

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene

**Analyse des molekularen Bindungsmechanismus
zwischen BbCRASP-2 von *Borrelia burgdorferi*
und den Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1**

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

vorgelegt von
Johanna Schreiber
aus Düsseldorf

Frankfurt am Main, 2010

Dekan: Prof. J. Pfeilschifter
Referent: Prof. P. Kraiczy
Korreferent: Prof. F. Nürnberger

Tag der mündlichen Prüfung: 11.08. 2011

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	5
1.1	<i>Borrelia burgdorferi</i>, der Erreger der Lyme-Borreliose	5
1.1.1	Taxonomie.....	5
1.1.2	Epidemiologie.....	6
1.1.3	Morphologie der Borrelienzelle.....	6
1.1.4	Genomstruktur und Genexpression.....	7
1.2	Pathogenese der Lyme-Borreliose	8
1.2.1	Klinischer Verlauf.....	8
1.2.1.1	Stadium I (lokale Infektion)	8
1.2.1.2	Stadium II (akute Organmanifestation)	9
1.2.1.3	Stadium III (chronische Organmanifestation)	9
1.2.2	Diagnose und Therapie der Lyme-Borreliose.....	10
1.3	Komplementsystem und Regulatorproteine	11
1.3.1	Alternativer Aktivierungsweg.....	13
1.3.2	Klassischer Aktivierungsweg.....	13
1.3.3	Lectin-Aktivierungsweg	14
1.3.4	Struktur der Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1	14
1.3.5	Rolle von Faktor H und FHL-1 für die Regulation des alternativen Aktivierungsweges	15
1.4	Immunevasions-Strategien von Borrelien	16
1.4.1	Antigene Variation	16
1.4.2	Regulation der Genexpression	16
1.4.3	Komplementresistenz von Mikroorganismen	17
1.5	Bedeutung der CRASP-Proteine für die Komplementresistenz von <i>B. burgdorferi</i>	17
1.5.1	Charakteristika von CRASP-Proteinen	18
1.5.1.1	Charakteristika von BbCRASP-2	19
1.5.1.2	Faktor H und FHL-1-Bindungsdomänen von BbCRASP-2	20
1.5.1.3	BbCRASP-2-Bindungsregionen innerhalb von Faktor H und FHL-1	20
1.6	Zielsetzung der Arbeit	21
2.	Materialien und Methoden	23
2.1	Materialien	23
2.1.1	Bakterienstamm	23
2.1.2	Vektoren	25
2.1.2.1	Basisvektoren	25
2.1.2.2	Generierte Vektoren	25
2.1.3	Oligonukleotide	27
2.1.4	Medien zur Kultivierung von <i>E. coli</i>	31
2.1.5	Puffer und Lösungen	32
2.1.5.1	Puffer und Lösungen für die Tris/Tricin-SDS-Gelelektrophorese	32
2.1.5.2	Puffer und Lösungen für die Westernblot- und Ligandenaffinitätsblot-Analyse	33
2.1.5.3	Lösung für die PCR	34
2.1.5.4	Puffer und Lösung für die Überexpression und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen	35
2.1.5.5	Puffer und Lösungen für ELISA	35
2.1.5.6	Sonstige Puffer und Lösungen	36

