

B. recurrentis ist, wie alle Borrelienspezies, auf einen bestimmten Vektor spezialisiert²⁸; allerdings ist *B. recurrentis* die einzige Borrelienspezies, die auf die Kleider- bzw. Körperlaus (*Pediculus humanus humanus* bzw. *corporis*) als Vektor adaptiert ist.²⁹ Trotz Hinweisen einer Übertragung von *B. recurrentis* auf den Menschen durch infizierte Kopfläuse (*Pediculus humanus capitis*) konnte bisher kein gesicherter Nachweis erbracht werden.^{22,30} Da Kopfläuse weiterhin ein globales Problem darstellen, im Gegensatz zu Körperläusen, deren Verbreitung weltweit im letzten Jahrhundert signifikant reduziert werden konnte,^{22,31} müssten weltweit Fälle von Läuserückfallfieber auftreten und nachgewiesen werden, was jedoch nicht der Fall ist.

Aufgrund der genetischen Verwandtschaft von *B. recurrentis* und *B. duttonii* besteht die Möglichkeit, dass auch *B. recurrentis* durch Zecken übertragen werden kann. Bereits

1942 gelang der Nachweis, dass Mäuse zumindest experimentell über Zecken mit *B. recurrentis* infiziert werden können.³² Weitere Daten geben Anlass zur Vermutung, dass auch *B. duttonii* durch Läuse als Vektoren übertragen werden kann.³³

Die Körperläuse leben etwa 21 Tage lang und nehmen währenddessen bis zu fünf Blutmahlzeiten zu sich. Ein einzelner Mensch kann hierbei von tausenden von Läusen befallen sein.³⁴ Da infizierte Läuse, im Gegensatz zu Zecken, nicht in der Lage sind, die Erreger an ihre Nachkommen weiterzugeben (vertikale Transmission), fungieren infizierte Menschen als Reservoir für *B. recurrentis*: Nicht infizierte Läuse können bei der Blutmahlzeit an einem infizierten Wirt die im Blut zirkulierenden Borrelien aufnehmen.^{28,35-38} Nach der Aufnahme der Spirochäten gelangen diese in den Mitteldarm und migrieren von dort in die Hämolymphe, nicht jedoch in die Speicheldrüsen.^{29,39} Durch die Blutmahlzeit der Läuse wird beim Wirt ein Juckreiz ausgelöst, der zu vermehrtem Kratzen führt, wodurch die Läuse zerdrückt werden. Zölomflüssigkeit oder Faeces von Läusen werden hierbei über Mikroläsionen oder Schleimhäute, wie die Konjunktiven, eingebracht und gelangen so in den menschlichen Blutkreislauf, wo sich die Erreger vermehren können. Das bedeutet, dass eine direkte Übertragung, wie sie z. B. bei den Lederzecken zu beobachten ist, nicht stattfindet. Allerdings kann eine Übertragung von *B. recurrentis* auch nosokomial über Bluttransfusionen, Nadelstichverletzungen und Schmierinfektionen stattfinden.²⁹

Eine 2019 erschienene Studie konnte zeigen, dass mit *B. recurrentis* infizierte Bettwanzen (*Cimex lectularius*) 20 Tage lang überlebensfähige Spirochäten im Mittel- und Hinterdarm aufwiesen.⁴⁰ Eine Übertragung auf den Menschen, ähnlich wie bei Läusen, ist daher potenziell möglich.

1.1.3 Geographische Verbreitung

Zu den Vektoren auf dem afrikanischen Kontinent, die die verschiedenen RF-Borrelienspezies übertragen, zählen u. a. *Ornithodoros (O.) erraticus*, welche in den marokkanischen Küstenarealen vorzufinden sind und als Vektor für *B. hispanica* dienen. *O. sonrai* ist in West- sowie in Teilen Nordafrikas vorzufinden und kann zur Infektion mit

B. crocidurae führen, während *O. moubata* und *O. porcinus* vor allem in Zentralafrika vorkommen und *B. duttonii* übertragen können. *B. recurrentis* ist hauptsächlich in Äthiopien und in anderen Ländern am Horn von Afrika, wie Somalia und Eritrea, sowie in Süd-Sudan bzw. im Süden des Sudans vorzufinden.^{28,31,41,42} Es kommt regelmäßig zur Entdeckung neuer, bisher nicht kultivierbarer Spirochäten, die phylogenetisch mit bereits bekannten RF-Borrelien verwandt sind.⁴³ Die geographische Verbreitung von RF-Borrelien in Afrika ist in Abbildung 4 dargestellt.

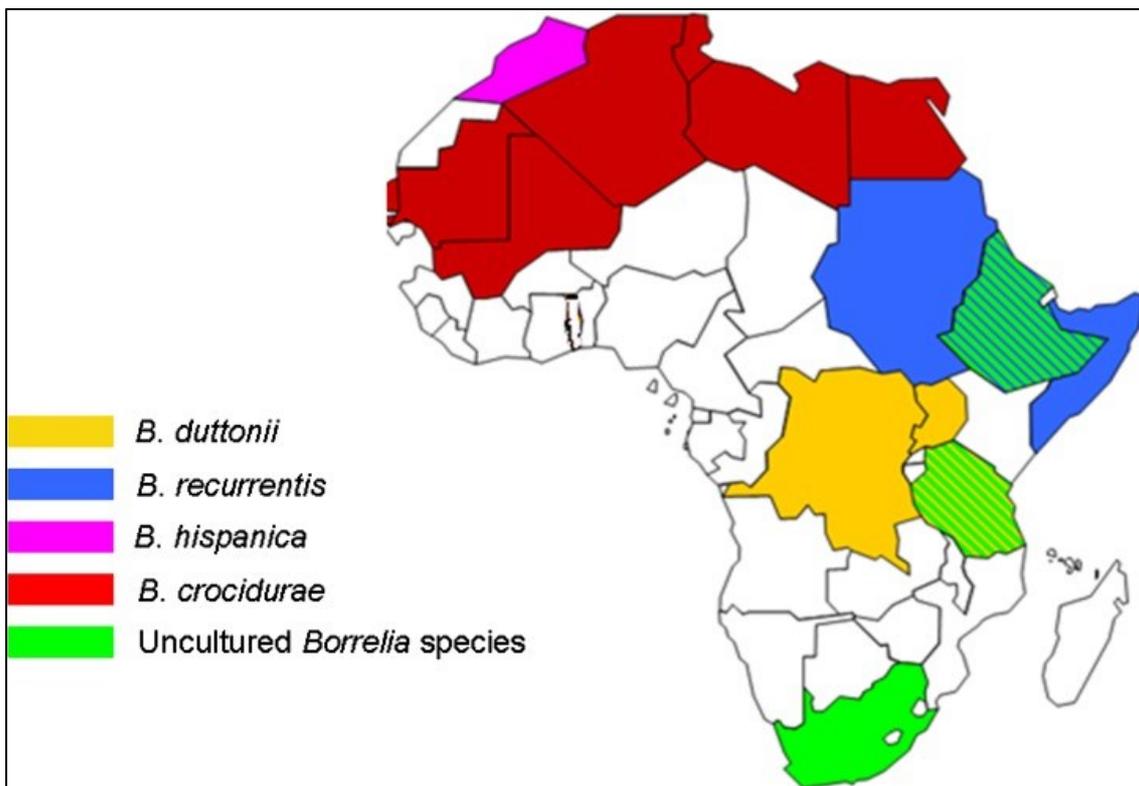


Abbildung 4: Geographische Verteilung afrikanischer Rückfallfieber-Borrelien

Die Verbreitung der einzelnen RF-Borrelienspezies ist farblich hervorgehoben (entnommen aus Elbir *et al.*, 2013²⁵).

1.2 Die klinische Entität Rückfallfieber

1.2.1 Historie und Epidemiologie

Erste ärztliche Beschreibungen einer Krankheit, die dem RF entspricht, stammen aus dem alten Ägypten sowie aus dem antiken Griechenland zu Zeiten von Hippokrates.⁴⁴⁻⁴⁹

Den Namen „Rückfallfieber“ erhielt das Krankheitsbild erst im Anschluss an einen Ausbruch im schottischen Edinburgh in den Jahren 1843 bis 1848 durch den Arzt David Craigie, der es klinisch von Typhus abgrenzte.⁵⁰ Die erstmalige Identifizierung des Erregers gelang 1873 durch Otto Obermeier an der Berliner Charité, der den gefärbten Blutausschrieb eines infizierten Patienten mikroskopierte.^{51,52} Erste Versuche, den Erreger durch die Infizierung von Tieren oder durch eine Selbstimpfung mit dem Blut von Infizierten zu übertragen, verliefen erfolglos. Münch und Mutschkoffsky führten 1874 und 1876 weitere Infektionsversuche mit dem Blut infizierter Patienten an sich selbst sowie an gesunden Probanden durch und konnten letztlich beweisen, dass das RF durch Spirochäten ausgelöst wurde, welche, in Andenken an den Erstentdecker Otto Obermeier, daraufhin die Bezeichnung *Spirochaeta obermeieri* bzw. *Treponema obermeieri* erhielten.³¹ J. Everett Dutton und John Todd gelang zu Beginn des 20. Jahrhunderts die Entdeckung des kausalen Zusammenhangs, dass RF auslösende Spirochäten durch Lederzecken der Gattung *O. moubata* übertragen werden. Zu Ehren J. E. Duttons erhielt der beobachtete Erreger die Bezeichnung *Borrelia duttonii*.⁵³ Anhand dieser Entdeckung wurde vermutet, dass auch Läuse zur Übertragung des Erregers des RF in der Lage sind, was 1907 der britische Arzt Frederick Percival Mackie sowie 1908 der französische Arzt Edmond Sergent und Henry Foley, welche in Algerien tätig waren, bestätigen konnten.^{25,54,55} Heute wird das Rückfallfieber in Zeckenrückfallfieber (ZRF) und Läuserückfallfieber (LRF) unterteilt.⁴³

Im Laufe der vergangenen Jahrhunderte sorgten immer wieder Kriege, Hungersnöte, Armut und Flucht dafür, dass viele Menschen unter prekären hygienischen Bedingungen auf engem Raum leben mussten. In der Folge kam es zu vermehrtem Lausbefall der Menschen und epidemischen Krankheitsausbrüchen,⁵⁶ wobei diese mit wiederkehrendem Fieber, Ikterus und Blutungen einhergingen. Diese Krankheitsbilder lassen sich mutmaßlich auf LRF zurückführen.⁴⁵ Neben größeren Epidemien im 17. und 18. Jahrhundert traten die letzten LRF-Epidemien im Rahmen der beiden Weltkriege von 1903 – 1936 mit 50 Millionen Fällen sowie 1943 – 1946 mit 10 Millionen Fällen auf.^{29,36,45,57} Aufgrund der Menge an Infizierten und seiner Krankheitsfolgen wurde das RF als „epidemischste unter den epidemischen Krankheiten“ bezeichnet.²⁹

Die Verbesserung hygienischer Standards sowie die Einführung des Insektizids Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT) in den 1940er Jahren führten zu einer massiven Reduktion des Lausbefalls und entsprechend auch zu einem massiven Rückgang des LRF.⁵⁸ In den letzten Jahrzehnten wird nur noch von einzelnen Ausbrüchen berichtet, wie 1985 in den peruanischen Anden.⁵⁹ Heute zählt das LRF zu den armutsassoziierten, vernachlässigten Infektionserkrankungen.³⁵

Dem weltweiten Rückgang an mit RF infizierten Patienten im 21. Jahrhundert steht die Situation in Ost-Afrika gegenüber, denn hier stellt die Erkrankung noch immer ein ernstes gesellschaftspolitisches Problem dar.³¹ Eine hohe perinatale Sterblichkeit wird in endemischen Regionen Tansanias durch das ZRF bedingt, welches hier auch unter den zehn häufigsten Todesursachen bei Kindern unter fünf Jahren aufgeführt wird.⁶⁰ Im Südsudan bzw. im Süden Sudans und in Äthiopien kommt hauptsächlich das LRF vor, welches in endemischen Gebieten häufig zu Hospitalisationen führt und mit einer erhöhten Morbiditäts- und Mortalitätsrate assoziiert ist.⁶¹ Laut den Angaben des äthiopischen Gesundheitsamtes stellt RF die siebthäufigste Ursache für einen stationären Krankenhausaufenthalt und die fünfthäufigste Todesursache dar.⁶² Personen, die unter schlechten hygienischen Bedingungen auf engem Raum miteinander leben, wie Gefängnisinsassen oder Erntearbeiter auf den Kaffeeplantagen während der Regenzeit, sind besonders bedroht, sich mit LRF zu infizieren.³⁵ Die zunehmende Globalisierung und die Zunahme an Tourismus und Geschäftsreisen in ostafrikanischen Ländern, aber auch die zunehmende Entwicklungshilfe in Krisengebieten, wie z. B. in Südsudan, kann dazu beitragen, dass mit *B. recurrentis* infizierte Läuse aus den endemischen Gebieten in Ost-Afrika wieder vermehrt in andere Regionen der Welt verbreitet werden.⁶³

Durch die Flüchtlingskrise 2015 wurde LRF bei 78, meist jungen und männlichen, Geflüchteten diagnostiziert, die in verschiedenen europäischen Staaten, meistens Italien und Deutschland, Zuflucht gesucht haben. Es ist davon auszugehen, dass die Dunkelziffer an Erkrankten höher lag.⁶⁴⁻⁶⁹ Es handelte sich hierbei um Asylsuchende aus Äthiopien, Eritrea, Somalia und anderen afrikanischen Staaten, die sich in überfüllten Unterkünften in Libyen, Italien oder einem anderen Land infiziert haben könnten.⁷⁰

LRF war vor 2015 in den meisten europäischen Staaten in Vergessenheit geraten; so auch in Deutschland, wo seit 1999 nur drei Fälle bei Reiserückkehrern gemeldet wurden.⁷¹ Dagegen wurden dem Robert Koch-Institut im Jahr 2015 45 Krankheitsfälle und ein Todesfall sowie im Jahr 2016 fünf Krankheitsfälle bei Asylsuchenden gemeldet.^{72,73}

Personen ohne festen Wohnsitz stellen eine weitere Gruppe dar, die durch eine erhöhte Prävalenz von Kleiderlausbefall potenziell gefährdet sind, sich mit LRF zu infizieren. Untersuchungen zur Häufigkeit des Kleiderlausbefalls ergaben in dieser Bevölkerungsgruppe einen Befall von 4 % in Boston,⁷⁴ von 16 % in Tokio⁷⁵ und von 30 % in San Francisco.⁷⁶ In Frankreich betrug die Prävalenz 12 – 22 %^{77,78}; in Brasilien, Kolumbien und Russland lag diese bei 18 – 40 %.^{23,79,80} Im Jahr 2005 konnten bei Personen ohne festen Wohnsitz in Marseille Anti-IgG-Antikörper gegen *B. recurrentis* nachgewiesen werden, was als Hinweis auf eine stattgehabte Infektion mit diesem Erreger gewertet wurde.⁷⁹

Die Möglichkeit, dass sich LRF durch humanitäre Katastrophen mit einhergehender Verschlechterung der hygienischen Standards wieder außerhalb der endemischen Gebiete, also auch innerhalb von Europa, verbreitet, ist jederzeit gegeben.⁶⁷

1.2.2 Klinik, Therapie und Prognose

Bei einer Infektion mit RF kann eine Vielzahl von Symptomen auftreten; das Leitsymptom stellen hierbei wiederkehrende, also „rekurrierende“ Fieberepisoden dar, die im Wechsel mit fieberfreien Phasen auftreten. Beim LRF treten bis zu fünf Fieberschübe mit Temperaturen bis zu 40 °C auf, während es beim ZRF zu bis zu 13 Fieberepisoden kommen kann, die über mehrere Monate verteilt auftreten.³¹ In den meisten Fällen (ca. 90 %) wird das Fieber von Zephalgien, Myalgien und Arthralgien begleitet,⁸¹ wobei es beim ZRF zusätzlich noch zu Emesis und Vomitus kommen kann.⁸² Das LRF hingegen ist häufiger mit Tachykardie (über 95 % der Patienten), Konjunktivitis (über 90 % der Fälle) und Hepatosplenomegalie (ca. 65 % der Patienten) assoziiert.²⁹ Thrombozytopenien und andere Blutungskomplikationen (s. Abbildung 5 a) werden

sowohl beim ZRF als auch beim LRF beschrieben, wobei sie beim LRF häufiger auftreten. Hierbei kann es zusätzlich noch zu Epistaxis, Hämoptysen, Hämatemesis, blutigen Diarrhöen, Hämaturie sowie zu subarachnoidalen, zerebralen oder retinalen Blutungen kommen (s. Abbildung 5 b und d).^{29,31,35,83,84} Bei Patienten, deren Infektion durch die Borrelienspezies *B. recurrentis*, *B. duttonii* oder *B. turicatae* ausgelöst wird, können zusätzlich neurologische Beschwerden, wie ein meningeales Syndrom oder Erkrankungen der Augen, auftreten.^{31,85} Auch werden Komplikationen in der Schwangerschaft bis hin zum Abort beobachtet.^{35,86} Ursächlich für das Versterben der Patienten ist häufig eine Myokarditis.⁸⁷



Abbildung 5: Klinische Manifestierungen einer LRF-Infektion bei einem äthiopischen Patienten

(a) Stammbetonte Petechien bei einer Koinfektion mit *Salmonella typhi*; (b) subkonjunktivale Einblutungen und Sklerenikterus, die auf eine Leberschädigung hinweisen; (c) Silberfärbung der Milzpulpa mit Nachweis von *B. recurrentis* (Pfeile); (d) Zerebrale Blutungen am 6. Krankheitstag (pathologisches Präparat) (entnommen aus Warrell, 2019³⁵).

Therapeutisch werden Einzeldosen von 500 mg Tetracyclin, 500 mg Erythromycin oder 100 mg Doxycyclin oral verabreicht.³⁵ Da es bei der oralen Gabe häufig zu Emesis

kommen kann, wird eine, ebenfalls einmalige, intravenöse Gabe von 250 mg Tetracyclinhydrochlorid oder 300 mg Erythromycin-Lactobionat empfohlen.^{88,89}

Während großer Epidemien in der Vergangenheit wurde die Letalität mit 30 – 70 % ohne Therapie berichtet, während die Letalität unter Therapie mit 2 – 6 % angegeben wird.^{29,90} Aktuell ist bei unbehandelten Patienten von einer Letalität von 10 – 40 % und bei Behandelten von unter 5 % auszugehen.⁹¹ Während eines Ausbruchs in Äthiopien 2016 betrug die Letalität 13 %.⁹²

1.2.3 Jarisch-Herxheimer-Reaktion als Komplikation

Bei der antibiotischen Behandlung des RF kann es zum Auftreten einer Jarisch-Herxheimer-Reaktion (JHR) kommen, welche durch die Lyse der im Blut zirkulierenden Bakterien und die Freisetzung von großen Mengen an pyrogenen Substanzen hervorgerufen wird.³⁵ Da bei einer Spirochätämie keine Endotoxine nachgewiesen werden konnten, ist davon auszugehen, dass die Lipoproteine an der Zelloberfläche der Borrelien für die Auslösung der JHR verantwortlich sind.^{93,94} Im Blutplasma kommt es durch die JHR zur vermehrten Freisetzung von Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α), Interleukin-6 und Interleukin-8.⁹⁵⁻⁹⁷ Durch die JHR kann es in den ersten Stunden nach Antibiotikagabe bei LRF-Patienten zu einer deutlichen Verschlechterung des Allgemeinzustandes kommen.

Bei LRF-Patienten tritt die JHR ca. 1 – 2 h nach der ersten Antibiotikagabe auf, wobei der Höhepunkt nach etwa 4 h erreicht wird und die Reaktion nach ungefähr 8 h wieder nachlässt.⁹⁸ Zu den häufigen Symptomen gehören hohes Fieber, Schüttelfrost, vermehrtes Schwitzen, Zephalgien, Myalgien, Tachykardie und Hypotension.^{99,100} Da diese Symptome auch im Rahmen der Infektion selbst auftreten können, besteht das Risiko, dass die JHR nicht erkannt wird und dementsprechend unbehandelt bleibt.⁹⁹ Außerdem können die Symptome als eine Unverträglichkeit des Antibiotikums fehlgedeutet werden. Eine JHR verläuft in 5 % der Fälle lebensbedrohlich, wobei die Schwere der LRF-Infektion eine große Rolle spielt.^{35,38,101,102} Besonders bei schwangeren Frauen mit LRF-Infektion steht die JHR im Verdacht, eine Frühgeburt mit vermindertem

Geburtsgewicht auszulösen, was häufig das Versterben des Säuglings zur Folge hat.¹⁰³⁻¹⁰⁵

Ansätze, die JHR durch eine präventive Steroidgabe,¹⁰⁶⁻¹⁰⁹ eine veränderte Applikation des Antibiotikums^{98,110} oder durch die Gabe eines Anti-TNF- α -Antikörpers⁹⁷ zu verhindern bzw. abzuschwächen, verliefen bislang erfolglos. Die beste Prognose für eine Besserung der Symptome nach wenigen Stunden besitzen aktuell supportive Maßnahmen und eine adäquate Hydrierung des Patienten.⁹⁹

1.2.4 Diagnostische Herausforderungen

Neben der Therapie gestaltet sich auch die Diagnose des RF schwierig, insbesondere durch die Überschneidungen der ähnlichen Krankheitssymptomatik mit anderen Infektionserkrankungen, wie z. B. Malaria, Typhus, Brucellose, Rickettsiose, Leptospirose oder einer bakteriellen Meningitis. Weiterhin treten auch häufig Koinfektionen mit Malaria- oder Typhus-verursachenden Erregern auf.^{38,111,112} Die Wright-Giemsa-Färbung eines mit Methanol fixierten dünnen Blutaussstrichs stellt hierbei die einfachste Nachweismethode dar, RF durch den mikroskopischen Nachweis von Borrelien mikrobiologisch zu diagnostizieren. Die Erregerkonzentration sollte jedoch mindestens 10^5 Zellen/ml Blut betragen, um Spirochäten nachzuweisen,¹¹³ die nur während der Fieberepisoden in hoher Konzentration vorliegen, nicht aber während der asymptomatischen, fieberfreien Phasen.¹¹⁴ Daher ist diese Nachweismethode nicht sensitiv genug.

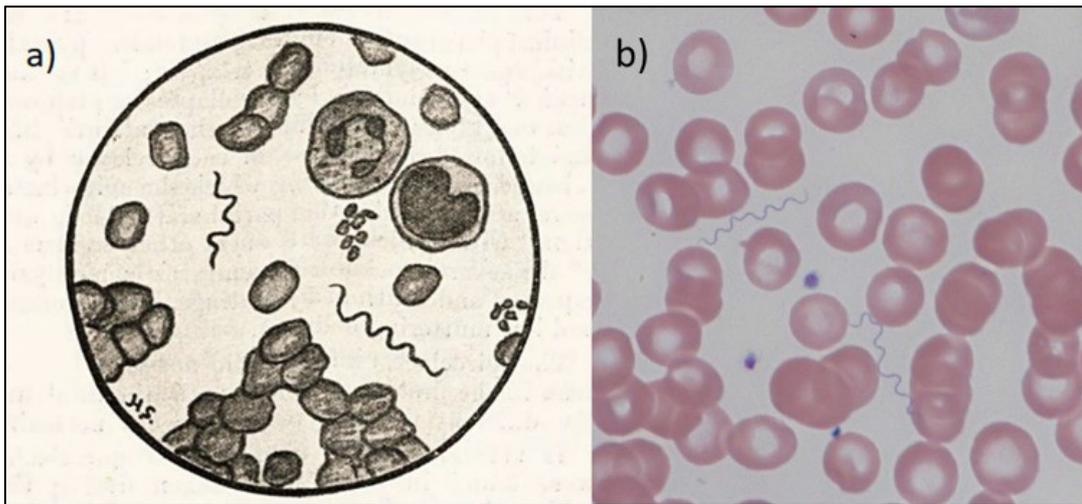


Abbildung 6: Mikroskopischer Nachweis von *B. recurrentis* in Blutausstrichen

a) Zeichnung von *B. recurrentis* in einem Blutausstrich eines an LRF erkrankten Patienten aus Jaipur, Indien (entnommen aus Stott, 1911¹¹⁵); b) Fotografie von *B. recurrentis* in einem dünnen, mit May-Grünwald-Giemsa gefärbten Blutausstrich (1000-fach vergrößert) eines 2015 an LRF erkrankten eritreischen Patienten in Basel, Schweiz (entnommen aus Kahlig *et al.*, 2021⁵⁶).

Mittels Multiplex Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (PCR) lassen sich mittlerweile *B. recurrentis*, *B. duttonii*, *B. crocidurae* und *B. hispanica* voneinander differenzieren,¹¹⁶ wobei jedoch eine Unterscheidung zwischen *B. duttonii* und *B. recurrentis* aufgrund ihrer hohen Sequenzidentität nicht möglich ist.^{21,26} Die PCR ist hierbei wesentlich sensitiver als die Mikroskopie, sodass bei LRF-Fällen in Europa sogar bei mikroskopisch negativem Befund eine Infektion mit *B. recurrentis* nachgewiesen werden konnte.^{69,117} Neue Forschungsansätze zielen auf einen serologischen Nachweis von *B. recurrentis*-Infektionen mit Hilfe von sensitiven und spezifischen immunologisch-basierten Testsystemen.¹¹⁸

Der Erreger *Candidatus* *Borrelia kalaharica* wurde vor Kurzem erstmalig in Zecken in Äthiopien nachgewiesen, was den ersten Nachweis von ZRF-übertragenden Erregern in einem für LRF endemischen Land bedeutet.¹¹⁹

1.2.5 Prophylaxe

Eine Impfung gegen *B. recurrentis* oder andere RF-Borrelien steht derzeit nicht zur Verfügung.³⁵ Die effektivste und sicherste Methode, um Infektionsketten zu unterbrechen, besteht daher in der Eliminierung der Läuse und der Verbesserung der hygienischen Standards. Patienten, die unter Lausbefall leiden, sollten sich regelmäßig

mit Seife baden und die infizierte Kleidung warm waschen (52 °C für 30 min).³⁵ Ohne Kontakt zum Menschen als Wirt und somit ohne Blutmahlzeit sterben die Läuse nach zehn Tagen bei jeder Temperatur ab.^{120,121}

1.3 Das Komplementsystem

Die menschliche Immunabwehr lässt sich in drei Hauptkomponenten untergliedern: 1. die physikalischen Barrieren des menschlichen Körpers, bspw. die Haut; 2. die unspezifische, angeborene Immunabwehr, die hier durch das Komplementsystem repräsentiert ist, und 3. das zelluläre und adaptive Immunsystem mit der spezifischen, erworbenen Immunabwehr mittels Antigen-spezifischer T- und B-Lymphozyten.¹²² Da in der vorliegenden Arbeit der Schwerpunkt auf der Interaktion zwischen bakteriellen Proteinen und dem Komplementsystem liegt, soll dieses kaskadenartige System im Folgenden näher betrachtet werden.

Als Teil des angeborenen Immunsystems dient das Komplementsystem als erste Abwehrlinie sowohl gegen invasive Mikroorganismen als auch gegen apoptotische und nekrotische humane Wirtszellen.¹²³ Im späten 19. Jahrhundert wurde es zunächst als „Alexin“ bezeichnet, als Mikrobiologen wie Paul Ehrlich, Jules Bordet oder George Nuttall den bakteriziden Effekt von Blut auf den Erreger *Bacillus anthracis* beobachteten.¹²⁴ Paul Ehrlich prägte 1899 den Begriff „Komplement“, da das entdeckte System von Proteinen im Blutserum die Antikörper-getriggerte Antwort des Immunsystems „komplementierte“. Die hitzestabile Substanz „Alexin“ wurde daraufhin in „Amboceptor“ umbenannt.¹²⁵

Inzwischen ist bekannt, dass das Komplementsystem aus über 50 Serumproteinen und Oberflächenrezeptoren besteht, die als membranständige Proteine auf verschiedenen Zellen lokalisiert sind oder aber im Blutkreislauf vorwiegend als aktivierbare Vorläufermoleküle löslich zirkulieren.¹²⁶ Zu den vielfältigen Aufgaben zählen extra- und intrazelluläre Funktionen, wie bspw. das Erkennen und Eliminieren invasiver Fremdorganismen¹²⁷ sowie die Markierung („Opsonisierung“) körpereigener nekrotischer und apoptotischer Zellen für die Phagozytose.^{128,129} Weiterhin besitzt das Komplementsystem eine entscheidende Funktion für die adaptive Immunabwehr¹³⁰ und

ist an diversen pathologischen Vorgängen, wie dem hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS), der Entstehung von Endometriose¹³¹ oder der altersbedingten Makuladegeneration (AMD),^{132,133} beteiligt, aber auch an Geweberegeneration¹³⁴, der Homöostase¹³⁵ oder, im dysregulierten Zustand, am Tumorwachstum.^{136,137} Neueste Erkenntnisse lassen vermuten, dass das Komplementsystem ebenso am Zellmetabolismus beteiligt ist.^{138,139}

Das Komplementsystem besteht aus drei unterschiedlichen, in Kaskaden von enzymatischen Reaktionen ablaufenden, aktivierbaren Wegen. Die Aktivierung führt zur Ausschüttung der Anaphylatoxine C3a und C5a, die eine elementare Rolle als Immunmodulatoren einnehmen, indem sie durch Opsonisierung Leukozyten anlocken („Chemotaxis“) und Phagozyten induzieren. Außerdem führen sie zur Entstehung der Komponenten C3b und C5b, wobei dem Molekül C3b eine zentrale Rolle zugeschrieben wird, da es durch die Abfolge jedes einzelnen der drei Komplementwege entsteht und an die Oberfläche von Zielzellen bindet, um diese zu markieren.¹⁴⁰ Die Aktivierung aller Wege mündet schlussendlich in den terminalen Weg, bei dem der Membranangriffskomplex (MAK) auf der Oberfläche der opsonisierten Zielzelle gebildet und die Lyse der Zelle eingeleitet wird. Diverse Moleküle sind in der Lage, die drei Komplementwege unabhängig voneinander zu initiieren. Inzwischen ist bekannt, dass das Komplementsystem netzwerkartig eng mit anderen Systemen, wie dem fibrinolytischen System, verknüpft ist.¹²³

1.3.1 Der klassische Weg des Komplementsystems

Über die Bindung von Immunglobulinen der Subklasse G (IgG) oder M (IgM) wird der klassische Weg des Komplementsystems initiiert, weshalb er auch als „abhängig von Antikörpern“ beschrieben wird (s. Abbildung 7). C1q, auch als „Pattern Recognition Molecule“ (PRM) bezeichnet, bindet an Immunglobuline sowie Pentraxine, die bereits mit mikrobiellen Oberflächenstrukturen oder bestimmten Antigenen interagieren. Zusammen mit den Komponenten und aktivierbaren Serinproteasen C1r und C1s kommt es zur Bildung des aktivierten C1-Komplexes,^{141,142} der C4 in C4a und C4b spaltet. Durch eine Konformationsänderung innerhalb des C4b-Moleküls wird ein Thioester freigesetzt,

wodurch C4b an der Aktivierungsstelle an die mikrobielle Oberfläche bindet. Dies führt zur Opsonisierung der Zielzelle. An C4b gebundenes C2 wird anschließend, mithilfe der C1s-Protease, in C2a und C2b gespalten. C4b und C2b bilden die C3-Konvertase, welche ihrerseits C3 in C3a und C3b spaltet. Das so entstandene C3b-Molekül kann entweder an die Oberfläche einer Zelle binden, um diese zu opsonisieren und so für die Phagozytose zu markieren, oder an die C3-Konvertase, so dass sich die C5-Konvertase des klassischen Weges (C4b2b3b) bildet. Die nachfolgende Spaltung von C5 in C5a und C5b führt zur Bindung von C5b an die Zelloberfläche, wodurch die terminale Sequenz eingeleitet wird und der MAK gebildet werden kann. C3a und C5a tragen in ihrer flüssigen Phase als Immunmodulatoren zu verschiedenen Entzündungsreaktionen bei.¹⁴³

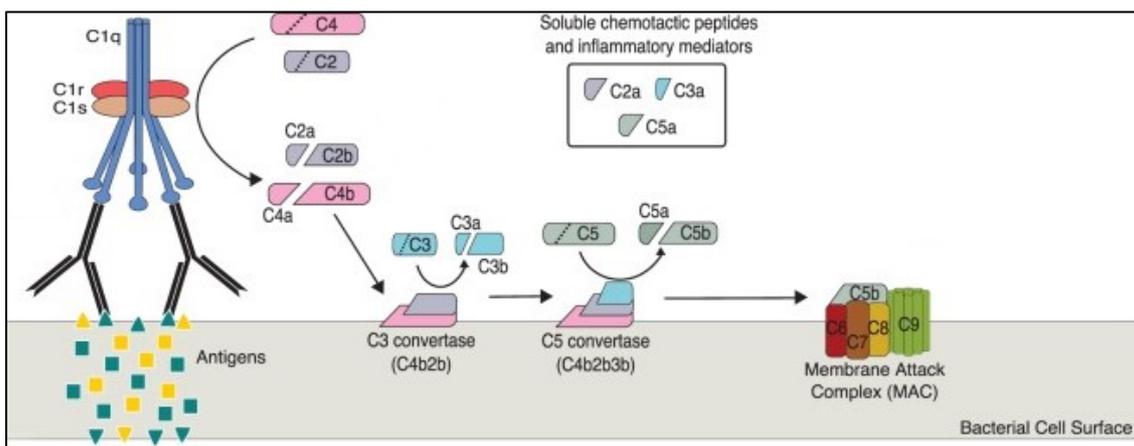


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Aktivierung des klassischen Weges auf einer bakteriellen Oberfläche

Der C1-Komplex besteht aus C1q, C1r und C1s und bindet an Antikörper, welche vorher an Antigene gebunden haben. Dadurch wird die Aktivierung des klassischen Weges initiiert. Anschließend kommt es zur Spaltung von C4 und C2, was die Formation der C3-Konvertase C4b2b auf der bakteriellen Oberfläche bedingt, welche ihrerseits C3 in C3a und C3b spaltet. Dadurch kommt es zur Entstehung der C5-Konvertase C4b2b3b sowie zur Spaltung von C5 in C5a und C5b. Durch die Anlagerung von C6, C7, C8 und C9 an das an die Oberfläche gebundene C5b-Molekül entsteht der MAK (entnommen aus Stone und Brissette, 2017¹⁴³; modifiziert).

1.3.2 Der Lektin-Weg des Komplementsystems

Die Aktivierung des Lektin-Weges erfolgt durch die Bindung der Kollektine Mannose-bindendes Lektin (MBL) sowie Ficolin an Kohlenhydrate, welche auf der Oberfläche von Pathogenen vorkommen. MBL und Ficolin liegen, zusammen mit MBL-assoziierten

Proteinen (MASP), gelöst im Serum vor.^{144,145} Zu den MASP zählen MASP-1, -2, -3 sowie MAP19, wobei es sich um ein verkürztes MASP-2 handelt.¹⁴⁴ Durch die Bindung des Lektin-Komplexes an mikrobielle Oberflächen wird eine Konformationsänderung von MASP-2 initiiert, welches seinerseits C4 in C4a und C4b spaltet (s. Abbildung 8). Das an der Oberfläche gebundene C4b führt wiederum zur Spaltung von C2, wodurch die Bildung der C3-Konvertase aus C4b und C2b resultiert. Die weiteren Aktivierungsschritte des Lektin-Weges entsprechen denen des klassischen Weges.¹⁴⁰ Die Funktion der übrigen MASPs ist Gegenstand aktueller Forschungsansätze.¹⁴⁵

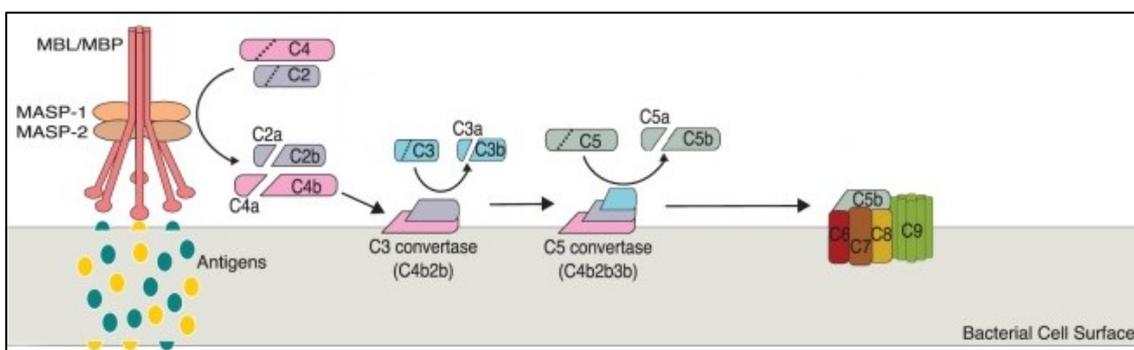


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Aktivierung des Lektin-Weges auf einer bakteriellen Oberfläche

Der Komplex aus MBL bzw. Ficolin und MASP-1 und MASP-2 bindet an pathogene Oberflächenstrukturen und initiiert so den Lektin-Weg. Es kommt zur Spaltung von C4 in C4a und C4b sowie von C2 in C2a und C2b, wodurch die C3-Konvertase C4b2b entsteht, die ihrerseits C3 in C3a und C3b spaltet. Durch die Bindung von C3b entsteht die C5-Konvertase C4b2b3b, die wiederum C5 in C5a und C5b spaltet. C5b kann sich nun mit C6, C7, C8 und C9 zum MAK zusammenlagern (entnommen aus Stone und Brissette, 2017¹⁴³; modifiziert).

1.3.3 Der alternative Weg des Komplementsystems

Der alternative Weg wird stets niedrigschwellig, aber konstitutiv aktiviert, wobei der dafür verantwortliche Prozess als „tick-over“ bezeichnet wird.¹⁴⁶ Durch fortwährende spontane Hydrolyse wird hierbei eine labile Thioesterverbindung innerhalb der Komplementkomponente C3 erzeugt (s. Abbildung 9) und resultiert in der bioaktiven Form C3(H₂O).¹⁴⁷ Durch diese strukturelle Veränderung wird eine Bindung von Faktor B (FB) ermöglicht, wobei die neu entstandene C3-Prokonvertase (C3bB) im Anschluss durch die Serinprotease Faktor D (FD) gespalten wird. Als Ergebnis dieser Spaltung entsteht dann die nicht membrangebundene C3-Konvertase C3(H₂O)Bb, welche nun C3 in C3a und C3b spaltet. Unter normalen Umständen findet dieser Prozess kontinuierlich

im Blut statt, sodass immer neues aktiviertes C3b entsteht, wodurch in Gegenwart von FB und FD neue lösliche C3-Konvertasen gebildet werden. Durch die Bindung von aktiviertem C3b und der nachfolgenden Bildung zur C3-Konvertase C3bBb wird dieser Enzymkomplex durch Properdin an der mikrobiellen Oberfläche stabilisiert. Die Anlagerung von C3b an die membrangebundene C3-Konvertase C3bBb führt zur Formierung der C5-Konvertase C3bBbC3b, welche wiederum C5 in C5a und C5b spaltet. Das entstandene C5b lagert sich mit C6, C7, C8 und C9 an der Zelloberfläche als MAK zusammen und initiiert so den terminalen Weg.¹⁴⁸

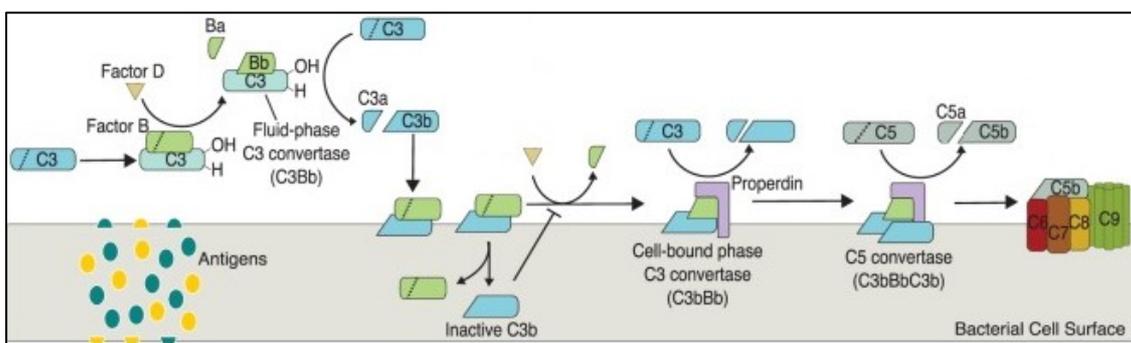


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Aktivierung des alternativen Weges auf einer bakteriellen Oberfläche

Durch die Hydrolyse von C3 und die anschließende Bindung von FB wird der alternative Weg initiiert. Es kommt zur Spaltung von FB durch FD sowie zur Bildung der Flüssigphase-C3-Konvertase C3(H₂O)Bb, welche ihrerseits C3 in C3a und C3b spaltet. C3b kann nun, zusammen mit FB und Properdin, an die Zelloberfläche binden und eine membrangebundene C3-Konvertase bilden. Diese führt wiederum zur Spaltung von weiteren C3-Molekülen, wobei C3b seinerseits an die C3-Konvertase binden und somit die C5-Konvertase C3bBb3b bilden kann, die C5 in C5a und C5b spaltet. C5b lagert sich, zusammen mit C6, C7, C8 und C9, an die Zelloberfläche und führt so zur Initiierung des terminalen Weges (entnommen aus Stone und Brissette, 2017¹⁴³; modifiziert).

1.3.4 Der terminale Weg des Komplementsystems

Die Aktivierung der drei Wege des Komplementsystems führt zur Bildung des porenförmigen MAK. Die terminale Sequenz wird durch die Bindung von C5b an die mikrobielle Oberfläche initiiert. Das an die Zelloberfläche gebundene C5b rekrutiert C6, wodurch sich ein hydrophiler Komplex bildet, dessen Konformation sich wiederum durch die Bindung von C7 verändert. Diese strukturelle Veränderung ermöglicht die Anlagerung von C8, so dass sich C8 in die Membran integriert. Letztlich binden 10 – 15 Moleküle von C9 an den vorher entstandenen C5b-8-Komplex, wodurch eine zylindrische Pore mit einer Größe von 10 Å entsteht. Sobald sich genügend Poren auf

der Zelloberfläche gebildet haben, kommt es durch die Diffusion von Ionen, kleinen Molekülen sowie von Wasser, welche entlang des Konzentrationsgradienten stattfindet, zu einem osmotischen Ungleichgewicht, welches letztlich zur Lyse der Bakterienzelle führt.^{124,149}

1.3.5 Regulatoren des Komplementsystems

Da das Komplementsystem nicht nur gegen pathogene und geschädigte humane Zellen zerstörend wirkt, sondern auch gegen vitale, körpereigene Zellen, ist eine balancierte Regulation des Komplementsystems notwendig. Eine Vielzahl von membrangebundenen und löslichen Regulatoren verhindert eine ungehinderte Aktivierung des Komplementsystems und wirkt einer massiven Zellschädigung entgegen.^{122,129}

C1-Esteraseinhibitor (C1-INH), der auch zu therapeutischen Zwecken verwendet wird, ist an der Regulation des klassischen Weges beteiligt.¹⁵⁰ Durch die Bindung an den C1-Komplex wird die proteolytische Aktivität von C1r und C1s gehemmt, wodurch diese Serinproteasen irreversibel deaktiviert werden. Weiterhin bindet er an MASP-1 und MASP-2, wodurch C1-INH auch inhibitorisch auf den Lektin-Weg wirkt.¹⁵¹⁻¹⁵³

Faktor I (FI) stellt einen weiteren Komplementregulator dar. Er katalysiert die Spaltung der α -Kette von C3b und C4b, was wiederum zur irreversiblen Inaktivierung dieser beiden Komplementkomponenten führt. FI benötigt hierfür die löslichen Kofaktoren Faktor H (FH),¹⁵⁴ „Factor H-like protein 1“ (FHL-1)^{155,156} sowie „C4b-binding protein“ (C4BP)¹⁵⁷ oder aber die membrangebundenen Proteine CD35 oder CD46. Die Bildung der C3-Konvertase wird hierbei durch FH und FHL-1 verhindert, indem beide Moleküle mit Faktor Bb um dessen Bindungsstelle konkurrieren. Außerdem tragen sie zur Dissoziation bereits gebildeter C3-Konvertasen bei, indem sie als Kofaktoren für FI bei der proteolytischen Spaltung von C3b fungieren.¹²³ C4BP gehört, als Kofaktor von FI, zu den Regulatoren des klassischen Weges. C4BP interagiert als Komplex mit bis zu vier C4b-Molekülen und initiiert, zusammen mit FI, deren Proteolyse und Inaktivierung.^{158,159} Die drei Kofaktoren FH, FHL-1 sowie C4BP binden auch an wirtsspezifische Oberflächenstrukturen, um eine Schädigung von körpereigenen Zellen zu verhindern.¹²³

Weiterhin sind noch Serumprotein S (Vitronektin) und Clusterin als Regulatoren des Komplementsystems zu nennen. Sie tragen zur Blockierung der MAK-Formation bei, indem sie an die lipophile Gruppe von C7 binden, wodurch der C5b-9-Komplex nicht mehr in der Zellmembran verankert werden kann.^{124,160,161}

1.4 Immunevasions-Strategien von Rückfallfieber-Borrelien

Im Falle einer Infektion bildet das adaptive Immunsystem bereits vor dem Auftreten des ersten Fieberschubs Anti-IgM-Antikörper, wodurch der klassische Weg des Komplementsystems aktiviert und die Erregerlast bereits stark reduziert wird. Eine Subpopulation von Spirochäten überlebt jedoch durch die Veränderung der Komposition der auf der Zelloberfläche exponierten Antigene (Vmp, s. weiter unten). Diese Subpopulation kann sich nun weiter vermehren, was einen erneuten Fieberschub zur Folge hat und den Namen „Rückfallfieber“ erklärt.^{162,163}

Die Antigene, die den jeweiligen Serotyp determinieren, werden als „variable membrane proteins“ (Vmp) bezeichnet¹⁶⁴ und lassen sich in zwei Klassen einteilen: die „variable small proteins“ (Vsp) mit einer molekularen Masse von etwa 20 kDa und die „variable large proteins“ (Vlp) mit einer molaren Masse von etwa 40 kDa.¹⁶⁵ *B. recurrentis* ist theoretisch in der Lage, 27 verschiedene Vmp zu produzieren.²¹ Die Gene, welche für Vsp und Vlp kodieren, werden während des Infektionsgeschehens neu arrangiert, wobei pro Zelle nur ein Vmp-kodierendes Gen aktiv exprimiert wird.¹⁶⁶ Die Vmp-kodierenden Gene sind auf linearen Plasmiden lokalisiert; die übrigen *vmp*-Gene befinden sich kassettenartig auf anderen Plasmiden und werden als „stille Gene“ nicht exprimiert.¹⁶⁷ Das aktive, exprimierte Gen kann hierbei durch eines der stillen Gene ausgetauscht werden, wodurch ein neuer Serotyp entsteht.^{38,168} Diese Subpopulation ist anfangs nur in geringer Konzentration vorhanden. Das adaptive Immunsystem führt zur Reduktion und Elimination des bisher vorherrschenden Serotyps, so dass der neu entstandene Serotyp sich durchsetzen kann (s. Abbildung 10).

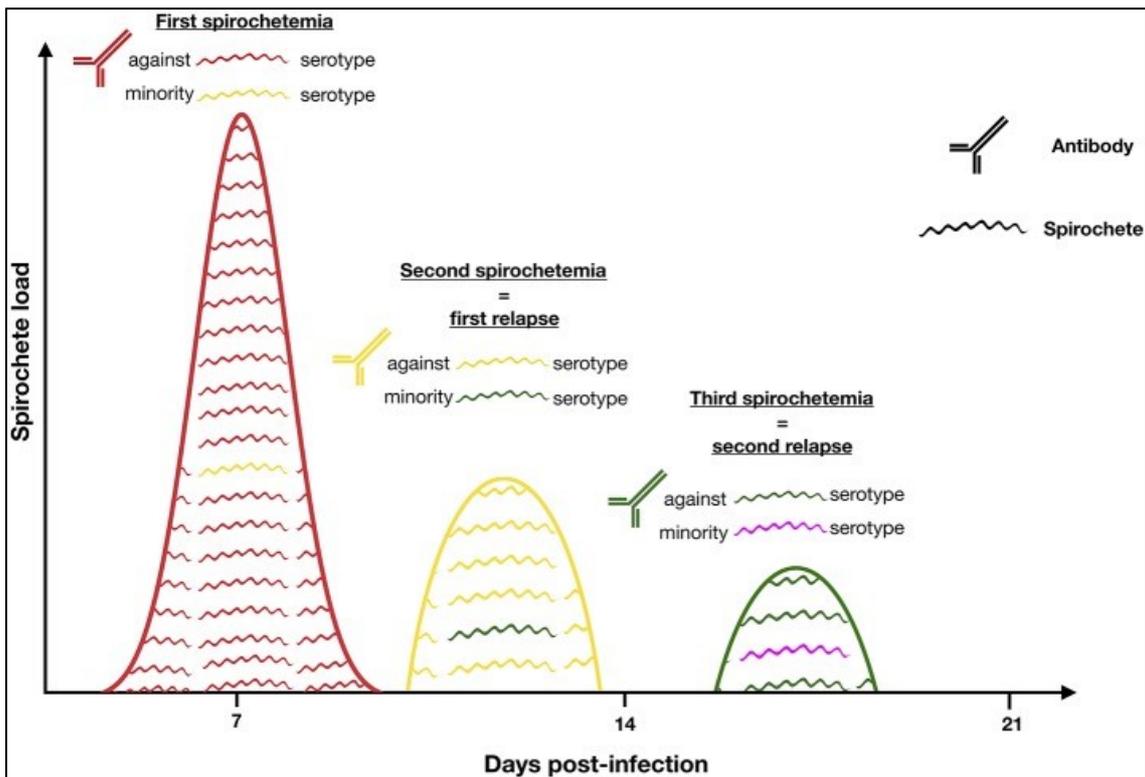


Abbildung 10: Charakteristischer Verlauf wiederholter Spirochätämien nach einer Infektion mit RF-Borrelien

Abgebildet sind drei Spirochätenpopulationen, welche durch das adaptive Immunsystem (dargestellt als Antikörper) fortschreitend eliminiert werden. Auf der X-Achse sind die postinfektiösen Tage und auf der Y-Achse die Bakterienlast im Blut aufgetragen. Derjenige Serotyp, der in der vorherigen Population nur in geringer Konzentration vorhanden war (dargestellt in einer anderen Farbe als die restliche Population), kann sich durchsetzen. Die ansteigende Bakterienkonzentration führt zum erneuten Fieberanstieg. Dieser Vorgang wiederholt sich, bis der Wirt stirbt oder die Bakterien aus dem Blut eradiziert werden (entnommen aus Talagrand-Reboul *et al.*, 2018¹⁵).

Verschiedene Mechanismen, die zur antigenen Variation der *vsp*- und *vlp*-Gene führen, werden aktuell diskutiert. Hierzu gehören z. B. die homologe DNA-Rekombination sowie Mutationen innerhalb des Promotorbereiches, die zu unterschiedlichen Transkriptionslevels führen können.^{166,169-172} Die nicht-reziproke unidirektionale Rekombination, bei der ein Austausch zwischen dem exprimierten Gen auf dem linearen „Expressionsplasmid“ und dem nicht-exprimierten Gen auf dem „stillen Plasmid“ stattfindet, scheint der Hauptmechanismus zu sein.³⁸ Eine weitere Möglichkeit stellt hierbei die intramolekulare Gen-Rekombination dar, wobei eine Deletion der kurzen Wiederholungen der 5'-Enden beider Gene eine Deletion des bisher aktiven Gens zur Folge hat. Es folgt die Expression des nachfolgenden *vmp*-Gens. Bedingung ist hierbei,

dass das exprimierte und das nicht-exprimierte Gen in derselben Orientierung vorliegen.^{38,173}

Zusätzlich zum bereits beschriebenen Mechanismus der Gen-Rekombination können Borrelien Plasminogen an ihrer Zelloberfläche binden, wodurch sie in der Lage sind, in extravaskuläres Gewebe zu penetrieren und sich dort vor dem Immunsystem zu schützen.¹⁷⁴ Dies könnte erklären, wie RF-Borrelien die Blut-Hirn-Schranke überwinden und in das zentrale Nervensystem eindringen können.^{175,176}

Weiterhin ist es möglich, dass sich RF-Borrelien vor dem angeborenen Immunsystem schützen, indem Komplementkomponenten an die äußere Membran binden, so dass eine Komplementaktivierung auf unterschiedlichen Aktivierungsstufen unterbunden wird.¹⁷⁷ Dieser Mechanismus basiert auf der Bindung von verschiedenen Komplementregulatoren, wie z. B. C1-INH, C4BP, FH oder FHL-1.¹⁷⁷ Für *B. recurrentis* und *B. duttoni* wurde bereits nachgewiesen, dass sowohl FH und FHL-1 als auch C4BP auf der Zelloberfläche gebunden werden, wodurch sowohl der alternative als auch der klassische Weg des Komplementsystems inaktiviert werden können.¹⁷⁸ Bei *B. recurrentis* konnten bereits zwei membranständige Lipoproteine identifiziert und in Bezug auf ihre Komplement-bindenden Eigenschaften näher beschrieben werden: HcpA („Human Complement regulator and Plasminogen binding protein A“) sowie CihC („Complement Inhibition via C4BP“). Im Falle von HcpA kommt es zu einer Bindung von FH, CFHR-1 („Complement Factor H-related protein 1“) sowie Plasminogen, während CihC sowohl mit C4BP als auch mit C1-INH interagiert.^{151,179} Durch diese Proteine ist *B. recurrentis* in der Lage, alle drei Komplementwege auf verschiedenen Aktivierungsstufen zu inhibieren.

1.5 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit

B. recurrentis weist auf dem linearen Plasmid Ip190 am 5'-Ende zwölf Gene auf, welche als „Open ReadinG Frames“ (*orf*) bezeichnet wurden.^{19,21} Diese sind in Abbildung 11 schematisch dargestellt.

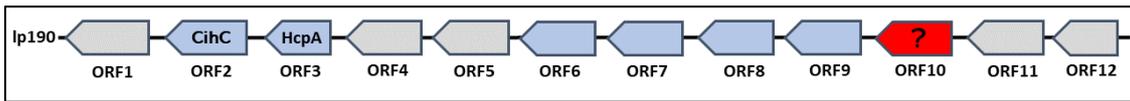


Abbildung 11: Ausschnitt der Organisation der ORF-kodierenden Gene auf dem linearen Plasmid Ip190 von *B. recurrentis*

Schematisch dargestellt ist das 5'-Ende des linearen Plasmids Ip190 mit dem Gencluster der zwölf *orf*-Gene sowie deren Genprodukten, die potenziell mit Komplementkomponenten interagieren können. Die bereits charakterisierten ORF-Proteine CihC (ORF2), HcpA (ORF3), ORF6, ORF7, ORF8 sowie ORF9 sind in Hellblau hinterlegt. Die Funktion der übrigen, in Grau hinterlegten ORF-Proteine ist bisher unklar. Das in dieser Arbeit charakterisierte Protein ORF10 ist in Rot hinterlegt.

Die entsprechenden ORF-Proteine weisen potenziell eine Interaktion sowohl mit Plasminogen als auch mit Komplementkomponenten auf, wobei zwei Proteine, CihC und HcpA, bereits hinsichtlich ihres Komplement-inhibierenden Potenzials charakterisiert wurden.^{151,179} Für die Proteine ORF6, ORF7, ORF8 und ORF9 von *B. recurrentis* konnte eine Inhibition des alternativen Weges des Komplementsystems nachgewiesen werden.¹⁸⁰ Alle vier Proteine besitzen die Eigenschaft, die Komplementkomponente C3b zu binden,¹⁸⁰ wobei ORF7, ORF8 und ORF9 zusätzlich in der Lage sind, C5 zu binden.⁹ Weiterhin können diese drei ORF-Proteine durch die Interaktion mit der Komplementkomponente C9 den terminalen Weg inhibieren.¹⁸⁰

Im Rahmen dieser Arbeit soll das ORF10-Protein in Hinblick auf seine inhibierenden Eigenschaften auf das humane Komplementsystem näher charakterisiert werden. Nach affinitätschromatographischer Reinigung sollen funktionelle Analysen erlauben, Aussagen über die inhibitorischen Eigenschaften von ORF10 auf die unterschiedlichen Wege des Komplementsystems zu treffen. Anhand der gewonnenen Ergebnisse sollen Interaktionsanalysen mit ausgewählten Komplementkomponenten durchgeführt werden. Durch Verwendung von Zell-basierten hämolytischen Assays soll die Interaktion von ORF10 mit dem terminalen Weg des Komplementsystems untersucht werden. Weitere Arbeiten beinhalten die Lokalisation der mit Komplement-interagierenden Regionen innerhalb des Proteins mit Hilfe von ORF10-Varianten, die durch *In-vitro*-Mutagenese erzeugt werden sollen. Mithilfe von Serumbakterizidietests soll außerdem analysiert werden, inwieweit ORF10 Borrelien Resistenz gegenüber der bakteriolytischen Wirkung von Komplement verleiht.

2 Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme

2.1.1 Borrelienstämme

Tabelle 1: Verwendete Borrelienstämme

Borrelienstamm	Genospezies	Geographische Herkunft	Biologische Herkunft	Referenz
PAbJ	<i>B. recurrentis</i>	München	Blut	Prof. Volker Fingerle, Nationales Referenzzentrum für Borrelien, Oberschleißheim ⁶⁹
G1	<i>B. garinii</i>	Deutschland	Liquor	Kraiczy <i>et al.</i> , 2000 ¹⁸¹
G1/pORF10	<i>B. garinii</i>			Diese Arbeit
G1/pKFSS1	<i>B. garinii</i>			Zur Verfügung gestellt, Prof. Peter Kraiczy

2.1.2 Escherichia coli-Stämme

Tabelle 2: Verwendete *Escherichia (E.) coli*-Stämme zur Transformation

Stamm	Genotyp	Hersteller	Artikelnummer
BL21 (DE3)	<i>fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHI ΔEcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5</i>	New England Biolabs	C2527H
M15	<i>F-, Φ80ΔlacM15, thi, lac-, mtl-, recA+, KmR</i>	Qiagen	

Stamm	Genotyp	Hersteller	Artikelnummer
NEB® 5- <i>alpha</i>	<i>fhuA2Δ(argF-lacZ)U169 phoA</i> <i>glnV44 φ80Δ(lacZ)M15 gyrA96</i> <i>recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	New England Biolabs	C2987H

2.2 Starteroligonukleotide und Basisvektoren

2.2.1 Starteroligonukleotide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Starteroligonukleotide sind in Tabelle 3 aufgelistet; sie wurden jeweils durch die Firma Merck synthetisiert. Die für die *In-vitro*-Mutagenese von ORF10 eingesetzten Starteroligonukleotide wurden mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) gereinigt.

Tabelle 3: Bezeichnungen und Nukleotidsequenz der verwendeten Oligonukleotide

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' → 3')	Verwendungszweck
<i>In-vitro</i> -Mutagenese von ORF10		
ORF9_C-term_FP	GAGATCTTGACTAGGGCTAATTAG GAGATTAATG	Amplifikation von ORF10 mit Promotorsequenz
ORF11_N-term_RP	GATCACAAGCTATTAGTAGTCG ACTTATCAACAC	
ORF10_Bam	GCTAATAGCTTGTGGTCAAAC GGAGAAATTCCTG	Klonierung von ORF10 in pQE-30 Xa
ORF10_Sal	TAAATTATAGTCGACATTAATCTA TTACTCGATCCC	
ORF10-C156S FP	GTCTTTAAAAAATAATGAGGTC TGCTACAGCTTACTACTATATAG	Überexpression von ORF10_C156S
ORF10-C156S RP	CATCTATATAGTAAGCTGTAGCA GACCTCATTATTTTTTAAAG	

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' → 3')	Verwendungszweck
ORF10-C227S FP	GAAAATTCACTCTGGATCTGATA ATATCTTAAGTTTATC	Überexpression von ORF10_C227S
ORF10-C227S RP	CAGAAGATAAACTTAAGATATTA TCAGATCCAGAGTG	
ORF10-L220-EcoRV FP	GCGCTAGTAGATATCAAGAAAA TTCACTCTGGATG	Überexpression von ORF10_L220-D203
ORF10-D203-EcoRV RP	CAGGTGTGATATCATTTTTCAAT TTCATTTTTGCC	
ORF10-I220L FP	GAAATTGAAAAATGATCTCAAGA AAATTCACTCTG	Überexpression von ORF10_I220L
ORF10-I220L RP	CATCCAGAGTGAATTTTCTTGAGA TCATTTTTCAATTC	
Sequenzierung von pQE-Vektoren		
pQE-FP30	CTGAGGTCATTAAGGATCTATC	Sequenzierung der pQE-Vektoren
pQE-RP	TTTGCTTTGTGAGCGGATAAC	

2.2.2 Vektoren

Für die Klonierung von Borrelienprotein-kodierenden Genen und die anschließende Transformation in den Serum-sensiblen *B. garinii*-Stamm G1 wurde der Shuttle-Vektor pKFSS1 (s. Tabelle 4) mit einer Größe von 6,1 kbp verwendet.¹⁸² Die hierbei erzeugte Streptomycin-Resistenz kam als Selektionsmarker zum Einsatz.

Der Expressionvektor pQE-30 Xa (s. Tabelle 4) mit einer Größe von 3,5 kbp wurde verwendet, um Fusionsproteine mit einem N-terminalen Hexahistidinpeptid zu in *E. coli*-Zellen zu produzieren. Als Selektionsmarker diente hierbei die auf dem Plasmid kodierte Ampicillin-Resistenzkassette.

Tabelle 4: Verwendete Vektoren

Bezeichnung	Eigenschaften	Hersteller bzw. Referenz
pKFSS1	6,1 kbp; Streptomycin-Resistenz	Frank <i>et al.</i> , 2003 ¹⁸²
pQE-30 Xa	3,5 kbp; Ampicillin-Resistenz	Qiagen, Art.-Nr.: 33203
pQE-ORF10		Prof. R. Wallich (<i>emer.</i>), Institut für Immunologie, Universität Heidelberg

2.3 Antikörper

Tabelle 5: Verwendete primäre Antikörper

Bezeichnung	Antigen	Eigenschaft	Hersteller	Artikelnummer
Anti-His ₆	Hexahistidin	Monoklonal	Qiagen	70796
Anti-C1q	Humanes C1q	Polyklonal	Quidel	A301
Anti-C2	Humanes C2	Polyklonal	Quidel	A303
Anti-C3	Humanes C3	Polyklonal	Calbiochem	204869
Anti-C4	Humanes C4	Polyklonal	Quidel	A305
Anti-C5	Humanes C5	Polyklonal	Complement Technology	A220
Anti-C5b-9	MAK	Monoklonal	Quidel	A239
Anti-FB	Humaner FB	Polyklonal	Quidel	A311
Anti-FH	Humaner FH	Polyklonal	Calbiochem	341274
Anti-FI	Humaner FI	Polyklonal	Quidel	A313

Tabelle 6: Verwendete sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Ursprung	Eigenschaft	Hersteller	Artikelnummer
Anti-Maus-IgG-HRP	Kaninchen	Polyklonal	DAKO Cytomation	P0260
Anti-Ziege-IgG-HRP	Kaninchen	Polyklonal	DAKO Cytomation	P0449

2.4 Proteine

Tabelle 7: Verwendete Restriktionsendonukleasen

Bezeichnung	Schnittstelle 5' → 3'	Hersteller	Artikelnummer
<i>Bam</i> HI	GGATCC	New England Biolabs	R3136
<i>Dpn</i> I	G[A-CH ₃]TC	New England Biolabs	R0176
<i>Eco</i> RI	GAATTC	New England Biolabs	R3101
<i>Eco</i> RV	GATATC	New England Biolabs	R0195
<i>Sal</i> I	GTCGAC	New England Biolabs	R3138

Tabelle 8: Verwendete Komplementkomponenten

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
Faktor B	Complement Technology	A135
Faktor H	Complement Technology	A137
Faktor I	Complement Technology	A138
Komplement C1q	Complement Technology	A099
Komplement C1r	Complement Technology	A102
Komplement C1s	Complement Technology	A104
Komplement C2	Complement Technology	A112
Komplement C3	Complement Technology	A113
Komplement C3b	Complement Technology	A114
Komplement C4	Complement Technology	A105

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
Komplement C4b	Complement Technology	A108
Komplement C5	Complement Technology	A120
Komplement C5b-6	Complement Technology	A122
Komplement C7	Complement Technology	A124
Komplement C8	Complement Technology	A125
Komplement C9	Complement Technology	A126

Tabelle 9: Gereinigte Borrelienproteine

Bezeichnung	Referenz
BBK32 ₂₀₅ aus <i>B. burgdorferi</i> B31	Zur Verfügung gestellt, Prof. Peter Kraiczky
BGA66 aus <i>B. bavariensis</i> PBi	Hammerschmidt <i>et al.</i> , 2016 ¹⁸³
CbiA aus <i>B. miyamotoi</i> HT31	Röttgerding <i>et al.</i> , 2017 ¹⁸⁴
CipA aus <i>A. baumannii</i> 19606	Ries <i>et al.</i> , 2022 ¹⁸⁵
CspA aus <i>B. burgdorferi</i> B31	Hammerschmidt <i>et al.</i> , 2014 ¹⁸⁶
Vsp1 aus <i>B. miyamotoi</i> LB-2001	Wagemakers <i>et al.</i> , 2016 ¹⁸⁷
ORF6 aus <i>B. recurrentis</i> PAbJ	Röttgerding F, 2018 ¹⁸⁰
ORF7 aus <i>B. recurrentis</i> PAbJ	Röttgerding F, 2018 ¹⁸⁰
ORF10 aus <i>B. recurrentis</i> PAbJ	Diese Arbeit

Tabelle 10: Sonstige verwendete Proteine

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich	A7030
HiFi-DNA-Polymerase	PCR Biosystems	PB10.41
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs	M0202
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Invitrogen	10342053
VeriFi™-DNA-Polymerase	PCR Biosystems	PB10.42
Vitronektin	Merck	CC080

2.5 Blutprodukte

2.5.1 Humanserum

Zur Gewinnung von normalem Humanserum (NHS) wurden freiwillige Spender zu Beginn der Blutentnahme über die Risiken und die Verwendung aufgeklärt. Eine schriftliche Einverständniserklärung wurde eingeholt. Die Entnahme des venösen Spenderblutes erfolgte mittels S-Monovetten (Sarstedt). Die Serumproben wurden anschließend auf Eis gelagert, bevor diese für 20 min bei $2000 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert wurden. Dann wurden die Spenderseren mittels eines ELISA (Enzygnost Borreliosis VlsE/IgG, Siemens; Enzygnost Borreliosis IgM, Siemens) sowie eines Immunoblots (recomLine *Borrelia* IgG, Mikrogen; recomLine *Borrelia* IgM, Mikrogen) auf Anti-Borrelien-Antikörper getestet, um sicherzustellen, dass keine artifiziellen Ergebnisse durch Vorhandensein von Anti-Borrelien-Antikörpern bei den durchzuführenden Serumbakterizidietests auftreten. Die negativ getesteten Seren wurden anschließend vereint, zu je $500 \mu\text{l}$ oder $1000 \mu\text{l}$ aliquotiert und bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Die Ethikkommission des Universitätsklinikums Frankfurt hat das Studiendesign sowie die Probandeninformation geprüft, woraufhin keine Bedenken zur Durchführung der Studie geäußert wurden (Geschäftsnummer 160/10).

Da die einzelnen Seren nicht mit Personendaten versehen wurden, ist eine Zurückführung auf die einzelnen Spender nicht gegeben.

2.5.2 Schaferythrozyten für hämolytische Assays

Die Schaferythrozyten für die hämolytischen Assays (s. Kapitel 2.14.1) wurden freundlicherweise von Prof. Michael Kirschfink (*emer.*), Institut für Immunologie der Universität Heidelberg, in Alsever'scher Lösung zur Verfügung gestellt.

2.6 Reagenzienpackungen

Tabelle 11: Verwendete Reagenzienpackungen

Bezeichnung	Verwendungszweck	Hersteller	Artikelnummer
MinElute Reaction Cleanup Kit	Reinigung von Restriktionsansätzen	Qiagen	28206
Monarch® Plasmid Miniprep Kit	Isolierung von Plasmid-DNA	New England Biolabs	T1010
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	Thermo Fisher Scientific	23227
PureYield Plasmid Midiprep System	Isolierung von Plasmid-DNA	Promega	A2495
TOPO TA Cloning® Kit	Klonieren von DNA in den pCR_2.1-TOPO®-Vektor	Thermo Fisher Scientific	K450641
Reversible Protein Detection Kit	Western-Blot-Analysen	Sigma-Aldrich	RPROB-1KT
QIAquick PCR Purification Kit	Aufreinigung von PCR-Amplifikaten	Qiagen	28106

2.7 Größenstandards

Die für die Agarose- und Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendeten Größenstandards sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Tabelle 12: Verwendete Protein- und DNA-Größenstandards

Bezeichnung	Verwendungszweck	Hersteller	Artikelnummer
100 bp DNA Ladder	Agarose-Gelelektrophorese	New England Biolabs	N3231
1 kbp DNA Ladder	Agarose-Gelelektrophorese	New England Biolabs	N3232

Bezeichnung	Verwendungszweck	Hersteller	Artikelnummer
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	SDS-PAGE für Western-Blot-Analysen	Bio-Rad	1610374
Precision Plus Protein™ Unstained Standards	SDS-PAGE für die Visualisierung von Proteinen mit Silbernitrat	Bio-Rad	1610363

2.8 Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien

2.8.1 Chemikalien

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Herstellung aller Lösungen verschiedene Chemikalien verwendet, die in Tabelle 13 aufgeführt sind. Alle Chemikalien wurden im höchsten Reinheitsgrad der jeweiligen Hersteller verwendet.