2.1.6	Chemikalien und Substanzen	37
2.1.7	Geräte	38
2.1.8	Sonstige Reagenzien und Materialien	40
2.1.8.1	Enzyme	40
2.1.8.2	Antikörper	40
2.1.8.3	Humanserum	41
2.1.8.4	Verschiedenes	41
2.1.8.4.1	Proteinstandard	41
2.1.8.4.2	Faktor H	41
2.1.8.4.3	FHL-1	41
2.1.8.4.4	Nitrocellulose-Membran	41
2.1.8.4.5	Isolierung von Plasmid-DNA	41
2.1.8.4.6	Sequenzierung von Plasmid-DNA	41
2.1.8.4.7	Säulen für die affinitätschromatographische Aufreinigung von rekombinanten Proteinen	42
2.1.8.4.8	Reagenzien und Materialien für ELISA	42
2.2	Methoden	42
2.2.1	Bakteriologische Methoden	42
2.2.1.1	Herstellung einer Übernachtskultur von <i>E. coli</i> -Zellen	42
2.2.1.2	Kultivierung von plasmidtragenden <i>E. coli</i> -Zellen für die Langzeitaufbewahrung	42
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	43
2.2.2.1	Herstellen von kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	43
2.2.2.2	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen mit Plasmid-DNA	43
2.2.2.3	In vitro Mutagenese mittels PCR	44
2.2.2.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	45
2.2.2.5	Sequenzierung	45
2.2.3	Biochemische Methoden	46
2.2.3.1	Expression rekombinanter GST-Fusionsproteine in <i>E. coli</i>	46
2.2.3.2	Herstellung von Bakterienextrakten für die Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	46
2.2.3.3	Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	46
2.2.3.4	Westernblot-Analyse	47
2.2.3.5	Ligandenaffinitätsblot-Analyse	47
2.2.3.6	Aufreinigung rekombinanter GST-Fusionsproteine	48
2.2.4	Immunologische Methoden	48
2.2.4.1	ELISA	48
2.2.5	Varianzanalyse	49
3.	Ergebnisse	50
3.1	Bindung von Faktor H und FHL-1 an GST-fusioniertes BbCRASP-2 Protein	50
3.2	Lokalisation der Faktor H/FHL-1 Bindungsregionen innerhalb des BbCRASP-2 Proteins	52
3.2.1	Charakterisierung der potenziellen Bindungsregion 2 von BbCRASP-2	52
3.2.1.1	Analyse des Bindungsverhaltens der in Bindungsregion 2 mutierten BbCRASP-2 Proteine	53
3.2.2	Charakterisierung der potenziellen Bindungsregion 3 von BbCRASP-2	57

3.2.2.1	Analyse des Bindungsverhaltens der in Bindungsregion 3 mutierten BbCRASP-2 Proteine	57
3.2.3	Charakterisierung der potenziellen Bindungsregion 4 von BbCRASP-2	60
3.2.3.1	Analyse des Bindungsverhaltens der in Bindungsregion 4 mutierten BbCRASP-2-Proteine	61
3.2.4	Charakterisierung der potenziellen coiled coil-Region innerhalb von BbCRASP-2	64
3.2.4.1	Analyse des Bindungsverhaltens der in der coiled-coil-Region mutierten BbCRASP-2-Proteine	65
4.	Diskussion	68
4.1	Charakteristika des BbCRASP-2-Proteins	68
4.1.1	Molekulargenetische und proteinspezifische Merkmale von BbCRASP-2	68
4.1.2	Biochemische Merkmale von BbCRASP-2 im Vergleich mit BbCRASP-1	71
4.2	Analyse der Aminosäuresubstitutionen und ihres Einflusses auf die Interaktion von BbCRASP-2 mit Faktor H und FHL-1	73
4.2.1	Analyse der Aminosäuresubstitutionen innerhalb der Bindungsregion 2 von BbCRASP-2	73
4.2.2	Analyse der Aminosäuresubstitutionen innerhalb der Bindungsregion 3 von BbCRASP-2	74
4.2.3	Analyse der Aminosäuresubstitutionen innerhalb der Bindungsregion 4 von BbCRASP-2	75
4.2.4	Analyse der Aminosäuresubstitutionen innerhalb der coiled-coil-Region von BbCRASP-2	76
4.3	Interaktion von Faktor H und FHL-1 mit verschiedenen bakteriellen Oberflächenproteinen	77
4.4	Bedeutung der Bindung von Heparin an Faktor H und FHL-1 für die Interpretation des molekularen Reaktionsmechanismus	81
4.5	Bedeutung der Interaktion von Komplementregulator C4BP mit Oberflächenproteinen anderer Mikroorganismen	83
4.5.1	Molekulare Grundlage für die Interaktion von Komplementregulator C4BP mit Oberflächenproteinen anderer Mikroorganismen	84
4.6	Zusammenfassung	85
4.7	Summary	87
5.	Literaturverzeichnis	89
6.	Abkürzungsverzeichnis	107
7.	Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen	108
7.1	Tabellen	108
7.2	Abbildungen	108
8.	Danksagung	110

1. Einleitung

1.1 *Borrelia burgdorferi*, der Erreger der Lyme-Borreliose

1.1.1 Taxonomie

Das Bakterium *Borrelia burgdorferi* gehört zur Familie der *Spirochaetaceae* und innerhalb dieser zur Gruppe *Borrelia*. Nach ihrer pathogenen Bedeutsamkeit werden die Borrelien in die Erreger des Rückfallfiebers (*B. recurrentis*, *B. duttonii*, *B. hermsii* u. a.) und die Erreger der Lyme-Borreliose (*B. burgdorferi*-Komplex oder *B. burgdorferi* sensu lato) unterteilt. Die Namensgebung ehrt den Mikrobiologen Ademée Borrel (1867 – 1936), wobei der Name der Spezies auf Willy Burgdorfer zurückgeht, dem es gemeinsam mit Alan Barbour im Jahr 1982 gelang, den Erreger der Lyme-Borreliose aus einer Zecke zu isolieren (Burgdorfer et al., 1982).