Tabelle 13: Chemikalien

Substanz	Hersteller	Artikelnummer
2 × YT-Medium	Carl Roth	6676.2
6-Aminocapronsäure	Alfa Aesar	A14719
β-Mercaptoethanol	AppliChem	A1108
A		
Acrylamid 2K	AppliChem	A1089
Agarose	Carl Roth	3810.3
APS	Carl Roth	9592.2
Ampicillin	Sigma-Aldrich	A9518
Aqua ad iniectabilia	Braun AG	02138599
B		
Bisacrylamid 2K	AppliChem	A1096

Substanz	Hersteller	Artikelnummer
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich	B5525
E		
EDTA	Sigma-Aldrich	E5134
EGTA	AppliChem	A0878
Essigsäure	Sigma-Aldrich	33209
Ethanol absolut (≥ 99,8 % Lösung)	Sigma-Aldrich	24102
F		
Formaldehyd (36,5 % Lösung)	Riedel-De-Haën	33220
G		
Gelatine, gepulvert	AppliChem	A1693
Glutaraldehyd (25 % Lösung)	Sigma-Aldrich	G6257
Glycerin	VWR Chemicals	24388.295
Glycin	LaboChem	LC-4522.2
Glycerol (99,5 %)	Sigma-Aldrich	49770
Glyoxal (40 % Lösung)	Sigma-Aldrich	128465
H		
HEPES	Sigma-Aldrich	H3375
I		
Imidazol	Sigma-Aldrich	56749
IPTG	Carl Roth	2316.3
K		
Kaliumchlorid	AppliChem	A2939
Kaliumdihydrogenphosphat	AppliChem	A3095
L		
Lysozym	Sigma-Aldrich	L6876
M		
Magermilchpulver	Heirler	

Substanz	Hersteller	Artikelnummer
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck	1.05883
N		
Natriumacetat	Carl Roth	6773.1
Natriumazid	Sigma-Aldrich	S8032
Natriumcarbonat	Carl Roth	8563.1
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich	31434
Natriumdihydrogenphosphat	AppliChem	A3559
Natriumdodecylsulfat	Carl Roth	CN30.3
Natriumhydrogencarbonat	AppliChem	A3590
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	AppliChem	A1883
S		
Salzsäure (> 37 % Lösung)	Sigma-Aldrich	30721
Salzsäure (1 M Lösung)	J. T. Baker	7088
Salzsäure (2 M Lösung)	AppliChem	182108.1211
Schwefelsäure (10 %)	AppliChem	A1446
SDS (Pellets)	Carl Roth	CN30.3
Silberrnitrat	Sigma-Aldrich	31630
Streptomycin	Sigma-Aldrich	S6501
T		
TEMED	Carl Roth	2367.3
Tricin	Carl Roth	6977.3
Tris	Sigma-Aldrich	T1503
Triton X-100	AppliChem	A1388
Tween20	Carl Roth	9127.1
W		
Wasserstoffperoxid (30 % Lösung)	Carl Roth	8070.2

2.8.2 Spezielle Materialien, Proteine, Substanzen und Puffer

Tabelle 14: Übersicht der verwendeten speziellen Materialien, Substanzen und fertigen Puffer

Bezeichnung	Verwendungszweck	Hersteller	Artikelnummer
Alsever'sche Lösung	Hämolytischer Assay	Sigma-Aldrich	A3551
Veronal Puffer (5 x)	WiELISA	Lonza	12-624E
Blocker BSA (10 %) in PBS	ELISA-Blockierungspuffer	Thermo Scientific	37525
Bottle Top Filter, 1 l	Sterilfilter, 0,22 µm	Corning	430015
Bottle Top Filter, 500 ml	Sterilfilter, 0,22 µm	Corning	430013
Chromatographiepapier	Western-Blot-Analysen	Whatman	3030917
cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Proteaseinhibitoren	Roche	04693124001
CutSmart™ Buffer (10 x)	Puffer für Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs	B7204S
DPBS	ELISA, WiELISA	Gibco	14190-094
DPBS ⁺⁺	ELISA, WiELISA	Gibco	14040-091
Filtropur S 0.45	Sterilfilter, 0,45 µm	Sarstedt	83.1826
F8 Maxisorp Nunc-Immuno Module (Flachboden)	ELISA, WiELISA, hämolytischer Assay	Thermo Scientific	468667
Gel Loading Dye, Purple (6 x)	Visualisierung von Proteinen in der SDS-PAGE	New England Biolabs	B7024
GVB ⁺⁺	WiELISA, hämolytischer Assay	Complement Technology	B100
IgM aus Humanserum	WiELISA	Sigma-Aldrich	I8260
Kova® Glasstic® Slide 10 with Grids	Zellzahlbestimmung (Borrelien)	Hycor	87144

Bezeichnung	Verwendungszweck	Hersteller	Artikelnummer
LPS aus <i>Salmonella enteritidis</i> (S-Form)	WiELISA	Hycult Biotech	HC4D59
Mannan aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	WiELISA	Sigma-Aldrich	M7504
Midori Green Direct	Visualisierung von DNA-Fragmenten bei der Agarose-Gelelektrophorese	Nippon Genetics	MG06
Nalgene Syringe Filter, sterile Nylon-Membran	Sterilfilter, 0,2 µm	Thermo Scientific	726-2520
Nitrocellulose-Blottingmembran	Membran für Western-Blot-Analysen	Cytiva Amersham	10600001
NEBExpress Ni Resin	Proteinaufreinigung	New England Biolabs	S1428
<i>ortho</i> -Phenylendiamin	Substrat für ELISA und WiELISA	Sigma-Aldrich	P5412
PBS	Puffer für diverse Versuche	Gibco	14190-094
PBS ⁺⁺	Puffer für diverse Versuche	Gibco	14040-091
Poly-Prep Chromatographiesäulen	Affinitätschromatographie	Bio-Rad	731-1550
PS-Microplate 96 Well U-Form (Rundboden)	Micro-BCA	Greiner Bio-One	650101
recomBlot TMB-Substrat	Detektionslösung für Western-Blot-Analysen	Mikrogen GmbH	10038
recomBlot Waschpuffer (5 ×)	Waschpuffer für Western-Blot-Analysen	Mikrogen GmbH	10012
SOC Outgrowth Medium	Kultivierung von transformierten <i>E. coli</i> -Zellen	New England Biolabs	B9020

Bezeichnung	Verwendungszweck	Hersteller	Artikelnummer
Vivaspin Turbo 15	Konzentrierung und Entsalzung von Proteinlösungen	Sartorius	VS15T12
Wasser, Bio-Science- Grade, Nuklease-frei und autoklaviert, DEPC- behandelt	Isolierung von Plasmid-DNA	Carl Roth	R143.4

2.8.3 Allgemeine Puffer und Lösungen

Tabelle 15: Verwendete allgemeine Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
Tris-gepufferte Saline (TBS)	50 mM Tris 200 mM Natriumchlorid pH 7,5 Der Puffer wurde autoklaviert.
Phosphat-gepufferte Saline (PBS)	10 mM Dinatriumhydrogenphosphat 1 mM Natriumdihydrogenphosphat 150 mM Natriumchlorid pH 7,4 Der Puffer wurde autoklaviert.
20 mM Tris	20 mM Tris ad 250 ml Aqua bidest. pH 7,2 (mit HCl eingestellt) Der Puffer wurde sterilfiltriert (0,22 µm).
150 mM Tris	150 mM Tris ad 250 ml Aqua bidest. pH 7,0 (mit HCl eingestellt) Der Puffer wurde sterilfiltriert (0,22 µm).

2.8.4 Geräte

Tabelle 16: Verwendete Materialien und Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese-Zubehör	
Elektrophorese-Kammer Horizon 11.14	Gibco-BRL
Gel-Kammer Gel Casting System 11.14	Gibco-BRL
Geldokumentationssystem FastGene® FAS-V	Nippon Genetics
Netzgerät E443	Consort
Netzgerät EV265	Consort
Beheizbare Magnetrührer	
IKAMAG RET	IKA
MR Hei-Standard	Heidolph
MR 2002	Heidolph
KMO 2 Basic	IKA
Brutschränke	
Brutschrank B 20	Heraeus
Brutschrank BBD 6220	Thermo Scientific
Dispergiergerät/Homogenisator	
MICCRA D-9 Dispergiergerät	Art Prozess- & Labortechnik
ELISA-Reader/Spektrometer	
Nanophotometer Pearl P 300	Implem
PowerWave HT	BioTek
Ultrospec 3100 Pro	Amersham Biosciences
Mikroskope	
Axio Imager M2	Zeiss
Standard 25 mit Dunkelfeldkondensator	Zeiss
PCR-Thermocycler	
T300 Thermocycler	Biometra
T Professional Basic	Biometra

Bezeichnung	Hersteller
pH-Meter	
pH-Meter 654	Metrohm
Pipetten	
Modelle: Reference, Research und ResearchPlus	Eppendorf
Pipetman Classic	Gilson
Finnpipette Novus	Thermo Fisher Scientific
Multipipette	Brand
Pipettierhilfen	
PIPETBOY acu	Integra Sciences
Easypet	Eppendorf
Schüttler und Inkubatoren	
M20 Minishaker	IKA
Novotron Incubator Shaker	Infors HAT
Rockomat	Integra Biosciences
Schüttler KL2	E. Bühler
Thermomixer comfort	Eppendorf
Thermomixer 5437	Eppendorf
Vortexer VF2	IKA
SDS-PAGE und Zubehör für Proteintransfer	
Netzgerät E835	Consort
Vertikale Elektrophoresekammer	Sigma-Aldrich
Blotgerät	Peqlab
Blotgerät	LFT
Densitometer	Bio-Rad
Ultraschallgerät mit Kühlung	
Sonifier B12 mit Becherresonator	Branson/Heinemann
Kühlungsgerät Multistar	Fryka

Bezeichnung	Hersteller
Sterilwerkbank	
Herasafe HS12	Heraeus
Waagen	
Analysenwaage 572	Kern
Feinwaage BP110S	Sartorius
Zentrifugen	
Multifuge™ X3	Thermo Scientific
Mikrozentrifuge 5417 R	Eppendorf
Mikrozentrifuge 220R	Hettich
Mini-Zentrifuge ROTILABO®	Carl Roth

2.8.5 Software

Die zur Anfertigung dieser Arbeit verwendete Software ist in Tabelle 17 aufgeführt. Eine statistische Analyse erfolgte anhand von GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc.) mittels eines einfaktoriellen ANOVA-Tests mit multiplem Vergleichstest nach Bonferroni (Konfidenzintervall 95 %).

Tabelle 17: Verwendete Software

Software	Hersteller
Citavi 6.14	Swiss Academic Software
CLC Sequence Viewer 8.0	CLC Bio
Corel Draw X5	Corel Corporation
Gen 5.1.11	BioTek Instruments
GIMP 2.10	The GIMP TEAM
GraphPad Prism 7	GraphPad Software Inc.
NEBioCalculator	New England Biolabs
Quantity One 4.2.1	Bio-Rad

2.9 Medien

2.9.1 Kulturmedien

Zur Kultivierung von *E. coli*-Zellen wurden die in Tabelle 18 aufgeführten Medien verwendet, wobei das 2 × YT-Medium sowie der LB-Agar nach dem Ansetzen bei 121 °C für 20 min autoklaviert wurden. Zur Kultivierung von Borrelien wurde BSK-H-Medium (Bio & Sell) mit 6 % Kaninchenserum (Sigma-Aldrich, R4505) supplementiert, welches für 40 min bei 56 °C erhitzt wurde.

Tabelle 18: Verwendete Medien zur Kultivierung von *E. coli* und Borrelien

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller	Artikelnummer
2 × YT-Medium	31 g auf 1 l Medium, pH 7,4	Carl Roth	6676.2
LB-Agar	40 g auf 1 l Medium, pH 7,0	Carl Roth	X969.1
BSK-H-Medium (ohne Glutamin)	500 ml, versetzt mit 6 % hitzeinaktiviertem Kaninchenserum (Sigma-Aldrich, R4505)	Bio & Sell	BS 2.120L

2.9.2 Antibiotika

Zur selektiven Kultivierung von Plasmid-tragenden *E. coli*- bzw. *B. garinii*-Zellen wurden Flüssigmedien oder Agarplatten mit den in Tabelle 19 angegebenen Antibiotika supplementiert. Die Stammlösungen der Antibiotika wurden sterilfiltriert (0,22 µm Porengröße) und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 19: Zur Selektion verwendete Antibiotika und deren verwendete Konzentration

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

2.10 Kultivierung und Zellzahlbestimmung von Mikroorganismen

2.10.1 Kultivierung von *E. coli*-Zellen

Zur Kultivierung von *E. coli*-Zellen wurden 2 × YT-Flüssigmedium oder LB-Agarplatten verwendet (s. Tabelle 18), welche zur selektiven Kultivierung mit Ampicillin (Endkonzentration: 50 µg/ml) supplementiert wurden. Die Flüssigkulturen wurden anschließend bei 37 °C und 180 rpm über Nacht inkubiert, die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C bebrütet.

Zum Animpfen von Übernachtskulturen wurden entweder bei -80 °C tiefgefrorene Stammkulturen oder Einzelkolonien von LB-Agarplatten verwendet.

2.10.2 Kultivierung von Borrelien

Die Borrelien wurden in BSK-H-Medium mit Zusatz von 6 % Kaninchenserum (Sigma-Aldrich, R4505) bei 33 °C unter mikroaerophilen Bedingungen kultiviert. Dabei wurden die Zellen, je nach Vitalität, alle sieben Tage in frisches BSK-H-Medium überführt. Die Vitalität bzw. Motilität der Spirochäten wurde im Direktpräparat mittels Dunkelfeldmikroskopie nachgewiesen. Zur Anzucht frischer Borrelienstämme wurden Stammkulturen aus -80 °C bei Raumtemperatur aufgetaut und in 10 ml frisches BSK-H-Medium überführt und anschließend bei 33 °C unter mikroaerophilen Bedingungen kultiviert, bis eine ausreichender Zellkonzentration erreicht wurde.

2.10.3 Bestimmung der optischen Dichte einer Bakterienkultur

Um die Zelldichte einer Bakterienkultur zu bestimmen, wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm mit dem Spektralphotometer Ultrospec 3100 Pro (Amersham Bioscience) bestimmt und diese in Relation zur Absorption des

Ausgangsmediums ohne Zellen gesetzt. Dabei wurde je 1 ml der Kultur in einer Küvette gemessen, als Nullwert diente unbeimpftes Kultivierungsmedium.

2.10.4 Zellzahlbestimmung von Borrelienzellen und Erythrozyten

Zur Bestimmung der Zellkonzentrationen von Borrelienkulturen sowie von Erythrozyten wurden zunächst verschiedene Verdünnungen (1:100, 1:1000 und 1:2000) in PBS⁺⁺ hergestellt. Im Anschluss wurden zur Zählung je 10 µl jeder einzelnen Verdünnung in eine Zählkammer (KOVA® Glasstic® Slide 10) pipettiert, wobei für die folgenden Schritte eine Verdünnung gewählt wurde, bei der 5 – 20 Zellen pro Quadrat vorlagen. Die Zellen wurden innerhalb von neun Quadranten der Zählkammer gezählt und der Mittelwert folgendermaßen bestimmt:

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

2.11 Molekularbiologische Methoden

2.11.1 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde angewendet, um spezifische DNA-Sequenzen zu amplifizieren. Hierbei wurden die *Taq*-DNA-Polymerase für konventionelle PCR und die HiFi-DNA-Polymerase bzw. VeriFi™-DNA-Polymerase (s. Tabelle 10) für Klonierungen (s. Kapitel 2.11.9) sowie für die *In-vitro*-Mutagenese (s. Kapitel 3.3.1) verwendet. Die jeweiligen Reaktionsansätze wurden hierbei auf Eis pipettiert. Die DNA-Polymerase wurde jeweils zum Schluss hinzugegeben und die PCR anschließend nach den jeweils aufgeführten Bedingungen durchgeführt, wobei die Schritte 2 bis 4 für 25 – 35 Zyklen durchgeführt wurden. Nach Beendigung wurden die Amplifikate bei 4 °C gelagert.

Tabelle 20: PCR-Reaktionsansatz für die *Taq*-DNA-Polymerase

Menge	Komponente
5 µl	10 x PCR-Puffer, ohne MgCl ₂
1,5 µl	50 mM MgCl ₂
1 µl	10 mM dNTP-Mix
2,5 µl	FP-Starteroligonukleotid (10 µM)
2,5 µl	RP- Starteroligonukleotid (10 µM)
1 – 5 µl	Matrizen-DNA (50 – 100 ng)
0,5 µl	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 E/µl)
ad 50 µl	Aqua bidest. (Nuklease-frei)

Tabelle 21: PCR-Bedingungen für die *Taq*-DNA-Polymerase

PCR-Zyklen	Temperatur und Dauer
1. Initiale Denaturierung	95 °C – 3 min
2. Denaturierung	95 °C – 45 s
3. Anlagerung der Starteroligonukleotide	55 °C – 30 s
4. Polymerisation	72 °C – 90 s/kbp
5. Finale Polymerisation	72 °C – 10 min

Tabelle 22: PCR-Reaktionsansatz für die HiFi-DNA-Polymerase

Menge	Komponente
10 µl	5 x HiFi-Puffer (PCRBIO)
2 µl	FP-Starteroligonukleotid (10 µM)
2 µl	RP- Starteroligonukleotid (10 µM)
1 – 5 µl	Matrizen-DNA (50 – 100 ng)
0,5 µl	HiFi-DNA-Polymerase (2 E/µl)
ad 50 µl	Aqua bidest. (Nuklease-frei)

Tabelle 23: PCR-Bedingungen für die HiFi-DNA-Polymerase

PCR-Zyklen	Temperatur und Dauer
1. Initiale Denaturierung	95 °C – 1 min
2. Denaturierung	95 °C – 15 s
3. Anlagerung der Starteroligonukleotide	60 °C – 15 s
4. Polymerisation	72 °C – 30 s/kbp
5. Finale Polymerisation	72 °C – 3 min

Tabelle 24: PCR-Reaktionsansatz für die VeriFi™-DNA-Polymerase

Menge	Komponente
10 µl	5 × VeriFi™-Puffer (PCRBIO)
5 µl	10 × VeriMax Enhancer (PCRBIO)
2 µl	FP-Starteroligonukleotid (10 µM)
2 µl	RP- Starteroligonukleotid (10 µM)
1 – 5 µl	Matrizen-DNA (50 – 100 ng)
0,5 µl	VeriFi™-DNA-Polymerase (2 E/µl)
ad 50 µl	Aqua bidest. (Nuklease-frei)

Tabelle 25: PCR-Bedingungen für die VeriFi™-DNA-Polymerase

PCR-Zyklen	Temperatur und Dauer
1. Initiale Denaturierung	95 °C – 1 min
2. Denaturierung	95 °C – 15 s
3. Anlagerung der Starteroligonukleotide	60 °C – 15 s
4. Polymerisation	72 °C – 30 s/kbp
5. Finale Polymerisation	72 °C – 3 min

2.11.2 Aufreinigung von amplifizierten DNA-Fragmenten

Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden mithilfe des QIAquick PCR Purification Kits (s. Tabelle 11) nach Herstellerprotokoll gereinigt. Die DNA-Fragmente wurden final in 30 µl RNase-/DNase-freiem Wasser eluiert.

2.11.3 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese

Mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese wurden DNA-Fragmente nach ihrer Größe separiert. Je nach Fragmentgröße wurden 0,5 – 2 % Agarosegele verwendet, wobei die entsprechende Menge an Agarose (w/v) in 100 ml 1 × TAE-Puffer (s. Tabelle 26) erhitzt und im Anschluss in die entsprechende Gießvorrichtung gegossen wurde. Nach dem Erstarren wurde das Agarose-Gel in einer Elektrophoresekammer positioniert.

Je 5 µl der zu analysierenden Proben wurden mit 5 µl Aqua bidest., 2 µl Gelbeladepuffer (s. Tabelle 14) sowie 0,5 µl Midori Green (s. Tabelle 14) versetzt und submers auf das Agarose-Gel aufgetragen. Je nach erwarteter Fragmentgröße wurden zusätzlich 5 µl des 100 bp oder des 1 kbp Größenstandards (s. Tabelle 12) eingesetzt.

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei 140 V, 220 mA und 110 W für 1 h. Anschließend wurden die DNA-Fragmente mithilfe des Geldokumentationssystems FastGene® FAS-V (Nippon Genetics) unter Blaulicht visualisiert und dokumentiert.

Tabelle 26: Zusammensetzung des Puffers für die Agarose-Gelelektrophorese

Puffer	Zusammensetzung
50 × TAE-Puffer	2 M Tris 1 M Essigsäure 100 mM EDTA ad 1 l Aqua bidest. pH 8,1

2.11.4 Hydrolyse von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Die Hydrolyse der DNA erfolgte mittels spezifischer Restriktionsendonukleasen (s. Tabelle 7). Dabei wurde jeweils nach Herstellerangaben vorgegangen, wobei pro μg zu hydrolysierender DNA je 1-2 E Enzym hinzugegeben wurden. Durchgeföhrt wurde die Reaktion bei 350 rpm und 37 °C für 3 h oder über Nacht. Anschließend wurde die Restriktionsreaktion gemäß der Anleitung des MinElute Reaction Cleanup Kits (s. Kapitel 2.6) gereinigt und in 20 μl Nuklease-freiem Wasser eluiert, wonach sie für die Transformation (s. Kapitel 2.11.9) eingesetzt werden konnte.

2.11.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von PCR-amplifizierten DNA-Fragmenten in den 3,9 kbp großen pCR-2.1-TOPO TA[®]-Vektor wurde das TOPO TA Cloning[®] Kit (s. Kapitel 2.6) verwendet. Für die Klonierung wurden 4 μl des gereinigten PCR-Ansatzes eingesetzt. Die Inkubation des Ligationsansatzes (s. Tabelle 27) erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der Ansatz in kompetente NEB[®] 5-alpha-Zellen (s. Kapitel 2.1.2) transformiert.

Tabelle 27: Ligationsansatz für das TOPO TA Cloning[®] Kit

Menge	Komponente
1 μl	Salt Solution (Kit)
1 μl	TOPO TA-Vektor (Kit)
4 μl	vorbehandeltes DNA-Fragment

Die Ligation der DNA-Fragmente in den pQE-30 Xa-Vektor (s. Kapitel 2.2.2) wurde mithilfe der T4-DNA-Ligase (s. Tabelle 10) durchgeföhrt. Vektor und Insert wurden dabei in einem Verhältnis von 1:5 eingesetzt und die benötigte DNA-Menge mithilfe von NEBioCalculator (s. Tabelle 17) berechnet. Anschließend wurde die T4-DNA-Ligase hinzugegeben. Der Ligationsansatz (s. Tabelle 28) wurde bei 16 °C und 350 rpm über Nacht inkubiert.

Tabelle 28: Ligationsansatz für die T4-DNA-Ligase

Menge	Komponente
2 µl	T4-DNA-Ligase-Puffer (10 ×)
100 ng	Vektor (pQE-30 Xa)
3 µl	vorbehandeltes DNA-Fragment
1 µl	T4-DNA-Ligase (400 E/µl)
ad 20 µl	Aqua bidest. (Nuklease-frei)

2.11.6 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen wurde mithilfe des Monarch® Plasmid Miniprep Kits gemäß der Anleitung des Herstellers für eine 5 ml Kultur und mithilfe des PureYield Plasmid Midiprep Systems für eine 50 ml Kultur isoliert (s. Tabelle 11). Die Isolierung von Plasmiden aus *B. garinii*-Zellen erfolgte ausschließlich mithilfe des Monarch® Plasmid Miniprep Kits aus 10 ml Kulturen. Die Plasmide wurden anschließend in 20 µl Nuklease-freiem Aqua bidest. eluiert und bei -20 °C gelagert.

2.11.7 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration der PCR-Amplifikate und Restriktionsreaktionen sowie von Plasmid-DNA wurde photometrisch bei 260 nm mithilfe des Nanophotometers Pearl P 300 (s. Kapitel 2.8.4) bestimmt, wobei als Referenz der jeweilige Elutionspuffer oder Nuklease-freies Wasser diente.

2.11.8 Sequenzierung von Plasmid-DNA und PCR-Amplifikaten

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA und PCR-Amplifikaten erfolgte durch die Firma Eurofins Genomics. Es wurden je 5 µl DNA zusammen mit 5 µl des jeweiligen Starteroligonukleotids (1 mM) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vermischt, wobei Plasmid-DNA eine Konzentration von 80 – 100 ng/µl und PCR-Amplifikate eine Konzentration von 20 – 80 ng/µl aufweisen mussten. Die erhaltenen Sequenzen wurden anschließend mittels CLC Sequence Viewer analysiert (s. Kapitel 2.8.5).

2.11.9 Transformation von *E. coli*-Zellen

Für die Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen (s. Tabelle 2) wurde die Hitzeschockmethode nach Anleitung des Herstellers angewandt. Die kompetenten Zellen (NEB® 5-alpha, BL21 Star™ (DE3) oder M15) wurden 5 min auf Eis aufgetaut. Zu 50 µl der Zellen wurden 10 µl der zu transformierenden DNA gegeben (Ligationsansatz oder *DpnI*-Restriktionsansatz) (s. Kapitel 2.11.4 und 2.11.5) und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock über 30 s bei 42 °C im Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen erneut 5 min auf Eis inkubiert, mit 950 µl SOC-Medium versetzt und für 1 h bei 37 °C und 350 rpm im Thermomixer inkubiert. Im Anschluss wurden 2/10 und 8/10 des Transformationsansatzes auf Ampicillin-haltigen Agarplatten (1:1000 verdünnt, Endkonzentration: 50 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank bebrütet. Von ausgewählten Kolonien wurden Übernachtskulturen angeimpft. Im Anschluss erfolgte ein Dreiösenausstrich der Bakterienkultur. Am Folgetag wurde, ausgehend von einer Einzelkolonie, erneut eine 5 ml Übernachtskultur angeimpft, um aus 3,5 ml die Plasmid-DNA zu isolieren (s. Kapitel 2.11.6) und das Insert zu sequenzieren (s. Kapitel 2.11.8). Die restlichen 1,5 ml der Kultur wurden mit 0,3 ml Glycerol versetzt und für die Langzeitlagerung bei -80 °C eingefroren.

2.12 Proteinbiochemische Methoden

2.12.1 Separation von Proteinen in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine nach ihrer molekularen Masse aufzutrennen, wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. In Tabelle 29 und Tabelle 30 sind die Zusammensetzung der Puffer sowie des Tris-Tricin (TT)-SDS-Polyacrylamidgels aufgelistet. Die Puffer wurden sterilfiltriert (Porengröße: 0,22 µm) und bei 4 °C gelagert.

Tabelle 29: Pufferzusammensetzung für die TT-SDS-Polyacrylamidgele

Puffer	Zusammensetzung
TT-Acrylamid-Lösung (49,5 % T, 3 % C)	240 g Acrylamid 7,5 g Bisacrylamid ad 500 ml Aqua bidest.
TT-Gelpuffer (3 x)	3 M Tris/HCl, pH 8,45 0,3 % (w/v) SDS ad 500 ml Aqua bidest.

Tabelle 30: Zusammensetzung für ein 10 % TT-SDS-Polyacrylamidgel

Komponente	Sammelgel (4 %)	Trenngel (10 %), (10 % T, 3 % C)
Glycerin	-	3 g
TT-Acrylamid-Lösung	1 ml	6 ml
TT-Gelpuffer (3 x)	3 ml	10 ml
Aqua bidest.	ad 12 ml	ad 30 ml
APS (10 %)	90 µl	150 µl
TEMED	9 µl	15 µl

APS (10 %) und TEMED wurden bei der Herstellung der Sammelgel- und Trenngel-Lösung jeweils erst kurz vor dem Gießen des Polyacrylamidgels hinzugegeben.

Zuerst wurde die Trenngel-Lösung zwischen zwei Glasplatten gegossen und diese mit 70-prozentigem Ethanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Polyacrylamidgels wurde das Ethanol abgegossen. Anschließend wurde die Sammelgel-Lösung pipettiert und der Kamm zwischen den Glasscheiben positioniert.

Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels wurden die SDS-Polyacrylamidgele direkt verwendet oder für maximal sieben Tage bei 4 °C gelagert.

Für die Färbung mit Silbernitrat (s. Kapitel 2.12.3) wurden je 2 µl des Precision Plus Protein Unstained Standards (s. Tabelle 12) und für Western-Blot-Analysen (s. Kapitel

2.13.1) je 15 µl des Precision Plus Protein Dual Color Standards (s. Tabelle 12) verwendet. Der Proteinstandard und die zu untersuchenden Proben wurden mit PBS⁺⁺ auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt, mit 6,8 µl TT-Inkubationspuffer (4 ×) versetzt und anschließend für 5 min bei 95 °C und 400 rpm erhitzt. Danach wurden die Proteinproben kurz zentrifugiert und auf ein 10 % TT-SDS-Polyacrylamidgel appliziert.

Die Separierung der Proben erfolgte zunächst bei 40 V, 50 W und 100 mA für 2 h im Sammelgel sowie anschließend bei 75 V, 50 W und 100 mA über Nacht im Trenngel.

Die Zusammensetzungen der jeweiligen Puffer sind in Tabelle 31 aufgeführt.

Tabelle 31: Zusammensetzung der Puffer für die Probenvorbereitung und die TT-SDS-PAGE

Puffer	Zusammensetzung
TT-Inkubationspuffer (4 ×)	150 mM Tris/HCl, pH 7,0 30 % (v/v) Glycerol 12 % (w/v) SDS 0,03 % (w/v) Bromphenolblau 6 % (v/v) β-Mercaptoethanol pH 6,8 – 7,0 ad 10 ml Aqua bidest.
Anodenpuffer	100 mM Tris/HCl, pH 8,9 ad 1 l Aqua bidest.
Kathodenpuffer	100 mM Tris/HCl, pH 8,25 100 mM Tricin 0,1 % (w/v) SDS ad 1 l Aqua bidest.

2.12.2 Transfer von Proteinen auf eine Nitrocellulosemembran (Western-Blot-Analyse)

Zur Vorbereitung eines Proteintransfers auf eine Nitrocellulosemembran wurde die Anode der Blotapparatur mit Anodenpuffer (s. Tabelle 32) befeuchtet und vier in

Anodenpuffer getränkte Chromatographiepapiere wurden luftblasenfrei aufgelegt. Im Anschluss wurde die Nitrocellulosemembran kurz in Aqua bidest. getaucht, mit Anodenpuffer getränkt und auf die Chromatographiepapiere gelegt. Schließlich wurde das Sammelgel vom Polyacrylamidgel abgetrennt, in Kathodenpuffer (s. Tabelle 32) getaucht und auf der Nitrocellulosemembran platziert. Es folgten vier in Kathodenpuffer getränkte Chromatographiepapiere, welche luftblasenfrei aufgelegt wurden. Danach wurde die Apparatur durch das Auflegen der Kathode verschlossen. Der Transfer der Proteine erfolgte für 2 h bei einer Stromstärke von 1 mA/cm². Zur Visualisierung der transferierten Proteine wurde das Reversible Protein Detection Kit (s. Kapitel 2.6) verwendet. Hierfür wurden 10 ml Lösung A mit 10 ml Lösung B gemischt und zur Membran gegeben. Nach der Visualisierung der Proteine wurde die Membran durch die Zugabe von EDTA-Stammlösung (s. Tabelle 32) vollständig entfärbt.

Tabelle 32: Zusammensetzung der Puffer für die Western-Blot-Analyse

Puffer	Zusammensetzung
Anodenpuffer	300 mM Tris/HCl, pH 8,7 100 mM Tricin ad 1 l Aqua bidest.
Kathodenpuffer	30 mM Tris/HCl, pH 8,6 300 mM 6-Aminocaprinsäure ad 1 l Aqua bidest.
EDTA-Stammlösung	0,5 M EDTA ad 1 l Aqua bidest. pH 8,0

2.12.3 Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen mittels Silbernitrat

Nach erfolgter Separation der Proteine mittels SDS-PAGE wurden diese durch eine 30-minütige Inkubation in Fixierlösung (s. Tabelle 33) im SDS-Polyacrylamidgel fixiert. Im Anschluss wurde das Polyacrylamidgel 30 min in Inkubationslösung (s. Tabelle 33) unter leichtem Schütteln inkubiert und dreimal für je 5 min mit Aqua bidest. gewaschen.

Danach erfolgte eine 20-minütige Inkubation unter leichtem Schütteln in Silbernitrat-Lösung (s. Tabelle 33). Anschließend wurde das SDS-Polyacrylamidgel zweimal in Aqua bidest. geschwenkt und schließlich für 2 – 5 min in Entwicklerlösung (s. Tabelle 33) inkubiert. Nach Visualisierung der Proteine wurde die Reaktion durch die Zugabe von Stopplösung (s. Tabelle 33) terminiert und das SDS-Polyacrylamidgel mithilfe des GS-900 Densitometers (s. Kapitel 2.8.4) digitalisiert.

Tabelle 33: Zusammensetzung der Lösungen für die Silberfärbung

Puffer	Zusammensetzung
Fixierlösung	100 ml Ethanol 25 ml Essigsäure ad 250 ml Aqua bidest.
Inkubationslösung	0,5 g Natriumthiosulfat 17 g Natriumacetat 1,25 ml Glutaraldehyd (25 % Lösung) 75 ml Ethanol ad 250 ml Aqua bidest.
Silbernitrat-Lösung	625 mg Silbernitrat 350 µl Formaldehyd (37 % Lösung) ad 250 ml Aqua bidest.
Entwicklerlösung	6,25 g Natriumcarbonat 175 µl Formaldehyd (37 % Lösung) ad 250 ml Aqua bidest.
Stopplösung	29,2 g ETDA ad 2 l Aqua bidest.

2.12.4 Produktion rekombinant hergestellter Proteine in *E. coli* (kleiner Versuchsmaßstab)

Zur Überprüfung, ob Plasmid-tragende *E. coli*-Zellen in der Lage sind, His₆-getaggte Proteine zu produzieren, wurde zunächst ein orientierender Versuchsmaßstab mit einem Gesamtvolumen von 20 ml durchgeführt.

Hierfür wurde eine 5 ml Übernachtskultur mit 2 × YT-Medium, 5 µl Ampicillin (1:1000 verdünnt, Endkonzentration: 50 µg/ml) sowie 10 µl der bei -80 °C gelagerten Glycerol-Kultur angesetzt, welche über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert wurde. Am nächsten Tag wurden zu 20 ml 2 × YT-Medium mit Ampicillin so viel an Übernachtskultur hinzugefügt, bis eine OD₆₀₀ von 0,2 erzielt wurde. Die Kultur wurde daraufhin erneut bei 37 °C und 180 rpm inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,5 – 0,6 erreicht werden konnte. Um die Proteinproduktion zu induzieren, wurden 4 µl 0,5 M IPTG hinzugegeben und die Kultur für weitere 3 h bei Raumtemperatur und 180 rpm inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationsdauer erfolgte eine Sedimentation der Zellen bei 5000 rpm und 4 °C für 20 min. Der Überstand wurde verworfen, die Zellsedimente wurden in 500 µl DPBS⁺⁺ resuspendiert und in Reaktionsgefäße von 1,5 ml überführt. Anschließend wurden die Zellen sechsmal für je 30 s sonifiziert (Sonifier B12 mit Becherresonator, Branson/Heinemann, s. Kapitel 2.8.4), wobei zwischendurch eine Lagerung auf Eis erfolgte. Die Lysate wurden anschließend bei 11.500 rpm bei 4 °C für 10 min zentrifugiert, die Überstände in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und das Sediment erneut in 500 µl DPBS⁺⁺ resuspendiert. Im Anschluss erfolgte ein weiterer Sonifizierungsvorgang wie oben beschrieben. Nach erfolgter Zentrifugation wurde das Sediment in 500 µl DPBS⁺⁺ resuspendiert.

Anschließend wurden je 20 µl des Überstands und 20 µl des Sediments mit 6,8 µl des TT-Inkubationspuffers (4 ×) versetzt und für 5 min bei 95 °C und 350 rpm erhitzt. Wie in Kapitel 2.12.1 beschrieben, wurden die Proben zur Analyse auf ein 10 % TT-SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und über Nacht separiert. Die restlichen Proben wurden bei -20 °C gelagert. Die separierten Proteine wurden anschließend auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und die His₆-getaggte Proteine mittels Anti-His₆-

Antikörpers (Verdünnung: 1:1000) mittels Western-Blot-Analyse detektiert (s. Kapitel 2.13.1).

2.12.5 Produktion und Reinigung rekombinant hergestellter Proteine aus *E. coli*-Zellen (großer Versuchsmaßstab)

Von ausgewählten Klonen wurde eine 250 ml Bakterienkultur in 2 × YT-Medium supplementiert mit Ampicillin (50 µg/ml) mit einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,2 inokuliert. Die Zellen wurde im Anschluss bei 180 rpm und 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 – 0,6 inkubiert und die Produktion der Proteine durch die Zugabe von 100 µl IPTG (0,5 M) induziert. Nach einer Inkubation von 4 h bei 200 rpm und 21 °C wurden die Zellen in 50 ml Röhrchen für 20 min bei 5000 × g und 4 °C sedimentiert. Es folgten das Dekantieren des Überstands und die Lagerung der Sedimente bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung.

Nach dem Auftauen der Zellsedimente auf Eis wurden diese in je 2,4 ml Lysepuffer resuspendiert, vereinigt und für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte der erste Zellaufschluss per Dispersionsgerät (MICCRA D-9, Art Prozess- & Labortechnik GmbH, s. Kapitel 2.8.4) für 20 s bei Stufe D-E. Anschließend wurden die Lysate fünfmal je 30 s sonifiziert. Die Proteinsuspensionen wurden für 30 min bei 5000 × g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand sterilfiltriert bei einer Porengröße des Filters von 0,45 µm.

Die Isolierung der His₆-getaggtten Proteine erfolgte anschließend mittels Affinitätschromatographie. Hierfür wurden 15 ml des sterilfiltrierten Überstands mit 300 µl Ni-NTA-Agarosepartikeln unter leichtem Schütteln für 1 h bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurde der Ansatz für 1 min bei 600 × g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Ni-NTA-Agarose mit 20 ml Waschpuffer (20 mM Imidazol) (s. Tabelle 34) resuspendiert. Die Agarosepartikel wurden erneut zentrifugiert und anschließend noch zwei weitere Male mit je 10 ml Waschpuffer gewaschen. Danach wurden die Agarosepartikel in 8 ml Waschpuffer resuspendiert, auf eine Chromatographiesäule (s. Kapitel 2.8.2) appliziert und schließlich bei 4 °C gelagert, bis

der gesamte Flüssigkeitsanteil die Säulenmatrix passiert hatte. Anschließend erfolgte die Elution der Proteine bei steigender Imidazolkonzentration (50 – 250 mM Imidazol) (s. Tabelle 34), wobei alle Fraktionen gesammelt wurden. Schließlich wurden je 10 µl der einzelnen Fraktionen mit 10 µl PBS⁺⁺ sowie 6,8 µl TT-Inkubationspuffer (s. Tabelle 31) versetzt und 5 min bei 95 °C erhitzt, bevor die Fraktionen auf ein 10 % TT-SDS-Polyacrylamidgel appliziert wurden. Am Folgetag wurde die Reinheit der Proteine in den einzelnen Fraktionen durch eine Färbung mit Silbernitrat (s. Kapitel 2.12.3) überprüft. Jene Fraktionen, welche das gewünschte Protein in ausreichender Reinheit enthielten, wurden vereinigt und in Ultrafiltrations-Zentrifugalkonzentratoren (Vivaspin Turbo 15, Sartorius) bei 4000 × g und 4 °C konzentriert (s. Kapitel 2.12.6).

Tabelle 34: Puffer für die Proteinreinigung

Puffer	Zusammensetzung
Lyse-Puffer	50 mM Natriumdihydrogenphosphat 300 mM Natriumchlorid 10 mM Imidazol 1 mg/ml Lysozym sterilfiltriert, pH 8,0 ad 1 l Aqua bidest.
Imidazolpuffer 20 mM	50 mM Natriumdihydrogenphosphat 300 mM Natriumchlorid 20 mM Imidazol 1 Tablette Proteaseinhibitor sterilfiltriert, pH 8,0 ad 1 l Aqua bidest.

Puffer	Zusammensetzung
Imidazolpuffer 50 mM	50 mM Natriumdihydrogenphosphat 300 mM Natriumchlorid 50 mM Imidazol ½ Tablette Proteaseinhibitor sterilfiltriert, pH 8,0 ad 400 ml Aqua bidest.
Imidazolpuffer 75 mM	50 mM Natriumdihydrogenphosphat 300 mM Natriumchlorid 75 mM Imidazol ½ Tablette Proteaseinhibitor sterilfiltriert, pH 8,0 ad 400 ml Aqua bidest.
Imidazolpuffer 100 mM	50 mM Natriumdihydrogenphosphat 300 mM Natriumchlorid 100 mM Imidazol ½ Tablette Proteaseinhibitor sterilfiltriert, pH 8,0 ad 400 ml Aqua bidest.
Imidazolpuffer 150 mM	50 mM Natriumdihydrogenphosphat 300 mM Natriumchlorid 150 mM Imidazol ½ Tablette Proteaseinhibitor sterilfiltriert, pH 8,0 ad 400 ml Aqua bidest.

Puffer	Zusammensetzung
Imidazolpuffer 200 mM	50 mM Natriumdihydrogenphosphat 300 mM Natriumchlorid 200 mM Imidazol ½ Tablette Proteaseinhibitor sterilfiltriert, pH 8,0 ad 400 ml Aqua bidest.
Imidazolpuffer 250 mM	50 mM Natriumdihydrogenphosphat 300 mM Natriumchlorid 250 mM Imidazol ½ Tablette Proteaseinhibitor sterilfiltriert, pH 8,0 ad 400 ml Aqua bidest.

2.12.6 Entsalzung und Konzentrierung von Protein-haltigen Lösungen

Zur Entsalzung von Proteinlösungen und um eine für analytische Zwecke verwendbare Probenkonzentrierung erzielen zu können, wurden die mit Imidazol eluierten Fraktionen mit dem höchsten Reinheitsgrad (s. Kapitel 2.12.3) vereinigt und bis zu einem Restvolumen von etwa 0,5 ml bei 3800 × g und 4 °C in Ultrafiltrations-Zentrifugalkonzentratoren (Vivaspin Turbo 15, Sartorius) zentrifugiert. Im Anschluss wurden 20 ml 50 mM Tris (pH 8,0) hinzupipettiert und die Proteinlösung erneut bis zu einem Restvolumen von etwa 0,5 ml zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde wiederholt, um Salze und Imidazol zu entfernen. Die gereinigten und entsalzten Proteine wurden anschließend bei -20 °C gelagert.

2.12.7 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Micro-BCA

Die Bestimmung der Konzentration gereinigter Proteine erfolgte mithilfe des BCA Protein Assay Kits (Thermo Fisher Scientific). Die zu messenden Proben wurden je 1:10, 1:20 sowie 1:40 verdünnt. In der Zwischenzeit wurden die Proteinstandards (25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 sowie 2000 µg BSA/µl) auf Eis aufgetaut. Im Anschluss wurden

jeweils 25 µl der BSA-Standards, Aqua bidest. als Nullwert sowie die verdünnten und unverdünnten Proben in eine Mikrotiterplatte mit Rundboden pipettiert. Das Working Reagent des Kits wurde im Verhältnis 1 Teil B zu 49 Teile A angesetzt. Je 200 µl dieses Ansatzes wurden nun in die vorgefüllten Kavitäten pipettiert und der Reaktionsansatz anschließend für 1 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgten die photometrische Messung bei 562 nm sowie die Berechnung der Proteinkonzentration anhand einer Standardkurve.

2.13 Immunologische Methoden

2.13.1 Western-Blot-Analyse

Mittels der Western-Blot-Analyse wurde der Nachweis von Proteinen durch spezifische Antikörper erbracht. Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte eine Inkubation der Membran für 1 h unter leichtem Schwenken mit 5 % Magermilchpulver in Blockierungspuffer (s. Tabelle 35), um freie Bindungsstellen abzusättigen. Im Anschluss wurde die Membran dreimal für je 5 min mit Blockierungspuffer gewaschen. Daraufhin wurde der primäre Antikörper, verdünnt in 1 × recomBlot Waschpuffer, appliziert und die Membran erneut 1 h lang unter leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut dreimal für je 5 min mit Waschpuffer (s. Tabelle 35) gewaschen und für 1 h mit dem sekundären Antikörper inkubiert, der im Verhältnis 1:1000 in recomBlot Waschpuffer verdünnt worden war. Schließlich folgten vier Waschvorgänge je 5 min mit Waschpuffer sowie die Visualisierung des Protein-Antikörper-Komplexes durch Zugabe von recomBlot TMB-Substrat.

Tabelle 35: Verwendete Puffer für die Western-Blot-Analyse

Puffer	Zusammensetzung
Blockierungspuffer	TBS/ 0,1 % (v/v) Tween20
Waschpuffer	TBS/ 0,2 % (v/v) Tween20

2.13.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Mithilfe des Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) wurde die Bindung von unterschiedlichen Komplementkomponenten an gereinigte Borrelienproteine analysiert.

2.13.2.1 Nachweis der Bindung von Komplementkomponenten an Borrelienproteine

Um die Bindung verschiedener Komplementkomponenten an gereinigte Borrelienproteine zu untersuchen, wurde ein ELISA durchgeführt. Hierfür wurden je 500 ng Protein in 100 µl Immobilisierungspuffer (s. Tabelle 36) verdünnt und in eine Mikrotiterplatte mit flachem Boden pipettiert. Die Immobilisierung der Proteine erfolgte bei 4 °C und leichtem Schwenken über Nacht. Am Folgetag wurden die Kavitäten dreimal mit je 200 µl ELISA-Waschpuffer (s. Tabelle 36) gewaschen und anschließend mit je 100 µl ELISA-Blockierungspuffer (s. Tabelle 36) für 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken inkubiert, um freie Bindungsstellen zu blockieren. Es wurde wiederholt mit 200 µl ELISA-Waschpuffer gewaschen und anschließend je 500 ng der zu untersuchenden Komplementkomponenten in PBS⁺⁺ appliziert. Es erfolgte eine erneute Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit je 200 µl ELISA-Waschpuffer wurden je 100 µl des 1:1000 in PBS⁺⁺ verdünnten primären Antikörpers hinzugegeben und die Mikrotiterplatte für 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken inkubiert.

Es erfolgten ein nächster Waschvorgang, wobei wieder dreimal mit je 200 µl ELISA-Waschpuffer pro Kavität gewaschen wurde, sowie die Applikation von je 100 µl des 1:1000 in PBS⁺⁺ verdünnten sekundären Antikörpers. Auch dieser wurde für 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken inkubiert.

Anschließend wurden die Kavitäten dreimal mit je 200 µl ELISA-Waschpuffer gewaschen. Für die Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe wurden eine Tablette *ortho*-Phenylendiamin (20 mg) (Sigma Aldrich) in 20 ml Substratpuffer (s. Tabelle 36) gelöst und nach vollständigem Auflösen 20 µl Wasserstoffperoxid hinzugegeben. Nun wurden je 100 µl dieser Substratlösung pro Kavität hinzupipettiert. Die Reaktion wurde

bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken inkubiert, bis sich ein Farbumschlag zeigte, und schließlich durch die Zugabe von je 50 µl ELISA-Stopplösung (s. Tabelle 36) terminiert. Es folgte eine Messung im ELISA-Reader bei einer Absorption von 490 nm.

Tabelle 36: Verwendete Puffer für den Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Puffer	Zusammensetzung
Immobilisierungspuffer	0,05 M Natriumcarbonat 0,02 % (w/v) Natriumazid pH 9,6 (mit Natriumhydrogencarbonat eingestellt) sterilfiltriert (0,22 µm)
ELISA-Waschpuffer	0,05 % (v/v) Tween20 ad 1 l PBS
ELISA-Blockierungspuffer	Blocker BSA (10 %) in PBS
Substratpuffer	0,1 M Kaliumdihydrogenphosphat ad 1 l Aqua bidest. pH 6,0 (mit Kaliumhydroxid eingestellt)
Stopplösung	2,6 M Schwefelsäure ad 500 ml Aqua bidest.

2.13.2.2 Konzentrationsabhängige Bindung einzelner

Komplementfaktoren an ORF10

Zur Bestimmung der konzentrationsabhängigen Bindung von C1q und C4b sowie von C3 und C3b an ORF10 wurden ELISAs durchgeführt (s. Kapitel 2.13.2.1). Die Bindung der Komplementfaktoren an ORF10 erfolgte in aufsteigenden Konzentrationen (5, 10, 15, 20 und 25 nM). Als Nullwert diente 100 µl PBS⁺⁺. Die Durchführung und Detektion der Bindung erfolgte, wie unter Kapitel 2.13.2.1 beschrieben.

2.13.3 Komplement-Aktivierungs-Assay (WiELISA)

Um die inhibitorische Wirkung von gereinigten Borrelienproteinen auf den alternativen, klassischen sowie Lektin-Weg zu untersuchen, wurde ein Komplement-Aktivierungs-Assay (WiELISA) durchgeführt. Hierbei wurde analysiert, ob die betreffenden Borrelienproteine in der Lage sind, die Aktivierung der drei Komplementwege zu inhibieren.

Für den alternativen Weg (AW) wurden je 1 µg Lipopolysaccharid aus *Salmonella enteritidis* (LPS, Hycult Biotech), für den klassischen Weg (KW) je 300 ng humanes Immunglobulin M (IgM, Sigma-Aldrich) sowie für den Lektin-Weg (LW) je 10 µg Mannan aus *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich) in jeweils 100 µl Immobilisierungspuffer (s. Tabelle 36) gelöst und in eine Mikrotiterplatte mit Flachboden gegeben. Es folgte die Immobilisation über Nacht bei 4 °C und leichtem Schwenken.

Am nächsten Tag wurden die Kavitäten dreimal mit je 100 µl WiELISA-Waschpuffer (s. Tabelle 37) gewaschen. Zur Blockierung freier Bindungsstellen wurden je 100 µl WiELISA-Blockierungspuffer (s. Tabelle 37) hinzugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken inkubiert.

Zwischenzeitlich wurden die zu untersuchenden Proteine mit 15 % normalem Humanserum (NHS) (für den AW), 1 % NHS (für den KW) oder 2 % NHS (für den LW) mit AW-Puffer (für den AW) (s. Tabelle 37) bzw. GVB⁺⁺ (für den KW und LW) auf ein Gesamtvolumen von je 100 µl aufgefüllt und für 15 min bei 37 °C und 350 rpm vorinkubiert.

Nach erfolgter Blockierung wurde erneut dreimal mit je 100 µl WiELISA-Waschpuffer gewaschen und die vorinkubierten Reaktionsansätze in die Kavitäten hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation der Reaktionsansätze für 1 h bei 37 °C im Brutschrank.

Anschließend wurde wieder dreimal mit je 100 µl WiELISA-Waschpuffer gewaschen und der primäre Antikörper (Neoepitop-spezifischer, monoklonaler Anti-C5b-9-Antikörper, im Verhältnis 1:500 in WiELISA-Waschpuffer verdünnt) hinzugegeben. Nach einer Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken wurde erneut dreimal mit je 100 µl WiELISA-Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde je 100 µl des HRP-konjugierten sekundären Antikörpers (Anti-Maus-IgG-Antikörper, im Verhältnis

1:1000 in WiELISA-Waschpuffer verdünnt, s. Kapitel 2.3) pro Kavität hinzugefügt und erneut für 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken inkubiert.

Nach einem erneuten Waschvorgang, bei dem pro Kavität dreimal mit je 100 µl WiELISA-Waschpuffer gewaschen wurde, folgte die Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe. Hierfür wurde eine Tablette *ortho*-Phenylendiamin (20 mg) (s. Kapitel 2.8.2) in 20 ml Substratpuffer (s. Tabelle 36) vollständig gelöst und kurz vor Applikation 20 µl Wasserstoffperoxid hinzugeben. Anschließend wurden je 100 µl dieser Substratlösung in die entsprechenden Kavitäten pipettiert. Die Reaktion wurde für einige Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken inkubiert, bis sich ein Farbumschlag zeigte, und schließlich durch die Zugabe von je 50 µl ELISA-Stopplösung (s. Tabelle 36) terminiert. Es folgte eine Messung im ELISA-Reader bei einer Absorption von 490 nm.

Tabelle 37: Zusammensetzung der verwendeten Puffer für den Komplement-Aktivierungs-Assay (WiELISA)

Puffer	Zusammensetzung
WiELISA-Waschpuffer	0,05 % (v/v) Tween20 ad 1 l TBS
WiELISA-Blockierungspuffer	0,05 % (v/v) Tween20 1 % (w/v) BSA ad 100 ml PBS Lagerung bei 4 °C
AW-Puffer	20 mM HEPES 0,1 % (w/v) Gelatine 140 mM Natriumchlorid 5 mM Magnesiumchlorid 10 mM EGTA pH 7,5 ad 1 l Aqua bidest. sterilfiltriert (0,22 µm) Lagerung bei 4 °C

2.14 Spezielle Methoden

2.14.1 Hämolytischer Assay

Um die inhibitorische Aktivität von Borrelienproteinen auf den terminalen Weg und somit die Bildung des MAK nachzuweisen, wurden sogenannte hämolytische Assays durchgeführt. Hierfür wurden 500 µl frische Schaferythrozyten dreimal mit jeweils 11,5 ml GVB⁺⁺ für je 5 min bei 900 × g und 4 °C gewaschen. Anschließend wurden die Erythrozyten in 6 ml GVB⁺⁺ resuspendiert und die Zellzahl bestimmt (s. Kapitel 2.10.4). Danach wurden die Zellen auf eine Konzentration von 5 × 10⁸ Erythrozyten/ml eingestellt.

Währenddessen wurden die verwendeten Proteine in den Konzentrationen 0,5, 1 sowie 2 µM in je 10 µl GVB⁺⁺ vorbereitet und auf Eis gelagert. Pro Reaktionsansatz wurde außerdem eine Mischung aus den Komplementkomponenten C7 (20 µg/ml), C8 (4 µg/ml) und C9 (20 µg/ml) in einem Gesamtvolumen von 20 µl vorbereitet und auf Eis gelagert.

Im Anschluss wurden je 30 µl Erythrozytensuspension in 1,5 ml Reaktionsgefäße pro Reaktionsansatz mit jeweils 1,5 µg C5b-6-Komplex für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden invertiert und weitere 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Parallel hierzu wurden die Komplementkomponenten zu den Reaktionsansätzen mit den unterschiedlichen Proteinkonzentrationen hinzugefügt und auch diese Reaktionen wurden für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Diese beiden Arbeitsschritte wurden so synchronisiert, dass die jeweiligen Inkubationszeiten gleichzeitig beendet waren.

Die mit Komplement vorinkubierten Proteinlösungen wurden zu den mit C5b-6 vorinkubierten Schaferythrozyten hinzugefügt und die Suspension für 30 min bei 37 °C inkubiert, bevor die Zellen bei 2000 × g für 5 min bei 4 °C sedimentiert wurden. Der Überstand wurde anschließend in eine Mikrotiterplatte mit flachem Boden (F8 Maxisorp Nunc-Immuno Module) pipettiert und die Absorption bei 414 nm im ELISA-Reader Power Wave HT (Biotek) gemessen.

2.14.2 Serumbakterizidie-Assay

Um nachzuweisen, inwieweit die Expression von ORF10 Serum-sensible Borrelien vor der Komplement-vermittelten Bakteriolyse schützt, wurden Serumbakterizidie-Assays durchgeführt. Für diesen Test wurden *B. garinii*-Zellen zur Verfügung gestellt, die einen Shuttle-Vektor mit dem ORF10-kodierenden Gen enthielten. Die zu untersuchenden Borrelienzellen wurden über 6 h in 25 % NHS inkubiert, wobei zu mehreren Zeitpunkten die Anzahl an motilen, lebenden Borrelienzellen mikroskopisch bestimmt wurde.

Zu Beginn des Versuches wurden je 10 ml einer exponentiell wachsenden Borrelienkultur bei 5000 × g und Raumtemperatur für 20 min zentrifugiert und das Sediment anschließend in 500 µl BSK-H-Medium (s. Kapitel 2.9.1) resuspendiert. Es folgte die Bestimmung der Zellkonzentration mittels Dunkelfeldmikroskopie (s. Kapitel 2.10.4). Anschließend wurden je 2×10^7 Zellen mit BSK-H-Medium auf ein Gesamtvolumen von 150 µl aufgefüllt. Nun wurden zu jedem Reaktionsansatz je 50 µl Humanserum hinzugegeben und je 100 µl der einzelnen Reaktionsansätze in eine Mikrotiterplatte überführt. Um die lebenden Zellen zum Zeitpunkt $t = 0$ h zu bestimmen, wurden 50 µl BSK-H-Medium statt 50 µl NHS hinzugegeben und die Zellzahl sofort ermittelt. Die Mikrotiterplatte wurde anschließend mit einer Klebefolie verschlossen, um mikroaerophile Bedingungen für ein optimales Borrelienzellwachstum zu gewährleisten. Die Reaktionsansätze wurden bei 33 °C für 6 h im Brutschrank inkubiert, wobei zu den Zeitpunkten $t = 1, 2, 4$ und 6 h die Anzahl der motilen Borrelienzellen mittels Dunkelfeldmikroskopie (s. Kapitel 2.10.4) bestimmt wurde. Die zu zählenden Borrelienzellen wurden vorsichtig resuspendiert, je 10 µl 1:100 in PBS⁺⁺ verdünnt und die motilen Zellen quantifiziert.

Proteine, je 500 ng für die SDS-PAGE und 1000 ng für die Western-Blot-Analyse, wurden in einem 10 % TT-SDS-Polyacrylamidgel geelektrophoretisch separiert (s. Kapitel 2.12.1). Die Visualisierung der Proteine erfolgte mittels Färbung mit Silbernitrat (s. Kapitel 2.12.3) sowie via Western-Blot-Analyse (s. Kapitel 2.13.1) anhand eines Anti-His₆-Antikörpers. Das SDS-Polyacrylamidgel bzw. die Nitrocellulosemembran wurden densitometrisch dokumentiert.

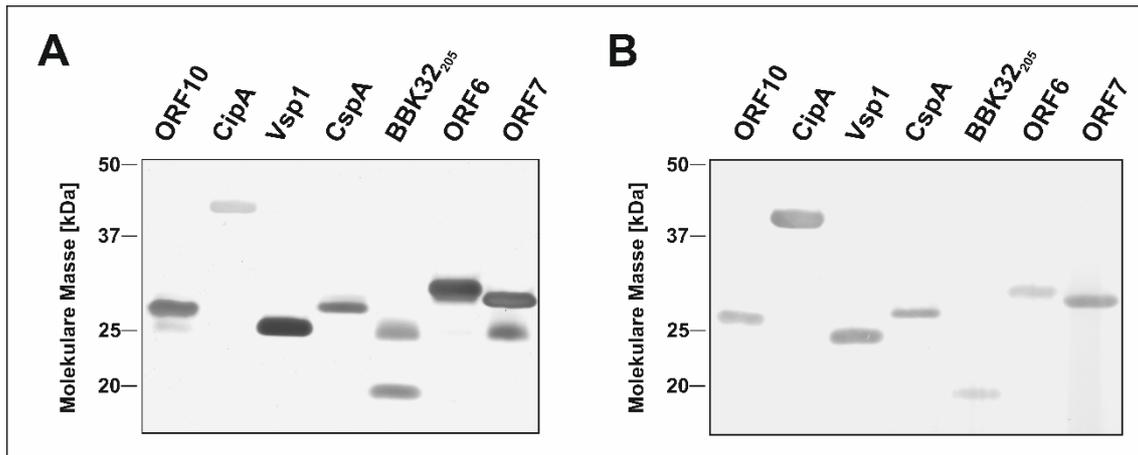


Abbildung 13: Reinheitsüberprüfung der isolierten His₆-getaggtten Proteine

Zur Überprüfung der Reinheit der isolierten His₆-getaggtten Proteine wurden je 500 ng Protein in einem 10 % TT-SDS-Polyacrylamidgel separiert und anschließend durch eine Färbung mit Silbernitrat (A) bzw. durch eine Western-Blot-Analyse (B) visualisiert. Hierbei wurden die transferierten Proteine durch einen monoklonalen Anti-His₆-Antikörper (1:1000 verdünnt) detektiert. Der Proteinstandard (Precision Plus Protein™ Unstained Standards bzw. Dual Color Standards) ist jeweils links angegeben.

Abbildung 13 ist zu entnehmen, dass alle Proteine einen hohen Reinheitsgrad aufwiesen. Es zeigten sich keine deutlichen Verunreinigungen der Proteine nach Anfärben des SDS-Polyacrylamidgels mit Silbernitrat. Allerdings konnte bei ORF10, ORF7 und BBK32₂₀₅ ein weiteres Protein nachgewiesen werden, welches jedoch nicht durch die mit dem Anti-His₆-Antikörper durchgeführte Western-Blot-Analyse detektiert wurde. Aus diesem Grund lässt der hohe Reinheitsgrad darauf schließen, dass diese Proteine für die weiteren funktionellen Analysen eingesetzt werden konnten.

3.2 Charakterisierung der Komplement-inhibitorischen Aktivität des ORF10-Proteins aus *B. recurrentis*

3.2.1 Nachweis der inhibierenden Eigenschaften des Proteins ORF10 auf die verschiedenen Komplementaktivierungswege

Mithilfe von funktionellen Analysen sollte überprüft werden, ob das ORF10-Protein inhibitorisch auf die Aktivierung des humanen Komplementsystems wirkt. Um die Interaktion von ORF10 mit Komplement zu charakterisieren, wurden steigende Konzentrationen verwendet (0,2, 0,5, 0,75, 1, 2 und 4 μM), um eine dosisabhängige Inhibition auf die drei Komplementaktivierungswege nachzuweisen.

Initial wurden entweder 300 ng IgM (KW), 1 μg LPS (AW) oder 10 μg Mannan (LW) in je 100 μl ELISA-Immobilisierungspuffer pro Reaktionsansatz über Nacht bei 4 °C immobilisiert. IgM dient als natürlicher Ligand des C1-Komplexes des klassischen Weges, während das LPS als Bestandteil der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien den alternativen Weg aktiviert. Mannan ist ein Ligand für MBL und führt somit zur Aktivierung des Lektin-Weges. Die Analyse erfolgte analog wie in Kapitel 2.13.3 beschrieben. Hierfür wurden die zu untersuchenden Proteine mit jeweils 1 % NHS in 100 μl GVB⁺⁺ (KW), 15 % NHS in 100 μl AW-Puffer (AW) oder 2 % NHS in 100 μl GVB⁺⁺ (LW) inkubiert. Nach Zugabe der vorinkubierten Reaktionsansätze wurde die Entstehung des MAK mithilfe des Anti-C5b-9-Antikörpers detektiert. BSA sowie ein Reaktionsansatz ohne Proteine wurden als Negativkontrollen verwendet. Die Borrelienproteine BBK32₂₀₅¹⁸⁸ (KW) und CspA¹⁸⁹ von *B. burgdorferi* (AW) sowie CipA von *Acinetobacter baumannii*¹⁸⁵ (KW, AW und LW) dienten als Positivkontrollen, da ihr inhibitorisches Potenzial auf die jeweiligen Komplementwege bereits beschrieben ist.

3.2.1.1 Untersuchung zum inhibitorischen Potenzial von ORF10 auf den klassischen Weg

Die durchgeführten Analysen mit steigenden Proteinkonzentrationen ergaben, dass ORF10 den klassischen Weg dosisabhängig inhibiert (s. Abbildung 14). Eine signifikante

Inhibition konnte deutlich ab einer Konzentration von 2 μM detektiert werden, wobei eine Interaktion vermutlich bereits ab 0,75 μM stattfand. CipA zeigte eine Inhibition bereits ab 0,75 μM und bei BBK32₂₀₅ als Positivkontrolle präsentierte sich eine deutliche Inhibition bereits ab 0,2 μM . ORF6 und ORF7 inhibierten den klassischen Weg bei einer höheren Konzentration von 4 μM . Für Vsp1 und BSA hingegen konnte in allen verwendeten Konzentrationen keine Komplement-inhibitorische Aktivität auf den klassischen Weg nachgewiesen werden. Die gemessenen Werte für BSA lagen auf dem Niveau der Negativkontrolle, die Werte für Vsp1 lagen geringfügig höher. Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich vermuten, dass ORF10 ein inhibitorisches Potenzial auf den klassischen Weg besitzt, welches vergleichbar mit CipA von *A. baumannii* ist, aber geringer ausgeprägt ist als bei dem Kontrollprotein BBK32₂₀₅ von *B. burgdorferi*.

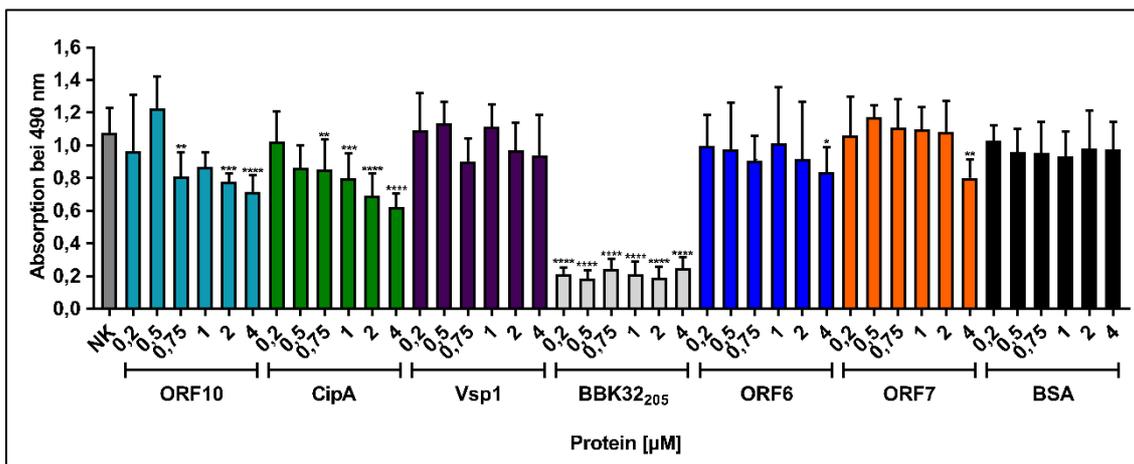


Abbildung 14: Dosisabhängige Inhibition des klassischen Weges durch ORF10

Es wurde zunächst IgM über Nacht immobilisiert und die Kavitäten wurden anschließend blockiert. Daraufhin wurde 1 % NHS mit den jeweiligen Proteinkonzentrationen vorinkubiert und in die Kavitäten pipettiert. Mithilfe des Anti-C5b-9-Antikörpers (1:500 verdünnt) wurde der MAK detektiert und die Absorption bei 490 nm gemessen. Die dargestellten Mittelwerte entsprechen jeweils Triplikaten dreier unabhängiger Versuche. Die statistische Auswertung erfolgte in Bezug auf die gemessenen Werte der Negativkontrolle (NK) mittels einfaktoriellen ANOVA-Tests mit multiplem Vergleichstest nach Bonferroni mit einem Konfidenzintervall von 95 %. *) $p \leq 0,1$; **) $p \leq 0,01$; ***) $p \leq 0,001$; ****) $p \leq 0,0001$. Für die nicht gekennzeichneten Werte konnte keine statistische Signifikanz ermittelt werden.

3.2.1.2 Untersuchung zum inhibitorischen Potenzial von ORF10 auf den alternativen Weg

Die Untersuchungen zur Inaktivierung des alternativen Weges ergaben, dass eine signifikante Hemmung durch ORF10 bereits ab 0,75 μM erzielt werden konnte

(s. Abbildung 15). Sowohl CspA als Positivkontrolle als auch Vsp1 zeigten eine Inhibition des alternativen Weges bereits ab 0,2 μM , wobei die Inhibition durch CspA stärker ausgeprägt war. ORF6 und ORF7 ließen, wie bereits beschrieben,¹⁸⁰ ein inhibitorisches Potenzial erkennen. Die gemessenen OD-Werte für BSA lagen etwa auf dem Niveau der Negativkontrolle und unterlagen Test-konformen Schwankungen.

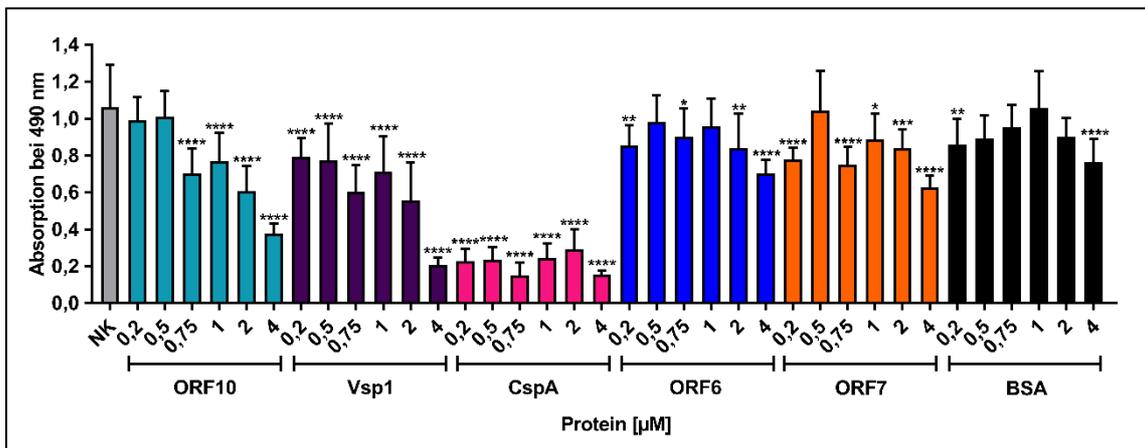


Abbildung 15: Dosisabhängige Inhibition des alternativen Weges durch ORF10

Es wurde zunächst LPS über Nacht bei 4 °C immobilisiert und die Kavitäten wurden anschließend blockiert. Daraufhin wurde 15 % NHS mit den jeweiligen Proteinkonzentrationen vorinkubiert und in die Kavitäten pipettiert. Mithilfe des Anti-C5b-9-Antikörpers (1:500 verdünnt) wurde der MAK detektiert und die Absorption bei 490 nm gemessen. Die dargestellten Mittelwerte entsprechen jeweils Triplikaten dreier unabhängiger Versuche. Die statistische Auswertung erfolgte in Bezug auf die gemessenen Werte der Negativkontrolle (NK) mittels einfaktoriellen ANOVA-Tests mit multiplem Vergleichstest nach Bonferroni mit einem Konfidenzintervall von 95 %. *) $p \leq 0,1$; **) $p \leq 0,01$; ***) $p \leq 0,001$; ****) $p \leq 0,0001$. Für die nicht gekennzeichneten Werte konnte keine statistische Signifikanz ermittelt werden.

3.2.1.3 Untersuchung zum inhibitorischen Potenzial von ORF10 auf den Lektin-Weg

Die Untersuchungen zur Inaktivierung des Lektin-Weges ergaben, dass ORF10 ebenfalls eine dosisabhängige Inhibition auf diesen Aktivierungsweg aufwies (s. Abbildung 16). Ab einer Konzentration von 2 μM konnte eine Hemmung beobachtet werden, die sich bei einer Konzentration von 4 μM als signifikant herausstellte. CspA als Positivkontrolle zeigte eine signifikante Hemmung bereits bei einer Konzentration von 0,2 μM . Vsp1, ORF6 und ORF7 wiesen kein inhibitorisches Potenzial auf den Lektin-Weg auf. Die für BSA gemessenen Werte lagen etwa auf dem gleichen Niveau wie die Negativkontrolle (NK).

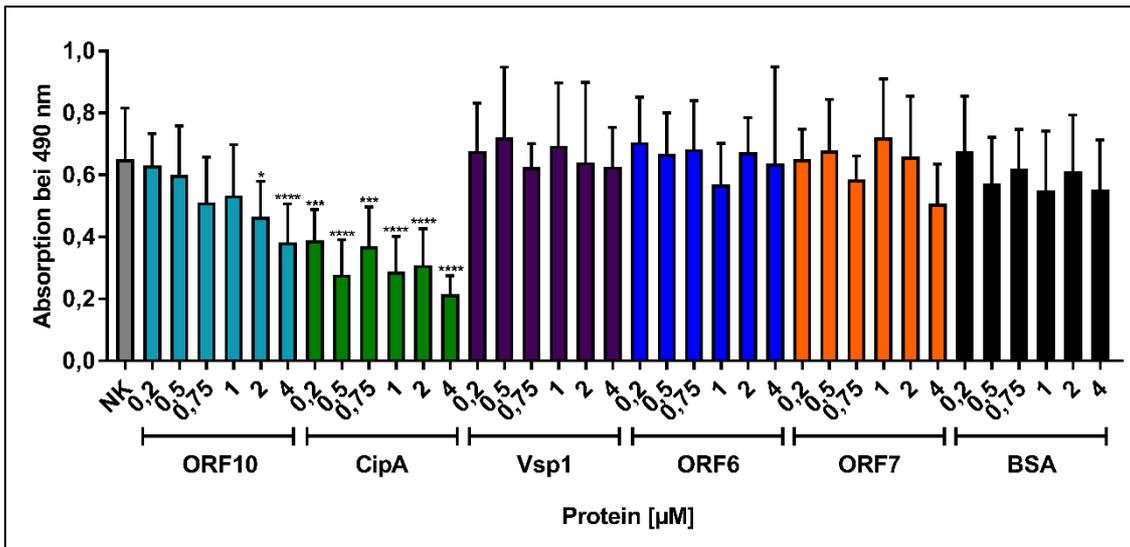


Abbildung 16: Dosisabhängige Inhibition des Lektin-Weges durch ORF10

Es wurde zunächst Mannan über Nacht bei 4 °C immobilisiert und die Kavitäten wurden anschließend blockiert. Daraufhin wurde 2 % NHS mit den jeweiligen Proteinkonzentrationen vorinkubiert und in die Kavitäten pipettiert. Mithilfe des Anti-C5b-9-Antikörpers (1:500 verdünnt) wurde der MAK detektiert und die Absorption bei 490 nm gemessen. Die dargestellten Mittelwerte entsprechen jeweils Triplikaten dreier unabhängiger Versuche. Die statistische Auswertung erfolgte in Bezug auf die gemessenen Werte der Negativkontrolle (NK) mittels einfaktoriellem ANOVA-Test mit multiplem Vergleichstest nach Bonferroni mit einem Konfidenzintervall von 95 %. *) $p \leq 0,1$; ***) $p \leq 0,001$; ****) $p \leq 0,0001$. Für die nicht gekennzeichneten Werte konnte keine statistische Signifikanz ermittelt werden.

3.2.2 Untersuchung zur Interaktion von ORF10 mit Komponenten des klassischen und des Lektin-Weges des Komplementsystems

Nachdem in den vorausgegangenen Versuchen eine Inhibition des klassischen (s. Kapitel 3.2.1.1) und des Lektin-vermittelten Weges durch ORF10 (s. Kapitel 3.2.1.3) gezeigt werden konnte, wurde der Frage nachgegangen, welche Komponenten des Komplementsystems an einer Interaktion beteiligt sein könnten. Aus diesem Grund wurden Bindungsstudien mit ausgewählten Komponenten des klassischen Weges (C1q, C1r, C1s) sowie mit Komponenten, die sowohl beim klassischen als auch beim Lektin-Weg involviert sind (C2, C4 und C4b), durchgeführt.

Für initiale Bindungsversuche wurden pro Kavität je 500 ng von ORF10 sowie parallel zwei Kontrollproteine, ORF6 und BSA, bei 4 °C über Nacht in je 100 µl Immobilisierungspuffer auf einer Mikrotiterplatte (5 ng/µl) immobilisiert. Anschließend wurden je 500 ng der Komplementkomponenten C1q, C2, C4 und C4b hinzugefügt. Nach

erfolgter Inkubation wurde die Protein-Protein-Interaktion mittels spezifischer Anti-Komplement-Antikörper (s. Tabelle 5) detektiert (s. Kapitel 2.13.2.1). ORF6 wurde als Negativkontrolle verwendet, da dieses Protein in vorangegangenen Untersuchungen nur eine Inhibition des alternativen Weges, nicht aber des klassischen oder Lektin-vermittelten Weges bewirkte.¹⁸⁰ BSA wurde in allen Untersuchungen als Negativkontrolle verwendet, um eine unspezifische Bindung zwischen Komplementkomponenten und primären Antikörpern ausschließen zu können.

Eine statistisch signifikante Bindung an ORF10 ließ sich für alle vier untersuchten Komplementkomponenten C1q, C2, C4 und C4b nachweisen (s. Abbildung 17). Die Bindung von C1q, C4 und C4b an ORF6 ist ebenfalls als signifikant ($p \leq 0,001$ bzw. $p \leq 0,0001$) zu beurteilen, während die Bindung von C2 an ORF6 mit einem p-Wert von $\leq 0,1$ als unwahrscheinlich anzusehen ist.

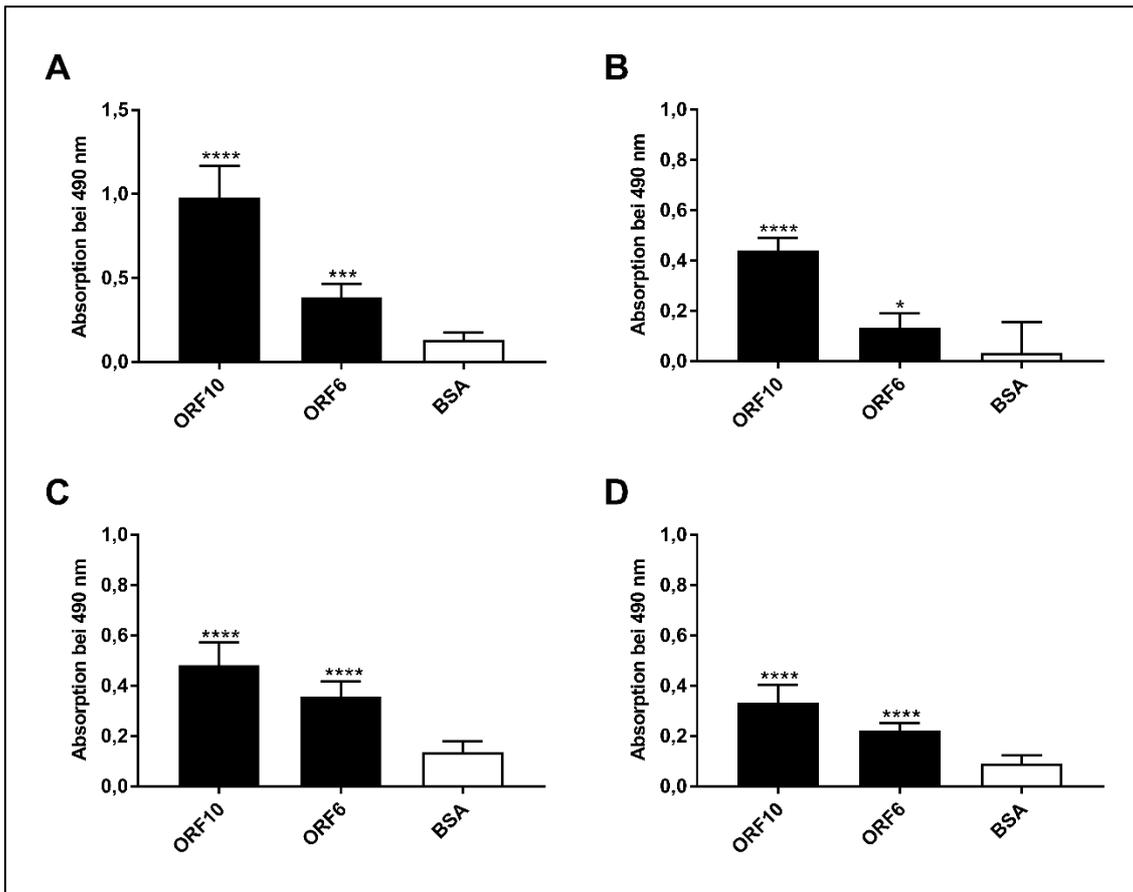


Abbildung 17: Nachweis der Bindung von ORF10 an verschiedene Komplementkomponenten des klassischen und des Lektin-Weges

Für folgende Komplementkomponenten wurde das Bindungsverhalten an ORF10 untersucht: (A) C1q, (B) C2, (C) C4 und (D) C4b. Hierfür wurden je 500 ng von ORF10, ORF6 sowie BSA in je 100 μ l Immobilisierungspuffer über Nacht bei 4 °C immobilisiert. Anschließend wurden die Kavitäten der Mikrotiterplatte blockiert und je 500 ng der zu analysierenden Komplementkomponenten hinzugefügt. Zur Detektion der Bindung wurden spezifische Antikörper (1:1000 verdünnt) verwendet und die Antigen-Antikörperkomplexe bei einer Absorption bei 490 nm gemessen. Hier dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen, die je als Triplikat durchgeführt wurden. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktoriellen ANOVA-Tests mit multiplen Vergleichstest nach Bonferroni und einem Konfidenzintervall von 95 %. Als Bezugsgröße zur Berechnung des Signifikanzniveaus dienten die Absorptionswerte von BSA. *) $p \leq 0,1$; ***) $p \leq 0,001$; *****) $p \leq 0,0001$.

Um die Interaktion von ORF10 mit weiteren Komponenten des C1-Komplexes zu untersuchen, wurden die Komplementfaktoren C1r und C1s in die Untersuchungen miteinbezogen. Für diese Analysen standen zwar gereinigtes C1r und C1s zur Verfügung, jedoch keine spezifischen Antikörper für die Detektion. Aus diesem Grund wurden die Komplementkomponenten auf der Mikrotiterplatte immobilisiert und die Interaktion mit ORF10 durch einen Anti-His₆-Antikörper detektiert. In entsprechender Weise

wurden auch die Komplementfaktoren C2, C4 und C4b in diese vergleichenden Analysen mit einbezogen.

Von den zu untersuchenden Komplementkomponenten C1q, C1r, C1s, C2, C4, und C4b wurden jeweils 500 ng bei 4 °C über Nacht in je 100 µl Immobilisierungspuffer pro Kavität immobilisiert. Als Negativkontrollen wurden je 100 µl des Immobilisierungspuffers ohne Komplementkomponenten eingesetzt und über Nacht inkubiert, um eine unspezifische Bindung zwischen den untersuchten Proteinen und dem primären Antikörper ausschließen zu können. Anschließend wurden je 500 ng von ORF10 sowie von den Kontrollproteinen ORF6 von *B. recurrentis* A17¹⁸⁰ und BBK32₂₀₅ von *B. burgdorferi* B31 hinzugegeben, da für letzteres bereits beschrieben wurde, dass es den klassischen Weg über die Bindung an C1r inhibiert.¹⁸⁸ Nach der Inkubation wurde die Bindung mittels eines Anti-His₆-Antikörpers (s. Tabelle 5) detektiert (s. Kapitel 2.13.2.1).

Es zeigte sich eine signifikante Bindung von ORF10 an C1q, C1s ($p \leq 0,0001$) sowie an C4b ($p \leq 0,01$), wobei die gemessenen Absorptionswerte im Fall von C1q bei 0,5 und im Fall von C1s zwischen 0,2 und 0,3 sehr niedrig lagen (s. Abbildung 18 A). In gleicher Weise ergaben sich sehr niedrige Absorptionswerte (0,2) für die Interaktion von C4b mit ORF10. Eine Bindung von ORF10 an C1r, C2 oder C4 konnte mittels ELISA nicht nachgewiesen werden. Für ORF6 zeigte sich lediglich eine Bindung an C1q ($p \leq 0,0001$) mit Absorptionswerten zwischen 0,3 und 0,4 (s. Abbildung 18 B). Das Kontrollprotein BBK32₂₀₅ wies eine deutliche Bindung an C1r ($p \leq 0,0001$) mit einem Absorptionswert von 1,4 auf (s. Abbildung 18 C). Es konnte auch eine Bindung von BBK32₂₀₅ an C1q ($p \leq 0,0001$) mit einem Absorptionswert von 0,5 nachgewiesen werden, wobei eine Bindung an C1s ($p \leq 0,1$) mit Absorptionswerten zwischen 0,3 und 0,4 als eher unwahrscheinlich angesehen werden kann.

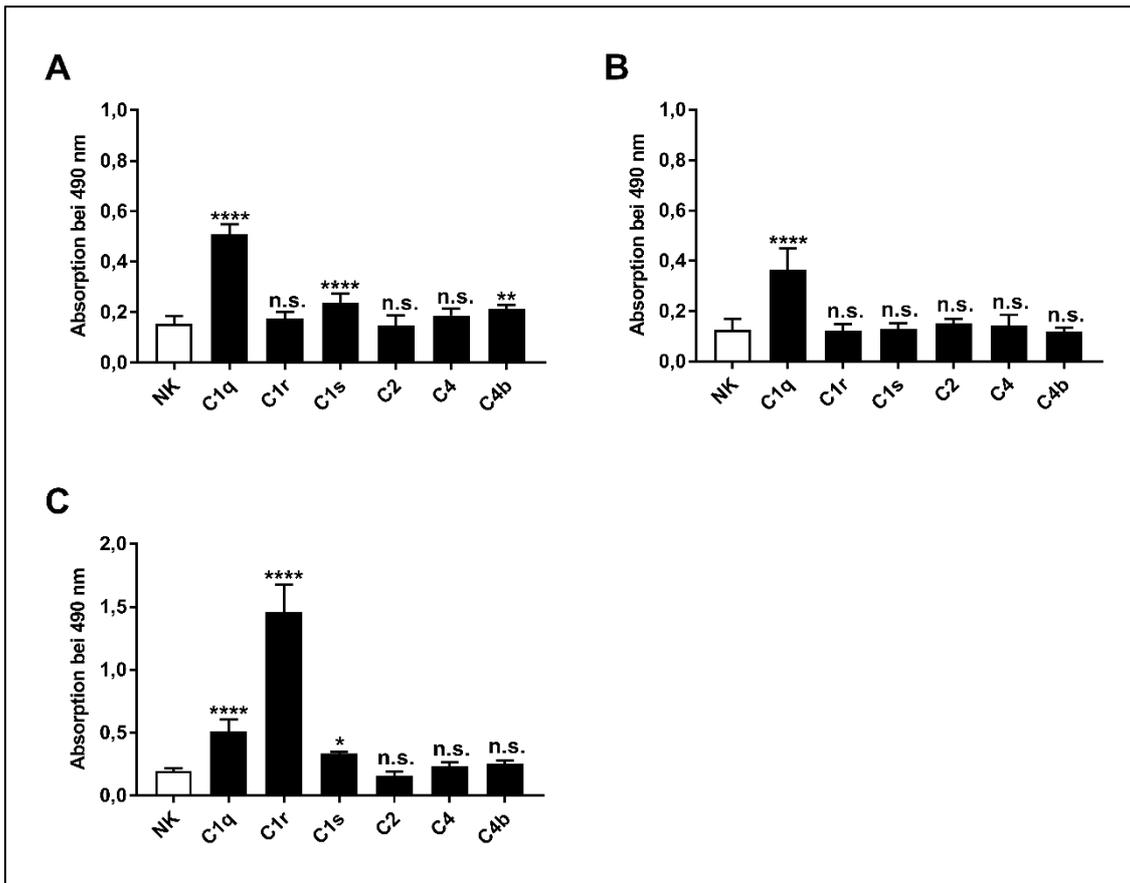


Abbildung 18: Nachweis der Bindung von verschiedenen Borrelienproteinen an Komplementkomponenten des klassischen und des Lektin-Weges

Das Bindungsverhalten an verschiedene Komplementkomponenten wurde für ORF10 (A), ORF6 (B) sowie BBK32₂₀₅ (C) im ELISA untersucht. Es wurden je 500 ng der zu untersuchenden Komplementkomponenten in je 100 µl Immobilisierungspuffer über Nacht bei 4 °C immobilisiert. Als Negativkontrolle (NK) dienten je 100 µl Immobilisierungspuffer ohne Komplementkomponenten. Anschließend wurden jeweils 500 ng der Borrelienproteine hinzugefügt und die Protein-Protein-Komplexe mithilfe eines Anti-His₆-Antikörpers (1:1000 verdünnt) detektiert. Die dargestellten Daten stellen Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen dar, die je als Triplikat durchgeführt wurden. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktoriellen ANOVA-Tests mit multiplem Vergleichstest nach Bonferroni und einem Konfidenzintervall von 95 %. Als Bezugsgröße zur Berechnung des Signifikanzniveaus dienten die Absorptionswerte der Negativkontrolle. n.s., nicht signifikant; *) $p \leq 0,1$; **) $p \leq 0,01$; ***) $p \leq 0,001$; ****) $p \leq 0,0001$.

Da sich in den vorausgegangenen Analysen eine Interaktion zwischen ORF10 und C1q, C1s, C2, C4 sowie C4b zeigte, wurden konzentrationsabhängige Bindungsstudien mit diesen Komplementkomponenten durchgeführt (s. Kapitel 2.13.2.2), um die Effizienz der Bindung von ORF10 zu eruieren. Für diese Analysen wurden je 500 ng gereinigtes ORF10 immobilisiert und anschließend die Komplementkomponenten C1q, C2, C4 sowie C4b in steigender Konzentration (0, 5, 10, 15, 20 und 25 nM) appliziert.

Wie in Abbildung 19 dargestellt, ließen sich die Versuchsergebnisse der vorangegangenen Bindungsanalysen bestätigen. Es zeigte sich ein charakteristischer, Konzentrations-abhängiger Verlauf für C1q und C4b. Die Bindung von C1q an ORF10 (s. Abbildung 19A) konnte bereits ab einer Zugabe von 5 nM C1q als signifikant ($p \leq 0,0001$) gewertet werden und die Bindungskurve von C4b (s. Abbildung 19B) zeigte bereits ab einer Konzentration von 10 nM C4b eine Signifikanz ($p \leq 0,0001$). Allerdings konnte selbst bei Zugabe von 25 nM bei beiden der untersuchten Komplementkomponenten keine Sättigung erzielt werden. Wie zu erwarten, zeigten die Absorptionswerte bei BSA keinen oder nur einen moderaten Anstieg.

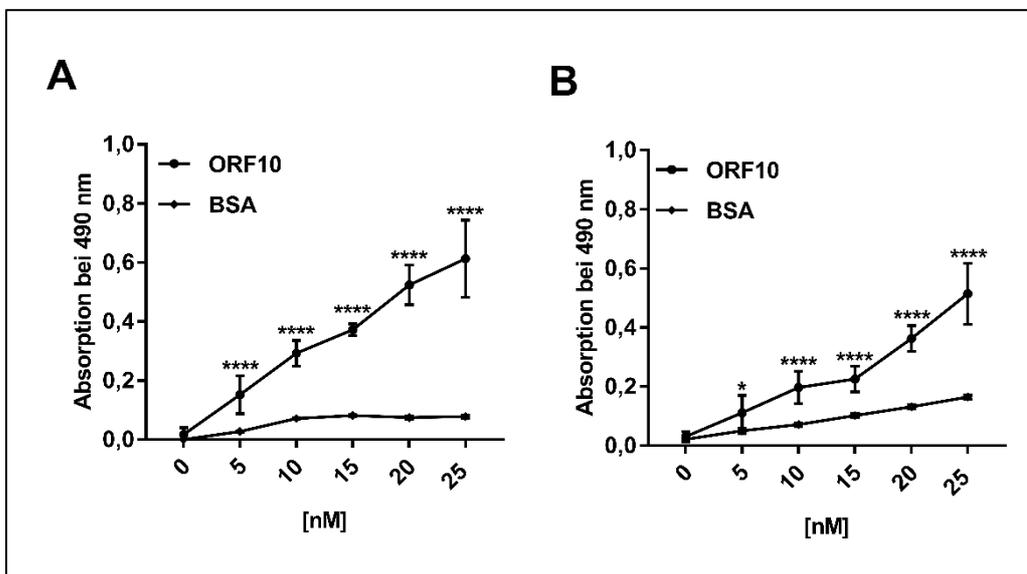


Abbildung 19: Vergleichende Untersuchungen zur konzentrationsabhängigen Bindung von C1q und C4b an ORF10

Es wurden je 500 ng ORF10 in den Kavitäten einer Mikrotiterplatte über Nacht bei 4 °C immobilisiert. Nach dem Blockieren mit 0,2 % Gelatine für 1 h bei Raumtemperatur wurden unterschiedliche Konzentrationen (0, 5, 10, 15, 20, 25 nM) an C1q (A) bzw. C4b (B) hinzugegeben, die Bindung an ORF10 mithilfe eines spezifischen Antikörpers für C1q bzw. C4b detektiert und die Absorption bei 490 nm gemessen. Hier dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen, die je als Triplikat durchgeführt worden sind. Die Bindungskurve wurde mittels nichtlinearer Regression als einfaches Bindungsmodell erstellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktoriellen ANOVA-Tests mit multiplem Vergleichstest nach Bonferroni und einem Konfidenzintervall von 95 %. Als Bezugsgröße zur Berechnung des Signifikanzniveaus dienten die Absorptionswerte von BSA. *) $p \leq 0,1$; ****) $p \leq 0,0001$.

Analog wurden auch mit den Komplementfaktoren C2 sowie C4 dosisabhängige Bindungsanalysen durchgeführt, da aufgrund der vorangegangenen Untersuchungen

eine Interaktion vermutet wurde (s. Abbildung 17); allerdings ließen sich hierbei keine konzentrationsabhängigen Bindungskurven erstellen.

Eine dosisabhängige Interaktion von ORF10 mit C1s konnte mangels eines spezifischen Anti-C1s-Antikörpers nicht untersucht werden.

3.2.3 Untersuchung zur Interaktion von ORF10 mit Komponenten des alternativen Weges des Komplementsystems

In den vorangegangenen Versuchen konnte eine Inhibition von ORF10 auch auf den alternativen Komplementweg nachgewiesen werden (s. Abbildung 15). Aus diesem Grund wurden Bindungsstudien mit den Hauptkomponenten C3, C3b und FB, die die C3-Konvertase bilden, sowie mit dem Komplementregulator FH und der Serinprotease FI durchgeführt. C3 und C3b wurden für die Analyse ausgewählt, da sie die zentralen Komponenten des alternativen Weges darstellen. Weiterhin wurde FB, der zusammen mit C3b die funktionell aktive C3-Konvertase bildet, ausgewählt. Darüber hinaus wurde auch die Bindung mit der Komplementkomponente C5 untersucht, da deren Spaltung zur Einleitung der terminalen Sequenz und letztlich zur Bildung des MAK führt.

Pro Kavität wurden je 500 ng der zu untersuchenden Proteine bei 4 °C über Nacht in je 100 µl Immobilisierungspuffer immobilisiert. Es folgte die Applikation von je 500 ng der entsprechenden Komplementkomponenten (C3, C3b, C5, FB, FH und FI). Nach der Inkubation mit den Komplementfaktoren wurde die Bindung mittels spezifischer Antikörper (s. Tabelle 5) detektiert (s. Kapitel 2.13.2.1). BSA wurde hier als Negativkontrolle verwendet, um eine unspezifische Bindung zwischen Komplementkomponenten und primären Antikörpern ausschließen zu können. Weiterhin wurden ORF6 und ORF7 von *B. recurrentis* A17¹⁸⁰ sowie CbiA von *B. miyamotoi* HT31¹⁸⁴ und BGA66 von *B. bavariensis* PBi¹⁸³ als zusätzliche Kontrollen verwendet, da deren Bindungseigenschaften gegenüber verschiedenen Komplementkomponenten bereits beschrieben worden sind.

Eine signifikante Bindung von ORF10 ließ sich für C3 (s. Abbildung 20 A), C3b (s. Abbildung 20 B) und C5 (s. Abbildung 20 C) nachweisen. Die Interaktion von ORF6

und ORF7 mit C3 zeigte ebenfalls ein signifikantes Bindungsverhalten, während die Bindung an C3b von ORF7 deutlicher ausfiel als von ORF6. Wie erwartet, ergab sich für CbiA eine signifikante Bindung von C3b, C3, C5 und FH, während sich für BGA66 eine Bindung mit einem p-Wert von $\leq 0,01$ bei FH zeigte. Für die Bindung von ORF10 an FB (s. Abbildung 20D), FH (s. Abbildung 20 E) oder FI (s. Abbildung 20 F) konnten keine signifikanten Absorptionswerte ermittelt werden. Keines der untersuchten Proteine wies eine Interaktion mit FI auf (s. Abbildung 20 F).

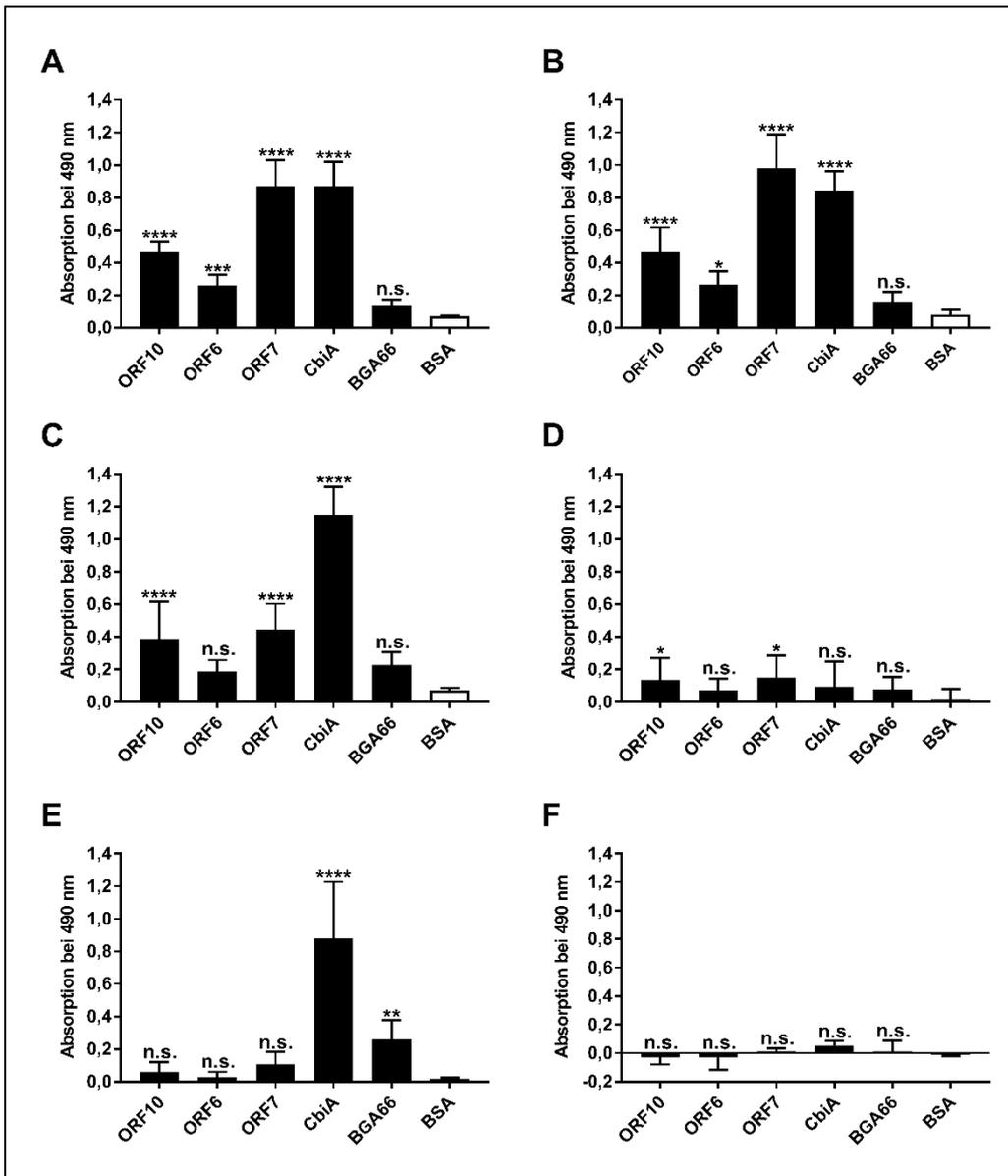


Abbildung 20: Nachweis der Bindung von ORF10 an verschiedene Komplementkomponenten des alternativen Weges

Für folgende Komplementkomponenten wurde das Bindungsverhalten via ELISA untersucht: (A) C3, (B) C3b, (C) C5, (D) Faktor B, (E) Faktor H und (F) Faktor I. Hierfür wurden je 500 ng der zu untersuchenden Proteine in je 100 µl Immobilisierungspuffer über Nacht bei 4 °C immobilisiert. Nach Blockierung wurden je 500 ng der zu analysierenden Komplementkomponenten hinzugefügt. Mithilfe spezifischer Antikörper (1:1000 verdünnt) wurde die Bindung durch Messung der Absorption bei 490 nm detektiert. Die dargestellten Mittelwerte wurden aus mindestens drei unabhängigen Versuchen, die je als Triplikat durchgeführt worden sind, ermittelt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktoriellen ANOVA-Tests mit multiplem Vergleichstest nach Bonferroni und einem Konfidenzintervall von 95 %. Als Bezugsgröße zur Berechnung des Signifikanzniveaus dienten die Absorptionswerte von BSA. n.s., nicht signifikant; *) $p \leq 0,1$; **) $p \leq 0,01$; ***) $p \leq 0,001$; ****) $p \leq 0,0001$.

Da sich die Bindungen von C3 und C3b an ORF10 als signifikant herausstellten, wurden im Anschluss ebenfalls konzentrationsabhängige Bindungsstudien mit diesen beiden

Komplementkomponenten durchgeführt (s. Kapitel 2.13.2.2). Hierzu wurde je 500 ng gereinigtes ORF10 immobilisiert und anschließend wurden C3 und C3b in aufsteigender Konzentration (0, 5, 10, 15, 20 und 25 nM), verdünnt in PBS⁺⁺, in die Kavitäten appliziert und die Bindung mit einem Anti-C3-Antikörper gemessen. BSA diente als Kontrolle für eine unspezifische Bindung.

Wie in Abbildung 21 dargestellt, bestätigten die erhobenen Daten die der vorangegangenen Bindungsanalysen und zeigten einen charakteristischen, dosisabhängigen Kurvenverlauf. Die Bindungen von C3 (s. Abbildung 21 A) und C3b (s. Abbildung 21 B) an ORF10 wurden mit steigender Konzentration stärker, wobei bereits ab 10 nM signifikante Absorptionswerte ($p \leq 0,0001$) erreicht wurden. Auch bei diesen Analysen konnte keine Sättigung bei den beiden untersuchten Komplementkomponenten erzielt werden. Wie zu erwarten, zeigten die Absorptionswerte bei BSA keinen oder nur einen moderaten Anstieg bei der höchsten applizierten Konzentration von C3 bzw. C3b.

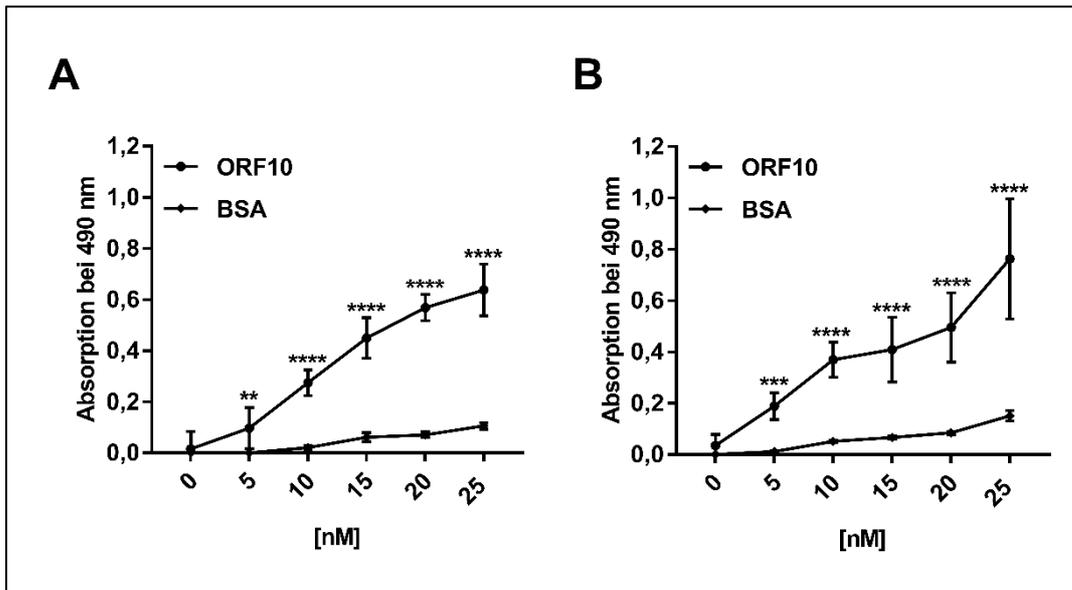


Abbildung 21: Vergleichende Untersuchung der konzentrationsabhängigen Bindung von C3 und C3b an ORF10

Es wurden je 500 ng ORF10 in 100 µl pro Kavität einer Mikrotiterplatte über Nacht bei 4 °C immobilisiert und anschließend für 1 h mit 0,2 % Gelatine bei Raumtemperatur unter Schütteln blockiert. Anschließend wurden in aufsteigender Konzentration (0, 5, 10, 15, 20 und 25 nM) C3 (A) bzw. C3b (B) hinzugegeben. Die Protein-Protein-Komplexe wurden mit einem polyklonalen Anti-C3-Antikörper (1:1000 verdünnt) bei 490 nm detektiert. Die Daten stellen Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen dar, die je als Triplikat durchgeführt worden sind. Die Bindungskurve wurde mittels nichtlinearer Regression als einfaches Bindungsmodell erstellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktoriellen ANOVA-Tests mit multiplem Vergleichstest nach Bonferroni und einem Konfidenzintervall von 95 %. Als Bezugsgröße zur Berechnung des Signifikanzniveaus dienen die Absorptionswerte von BSA. **) $p \leq 0,01$; ***) $p \leq 0,001$; ****) $p \leq 0,0001$.

Die Untersuchungen zur Bindung von ORF10 an verschiedene Komponenten des alternativen Weges ließen eine Interaktion mit C5 vermuten (s. Abbildung 20). Im Rahmen seiner Dissertation führte Dr. Florian Röttgerding ebenfalls dosisabhängige Bindungsstudien von ORF10 mit C5 durch, analog zur Titration von C3 und C3b (s. Abbildung 21). Es zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Verlauf von C5 ($p \leq 0,0001$) für ORF10, wobei für C5 ebenfalls keine Sättigung erzielt werden konnte.⁹ Aus diesem Grund wurden die Ergebnisse nicht in dieser Arbeit dargestellt.

3.2.4 Untersuchung zur Komplement-inhibierenden Eigenschaft von ORF10 auf den terminalen Weg des Komplementsystems

Zum Nachweis der inhibierenden Wirkung von ORF10 auf den terminalen Weg wurde ein unabhängiges Testverfahren zum ELISA durchgeführt. Für die hämolytischen Assays

wurden frische Schaferythrozyten als natürliche Komplementaktivatoren verwendet (s. Kapitel 2.14.1). Die Erythrozyten wurden mit dem C5b-6-Komplex vorinkubiert, welcher sich an die Zellmembran anlagerte, jedoch zu keiner Lyse führte. Parallel wurden die Komplementkomponenten C7, C8 sowie C9 mit den zu untersuchenden Borrelien- bzw. Kontrollproteinen inkubiert. Beide vorinkubierten Reaktionsansätze wurden anschließend vereinigt. Sofern eine Interaktion zwischen den untersuchten Proteinen und den Komplementkomponenten des terminalen Weges stattfindet, sind diese nicht mehr in der Lage, an den C5b-6-Komplex binden. Dadurch kann der MAK nicht mehr ausgebildet werden und die Zellen bleiben vor der Lyse durch Komplement geschützt. Sollten die zu untersuchenden Proteine jedoch keine Bindungsaffinität zu den terminalen Komponenten C7, C8 oder C9 aufweisen, dann kann sich der MAK auf der Oberfläche der Erythrozytenzelle ausbilden. Nach Integration des MAK werden die Erythrozyten lysiert und entsprechend Hämoglobin freigesetzt, welches photometrisch bei 414 nm gemessen werden kann. Je stärker die inhibierende Eigenschaft des Proteins, umso niedriger fallen die gemessenen Werte aus. Als Negativkontrolle diente ein Reaktionsansatz aus NHS und Komplement, welcher ohne Proteinzugabe vorinkubiert wurde, und als Positivkontrolle diente ein Reaktionsansatz mit Vitronektin, dem natürlichen Regulator des terminalen Weges.

Wie in Abbildung 22 zu erkennen ist, konnten die Ergebnisse der WIELISA (s. Abbildung 14, Abbildung 15 und Abbildung 16) durch den hämolytischen Assay bestätigt werden. ORF10 und ORF7 führten bereits ab einer Konzentration von 0,5 μM zu einer signifikanten Inhibition ($p \leq 0,0001$) des terminalen Weges. CspA von *B. burgdorferi* B31 als weitere Positivkontrolle zeigte zwar bereits bei einer Konzentration von 0,5 μM eine inhibitorische Wirkung auf die Bildung des MAK, diese war jedoch erst ab einer Konzentration von 1 μM signifikant. BSA als Negativkontrolle zeigte einen leicht inhibierenden Effekt ($p \leq 0,01$) bei der höchsten Konzentration von 2 μM .

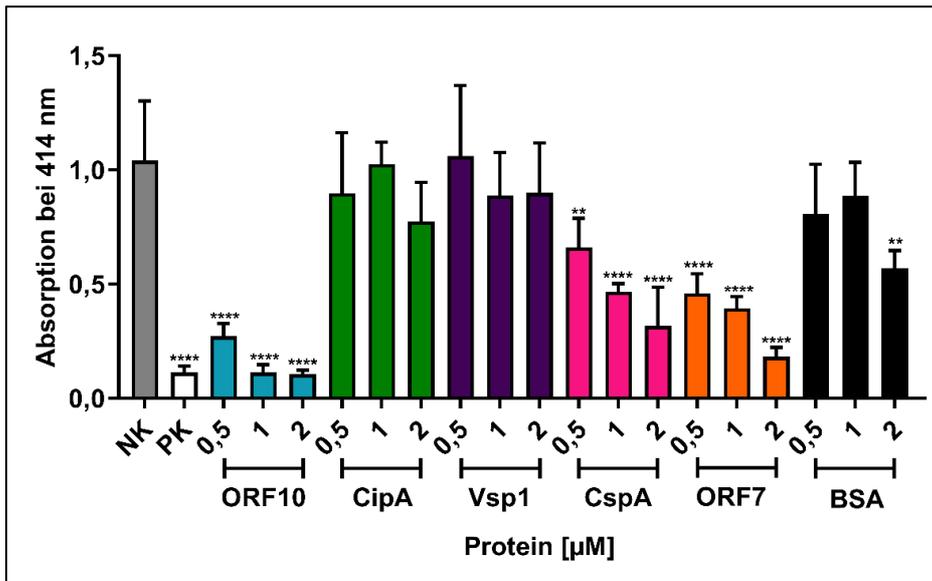


Abbildung 22: Untersuchung der inhibierenden Wirkung von ORF10 auf den terminalen Weg

Für den Versuch wurden Schaferythrozyten mit GVB⁺⁺ gewaschen und auf die benötigte Zellzahl (5×10^8 Erythrozyten/ml) eingestellt. Die Zellen wurden anschließend mit gereinigtem C5b-6-Komplex und parallel die zu untersuchenden Proteine mit den Komplementkomponenten C7, C8 und C9 vorinkubiert. Diese Reaktionsansätze wurden zu den vorinkubierten Erythrozyten hinzugegeben und die Absorption bei 414 nm gemessen. Als Positivkontrolle (PK) diente Vitronektin und ein Reaktionsansatz aus NHS und Komplement als Negativkontrolle (NK). Dargestellt sind die Mittelwerte dreier unabhängiger, als Triplet durchgeführter Versuche. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktoriellen ANOVA-Tests mit multiplem Vergleichstest nach Bonferroni und einem Konfidenzintervall von 95 %. Als Bezugsgröße zur Berechnung des Signifikanzniveaus dienten die Werte der Negativkontrolle. **) $p \leq 0,01$; ***) $p \leq 0,001$; ****) $p \leq 0,0001$.

3.3 Untersuchung zur Bindung von generierten ORF10-Varianten an Komplementkomponenten

Um den molekularen Mechanismus der Interaktion zwischen ORF10 und dem humanen Komplementsystem näher beschreiben zu können, sollten die mit Komplement interagierenden Domänen innerhalb des ORF10-Proteins charakterisiert werden. Im Rahmen des LOEWE-Zentrums DRUID konnte, in Kooperation mit Dr. Karin Fritz-Wolf aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jude Przyborski (Institut für Ernährungswissenschaften, Justus-Liebig-Universität Gießen), die Struktur von ORF10 mittels AlphaFold modelliert werden (s. Abbildung 23). Die Analyse ergab, dass ORF10 aus 245 Aminosäuren besteht, welche in sieben α -Helices und einem β -Faltblatt mit zwei Strängen angeordnet sind.

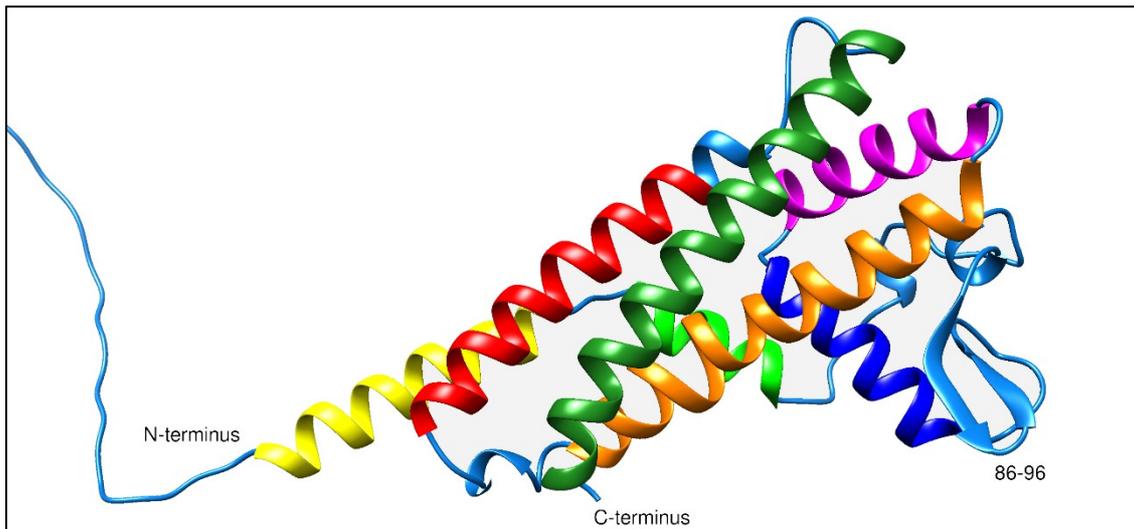


Abbildung 23: Modellerte dreidimensionale Struktur des ORF10-Proteins von *B. recurrentis*

Dargestellt ist die dreidimensionale Struktur des ORF10-Proteins. Die sieben α -Helices sind unterschiedlich eingefärbt, das β -Faltblatt ist mit Nummern gekennzeichnet. Die Abbildung wurde von Dr. Karin Fritz-Wolf zur Verfügung gestellt.

Auf der Basis dieser Computer-gestützten Modellierung des Proteins ORF10 anhand der bekannten Struktur des ORF7-Proteins⁹ (s. Abbildung 24) wurden solche Aminosäuren bzw. Bereiche ausgewählt, die potenziell bei der Interaktion mit Komplementkomponenten beteiligt sein können. Für ORF10 wurde Cystein an Position 156 sowie 227 ausgewählt, welches durch Serin substituiert werden sollte, sowie Isoleucin an Position 220, welches durch Leucin substituiert werden sollte. Darüber hinaus sollte zwischen der Position 203 und 220 eine Deletion eingefügt werden, da anhand der Modellierung vermutet wurde, dass sich in dieser Region des ORF10-Proteins eine Loop-Struktur ausbildet, die mit Komplementkomponenten interagieren könnte.

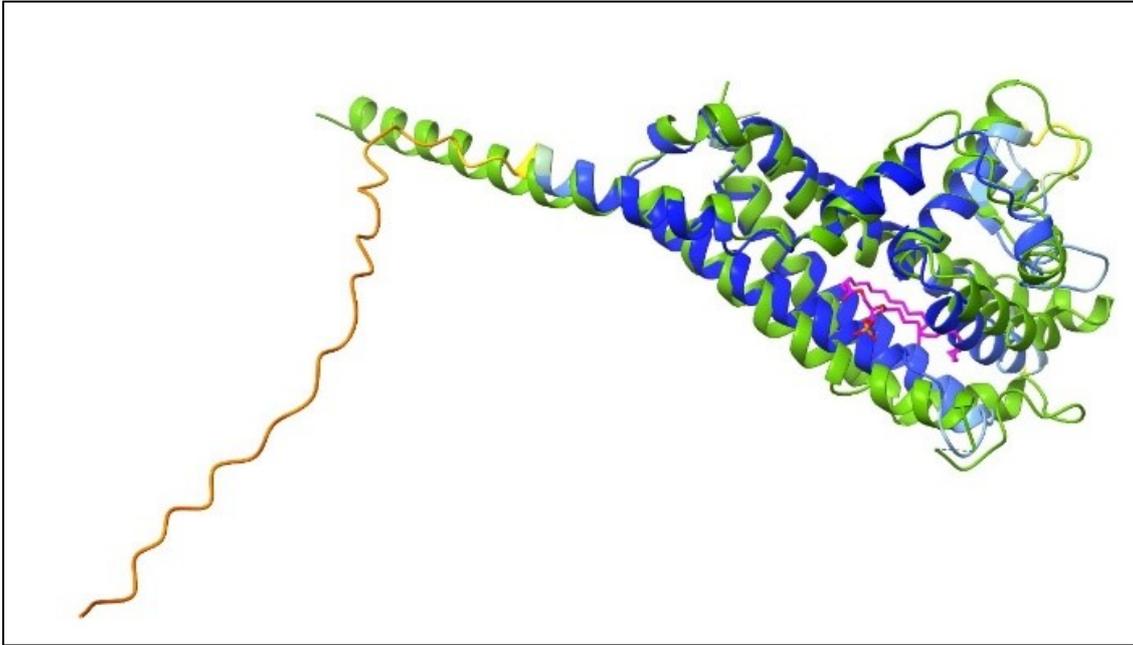


Abbildung 24: Vergleich der übereinandergelegten, dreidimensionalen Struktur von ORF10 mit ORF7

Dargestellt ist eine Überlagerung der dreidimensionalen Struktur von ORF10 (in Blau) im Vergleich zur dreidimensionalen Struktur von ORF7 (in Grün). Die Abbildung wurde von Dr. Karin Fritz-Wolf zur Verfügung gestellt.

3.3.1 Herstellung substituierter bzw. deletierter Varianten von ORF10 durch *In-vitro*-Mutagenese

Zur zielgerichteten Einführung von Aminosäuresubstitutionen wurde eine *In-vitro*-Mutagenese (s. Kapitel 2.11.1) mit dem Plasmid pQE-ORF10 als Matrize und entsprechenden Starteroligonukleotiden (s. Kapitel 2.2.1) durchgeführt, um die entsprechenden Mutationen im ORF10-kodierenden Gen zu generieren. Anschließend wurde die ursprünglich aus *E. coli* isolierte und methylierte Matrizen-DNA durch die Zugabe von *DpnI* hydrolysiert (s. Kapitel 2.11.4). Nach Transformation in *E. coli*-Zellen wurden Plasmid-tragende Zellen auf Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten selektioniert und aus ausgewählten Klonen Plasmide isoliert. Diese wurden anschließend sequenziert, um zu überprüfen, ob die zielgerichteten Mutationen eingeführt wurden, und um auszuschließen, dass weitere, unerwünschte Mutationen während der Amplifikation generiert wurden. Die Sequenzierung der durch *In-vitro*-Mutagenese generierten Plasmide ergab, dass die gewünschten Aminosäuresubstitutionen bzw. -deletionen korrekt eingeführt werden konnten.

Von ausgewählten Klonen wurde, wie in Kapitel 2.11.9 beschrieben, eine Produktion der ORF10-Varianten in *E. coli* NEB® 5-alpha-Zellen, in *E. coli* BL21 Star™ (DE3)-Zellen sowie in *E. coli* M15-Zellen mit anschließender SDS-PAGE (s. Kapitel 2.12.1) und Western-Blot-Analyse (s. Kapitel 2.12.2) durchgeführt. Trotz veränderter Bedingungen im Aufreinigungsprozess sowie der Verwendung unterschiedlicher *E. coli*-Zellen (s. o.) konnte nur das Kontrollprotein ORF10, jedoch keine der generierten Varianten mittels Western-Blot-Analyse detektiert werden (s. Abbildung 25). Es ist davon auszugehen, dass die ORF10-Varianten in keinem der drei *E. coli*-Stämme produziert werden konnten.

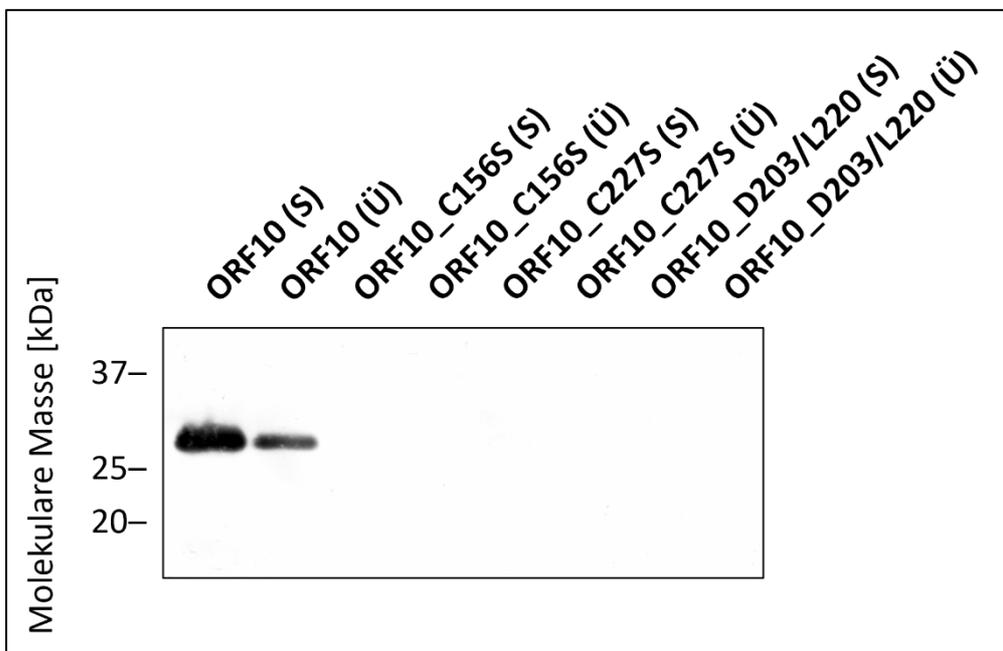


Abbildung 25: Western-Blot-Analyse der in *E. coli* produzierten ORF10-Varianten

Zur Visualisierung der His₆-getaggtten Proteinvarianten sowie von ORF10 als Positivkontrolle wurden jeweils das bei der Aufreinigung entstandene Sediment (S) und der Überstand (Ü) auf einem 10 % TT-SDS-Polyacrylamidgel separiert und anschließend durch eine Western-Blot-Analyse visualisiert. Hierbei wurden die transferierten Proteine durch einen monoklonalen Anti-His₆-Antikörper (1:1000 verdünnt) detektiert. Der Proteinstandard (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards) ist links angegeben.

3.4 Untersuchungen zur Serumresistenz von ORF10-produzierenden Borrelienzellen gegenüber Humanserum

Um zu überprüfen, ob ORF10-produzierende „gain of function“-Borrelienstämme *in vitro* die Eigenschaft besitzen, in Humanserum zu überleben, wurde ein

Serumbakterizidie-Assay (s. Kapitel 2.14.2) durchgeführt. Als Negativkontrolle diente hierbei der Serum-sensitive Surrogatstamm *B. garinii* G1, welcher den Basisvektor pKFSS1 (s. Kapitel 2.2.2) enthielt und einen Serum-sensiblen Phänotyp aufwies.

Für den Serumbakterizidie-Test wurden je 2×10^7 motile Borrelienzellen in 150 μ l BSK-H-Medium resuspendiert und diese Suspension anschließend mit 50 μ l NHS versetzt. Der Reaktionsansatz, der den Zeitpunkt $t = 0$ h markierte, wurde mit 50 μ l BSK-H-Medium anstelle von 50 μ l NHS versetzt und die Zellkonzentration der Borrelien unmittelbar ermittelt. Anschließend wurden je 100 μ l der Reaktionsansätze für 6 h bei 33 °C inkubiert, wobei zu den Zeitpunkten $t = 1, 2, 4$ und 6 h der prozentuale Anteil an motilen Borrelienzellen unter dem Dunkelfeldmikroskop bestimmt wurde (s. Kapitel 2.14.2). Die visuelle Beurteilung der Zellmotilität und einer charakteristischen Morphologie ohne Blebbildung gilt als Nachweis des Überlebens der Borrelien in Humanserum.¹⁹⁰

Sowohl beim untersuchten „gain of function“-Stamm G1/pORF10 als auch bei dem Kontrollstamm G1/pKFSS1 zeigte sich bereits nach einer Stunde ein deutliches Absinken der Zahl an beweglichen Zellen, wobei sich der prozentuale Anteil an immotilen Zellen mit jeder weiteren Inkubationsstunde kontinuierlich erhöhte. Bei der Messung nach 6 h Inkubation waren nur noch vereinzelt motile Zellen bzw. ausschließlich immotile Zellen sowohl bei G1/pORF10 als auch beim Referenzstamm G1/pKFSS1 mikroskopisch zu erkennen (s. Abbildung 26). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die heterologe Produktion von ORF10 in Serum-sensitiven Borrelienzellen keine Resistenz gegenüber Humanserum bewirkt.

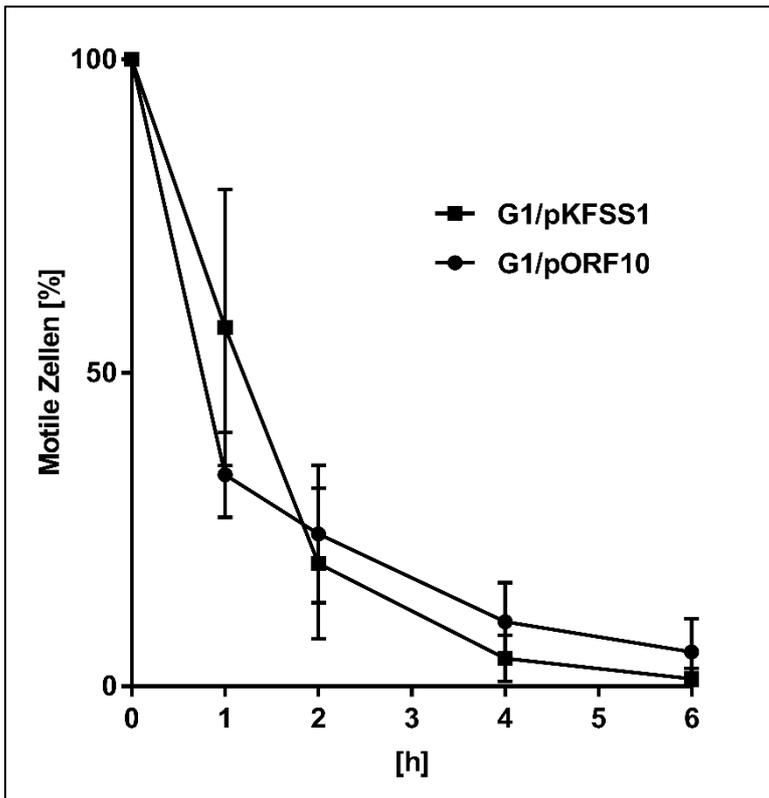


Abbildung 26: Nachweis von motilen Borrelienzellen in Anwesenheit von 25 % Humanserum mittels Dunkelfeldmikroskopie

Es wurden je 2×10^7 motile Zellen mit BSK-H-Medium auf ein Gesamtvolumen von 150 μl eingestellt und mit 50 μl Humanserum versetzt. Der Reaktionsansatz zum Zeitpunkt $t = 0$ h wurde mit 50 μl BSK-H-Medium anstelle von 50 μl NHS versetzt und die Zellen sofort gezählt. Anschließend wurden je 100 μl in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte pipettiert. Die Ansätze wurden anschließend bei 33 °C über einen Zeitraum von 6 h inkubiert. Nach 1, 2, 4 und 6 h erfolgte eine Zählung der motilen Zellen mittels Dunkelfeldmikroskopie. Abgebildet ist die graphische Darstellung von drei unabhängigen, biologischen Replikaten.

4 Diskussion

4.1 *Borrelia recurrentis*, der Erreger des Läuserückfallfiebers

B. recurrentis gehört zu den RF-Borrelien und ist die einzige Borrelienspezies, die ausschließlich in der Kleider- bzw. Körperlaus (*Pediculus humanus humanus* bzw. *corporis*) nachgewiesen wurde und nach Zerquetschen über Mikroläsionen in der menschlichen Haut übertragen wird^{24,29} und anschließend das LRF verursacht.^{3,4} In der Vergangenheit kam es in Krisenzeiten, wie z. B. während Kriegen und Hungersnöten, sowohl zu epidemischen als auch endemischen Ausbrüchen mit Millionen von Infizierten.³¹ Durch eine Verbesserung der Hygienestandards und der allgemeinen Lebensbedingungen im letzten Jahrhundert gelang es, den Läusebefall in den Ländern des globalen Nordens stark zu reduzieren, wodurch auch die Verbreitung des Erregers massiv eingedämmt wurde. Nur in Ost-Afrika, insbesondere in Äthiopien, stellt das LRF auch heute noch eine Herausforderung für das Gesundheitssystem dar.^{34,84}

Um das humane Immunsystem zu umgehen, haben Borrelien verschiedene Mechanismen der Immunevasion entwickelt.^{122,127} *B. recurrentis* weist auf dem linearen Plasmid lp190 Gene auf, die für Proteine kodieren (s. Abbildung 11), die durch die Bindung von Komplementkomponenten und -regulatoren eine Inhibition des Komplementsystems bewirken können.¹⁸⁰ Für die Proteine CihC und HcpA^{151,179} sowie für ORF6, ORF7, ORF8 und ORF9^{9,118,180} konnte eine Inhibition des Komplementsystems nachgewiesen werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Charakterisierung des ORF10-Proteins von *B. recurrentis* in Bezug auf potenzielle Komplement-inhibitorischen Eigenschaften. Dieses Protein wird von einem Gen kodiert, welches sich ebenfalls auf dem linearen Plasmid lp190 befindet (s. Abbildung 11). Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse sollen, vergleichend zu bereits bekannten Protein-Komplement-Interaktionen, diskutiert und der mögliche Beitrag von ORF10 zur Immunevasion von *B. recurrentis* eingeschätzt werden.

4.2 Charakterisierung des ORF10-Proteins von *B. recurrentis*

Für die funktionelle Charakterisierung von ORF10 musste dieses sowie die verwendeten Kontrollproteine im bestmöglichen Reinheitsgrad isoliert werden. Nach affinitätschromatographischer Reinigung der rekombinanten Proteine wurden diese zur Überprüfung des Reinheitsgrades auf ein 10 % TT-SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und mithilfe von Silbernitrat visualisiert. Alle für diese Studie verwendeten Proteine wiesen einen hohen Reinheitsgrad ohne sichtbare Verunreinigungen oder Degradationen auf. Zur Bestätigung wurde eine Western-Blot-Analyse durchgeführt, die ebenfalls ergab, dass alle Proteine einen hohen Reinheitsgrad zeigten und der N-terminale His₆-Tag vorhanden war (s. Abbildung 13). Ein potenzieller Einfluss von Verunreinigungen mit anderen Proteinen aus *E. coli* auf die durchgeführten Interaktions- und Inhibitionsanalysen konnte daher nahezu ausgeschlossen werden.

Bei ORF10, ORF7 und BBK32₂₀₅ zeigte sich ein weiteres Protein, welches jedoch nicht in der Western-Blot-Analyse detektiert werden konnte. Es ist anzunehmen, dass die schwächeren Signale bei ORF10 und ORF7 nicht auf eine Degradierung zurückzuführen sind, da mehrere Proteinfragmente zu erwarten gewesen wären. Bei BBK32₂₀₅ ist wahrscheinlich von einer Dimerisierung auszugehen, wie sie bereits bei anderen Borrelienproteinen, wie z. B. Vsp1 aus *B. miyamotoi*¹⁸⁷ oder CspA aus *B. burgdorferi*,¹⁹¹ beschrieben worden ist.

4.2.1 Inhibitorische Wirkung von ORF10 auf die verschiedenen Wege des humanen Komplementsystems

Strukturell unterschiedliche Proteine aus Lyme-Borrelien, aber auch aus RF-Borrelien sind in der Lage, das humane Komplementsystem auf verschiedene Aktivierungsstufen zu inhibieren, wie z. B. BBK32₂₀₅ aus *B. burgdorferi* B31,¹⁸⁸ BGA66 aus *B. bavariensis* PBi,¹⁸³ CbiA aus *B. miyamotoi* HT31,¹⁸⁴ CspA aus *B. burgdorferi*, *B. afzelii* und *B. spielmannii*,^{186,189} Vsp1 aus *B. miyamotoi* LB-2001¹⁸⁷ sowie ORF6, ORF7, ORF8 und ORF9 aus *B. recurrentis* A17¹⁸⁰ (s. Tabelle 38).

Tabelle 38: Zusammenfassung verschiedener Borrelienproteine und deren Inhibition der Komplementwege und ihrer Interaktion mit Komplementkomponenten

Erreger	Protein	Faktoren	Weg	Quelle
<i>B. burgdorferi</i>	BBK32 ₂₀₅	C1, C1r	KW	Garcia <i>et al.</i> , 2016 ¹⁸⁸
<i>B. bavariensis</i>	BGA66	C7, C8, C9	TW	Hammerschmidt <i>et al.</i> , 2016 ¹⁸³
<i>B. miyamotoi</i>	CbiA	C3, C3b, C4b, C5, C9, FH	KW, TW	Röttgerding <i>et al.</i> , 2017 ¹⁸⁴
	Vsp1	n. n.	TW	Wagemakers <i>et al.</i> , 2016 ¹⁸⁷
<i>B. burgdorferi</i> , <i>B. afzelii</i> , <i>B. spielmannii</i>	CspA	FH, CFH, FHL-1	AW	Hallström <i>et al.</i> , 2013 ¹⁸⁹ sowie Hammerschmidt <i>et al.</i> , 2014 ¹⁸⁶
<i>B. recurrentis</i>	ORF6	C3b	AW	Röttgerding F, 2018 ¹⁸⁰ und 2023 ⁹
	ORF7	C3b, C5, C9	AW, TW	
	ORF8	C3b, C5, C9	AW, TW	
	ORF9	C3b, C5, C9	AW, TW	

n. n., nicht nachgewiesen

Nicht nur Borrelien, auch andere humanpathogene Erreger sind in der Lage, mithilfe von Oberflächenproteinen unterschiedliche Faktoren und Regulatoren des Komplementsystems zu binden und dadurch eine Inhibition zu bewirken. Ein gut untersuchter Mechanismus ist hierbei die Interaktion mit FH und dadurch eine Inhibition des alternativen Weges (z. B. bei Scl1 aus *Streptococcus pyogenes*,¹⁹² PspC aus *Streptococcus pneumoniae*,¹⁹³ Sbi aus *Staphylococcus aureus*,¹⁹⁴ OlpA aus *Moraxella catarrhalis*,¹⁹⁵ FHbp aus *Neisseria meningitidis*¹⁹⁶ oder AbOmpA aus *A. baumannii*¹⁹⁷).¹⁹⁸ Ein weiteres Protein aus *Streptococcus pyogenes*, ScpA, ist etwa in der Lage, den alternativen und den terminalen Weg zu inhibieren, indem es C3, C3b und C5a bindet.¹⁹⁹ *Staphylococcus aureus* exprimiert SSL10, welches durch die Bindung von IgG den klassischen Weg hemmt,²⁰⁰ sowie SCIN, welches durch eine Bindung der C3-Konvertase eine Inhibition aller drei Wege bewirken kann.²⁰¹ Auch CipA aus *A. baumannii* 19606 inhibiert alle drei Komplementwege hauptsächlich durch die Interaktion mit FI und der

Formation eines quadripartiten Komplexes sowie durch Bindung an C3, C3b, C4b, C5, und FB¹⁸⁵ (s. Tabelle 39).

Tabelle 39: Selektive Auswahl diverser humanpathogene Erreger, deren Komplement-interagierende Proteine und Inhibition des Komplementsystems

Erreger	Protein	Faktoren	Weg	Quelle
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ScI1	FH, FHR-1	AW, TW	Reuter <i>et al.</i> , 2010 ¹⁹²
	ScpA	C3, C3b, C5a	AW, TW	Lynskey <i>et al.</i> , 2017 ¹⁹⁹
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	PspC	FH	AW	Achila <i>et al.</i> , 2015 ¹⁹³
<i>Staphylococcus aureus</i>	SSL10	IgG	KW	Itoh <i>et al.</i> , 2010 ²⁰⁰
	Sbi	C3, C3b, FH, FHR-1	AW	Koch <i>et al.</i> , 2012 ¹⁹⁴
	SCIN	C3-Konvertase	KW, LW, AW	Rooijackers <i>et al.</i> , 2005 ²⁰¹
<i>Moraxella catarrhalis</i>	OlpA	FH	AW	Bernhard <i>et al.</i> , 2014 ¹⁹⁵
<i>Neisseria meningitidis</i>	FHbp	FH	AW	Schneider <i>et al.</i> , 2009 ¹⁹⁶
<i>Acinetobacter baumannii</i>	AbOmpA	FH	AW	Kim <i>et al.</i> , 2009 ¹⁹⁷
	CipA	C3, C3b, C4b, C5, FB, FD, FI	KW, LW, AW	Ries <i>et al.</i> , 2022 ¹⁸⁵

Um der Frage nachzugehen, inwieweit ORF10 ähnliche Komplement-inhibierende Eigenschaften besitzt, wurden Komplement-Aktivierungs-Assays durchgeführt (s. Kapitel 2.13.3). Die durchgeführten Analysen mit ORF10 verdeutlichen, dass dieses Protein sowohl den klassischen Weg (s. Abbildung 14), den alternativen Weg (s. Abbildung 15) als auch den Lektin-Weg (s. Abbildung 16) inhibiert. Das bedeutet, dass ORF10 im Vergleich zu anderen bekannten Komplement-inhibierenden Proteinen von RF-Borrelien, wie z. B. CihC und HcpA aus *B. recurrentis* und *B. duttonii*,^{151,179} BhCRASP- 1 und FbpC aus *B. hermsii*,²⁰²⁻²⁰⁴ CbiA und BOM1093 aus *B. miyamotoi*,^{174,184,205} eine

Komplementinhibition aller drei Wege bewirkt und daher eine besondere Rolle für die Immunevasion von *B. recurrentis* einnehmen könnte.

4.2.2 Interaktion von ORF10 mit verschiedenen Komplementkomponenten

Sowohl für Borrelien (s. Tabelle 38) als auch andere humanpathogene Erreger (s. Tabelle 39) wurden verschiedene membranständige Proteine beschrieben, die in der Lage sind, mit Komplementkomponenten des alternativen, des klassischen oder des Lektin-Weges zu interagieren und die Komplementkaskade auf unterschiedlichen Aktivierungsstufen zu inhibieren.^{178,179,184,203,204,206}

Da aus den funktionellen Komplementanalysen nachgewiesen werden konnte, dass ORF10 alle drei genannten Wege inhibieren kann, wurde untersucht, mit welchen Komplementregulatoren und -komponenten dieses Protein interagiert (s. Kapitel 3.2.2 und 3.2.3).

4.2.2.1 Interaktion von ORF10 mit Komponenten des klassischen und des Lektin-Weges

C1q bildet, zusammen mit C1r und C1s, den aktivierten C1-Komplex, wodurch die Komplementkomponente C4 durch aktiviertes C1s in C4a und C4b gespalten werden kann.^{141,142} Weiterhin führt die C1s-Protease zur Spaltung von an C4b gebundenem C2 in C2a und C2b, sodass die C3-Konvertase des klassischen Weges entstehen kann. Die drei Komponenten des C1-Komplexes nehmen somit eine essenzielle Rolle bei der Initiierung des klassischen Weges ein. In den durchgeführten Bindungsanalysen konnte gezeigt werden, dass ORF10 an C1q bindet (s. Abbildung 17 A). Es ist davon auszugehen, dass diese Bindung maßgeblich an der Inhibition des klassischen Weges durch ORF10 (s. Abbildung 14) beteiligt ist. Auch ORF6 als Kontrollprotein zeigte eine Bindung an C1q. Neben der Interaktion mit C1q zeigte sich auch eine signifikante Bindung von C2 an ORF10 (s. Abbildung 17 B), einer Komponente des klassischen und des Lektin-Weges. Diese Bindung korreliert mit dem Ergebnis, dass ORF10 den klassischen und den Lektin-Weg inhibieren kann (s. Abbildung 14 und Abbildung 16). Die erhaltenen Absorptionswerte und anschließende Berechnung der statistischen Signifikanz lassen eine Bindung von C2 an ORF6 vermuten, allerdings zeigte dieses Protein in

vorangegangenen Untersuchungen keine Inhibition des klassischen oder Lektin-Weges.¹⁸⁰ Unabhängig davon konnte dieses Ergebnis auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (s. Abbildung 14 und Abbildung 16), so dass davon ausgegangen werden kann, dass ORF6 nicht mit C2 interagiert.

Die durchgeführten Bindungsanalysen mit weiteren Komplementkomponenten des klassischen und des Lektin-Weges ergaben, dass ORF10 in der Lage ist, an C4 als auch an C4b (s. Abbildung 17 C und Abbildung 17 D) zu binden. Eine Bindung an C4 oder C4b könnte eine Inhibition des klassischen und des Lektin-Weges zur Folge haben. Auch ORF6 als Kontrollprotein zeigte eine Bindung an beide Komplementkomponenten. Bisher lagen keine Daten zum Bindungsverhalten von ORF6 an C4 und C4b vor. Diese Interaktion scheint jedoch keine Auswirkung auf die Aktivierung des klassischen oder des Lektin-Weges zu haben, wie in früheren Untersuchungen¹⁸⁰ als auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte (s. Abbildung 14 und Abbildung 16). Eine Inhibition der Komplementkaskade durch die Bindung von ORF6 an C4 bzw. C4b konnte in den durchgeführten Analysen jedoch nicht eindeutig bestätigt werden.

Da für die Komplementkomponenten C1r und C1s kein spezifischer Antikörper zur Verfügung stand, diese jedoch in die Bindungsanalysen miteinbezogen werden sollten, wurden die Komplementkomponenten zunächst immobilisiert und anschließend die zu untersuchenden, gereinigten Borrelienproteine hinzugegeben. Die gebildeten Komplexe wurden mit dem Anti-His₆-Antikörper detektiert. Diese Analysen ergaben eine signifikante Bindung von ORF10 an C1q und C1s (s. Abbildung 18 A). Auch zeigte sich eine Bindung an C4b, während eine Bindung von C1r, C2 und C4 an ORF10 nicht nachgewiesen werden konnte. Die in Abbildung 17 B und D dargestellten Ergebnisse lassen zwar eine Bindung von C2 und C4 an ORF10 vermuten, welche sich unter diesen Bedingungen jedoch nicht bestätigen ließ. Eine Ursache für die scheinbare Bindung könnte die Verwendung der unspezifisch reagierenden, polyklonalen Antikörper gegen C2 und C4 sein, welche in den initialen Untersuchungen eingesetzt wurden.

ORF6 zeigte lediglich eine Bindung an C1q (s. Abbildung 18 B), weshalb davon ausgegangen werden kann, dass es sich bei der in Abbildung 17 C und D dargestellten Bindung an C4 und C4b ebenfalls um eine unspezifische Bindung des verwendeten polyklonalen Anti-C4-Antikörpers handelt. Inwieweit eine Bindung von ORF6 an C1q

besteht, bedarf weiterer Analysen, da eine Inhibition von ORF6 auf den klassischen Weg bisher nicht bestätigt werden konnte.¹⁸⁰

Die Ergebnisse zum Bindungsverhalten von BBK32₂₀₅ an C1r und C1q konnten auch in dieser Arbeit bestätigt werden. Es zeigte sich eine signifikante Bindung an C1r und C1q (s. Abbildung 18 C), wie in der Literatur bereits beschrieben.¹⁸⁸ Eine Bindung von BBK32₂₀₅ an C1s kann aufgrund der publizierten Daten ausgeschlossen werden. Die in dieser Arbeit durchgeführten Bindungsanalysen waren durch die sehr niedrigen Absorptionswerte gekennzeichnet, so dass von keiner Bindung an C1s auszugehen ist.

Um das inhibitorische Potenzial von ORF10 auf den Lektin-Weg noch näher zu untersuchen, wären Bindungsstudien mit gereinigtem MBL wegweisend. Dieses Komplementprotein lag zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Bindungsanalysen leider nicht in ausreichend hoher Reinheit vor.

4.2.2.2 Interaktion von ORF10 mit Komponenten des alternativen Weges

Hinsichtlich der Interaktion von ORF10 mit den Komponenten des alternativen Weges konnte nachgewiesen werden, dass ORF10 die Komplementkomponente C3 bindet (s. Abbildung 20 A). C3 wird durch die C3-Konvertasen in seine aktiven Fragmente C3a und C3b gespalten. Während C3a in der Flüssigphase als Immunmodulator für zahlreiche inflammatorische Prozesse fungiert,¹⁴³ stellt C3b eine zentrale Komponente aller drei Wege dar. Eine Bindung an C3 kann daher eine Inhibition aller drei Komplementwege mit sich führen. Eine Bindung von C3 an ORF6 und ORF7 wurde bisher noch nicht untersucht, allerdings konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass beide ORF-Proteine C3b binden können und auch inhibitorisch auf den alternativen Weg wirken.¹⁸⁰ Auch C3b als Schlüsselkomponente des alternativen Weges wurde in die Untersuchungen miteinbezogen. Es ist ein Bestandteil der C3-Konvertase und kann weiterhin unspezifisch an Zellen binden und diese somit markieren (Opsonisierung).¹²² In der Vergangenheit konnte bereits gezeigt werden, dass die Transmembranproteine gC1 und gC2 des Herpes simplex-Virus Typ 1 eine Bindung an C3b bewirken, was zur signifikanten Verringerung der Halbwertszeit der C3-Konvertase führt.²⁰⁷ In den durchgeführten Bindungsstudien konnte neben C3 ebenfalls eine signifikante Bindung

von ORF10 an C3b gezeigt werden (s. Abbildung 20 B). Es ist davon auszugehen, dass die Bindung von ORF10 sowohl an C3 als auch an C3b maßgeblich daran beteiligt ist, dass ORF10 den alternativen Weg inhibiert (s. Abbildung 15).

Im alternativen, im klassischen und im Lektin-Weg findet eine Spaltung der Komplementkomponente C5 durch die C5-Konvertase in C5a und C5b statt. C5b ist daran beteiligt, dass der terminale Weg aktiviert wird, der die Bildung des MAK zur Folge hat.²⁰⁸ Eine Bindung von C5 hätte zur Folge, dass alle drei Wege des Komplementsystems inhibiert werden könnten. Tatsächlich konnte für ORF10 eine signifikante Bindung an C5 nachgewiesen werden (s. Abbildung 20 C). Dieses Ergebnis korreliert mit der Fähigkeit von ORF10, alle drei Komplementwege zu inhibieren (s. Kapitel 3.2.1).

FB nimmt eine essenzielle Rolle für den alternativen Weg ein. Gebunden an hydrolysiertem C3(H₂O), wird es durch FD in Faktor Ba und Bb gespalten, sodass FB zusammen mit C3 die C3-Konvertase der Flüssigphase C3(H₂O)Bb bilden kann.¹²³ Bei den Bindungsstudien konnte für keines der untersuchten Proteine eine eindeutige Interaktion mit FB gezeigt werden (s. Abbildung 20 D).

Weiterhin wurde die Bindung mit FH, dem zentralen Regulator des alternativen Weges, untersucht. FH dient als Kofaktor für FI, welcher die Degradation von C3b unterstützt. Außerdem wird die Dissoziation der auf der Zelloberfläche gebildeten C3-Konvertase (C3bBb) gefördert.¹²² Im Rahmen der durchgeführten Analysen konnte ebenfalls keine Bindung von FH an ORF10 nachgewiesen werden, jedoch konnte, wie erwartet, die Interaktion von FH mit CbiA bestätigt werden (s. Abbildung 20 E).¹⁸⁴ Eine Bindung von FH an BGA66 lässt sich ausschließlich im ELISA vermuten, allerdings nicht mit anderen Untersuchungsmethoden.¹⁸³

Die vergleichenden Analysen zur Interaktion mit FI, welcher, zusammen mit FH und C4BP, die Spaltung von C3b bzw. C4b katalysiert (s. Kapitel 1.3.5), führten zur Erkenntnis, dass keines der untersuchten Proteine, eingeschlossen ORF10, an diese Komplementkomponente bindet (s. Abbildung 20 F).

In Tabelle 40 sind die Ergebnisse der Bindungsanalysen von ORF10 an die untersuchten Komplementfaktoren zusammengefasst. Der entsprechende Komplementweg, der

durch die Bindung an den jeweiligen Komplementfaktor inhibiert wird, ist ebenfalls aufgeführt.

Tabelle 40: Zusammenfassung der Ergebnisse zur Interaktion von ORF10 an untersuchte Komplementfaktoren

Komplementfaktoren	Bindung von ORF10	Komplementweg
C1q	+	KW
C1r	-	KW
C1s	+	KW
C2	(-)*	KW, LW
C3	+	AW
C3b	+	AW
C4	(-)*	KW, LW
C4b	+	KW, LW
C5	+	KW, LW, AW
FB	-	AW
FH	-	AW (KW)
FI	-	KW, LW, AW

* Eine Bindung von ORF10 an C2 und C4 konnte nicht eindeutig bestätigt werden.

In Ergänzung zu den durchgeführten Bindungsanalysen wurden dosisabhängige Interaktionen von ORF10 an C1q und C4b sowie an C3 und C3b durchgeführt (s. Kapitel 2.13.2.2), um einen ersten Anhalt für die Bindungsaffinität der ausgewählten Komplementkomponenten an ORF10 zu erhalten. Die gemessenen Werte im nanomolaren Bereich wiesen für C1q und C4b eine starke Bindungsaffinität an ORF10 auf (s. Abbildung 19). Für C3 und C3b ließ sich ab 10 nM eine signifikante Bindung an ORF10 nachweisen (s. Abbildung 21); allerdings konnte für keine der untersuchten Reaktionen eine Sättigung erzielt werden.

Für die Komponente C5 ist bereits eine dosisabhängige Bindung dokumentiert; allerdings konnte auch hier keine Sättigung erzielt werden.⁹ Die Interaktion von ORF10 mit C1s (s. Abbildung 18 A) konnte nicht weitergehend untersucht werden, da zum

Zeitpunkt der durchgeführten Versuche kein geeigneter Anti-C1s-Antikörper zur Verfügung stand.

Um detaillierte Erkenntnisse zur ORF10-Komplement-Interaktion zu erhalten, wären weitere Verfahren, wie die Oberflächen-Resonanzspektroskopie („Surface Plasmon Resonance Spectroscopy“) oder Thermophorese („Microscale Thermophoresis“), von aussagekräftiger Relevanz.

4.2.3 Inhibitorischer Einfluss von ORF10 auf den terminalen Weg des Komplementsystems

Der inhibierende Einfluss von ORF10 auf den terminalen Komplementweg wurde mit einem zellbasierten hämolytischen Assay untersucht (s. Kapitel 2.14.1), um die funktionellen Analysen zur Komplement-inhibierenden Wirkung von ORF10 zu finalisieren. Hierfür wurden die am terminalen Weg beteiligten Komponenten C7, C8 und C9 mit den zu untersuchenden Proteinen vorinkubiert und anschließend zu Schaferythrozyten hinzugegeben, welche ihrerseits mit dem C5b-6-Komplex vorinkubiert wurden. Bei einer Absorption von 414 nm konnte die Lyse der Erythrozyten durch das Freisetzen von Hämoglobin gemessen werden. ORF10 zeigte auf den terminalen Weg eine deutliche Inhibition bereits ab einer Konzentration von 0,5 nM (s. Abbildung 22). Die zusätzliche Blockade der Aktivierung des terminalen Weges neben der Inhibition des alternativen, des klassischen und des Lektin-Weges (s. Abbildung 14, Abbildung 15 und Abbildung 16) würde die Komplement-inhibierende Wirkung von ORF10 insgesamt verstärken. Hierbei scheint die Inhibition der Auto-Polymerisation von C9 eine wesentliche Rolle zu spielen, wie bereits für ORF10²⁰⁹ als auch für ORF7, ORF8 und ORF9¹⁸⁰ in früheren Analysen gezeigt werden konnte.

4.2.4 Struktur-basierte Mutationen von ORF10 und deren Auswirkung auf die Komplementinteraktion

Vergleicht man die modellierte Struktur von ORF10 mit der publizierten Struktur anderer Komplement-interagierender Borrelienproteine, wie z. B. CspA von *B. burgdorferi*,^{189,210} BGA71 von *B. bavariensis*^{183,211} oder auch ORF7 von *B. recurrentis*,⁹

so lassen sich Übereinstimmungen in der Proteinkonformation feststellen (s. Abbildung 27). Alle genannten Proteine weisen mehrere α -Helices sowie ein β -Faltblatt auf.

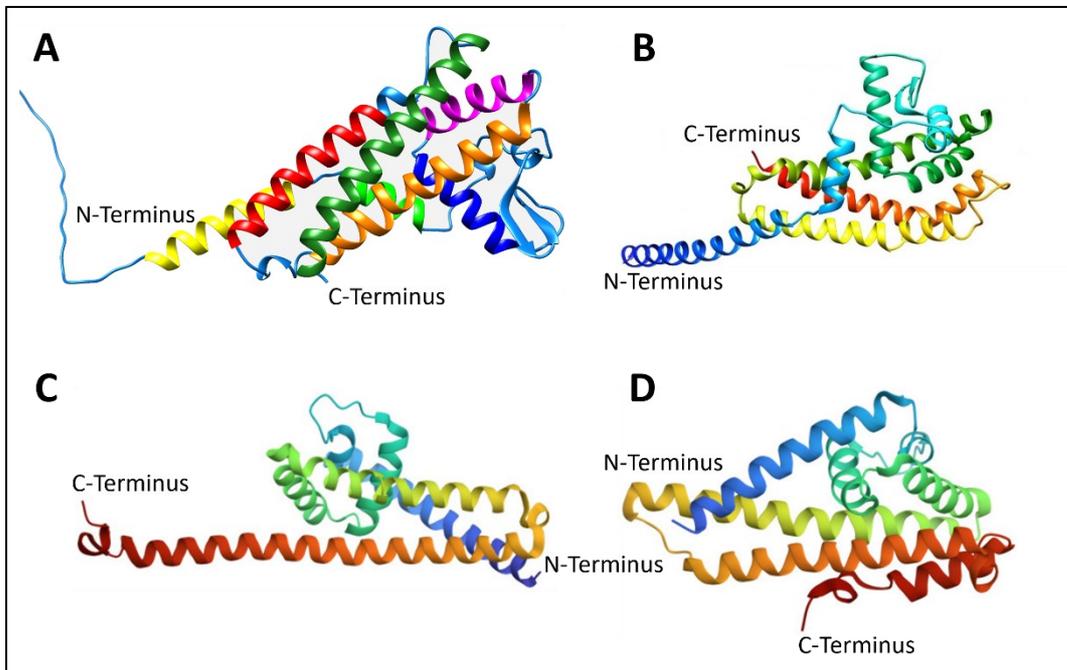


Abbildung 27: Struktureller Vergleich der Modelle von ORF10, ORF7, CspA und BGA71

Vergleich der dreidimensionalen Strukturen von ORF10 von *B. recurrentis* (A), ORF7 von *B. recurrentis* (B), CspA von *B. burgdorferi* (C) und BGA71 von *B. bavariensis* (D). Es sind jeweils der N- und C-Terminus gekennzeichnet. Die modellierten Strukturen von ORF10 und ORF7 wurden von Dr. Karin Fritz-Wolf zur Verfügung gestellt; modifiziert. CspA und BGA71 sind jeweils als Monomere dargestellt (entnommen Caesar *et al.*, 2013²¹⁰ sowie Brangulis *et al.*, 2018²¹¹; jeweils modifiziert).

Anhand der zur Verfügung gestellten, modellierten, dreidimensionalen Struktur von ORF10 wurden einzelne Aminosäuren und Regionen ausgewählt, die potenziell an der Interaktion von ORF10 mit den untersuchten Komplementkomponenten beteiligt sein könnten. Obwohl mit Hilfe der *In-vitro*-Mutagenese drei von vier Proteinmutanten erfolgreich generiert werden konnten, ließen sich die veränderten ORF10-Varianten nicht aus *E. coli*-Lysaten affinitätschromatographisch isolieren (s. Kapitel 3.3.1). Der fehlende Nachweis der ORF10-Varianten in den *E. coli*-Lysaten lässt vermuten, dass die veränderten Proteine proteolytisch degradiert werden oder zu instabil sind, um in ausreichender Menge isoliert werden zu können.

4.2.5 Untersuchungen zur Serumresistenzentstehung von Borrelien durch heterologe Produktion von ORF10

Um die Relevanz von ORF10 für die intrinsische Serumresistenz von *B. recurrentis* zu eruieren, müssten genetisch veränderte Borrelienzellen hergestellt werden, denen das ORF10-kodierende Gen fehlt. Bei Bakterien, die mehrere Komplement-interagierende Proteine besitzen, ist ein „knock-out“ mehrerer Gene, ohne zusätzliche Mutationen zu generieren, kaum möglich. Insbesondere bei *B. recurrentis* fehlen methodische Möglichkeiten, die es erlauben, den Erreger selbst genetisch zu manipulieren. Aus diesem Grund wurden sogenannte „gain of function“-Vektoren, die das ORF10-kodierende Gen mit dem nativen Promotor von *B. recurrentis* enthalten, generiert und diese anschließend in Serum-sensitive Borrelien der Spezies *B. garinii* transformiert. Dieser Surrogat-Stamm ist in der Lage, Proteine anderer Borrelienspezies heterolog zu produzieren. Die ORF10-produzierenden Borrelienzellen wurden auf ihre Eigenschaft, in Gegenwart von aktivem Humanserum zu überleben, in einem sogenannten Serumbakterizidietest untersucht (s. Kapitel 2.14.2).

Es existieren bereits zahlreiche Studien mit „gain of function“-Stämmen, die bewiesen, dass transformierte Borrelien zur Untersuchung der Serumresistenz geeignet sind, wenn keine gezielten genetischen Manipulationen der zu untersuchenden Borrelienspezies möglich sind.^{179,184,203,204} Für die Proteine ORF7, ORF8 und ORF9 von *B. recurrentis* konnte gezeigt werden, dass sie den transformierten Borrelienzellen protektiven Schutz vor Komplement-vermittelter Lyse verleihen, während ORF6 keine Resistenz gegenüber Humanserum bewirkt.⁹ Auch HcpA und CihC verleihen sowohl in *B. garinii*⁹ als auch in *B. burgdorferi* B313 eine Resistenz gegenüber Humanserum.^{151,179}

Die in dieser Arbeit durchgeführten Serumresistenztests mit G1/pORF10 als auch mit dem Kontrollstamm G1/pKFSS1, der nur den „Shuttle“-Vektor enthielt, verdeutlichten, dass die Anzahl an motilen Zellen bereits nach einer Stunde deutlich abnahm. Im weiteren Verlauf reduzierte sich die Anzahl an motilen Zellen kontinuierlich und nach 6 h ließen sich nur noch vereinzelte motile Zellen detektieren (s. Abbildung 26). Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass ORF10 allein nicht in der Lage ist, Serum-

sensiblen Borrelienzellen *in vitro* Serumresistenz zu verleihen. Mögliche Erklärungen für dieses Ergebnis könnten z. B. die fehlende Exposition oder zu geringe Konzentration des Proteins auf der Zelloberfläche sein sowie eine veränderte Konformation, die zu einem Funktionsverlust führen könnte. Es ist denkbar, dass das gebildete ORF10-Protein nicht in der Lage ist, mit Komplement zu interagieren, da es von anderen, auf der Zelloberfläche befindlichen Proteinen abgeschirmt wird. Eine weitere Möglichkeit bestünde darin, dass die Produktion eines „fremden“ Proteins zu einer verminderten Fitness der *B. garinii*-Zellen führt, was in einer erhöhten Sensibilität gegenüber Humanserum resultieren könnte.

4.3 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten erste Erkenntnisse zur Interaktion des Proteins ORF10 von *B. recurrentis* mit verschiedenen Komplementkomponenten gewonnen werden. Es lässt sich schlussfolgern, dass dieses Protein aufgrund des umfangreichen inhibitorischen Potenzials eine wichtige Rolle für die Immunevasion von *B. recurrentis* spielen könnte. Die Interaktion mit C3 und C3b als zentrale Komponenten scheint bedeutend für die Inhibition des alternativen Komplementweges zu sein. Zukünftige Untersuchungen könnten der Frage nachgehen, ob die Interaktion mit ORF10 und C3 bzw. C3b zu einer Inhibition der Assemblierung der C3-Konvertase bzw. C3-Prokonvertase führt. Die nachgewiesene Interaktion mit C1q und C4b lässt eine wichtige Rolle von ORF10 für die Inaktivierung des klassischen und Lektin-Weges vermuten. Weiterführende Fragestellungen könnten die Inhibition der C3-Konvertase C4bC2a im Fokus haben. Des Weiteren könnte analysiert werden, ob ORF10 neben der bereits gefundenen Bindung an C9 auch mit anderen Komponenten des MAK interagiert, wie dies bereits für CspA von *B. burgdorferi*¹⁸⁹ sowie für BGA66 und BGA71 von *B. bavariensis* nachgewiesen werden konnte.¹⁸³

5 Zusammenfassung

Im Fokus der vorliegenden Arbeit stand die Fragestellung, inwieweit ORF10 von *B. recurrentis*, dem Erreger des Läuserückfallfiebers, mit verschiedenen Komplementkomponenten interagieren kann.

Mit funktionellen Komplementtests konnte gezeigt werden, dass ORF10 den klassischen, den alternativen sowie den Lektin-Weg inhibiert, wobei sich die stärkste Inhibition gegenüber dem alternativen Weg manifestierte. Darüber hinaus ließ sich in einem Zell-basierten Hämolyse-Assay eine Inhibition des terminalen Komplementweges durch ORF10 nachweisen.

Die durchgeführten Bindungsanalysen mit verschiedenen Komplementkomponenten führten zu dem Ergebnis, dass ORF10 mit C1q, C1s, C3, C3b, C4b und C5 interagiert und diese Protein-Protein-Interaktion mit den Komplementkomponenten C1q, C3, C3b und C4b durch einen dosisabhängigen Verlauf charakterisiert ist. Eine Bindung von C1r, C2, C4, FB, FH sowie FI konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Auf Basis der modellierten Struktur von ORF10 wurden mithilfe der *In-vitro*-Mutagenese drei verschiedene Varianten generiert, die jedoch nicht affinitätschromatographisch aus *E. coli*-Zelllysaten isoliert werden konnten und deshalb nicht für weiterführende funktionelle Analysen zur Verfügung standen.

Die Ergebnisse der Serumbakterizidie-Tests mit einem „gain of function“-Borrelienstamm, welcher ORF10 heterolog produzieren sollte, ergaben, dass keine erhöhte Resistenz gegenüber Humanserum nachgewiesen werden konnte. Inwieweit ORF10 bei der intrinsischen Serumresistenz von *B. recurrentis* beteiligt ist, lässt sich abschließend nicht vollumfänglich erklären.

6 Summary

The focus of the present work deals with the interaction of ORF10 from *B. recurrentis*, the pathogen causing louse-borne relapsing fever, with various complement components.

By using functional complement tests, it was shown that ORF10 inhibits the classical, the alternative and the lectin pathway displaying the strongest inhibition against the alternative pathway. In addition, inhibition of the terminal complement pathway by ORF10 could also be demonstrated in a cell-based hemolysis assay.

The binding analyses conducted with various complement components led to the conclusion that ORF10 interacts with C1q, C1s, C3, C3b, C4b and C5. In addition, ORF10 bound to complement components C1q, C3, C3b and C4b dose-dependently. However, ORF10 did not bind C1r, C2, C4, FB, FH, and FI.

Based on the modelled structure of ORF10, three different variants were generated using *in vitro* mutagenesis, which, however, could not be isolated from *E. coli* cell lysates using affinity chromatography and were, therefore, not available for further functional analyses.

The results of the serum bactericidal assays with a "gain of function" *Borrelia* strain, which was supposed to produce ORF10 heterologously, suggested that this protein does not increase resistance to human serum. Thus, whether ORF10 is involved in serum resistance of *B. recurrentis* warrants further analyses.

7 Literaturverzeichnis

1. Buchanan RE. Studies in the nomenclature and classification of the bacteria: II. The primary subdivisions of the *Schizomycetes*. *J Bacteriol.* 1917;2(2):155-164. doi:10.1128/jb.2.2.155-164.1917.
2. Skerman VBD, McGowan V, Sneath PHA. Approved lists of bacterial names. *Int J Syst Bacteriol.* 1980;30:225-420.
3. Takano A, Goka K, Une Y, Shimada Y, Fujita H, Shiino T, Watanabe H, Kawabata H. Isolation and characterization of a novel *Borrelia* group of tick-borne *borreliae* from imported reptiles and their associated ticks. *Environ Microbiol.* 2010;12(1):134-146. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.02054.x.
4. Cutler SJ, Moss J, Fukunaga M, Wright DJ, Fekade D, Warrell D. *Borrelia recurrentis* characterization and comparison with relapsing-fever, Lyme-associated, and other *Borrelia* spp. *Int J Syst Bacteriol.* 1997;47(4):958-968. doi:10.1099/00207713-47-4-958.
5. Hulínská D, Jirous J, Valesová M, Herzogová J. Ultrastructure of *Borrelia burgdorferi* in tissues of patients with Lyme disease. *J Basic Microbiol.* 1989;29(2):73-83. doi:10.1002/jobm.3620290203.
6. Hougen KH. Electron microscopy of *Borrelia merionesi* and *Borrelia recurrentis*. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol.* 1974;82(6):799-809. doi:10.1111/j.1699-0463.1974.tb02377.x.
7. Nakamura S. Spirochete flagella and motility. *Biomolecules.* 2020;10(4):1-16. doi:10.3390/biom10040550.
8. Fraser GM. Bacterial physiology: The ties that bind. *Nat Microbiol.* 2016;1(10):16192. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.192.
9. Röttgerding F. *Charakterisierung von Komplement-interagierenden Proteinen von Borrelia recurrentis und Entwicklung spezifischer Immunoassays für die Serodiagnostik des epidemischen Läuserückfallfiebers*. [dissertation]. Frankfurt am Main: Johann Wolfgang Goethe-Universität; 2023.
10. Barbour AG, Hayes SF. Biology of *Borrelia* species. *Microbiol Rev.* 1986;50(4):381-400. doi:10.1128/mr.50.4.381-400.1986.

11. Kraiczy P. Hide and seek: how Lyme disease spirochetes overcome complement attack. *Front Immunol.* 2016;7(385):1-8. doi:10.3389/fimmu.2016.00385.
12. Barbour AG. Linear DNA of *Borrelia* species and antigenic variation. *Trends Microbiol.* 1993;1(6):236-239. doi:10.1016/0966-842x(93)90139-i.
13. Fraser CM, Norris SJ, Weinstock GM, White O, Sutton GG, Dodson R, Gwinn M, Hickey EK, Clayton R, Ketchum KA, Sodergren E, Hardham JM, McLeod MP, Salzberg S, Peterson J, Khalak H, Richardson D, Howell JK, Chidambaram M, Utterback T, McDonald L, Artiach P, Bowman C, Cotton MD, Fujii C, Garland S, Hatch B, Horst K, Roberts K, Sandusky M, Weidman J, Smith HO, Venter JC. Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Science.* 1998;281(5375):375-388. doi:10.1126/science.281.5375.375.
14. Ren S-X, Fu G, Jiang X-G, Zeng R, Miao Y-G, Xu H, Zhang Y-X, Xiong H, Lu G, Lu L-F, Jiang H-Q, Jia J, Tu Y-F, Jiang J-X, Gu W-Y, Zhang Y-Q, Cai Z, Sheng H-H, Yin H-F, Zhang Y, Zhu G-F, Wan M, Huang H-L, Qian Z, Wang S-Y, Ma W, Yao Z-J, Shen Y, Qiang B-Q, Xia Q-C, Guo X-K, Danchin A, Saint Girons I, Somerville RL, Wen Y-M, Shi M-H, Chen Z, Xu J-G, Zhao G-P. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature.* 2003;422(6934):888-893. doi:10.1038/nature01597.
15. Talagrand-Reboul E, Boyer PH, Bergström S, Vial L, Boulanger N. Relapsing fevers: neglected tick-borne diseases. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8(98):1-21. doi:10.3389/fcimb.2018.00098.
16. Dobrindt U, Hacker J. Whole genome plasticity in pathogenic bacteria. *Curr Opin Microbiol.* 2001;4(5):550-557. doi:10.1016/s1369-5274(00)00250-2.
17. Fraser CM, Casjens S, Huang WM, Sutton GG, Clayton R, Lathigra R, White O, Ketchum KA, Dodson R, Hickey EK, Gwinn M, Dougherty B, Tomb JF, Fleischmann RD, Richardson D, Peterson J, Kerlavage AR, Quackenbush J, Salzberg S, Hanson M, van Vugt R, Palmer N, Adams MD, Gocayne J, Weidman J, Utterback T, Watthey L, McDonald L, Artiach P, Bowman C, Garland S, Fuji C, Cotton MD, Horst K, Roberts K, Hatch B, Smith HO, Venter JC. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature.* 1997;390(6660):580-586. doi:10.1038/37551.
18. Gupta RS, Mahmood S, Adeolu M. A phylogenomic and molecular signature based approach for characterization of the phylum Spirochaetes and its major clades:

- proposal for a taxonomic revision of the phylum. *Front Microbiol.* 2013;4(217):1-18. doi:10.3389/fmicb.2013.00217.
19. Marosevic D, Margos G, Wallich R, Wieser A, Sing A, Fingerle V. First insights in the variability of *Borrelia recurrentis* genomes. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(9):e0005865. doi:10.1371/journal.pntd.0005865.
20. Cutler SJ, Scott JC, Wright DJ. Phylogenetic origins of *Borrelia recurrentis*. *International Journal of Medical Microbiology.* 2008;298:193-202. doi:10.1016/j.ijmm.2007.11.011.
21. Lescot M, Audic S, Robert C, Nguyen TT, Blanc G, Cutler SJ, Wincker P, Couloux A, Claverie J-M, Raoult D, Drancourt M. The genome of *Borrelia recurrentis*, the agent of deadly louse-borne relapsing fever, is a degraded subset of tick-borne *Borrelia duttonii*. *PLoS Genet.* 2008;4(9):e1000185. doi:10.1371/journal.pgen.1000185.
22. Boutellis A, Mediannikov O, Bilcha KD, Ali J, Campelo D, Barker SC, Raoult D. *Borrelia recurrentis* in head lice, Ethiopia. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(5):796-798. doi:10.3201/eid1905.121480.
23. Leibler JH, Zakhour CM, Gadhoke P, Gaeta JM. Zoonotic and vector-borne infections among urban homeless and marginalized people in the United States and Europe, 1990-2014. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2016;16(7):435-444. doi:10.1089/vbz.2015.1863.
24. Ras NM, Lascola B, Postic D, Cutler SJ, Rodhain F, Baranton G, Raoult D. Phylogenesis of relapsing fever *Borrelia* spp. *Int J Syst Bacteriol.* 1996;46(4):859-865. doi:10.1099/00207713-46-4-859.
25. Elbir H, Raoult D, Drancourt M. Relapsing fever borreliae in Africa. *Am J Trop Med Hyg.* 2013;89(2):288-292. doi:10.4269/ajtmh.12-0691.
26. Elbir H, Abi-Rached L, Pontarotti P, Yoosuf N, Drancourt M. African relapsing fever borreliae genomospecies revealed by comparative genomics. *Front Public Health.* 2014;2(43):1-8. doi:10.3389/fpubh.2014.00043.
27. Cutler SJ. Relapsing fever borreliae: a global review. *Clin Lab Med.* 2015;35(4):847-865. doi:10.1016/j.cll.2015.07.001.
28. Parola P, Raoult D. Ticks and tick-borne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin Infect Dis.* 2001;32(6):897-928. doi:10.1086/319347.

29. Bryceson AD, Parry EH, Perine PL, Warrell DA, Vukotich D, Leithead CS. Louse-borne relapsing fever. *Q J Med.* 1970;39(153):129-170.
30. Amanzougaghene N, Akiana J, Mongo Ndombe G, Davoust B, Nsana NS, Parra H-J, Fenollar F, Raoult D, Mediannikov O. Head lice of pygmies reveal the presence of relapsing fever borreliae in the Republic of Congo. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(12):e0005142. doi:10.1371/journal.pntd.0005142.
31. Cutler SJ. Relapsing fever—a forgotten disease revealed. *J Appl Microbiol.* 2010;108(4):1115-1122. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04598.x.
32. Francis E. The longevity of fasting and non-fasting *Ornithodoros turicata* and the survival of *Spirochaeta obermeieri* within them. In: Moulton FR, ed. *A symposium on relapsing fever in the Americas*. Washington, DC: American Association for the Advancement of Science; 1942:85-88.
33. Baltazard M, Bahmanyar M, Mofidi C. Fièvres récurrentes transmises à la fois par ornithodores et par poux [Recurrent fevers transmitted by both *Ornithodores* and lice]. *Ann Inst Pasteur (Paris)*. 1947;73(11):1066-1071.
34. Roux V, Raoult D. Body lice as tools for diagnosis and surveillance of reemerging diseases. *J Clin Microbiol.* 1999;37(3):596-599. doi:10.1128/JCM.37.3.596-599.1999.
35. Warrell DA. Louse-borne relapsing fever (*Borrelia recurrentis* infection). *Epidemiol Infect.* 2019;147(e106):1-8. doi:10.1017/S0950268819000116.
36. Sangaré AK, Doumbo OK, Raoult D. Management and treatment of human lice. *Biomed Res Int.* 2016;2016(8962685):1-12. doi:10.1155/2016/8962685.
37. Hunter GW, Magill AJ, Hill DR, Ryan ET, Solomon T, eds. *Hunter's tropical medicine and emerging infectious disease*. 10th ed. London: Elsevier Saunders; 2020.
38. Guerrant RL, Walker DH, Weller PF. *Tropical Infectious Diseases. Principles, Pathogens and Practice*. ["Expert Consult Title"]. 3rd ed. Saunders; 2011.
39. Barbour AG. Relapsing fever and other *Borrelia* diseases. In: Guerrant RL, ed. *Tropical infectious diseases: Principles, pathogens and practice*. 3. ed. Edinburgh: Saunders Elsevier; 2011:295-302. *Expert consult*.
40. El Hamzaoui B, Laroche M, Bechah Y, Bérenger JM, Parola P. Testing the competence of *Cimex lectularius* bed bugs for the transmission of *Borrelia recurrentis*, the agent of relapsing fever. *Am J Trop Med Hyg.* 2019;100(6):1407-1412. doi:10.4269/ajtmh.18-0804.

41. Dupont HT, La Scola B, Williams R, Raoult D. A focus of tick-borne relapsing fever in southern Zaire. *Clin Infect Dis*. 1997;25(1):139-144. doi:10.1086/514496.
42. Jong J de, Wilkinson RJ, Schaeffers P, Sondorp HE, Davidson RN. Louse-borne relapsing fever in southern Sudan. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1995;89(6):621. doi:10.1016/0035-9203(95)90414-x.
43. Trevisan G, Cinco M, Trevisini S, Di Meo N, Ruscio M, Forgiione P, Bonin S. *Borreliae* part 2: *Borrelia* relapsing fever group and unclassified *Borrelia*. *Biology (Basel)*. 2021;10(1117):1-23. doi:10.3390/biology10111117.
44. Hippocrates. *Hippocratic writings*. Reprint. Harmondsworth: Penguin Books; 1983. (The Penguin classics; 451).
45. Mac Arthur W. Historical notes on some epidemic diseases associated with jaundice. *Br Med Bull*. 13;1957(2):146-149.
46. Felsenfeld O. *Borrelia*: strains, vectors, human and animal borreliosis. 1971.
47. Chadwick J, Mann W. N. *The medical works of Hippocrates: a new translation from the original Greek made especially for English readers*. Oxford Blackwell Scientific Publications; 1950.
48. Chadwick J, Mann WN. The medical works of Hippocrates: a new translation from the original Greek made especially for English readers. *JAMA*. 1951;147(15):1506. doi:10.1001/jama.1951.03670320106045.
49. Felsenfeld O. *Borrelia* strains, vectors, human and animal borreliosis. *Ann Intern Med*. 1971;75(5):822. doi:10.7326/0003-4819-75-5-822_4.
50. Craigie D. Notice of a febrile disorder which has prevailed at Edinburgh during the summer of 1843. *Edinb Med Surg J*. 1843;60(157):410-418.
51. Obermeier O. Vorkommen feinsten eine Eigenbewegung zeigender Fäden im Blute von Rekurrenkranken. *Zentralbl Med Wiss*. 1873;(11):145-155.
52. Wright DJM, Maria B. Ich bin ein Berliner*. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(4):484-486. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03475.x.
53. Dutton JE, Todd JL, Newstead R. The nature of human tick-fever in the eastern part of the Congo Free State: with notes on the distribution and bionomics of the tick: Memoirs of the Liverpool School of Tropical Medicine. *University Press of Liverpool by Williams & Norgate*. 1905;(17):1-26.

54. Mackie FP. The part played by *Pediculus corporis* in the transmission of relapsing fever. *Br Med J*. 1907;2(2450):1706-1709. doi:10.1136/bmj.2.2450.1706.
55. Doury P. Henry Foley et la découverte du rôle du pou dans la transmission de la fièvre récurrente et du typhus exanthématique [Henry Foley and the discovery in 1908 of the role played by the louse in the transmission of relapsing fever]. *Hist Sci Med*. 1996;30(3):363-369.
56. Kahlig P, Paris DH, Neumayr A. Louse-borne relapsing fever-A systematic review and analysis of the literature: Part 1-Epidemiology and diagnostic aspects. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021;15(3):e0008564. doi:10.1371/journal.pntd.0008564.
57. Cutler SJ, Abdissa A, Trape J-F. New concepts for the old challenge of African relapsing fever borreliosis. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15(5):400-406. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.02819.x.
58. Levot G. Resistance and the control of lice on humans and production animals. *Int J Parasitol*. 2000;30(3):291-297. doi:10.1016/s0020-7519(99)00203-9.
59. Valdizán M, López J, Delgado A. Borreliosis en las alturas del Perú [Borreliosis in high altitude in Peru]. *Diagnóstico (Perú)*. 1985;15(1):9-13.
60. McConnell J. Tick-borne relapsing fever under-reported. *Lancet Infect Dis*. 2003;3(10):604. doi:10.1016/s1473-3099(03)00787-4.
61. Ramos JM, Malmierca E, Reyes F, Tesfamariam A. Results of a 10-year survey of louse-borne relapsing fever in southern Ethiopia: a decline in endemicity. *Ann Trop Med Parasitol*. 2008;102(5):467-469. doi:10.1179/136485908X300887.
62. Badiaga S, Brouqui P. Human louse-transmitted infectious diseases. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(4):332-337. doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03778.x.
63. Colebunders R, Serrano P de, van Gompel A, Wynants H, Blot K, van den Enden E, van den Ende J. Imported relapsing fever in European tourists. *Scand J Infect Dis*. 1993;25(4):533-536. doi:10.3109/00365549309008539.
64. Ciervo A, Mancini F, Di Bernardo F, Giammanco A, Vitale G, Dones P, Fasciana T, Quartaro P, Mazzola G, Rezza G. Louse-borne relapsing fever in young migrants, Sicily, Italy, July-September 2015. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(1):152-153. doi:10.3201/eid2201.151580.

65. Isenring E, Fehr J, Gültekin N, Schlagenhaut P. Infectious disease profiles of Syrian and Eritrean migrants presenting in Europe: a systematic review. *Travel Med Infect Dis*. 2018;25:65-76. doi:10.1016/j.tmaid.2018.04.014.
66. Ackermann N, Marosevic D, Hörmansdorfer S, Eberle U, Rieder G, Treis B, Berger A, Bischoff H, Bengs K, Konrad R, Hautmann W, Schönberger K, Belting A, Schlenk G, Margos G, Hoch M, Pürner F, Fingerle V, Liebl B, Sing A. Screening for infectious diseases among newly arrived asylum seekers, Bavaria, Germany, 2015. *Euro Surveill*. 2018;23(10):1-11. doi:10.2807/1560-7917.ES.2018.23.10.17-00176.
67. Antinori S, Mediannikov O, Corbellino M, Raoult D. Louse-borne relapsing fever among East African refugees in Europe. *Travel Med Infect Dis*. 2016;14(2):110-114. doi:10.1016/j.tmaid.2016.01.004.
68. Hytönen J, Khawaja T, Grönroos JO, Jalava A, Meri S, Oksi J. Louse-borne relapsing fever in Finland in two asylum seekers from Somalia. *APMIS*. 2017;125(1):59-62. doi:10.1111/apm.12635.
69. Hoch M, Wieser A, Löscher T, Margos G, Pürner F, Zühl J, Seilmaier M, Balzer L, Guggemos W, Rack-Hoch A, Both U von, Hauptvogel K, Schönberger K, Hautmann W, Sing A, Fingerle V. Louse-borne relapsing fever (*Borrelia recurrentis*) diagnosed in 15 refugees from northeast Africa: epidemiology and preventive control measures, Bavaria, Germany, July to October 2015. *Euro Surveill*. 2015;20(42):1-5. doi:10.2807/1560-7917.ES.2015.20.42.30046.
70. Grecchi C, Zanotti P, Pontarelli A, Chiari E, Tomasoni LR, Gulletta M, Barbui A, Caligaris S, Matteelli A, Castelli F. Louse-borne relapsing fever in a refugee from Mali. *Infection*. 2017;45(3):373-376. doi:10.1007/s15010-017-0987-2.
71. Robert Koch-Institut. Spezielle Krankheiten: Läuserückfallfieber. *Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2005*. 2006:113-114.
72. Robert Koch-Institut. Spezielle Krankheiten: Läuserückfallfieber. *Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2020*. 2021:132-133. doi:10.25646/8773.
73. Robert Koch-Institut. Reiseassoziierte Krankheiten 2015. *Epidemiologisches Bulletin*. 2016;(39):437.

74. Leibler JH, Robb K, Joh E, Gaeta JM, Rosenbaum M. Self-reported animal and ectoparasite exposure among urban homeless people. *J Health Care Poor Underserved*. 2018;29(2):664-675. doi:10.1353/hpu.2018.0050.
75. Sasaki T, Kobayashi M, Agui N. Detection of *Bartonella quintana* from body lice (*Anoplura: Pediculidae*) infesting homeless people in Tokyo by molecular technique. *J Med Entomol*. 2002;39(3):427-429. doi:10.1603/0022-2585-39.3.427.
76. Bonilla DL, Cole-Porse C, Kjemtrup A, Osikowicz L, Kosoy M. Risk factors for human lice and bartonellosis among the homeless, San Francisco, California, USA. *Emerg Infect Dis*. 2014;20(10):1645-1651. doi:10.3201/eid2010.131655.
77. Brouqui P, Stein A, Dupont HT, Gallian P, Badiaga S, Rolain JM, Mege JL, La Scola B, Berbis P, Raoult D. Ectoparasitism and vector-borne diseases in 930 homeless people from Marseilles. *Medicine (Baltimore)*. 2005;84(1):61-68. doi:10.1097/01.md.0000152373.07500.6e.
78. Ly TDA, Touré Y, Calloix C, Badiaga S, Raoult D, Tissot-Dupont H, Brouqui P, Gautret P. Changing demographics and prevalence of body lice among homeless persons, Marseille, France. *Emerg Infect Dis*. 2017;23(11):1894-1897. doi:10.3201/eid2311.170516.
79. Brouqui P, Raoult D. Arthropod-borne diseases in homeless. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1078:223-235. doi:10.1196/annals.1374.041.
80. Cheslock MA, Embers ME. Human bartonellosis: an underappreciated public health problem? *Trop Med Infect Dis*. 2019;4(69):1-16. doi:10.3390/tropicalmed4020069.
81. Relapsing Fever and Borrelioses. In: Hunter GW, Magill AJ, Hill DR, Ryan ET, Solomon T, eds. *Hunter's tropical medicine and emerging infectious disease*. 10th ed. London: Elsevier Saunders; 2020:641-645.
82. Schwan TG, Raffel SJ, Schrupf ME, Webster LS, Marques AR, Spano R, Rood M, Burns J, Hu R. Tick-borne relapsing fever and *Borrelia hermsii*, Los Angeles County, California, USA. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(7):1026-1031. doi:10.3201/eid1507.090223.
83. Dworkin MS, Anderson DE, Schwan TG, Shoemaker PC, Banerjee SN, Kassen BO, Burgdorfer W. Tick-borne relapsing fever in the northwestern United States and southwestern Canada. *Clin Infect Dis*. 1998;26(1):122-131. doi:10.1086/516273.

84. Abera EG, Tukeni KN, Didu GH, Chala TK, Yilma D, Gudina EK. Epistaxis and thrombocytopenia as major presentations of louse-borne relapsing fever: Hospital-based study. *PLoS One*. 2022;17(12):e0279721. doi:10.1371/journal.pone.0279721.
85. Cadavid D, Barbour AG. Neuroborreliosis during relapsing fever: review of the clinical manifestations, pathology, and treatment of infections in humans and experimental animals. *Clin Infect Dis*. 1998;26(1):151-164. doi:10.1086/516276.
86. Larsson C, Andersson M, Guo BP, Nordstrand A, Hagerstrand I, Carlsson S, Bergstrom S. Complications of pregnancy and transplacental transmission of relapsing-fever borreliosis. *J Infect Dis*. 2006;194(10):1367-1374. doi:10.1086/508425.
87. Wengrower D, Knobler H, Gillis S, Chajek-Shaul T. Myocarditis in tick-borne relapsing fever. *J Infect Dis*. 1984;149(6):1033. doi:10.1093/infdis/149.6.1033.
88. Antinori S, Mediannikov O, Corbellino M, Grande R, Parravicini C, Bestetti G, Longhi E, Ricaboni D, Ehounoud CB, Fenollar F, Raoult D, Rimoldi SG. Louse-borne relapsing fever (*Borrelia recurrentis*) in a Somali refugee arriving in Italy: a re-emerging infection in Europe? *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(5):e0004522. doi:10.1371/journal.pntd.0004522.
89. Perine PL, Teklu B. Antibiotic treatment of louse-borne relapsing fever in Ethiopia: a report of 377 cases. *Am J Trop Med Hyg*. 1983;32(5):1096-1100. doi:10.4269/ajtmh.1983.32.1096.
90. Eguale T, Abate G, Balcha F. Relapsing fever in Hossana, Ethiopia: a clinical and epidemiological study. *Ethiopian Journal of Health Sciences*. 2002;12(2):103-108.
91. Robert Koch-Institut. Läuserückfallfieber (Infektion mit *Borrelia recurrentis*) bei Migranten. *Epidemiologisches Bulletin*. 2015;(33):326.
92. Nordmann T, Feldt T, Bosselmann M, Tufa TB, Lemma G, Holtfreter M, Häussinger D. Outbreak of louse-borne relapsing fever among urban dwellers in Arsi Zone, Central Ethiopia, from July to November 2016. *Am J Trop Med Hyg*. 2018;98(6):1599-1602. doi:10.4269/ajtmh.17-0470.
93. Butler T, Hazen P, Wallace CK, Awoke S, Habte-Michael A. Infection with *Borrelia recurrentis*: pathogenesis of fever and petechiae. *J Infect Dis*. 1979;140(5):665-675. doi:10.1093/infdis/140.5.665.

94. Yang C-W, Hung C-C, Wu M-S, Tian Y-C, Chang C-T, Pan M-J, Vandewalle A. Toll-like receptor 2 mediates early inflammation by leptospiral outer membrane proteins in proximal tubule cells. *Kidney Int.* 2006;69(5):815-822. doi:10.1038/sj.ki.5000119.
95. Negussie Y, Remick DG, DeForge LE, Kunkel SL, Eynon A, Griffin GE. Detection of plasma tumor necrosis factor, interleukins 6, and 8 during the Jarisch-Herxheimer Reaction of relapsing fever. *J Exp Med.* 1992;175(5):1207-1212. doi:10.1084/jem.175.5.1207.
96. Cuevas LE, Borgnolo G, Hailu B, Smith G, Almaviva M, Hart CA. Tumour necrosis factor, interleukin-6 and C-reactive protein in patients with louse-borne relapsing fever in Ethiopia. *Ann Trop Med Parasitol.* 1995;89(1):49-54. doi:10.1080/00034983.1995.11812928.
97. Fekade D, Knox K, Hussein K, Melka A, Laloo DG, Coxon RE, Warrell DA. Prevention of Jarisch-Herxheimer reactions by treatment with antibodies against tumor necrosis factor alpha. *N Engl J Med.* 1996;335(5):311-315. doi:10.1056/NEJM199608013350503.
98. Warrell DA, Perine PL, Krause DW, Bing DH, MacDougal SJ. Pathophysiology and immunology of the Jarisch-Herxheimer-like reaction in louse-borne relapsing fever: comparison of tetracycline and slow-release penicillin. *J Infect Dis.* 1983;147(5):898-909. doi:10.1093/infdis/147.5.898.
99. Butler T. The Jarisch-Herxheimer reaction after antibiotic treatment of spirochetal infections: a review of recent cases and our understanding of pathogenesis. *Am J Trop Med Hyg.* 2017;96(1):46-52. doi:10.4269/ajtmh.16-0434.
100. Guerrier G, Doherty T. Comparison of antibiotic regimens for treating louse-borne relapsing fever: a meta-analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2011;105(9):483-490. doi:10.1016/j.trstmh.2011.04.004.
101. Bryceson AD, Cooper KE, Warrell DA, Perine PL, Parry EH. Studies of the mechanism of the Jarisch-Herxheimer reaction in louse-borne relapsing fever: evidence for the presence of circulating *Borrelia* endotoxin. *Clin Sci.* 1972;43(3):343-354. doi:10.1042/cs0430343.
102. García-Soler P, Núñez-Cuadros E, Milano-Manso G, Ruiz Sánchez P. Reacción de Jarisch-Herxheimer grave en fiebre recurrente transmitida por garrapatas [Severe

- Jarisch-Herxheimer reaction in tick-borne relapsing fever]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(9):710-711. doi:10.1016/j.eimc.2011.01.019.
103. Jongen VH, van Roosmalen J, Tiems J, van Holten J, Wetsteyn JC. Tick-borne relapsing fever and pregnancy outcome in rural Tanzania. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1997;76(9):834-838. doi:10.3109/00016349709024361.
 104. Melkert PW, Stel HV. Neonatal *Borrelia* infections (relapsing fever): report of 5 cases and review of the literature. *East Afr Med J*. 1991;68(12):999-1005.
 105. Rustenhoven-Spaan I, Melkert P, Nelissen E, van Roosmalen J, Stekelenburg J. Maternal mortality in a rural Tanzanian hospital: fatal Jarisch-Herxheimer reaction in a case of relapsing fever in pregnancy. *Trop Doct*. 2013;43(4):138-141. doi:10.1177/0049475513497477.
 106. Pound MW, May DB. Proposed mechanisms and preventative options of Jarisch-Herxheimer reactions. *J Clin Pharm Ther*. 2005;30(3):291-295. doi:10.1111/j.1365-2710.2005.00631.x.
 107. Sheldon WH, Heyman A. Morphologic changes in syphilitic lesions during the Jarisch-Herxheimer reaction. *Am J Syph Gonorrhea Vener Dis*. 1949;33(3):213-224.
 108. Zifko U, Lindner K, Wimberger D, Volc B, Grisold W. Jarisch-Herxheimer reaction in a patient with neurosyphilis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1994;57(7):865-867. doi:10.1136/jnnp.57.7.865.
 109. Butler T, Jones PK, Wallace CK. *Borrelia recurrentis* infection: single-dose antibiotic regimens and management of the Jarisch-Herxheimer reaction. *J Infect Dis*. 1978;137(5):573-577. doi:10.1093/infdis/137.5.573.
 110. Seboxa T, Rahlenbeck SI. Treatment of louse-borne relapsing fever with low dose penicillin or tetracycline: a clinical trial. *Scand J Infect Dis*. 1995;27(1):29-31. doi:10.3109/00365549509018969.
 111. Nordstrand A, Bunikis I, Larsson C, Tsogbe K, Schwan TG, Nilsson M, Bergström S. Tick-borne relapsing fever diagnosis obscured by malaria, Togo. *Emerg Infect Dis*. 2007;13(1):117-123. doi:10.3201/eid1301.060670.
 112. Ramos JM, Reyes F, Tesfamariam A, Malmierca E. Louse-borne relapsing fever and malaria co-infection in Ethiopia. *Trop Doct*. 2007;37(2):121-122. doi:10.1177/004947550703700229.

113. Hovette P, Aubron C, Perrier-Gros-Claude JD, Schieman R, N'Dir MC, Camara P. Intérêt du Quantitative Buffy Coat (QBC) dans la co-infection borréliose-paludisme [Value of Quantitative Buffy Coat (QBC) in borreliosis-malaria co-infection]. *Med Trop (Mars)*. 2001;61(2):196-197.
114. 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.
115. Stott H. On two varieties of relapsing fever spirochætal infection in India. *Ind Med Gaz*. 1911;46(8):292-298.
116. Elbir H, Henry M, Diatta G, Mediannikov O, Sokhna C, Tall A, Socolovschi C, Cutler SJ, Bilcha KD, Ali J, Campelo D, Barker SC, Raoult D, Drancourt M. Multiplex real-time PCR diagnostic of relapsing fevers in Africa. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(1):e2042. doi:10.1371/journal.pntd.0002042.
117. Antinori S, Tonello C, Edouard S, Parravicini C, Gastaldi D, Grande R, Milazzo L, Ricaboni D, Fenollar F, Raoult D, Corbellino M, Mediannikov O. Diagnosis of louse-borne relapsing fever despite negative microscopy in two asylum seekers from Eastern Africa. *Am J Trop Med Hyg*. 2017;97(6):1669-1672. doi:10.4269/ajtmh.17-0320.
118. Röttgerding F, Njeru J, Schlüfter E, Latz A, Mahdavi R, Steinhoff U, Cutler SJ, Besier S, Kempf VAJ, Fingerle V, Kraiczky P. Novel approaches for the serodiagnosis of louse-borne relapsing fever. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12(983770):1-15. doi:10.3389/fcimb.2022.983770.
119. Bankole AA, Kumsa B, Mamo G, Ogo NI, Elelu N, Morgan W, Cutler SJ. Comparative analysis of tick-borne relapsing fever spirochaetes from Ethiopia and Nigeria. *Pathogens*. 2023;12(81):1-21. doi:10.3390/pathogens12010081.
120. Barker SC, Barker D. Killing clothes lice by holding infested clothes away from hosts for 10 days to control louseborne relapsing fever. *Emerg Infect Dis*. 2019;25(2):304-310.
121. Kimmig P. Ektoparasiten: Anoplura. In: Neumeister B, Geiss HK, Braun R, Kimmig P, eds. *Mikrobiologische Diagnostik: Bakteriologie - Mykologie - Virologie - Parasitologie*. 2., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme; 2009:1107-1108. <http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bsz:24-epflicht-1912775>.

122. Zipfel PF. Complement and immune defense: from innate immunity to human diseases. *Immunol Lett.* 2009;126(1-2):1-7. doi:10.1016/j.imlet.2009.07.005.
123. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol.* 2010;11(9):785-797. doi:10.1038/ni.1923.
124. Ehrnthaller C, Ignatius A, Gebhard F, Huber-Lang M. New insights of an old defense system: structure, function, and clinical relevance of the complement system. *Mol Med.* 2011;17(3-4):317-329. doi:10.2119/molmed.2010.00149.
125. Ehrlich P, Morgenroth J. Zur Theorie der Lysenwirkung. *Berliner Klinische Wochenschrift.* 1899;(36):6.
126. Reid KB, Porter RR. The proteolytic activation systems of complement. *Annu Rev Biochem.* 1981;50:433-464. doi:10.1146/annurev.bi.50.070181.002245.
127. Zipfel PF, Würzner R, Skerka C. Complement evasion of pathogens: common strategies are shared by diverse organisms. *Mol Immunol.* 2007;44(16):3850-3857. doi:10.1016/j.molimm.2007.06.149.
128. Ogden CA, Elkon KB. Role of complement and other innate immune mechanisms in the removal of apoptotic cells. *Curr Dir Autoimmun.* 2006;9:120-142. doi:10.1159/000090776.
129. Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement system part I - molecular mechanisms of activation and regulation. *Front Immunol.* 2015;6(262):1-30. doi:10.3389/fimmu.2015.00262.
130. Dunkelberger JR, Song W-C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res.* 2010;20(1):34-50. doi:10.1038/cr.2009.139.
131. Rahal D, Andrade F, Nisihara R. Insights into the role of complement system in the pathophysiology of endometriosis. *Immunol Lett.* 2021;231:43-48. doi:10.1016/j.imlet.2021.01.005.
132. Wagner E, Frank MM. Therapeutic potential of complement modulation. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(1):43-56. doi:10.1038/nrd3011.
133. Jong S de, Gagliardi G, Garanto A, Breuk A de, Lechanteur YTE, Katti S, van den Heuvel LP, Volokhina EB, Hollander AI den. Implications of genetic variation in the complement system in age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res.* 2021;84(100952):1-31. doi:10.1016/j.preteyeres.2021.100952.

134. Vignesh P, Rawat A, Sharma M, Singh S. Complement in autoimmune diseases. *Clin Chim Acta*. 2017;465:123-130. doi:10.1016/j.cca.2016.12.017.
135. Hajishengallis G, Reis ES, Mastellos DC, Ricklin D, Lambris JD. Novel mechanisms and functions of complement. *Nat Immunol*. 2017;18(12):1288-1298. doi:10.1038/ni.3858.
136. Qu H, Ricklin D, Lambris JD. Recent developments in low molecular weight complement inhibitors. *Mol Immunol*. 2009;47(2-3):185-195. doi:10.1016/j.molimm.2009.08.032.
137. Bareke H, Akbuga J. Complement system's role in cancer and its therapeutic potential in ovarian cancer. *Scand J Immunol*. 2018;88:e12672. doi:10.1111/sji.12672.
138. Kolev M, Kemper C. Keeping it all going - complement meets metabolism. *Front Immunol*. 2017;8(1):1-18. doi:10.3389/fimmu.2017.00001.
139. Hertle E, van Greevenbroek MMJ, Stehouwer CDA. Complement C3: an emerging risk factor in cardiometabolic disease. *Diabetologia*. 2012;55(4):881-884. doi:10.1007/s00125-012-2462-z.
140. Sarma JV, Ward PA. The complement system. *Cell Tissue Res*. 2011;343(1):227-235. doi:10.1007/s00441-010-1034-0.
141. Gaboriaud C, Thielens NM, Gregory LA, Rossi V, Fontecilla-Camps JC, Arlaud GJ. Structure and activation of the C1 complex of complement: unraveling the puzzle. *Trends Immunol*. 2004;25(7):368-373. doi:10.1016/j.it.2004.04.008.
142. Wallis R, Mitchell DA, Schmid R, Schwaebler WJ, Keeble AH. Paths reunited: initiation of the classical and lectin pathways of complement activation. *Immunobiology*. 2010;215(1):1-11. doi:10.1016/j.imbio.2009.08.006.
143. 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):1-16. doi:10.3389/fimmu.2017.00012.
144. Sørensen R, Thiel S, Jensenius JC. Mannan-binding-lectin-associated serine proteases, characteristics and disease associations. *Springer Semin Immunopathol*. 2005;27(3):299-319. doi:10.1007/s00281-005-0006-z.

145. Wallis R. Interactions between mannose-binding lectin and MASPs during complement activation by the lectin pathway. *Immunobiology*. 2007;212(4-5):289-299. doi:10.1016/j.imbio.2006.11.004.
146. Lachmann PJ, Halbwachs L. The influence of C3b inactivator (KAF) concentration on the ability of serum to support complement activation. *Clin Exp Immunol*. 1975;21(1):109-114.
147. Pangburn MK, Schreiber RD, Müller-Eberhard HJ. Formation of the initial C3 convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3. *J Exp Med*. 1981;154(3):856-867. doi:10.1084/jem.154.3.856.
148. Kemper C, Atkinson JP, Hourcade DE. Properdin: emerging roles of a pattern-recognition molecule. *Annu Rev Immunol*. 2010;28:131-155. doi:10.1146/annurev-immunol-030409-101250.
149. Dalmaso AP, Falk RJ, Raij L. The pathobiology of the terminal complement complexes. *Complement Inflamm*. 1989;6(1):36-48. doi:10.1159/000463070.
150. Davis AE, Mejia P, Lu F. Biological activities of C1 inhibitor. *Mol Immunol*. 2008;45(16):4057-4063. doi:10.1016/j.molimm.2008.06.028.
151. Grosskinsky S, Schott M, Brenner C, Cutler SJ, Simon MM, Wallich R. Human complement regulators C4b-binding protein and C1 esterase inhibitor interact with a novel outer surface protein of *Borrelia recurrentis*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(6):e968. doi:10.1371/journal.pntd.0000698.
152. Davis AE, Lu F, Mejia P. C1 inhibitor, a multi-functional serine protease inhibitor. *Thromb Haemost*. 2010;104(5):886-893. doi:10.1160/TH10-01-0073.
153. Beinrohr L, Dobó J, Závodszy P, Gál P. C1, MBL-MASPs and C1-inhibitor: novel approaches for targeting complement-mediated inflammation. *Trends Mol Med*. 2008;14(12):511-521. doi:10.1016/j.molmed.2008.09.009.
154. Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med*. 2001;344(14):1058-1066. doi:10.1056/NEJM200104053441406.
155. Zipfel PF, Skerka C. FHL-1/reconectin: a human complement and immune regulator with cell-adhesive function. *Immunol Today*. 1999;20(3):135-140. doi:10.1016/s0167-5699(98)01432-7.

156. Hourcade DE. Properdin and complement activation: a fresh perspective. *Curr Drug Targets*. 2008;9(2):158-164. doi:10.2174/138945008783502458.
157. Blom AM, Villoutreix BO, Dahlbäck B. Complement inhibitor C4b-binding protein-friend or foe in the innate immune system? *Mol Immunol*. 2004;40(18):1333-1346. doi:10.1016/j.molimm.2003.12.002.
158. Blom AM, Webb J, Villoutreix BO, Dahlbäck B. A cluster of positively charged amino acids in the C4BP alpha-chain is crucial for C4b binding and factor I cofactor function. *J Biol Chem*. 1999;274(27):19237-19245. doi:10.1074/jbc.274.27.19237.
159. Hofmeyer T, Schmelz S, Degiacomi MT, Dal Peraro M, Daneschdar M, Scrima A, van den Heuvel J, Heinz DW, Kolmar H. Arranged sevenfold: structural insights into the C-terminal oligomerization domain of human C4b-binding protein. *J Mol Biol*. 2013;425(8):1302-1317. doi:10.1016/j.jmb.2012.12.017.
160. Liszewski MK, Farries TC, Lublin DM, Rooney IA, Atkinson JP. Control of the complement system. *Adv Immunol*. 1996;61:201-283. doi:10.1016/s0065-2776(08)60868-8.
161. Meri S, Jarva H. Complement regulation. *Vox Sang*. 1998;(S2):291-302. doi:10.1111/j.1423-0410.1998.tb05434.x.
162. Barbour AG, Restrepo BI. Antigenic variation in vector-borne pathogens. *Emerg Infect Dis*. 2000;6(5):449-457. doi:10.3201/eid0605.000502.
163. Alugupalli KR, Gerstein RM, Chen J, Szomolanyi-Tsuda E, Woodland RT, Leong JM. The resolution of relapsing fever borreliosis requires IgM and is concurrent with expansion of B1b lymphocytes. *J Immunol*. 2003;170(7):3819-3827. doi:10.4049/jimmunol.170.7.3819.
164. Barbour AG, Tessier SL, Stoenner HG. Variable major proteins of *Borrelia hermsii*. *J Exp Med*. 1982;156(5):1312-1324. doi:10.1084/jem.156.5.1312.
165. Restrepo BI, Kitten T, Carter CJ, Infante D, Barbour AG. Subtelomeric expression regions of *Borrelia hermsii* linear plasmids are highly polymorphic. *Mol Microbiol*. 1992;6(22):3299-3311. doi:10.1111/j.1365-2958.1992.tb02198.x.
166. Dai Q, Restrepo BI, Porcella SF, Raffel SJ, Schwan TG, Barbour AG. Antigenic variation by *Borrelia hermsii* occurs through recombination between extragenic repetitive elements on linear plasmids. *Mol Microbiol*. 2006;60(6):1329-1343. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05177.x.

167. 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. doi:10.1128/IAI.66.2.432-440.1998.
168. 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.
169. Meier JT, Simon MI, Barbour AG. 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.
170. Plasterk RH, Simon MI, Barbour AG. Transposition of structural genes to an expression sequence on a linear plasmid causes antigenic variation in the bacterium *Borrelia hermsii*. *Nature*. 1985;318(6043):257-263. doi:10.1038/318257a0.
171. Pennington PM, Cadavid D, Bunikis J, Norris SJ, Barbour AG. Extensive interplasmidic duplications change the virulence phenotype of the relapsing fever agent *Borrelia turicatae*. *Mol Microbiol*. 1999;34(5):1120-1132. doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01675.x.
172. 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.
173. Restrepo BI, Carter CJ, Barbour AG. Activation of a *vmp* pseudogene in *Borrelia hermsii*: an alternate mechanism of antigenic variation during relapsing fever. *Mol Microbiol*. 1994;13(2):287-299. doi:10.1111/j.1365-2958.1994.tb00423.x.
174. 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.
175. 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.
176. 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.
177. Kraiczy P, Wallich R. Borrelial complement-binding proteins. In: Embers ME, ed. *The pathogenic spirochetes. Strategies for evasion of host immunity and persistence*. New York: Springer; 2012:63-88.
 178. Meri T, Cutler SJ, Blom AM, Meri S, Jokiranta TS. Relapsing fever spirochetes *Borrelia recurrentis* and *B. duttonii* acquire complement regulators C4b-binding protein and factor H. *Infect Immun*. 2006;74(7):4157-4163. doi:10.1128/IAI.00007-06.
 179. Grosskinsky S, Schott M, Brenner C, Cutler SJ, Kraiczy P, Zipfel PF, Simon MM, Wallich R. *Borrelia recurrentis* employs a novel multifunctional surface protein with anti-complement, anti-opsonic and invasive potential to escape innate immunity. *PLoS One*. 2009;4(3):e4858. doi:10.1371/journal.pone.0004858.
 180. Röttgerding F. *Funktionelle Charakterisierung verschiedener Lipoproteine aus Borrelia recurrentis, dem Erreger des Rückfallfiebers*. [master's thesis]. Frankfurt am Main: Johann Wolfgang Goethe-Universität; 2018.
 181. Kraiczy P, Hunfeld KP, Breitner-Ruddock S, Würzner R, Acker G, Brade V. Comparison of two laboratory methods for the determination of serum resistance in *Borrelia burgdorferi* isolates. *Immunobiology*. 2000;201(3-4):406-419. doi:10.1016/S0171-2985(00)80094-7.
 182. Frank KL, Bundle SF, Kresge ME, Eggers CH, Samuels DS. aadA confers streptomycin resistance in *Borrelia burgdorferi*. *J Bacteriol*. 2003;185(22):6723-6727. doi:10.1128/JB.185.22.6723-6727.2003.
 183. Hammerschmidt C, Klevenhaus Y, Koenigs A, Hallström T, Fingerle V, Skerka C, Pos KM, Zipfel PF, Wallich R, Kraiczy P. BGA66 and BGA71 facilitate complement resistance of *Borrelia bavariensis* by inhibiting assembly of the membrane attack complex. *Mol Microbiol*. 2016;99(2):407-424. doi:10.1111/mmi.13239.
 184. 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(303):1-15. doi:10.1038/s41598-017-00412-4.

185. Ries JI, Heß M, Nouri N, Wichelhaus TA, Göttig S, Falcone FH, Kraiczy P. CspA mediates complement resistance of *Acinetobacter baumannii* by formation of a factor I-dependent quadripartite assemblage. *Front Immunol.* 2022;13(942482):1-17. doi:10.3389/fimmu.2022.942482.
186. 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.
187. Wagemakers A, Koetsveld J, Narasimhan S, Wickel M, Deponte K, Bleijlevens B, Jahfari S, Sprong H, Karan LS, Sarksyian 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.
188. Garcia BL, Zhi H, Wager B, Höök M, Skare JT. *Borrelia burgdorferi* BBK32 inhibits the classical pathway by blocking activation of the C1 complement complex. *PLoS Pathog.* 2016;12(1):e1005404. doi:10.1371/journal.ppat.1005404.
189. 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):e00481-13. doi:10.1128/mBio.00481-13.
190. Rollins RE, Wülbern J, Röttgerding F, Nowak TA, Hepner S, Fingerle V, Margos G, Lin Y-P, Kraiczy P, Becker NS. Utilizing two *Borrelia bavariensis* isolates naturally lacking the PFam54 gene array to elucidate the roles of PFam54-encoded proteins. *Appl Environ Microbiol.* 2022;88(5):e0155521. doi:10.1128/AEM.01555-21.
191. Cordes FS, Roversi P, Kraiczy P, Simon MM, Brade V, Jahraus O, Wallis R, Skerka C, Zipfel PF, Wallich R, Lea SM. A novel fold for the factor H-binding protein BbCRASP-1 of *Borrelia burgdorferi*. *Nat Struct Mol Biol.* 2005;12(3):276-277. doi:10.1038/nsmb902.
192. Reuter M, Caswell CC, Lukomski S, Zipfel PF. Binding of the human complement regulators CFHR1 and factor H by streptococcal collagen-like protein 1 (Scl1) via their conserved C termini allows control of the complement cascade at multiple levels. *J Biol Chem.* 2010;285(49):38473-38485. doi:10.1074/jbc.M110.143727.

193. Achila D, Liu A, Banerjee R, Li Y, Martinez-Hackert E, Zhang J-R, Yan H. Structural determinants of host specificity of complement factor H recruitment by *Streptococcus pneumoniae*. *Biochem J*. 2015;465(2):325-335. doi:10.1042/BJ20141069.
194. Koch TK, Reuter M, Barthel D, Böhm S, van den Elsen J, Kraiczky P, Zipfel PF, Skerka C. *Staphylococcus aureus* proteins Sbi and Efb recruit human plasmin to degrade complement C3 and C3b. *PLoS One*. 2012;7(10):e47638. doi:10.1371/journal.pone.0047638.
195. Bernhard S, Fleury C, Su Y-C, Zipfel PF, Koske I, Nordström T, Riesbeck K. Outer membrane protein OlpA contributes to *Moraxella catarrhalis* serum resistance via interaction with factor H and the alternative pathway. *J Infect Dis*. 2014;210(8):1306-1310. doi:10.1093/infdis/jiu241.
196. Schneider MC, Prosser BE, Caesar JJE, Kugelberg E, Li S, Zhang Q, Quoraishi S, Lovett JE, Deane JE, Sim RB, Roversi P, Johnson S, Tang CM, Lea SM. *Neisseria meningitidis* recruits factor H using protein mimicry of host carbohydrates. *Nature*. 2009;458(7240):890-893. doi:10.1038/nature07769.
197. Kim SW, Choi CH, Moon DC, Jin JS, Lee JH, Shin J-H, Kim JM, Lee YC, Seol SY, Cho DT, Lee JC. Serum resistance of *Acinetobacter baumannii* through the binding of factor H to outer membrane proteins. *FEMS Microbiol Lett*. 2009;301(2):224-231. doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01820.x.
198. Moore SR, Menon SS, Cortes C, Ferreira VP. Hijacking factor H for complement immune evasion. *Front Immunol*. 2021;12:602277. doi:10.3389/fimmu.2021.602277.
199. Lynskey NN, Reglinski M, Calay D, Siggins MK, Mason JC, Botto M, Sriskandan S. Multi-functional mechanisms of immune evasion by the streptococcal complement inhibitor C5a peptidase. *PLoS Pathog*. 2017;13(8):e1006493. doi:10.1371/journal.ppat.1006493.
200. Itoh S, Hamada E, Kamoshida G, Yokoyama R, Takii T, Onozaki K, Tsuji T. Staphylococcal superantigen-like protein 10 (SSL10) binds to human immunoglobulin G (IgG) and inhibits complement activation via the classical pathway. *Mol Immunol*. 2010;47(4):932-938. doi:10.1016/j.molimm.2009.09.027.

201. Rooijackers SHM, Ruyken M, Roos A, Daha MR, Presanis JS, Sim RB, van Wamel WJB, van Kessel KPM, van Strijp JAG. Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases. *Nat Immunol.* 2005;6(9):920-927. doi:10.1038/ni1235.
202. Roy S, Booth CE, Powell-Pierce AD, Schulz AM, Skare JT, Garcia BL. Conformational dynamics of complement protease C1r inhibitor proteins from Lyme disease- and relapsing fever-causing spirochetes. *J Biol Chem.* 2023;299(8):104972. doi:10.1016/j.jbc.2023.104972.
203. Rossmann E, Kraiczy P, Herzberger P, Skerka C, Kirschfink M, Simon MM, Zipfel PF, Wallich R. Dual binding specificity of a *Borrelia hermsii*-associated complement regulator-acquiring surface protein for factor H and plasminogen discloses a putative virulence factor of relapsing fever spirochetes. *J Immunol.* 2007;178(11):7292-7301. doi:10.4049/jimmunol.178.11.7292.
204. Schott M, Grosskinsky S, Brenner C, Kraiczy P, Wallich R. Molecular characterization of the interaction of *Borrelia parkeri* and *Borrelia turicatae* with human complement regulators. *Infect Immun.* 2010;78(5):2199-2208. doi:10.1128/IAI.00089-10.
205. 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.
206. McDowell JV, Wolfgang J, Tran E, Metts MS, Hamilton D, Marconi RT. Comprehensive analysis of the factor h binding capabilities of *Borrelia* species associated with Lyme disease: delineation of two distinct classes of factor h binding proteins. *Infect Immun.* 2003;71(6):3597-3602. doi:10.1128/IAI.71.6.3597-3602.2003.
207. Lubinski J, Nagashunmugam T, Friedman HM. Viral interference with antibody and complement. *Semin Cell Dev Biol.* 1998;9(3):329-337. doi:10.1006/scdb.1998.0242.
208. Ward PA. Functions of C5a receptors. *J Mol Med (Berl).* 2009;87(4):375-378. doi:10.1007/s00109-009-0442-7.

209. Hloch J. *Untersuchung der Komplementinaktivierungskapazität des Proteins Bdu_1066 aus Borrelia duttonii und des Proteins ORF10 aus Borrelia recurrentis*. [Berichtsheft zum Berufspraktischen Semester]. Idstein: Hochschule Fresenius; 2019.
210. Caesar JJE, Wallich R, Kraiczy P, Zipfel PF, Lea SM. Further structural insights into the binding of complement factor H by complement regulator-acquiring surface protein 1 (CspA) of *Borrelia burgdorferi*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 2013;69(Pt 6):629-633. doi:10.1107/S1744309113012748.
211. Brangulis K, Akopjana I, Petrovskis I, Kazaks A, Kraiczy P, Tars K. Crystal structure of the membrane attack complex assembly inhibitor BGA71 from the Lyme disease agent *Borrelia bavariensis*. *Sci Rep*. 2018;8(1):11286. doi:10.1038/s41598-018-29651-9.

8 Danksagung

Mein größter Dank gilt Prof. Dr. Peter Kraiczky für die Bereitstellung des Themas, die herausragende Betreuung während der Anfertigung dieser Arbeit, die konstruktive und angenehme Arbeitsatmosphäre, das fortwährende Interesse sowie für die kritische und hilfreiche Durchsicht meiner Arbeit.

Weiterhin gilt mein Dank Prof. Dr. Volkhard A. J. Kempf, dem Leiter des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene des Universitätsklinikums Frankfurt am Main, für die Ermöglichung der Anfertigung meiner Promotion an seinem Institut und die Förderung im Rahmen des FPF Promotionsstipendiums.

Mein Dank gilt ebenso unseren Kooperationspartnern innerhalb des LOEWE-Zentrums DRUID (Novel Drug Targets against Poverty-related and Neglected Tropical Infectious Diseases), im Besonderen Dr. Karin Fritz-Wolf aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jude Przyborski (Institut für Ernährungswissenschaften, Justus-Liebig-Universität Gießen) für die Bereitstellung der modellierten Strukturen von ORF10 und ORF7.

Vielen Dank an Dr. Florian Röttgerding, Valerie Sürth, Frederik Schmidt, Dr. Martin Amborn und Martyna Olesiuk für die jahrelange Unterstützung, für zahlreiche Problemlösungen sowie konstruktive Beiträge zu diesem Projekt. Die Zeit, die wir gemeinsam im Labor verbracht haben, werde ich mit allen Höhen und Tiefen immer in bester Erinnerung behalten.

Außerdem danke ich allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene am Universitätsklinikum Frankfurt für ihre Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima.

Ein großer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich während des Studiums und darüber hinaus immer wieder unterstützt und motiviert haben.

Gefördert wurde dieses Projekt durch die Frankfurter Promotionsförderung.

9 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

Funktionelle Analysen zur Interaktion des ORF10 Proteins von *Borrelia recurrentis* mit dem humanen Komplementsystem

in dem 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.

Frankfurt am Main, 18.12.2023

(Ort, Datum)

(Unterschrift)