Erreger des Rückfallfiebers	Erreger der Lyme-Borreliose
<i>B. recurrentis</i>	<i>B. burgdorferi</i> -Komplex = <i>B. burgdorferi</i> sensu lato (s.l.):
<i>B. hermsii</i>	<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto (s.s.)
<i>B. parkeri</i>	<i>B. garinii</i>
<i>B. turicatae</i>	<i>B. afzelii</i>
<i>B. duttonii</i>	<i>B. lusitaniae</i>
u. a.	<i>B. valaisiana</i>
	<i>B. andersonii</i>
	<i>B. bissettii</i>
	<i>B. japonica</i>
	<i>B. tanukii</i>
	<i>B. turdi</i>
	<i>B. sinica</i>
	<i>B. spielmanii</i>
	<i>B. californiensis</i>
	<i>B. bavariensis</i>

Tab. 1.1 : Taxonomie der Borrelien

Von den bislang 14 unterschiedenen Genospezies des *B. burgdorferi* s.l.-Komplexes gelten die vier Genospezies *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii*, *B. afzelii* und *B. spielmanii* als gesicherte Erreger der Lyme-Borreliose (Postic et al., 1994, 2007; Wang, 1999; Richter, 2004). Für *B. bissettii* und *B. lusitaniae* wird ein humanpathogenes Potenzial eingeräumt (Le Fleche, 1997; da Franca et al., 2005).

1.1.2 Epidemiologie

Während in Nordamerika nur *B. burgdorferi* s.s. als infektiöses Agens endemisch ist, kommen in Europa alle vier humanpathogenen Spezies vor, wobei *B. afzelii* und *B. garinii* am häufigsten auftreten und *B. burgdorferi* s.s. nur selten nachgewiesen werden kann (Hubalek und Halouzka, 1997).

In Europa sind die Überträger von Borrelien *Ixodes ricinus* und *Ixodes hexagonus*, während in Osteuropa und Asien *I. persulcatus* und *I. ovatus*, in Nordamerika *I. scapularis* und *I. pacificus* als Vektoren gelten (Sigal und Curran, 1991; Schäfer et al. 1999). Sie befallen in der Regel Tiere des Waldes. Vögel und kleinere Säugetiere wie Mäuse und Igel, aber auch Rotwild zählen zu den natürlichen Wirten. Während des Saugaktes gelangen die Borrelien vom Mitteldarm über die Speicheldrüsen der Zecke in die Blutbahn des jeweiligen Wirtes. Das Infektionsrisiko steigt mit der Dauer des Saugaktes, so dass eine Infektion mit dem Erreger überwiegend nach 12 bis 24 Stunden erfolgt (Piesman, 1993; des Vignes et al., 2001). In jedem der drei Entwicklungsstadien von der Larve über die Nymphe zur adulten Zecke benötigt die Zecke jeweils eine einzige Blutmahlzeit. Untersuchungen in Deutschland konnten nachweisen, dass die Durchseuchungsrate abhängig vom Entwicklungsstadium ansteigt: 1% der Larven, 11-26% der Nymphen und 11-34% der adulten, geschlechtsreifen Zecken sind mit Borrelien durchseucht. Abhängig von Gebiet und Jahrgang zeigen sich zum Teil große Unterschiede in der Durchseuchungsrate bei Zecken (Fingerle et al., 1994; Wikel et al., 1997; Schäfer et al. 1999). Obwohl in Europa zwischen 3 und 26% der Zecken mit Borrelien infiziert sind, entwickeln nur 5% der Menschen, die von einer infizierten Zecke gestochen wurden, Symptome einer Lyme-Borreliose (Steere, 1989; Oschmann und Kaiser, 1999).

Die Lyme-Borreliose ist neben der Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) die zweithäufigste durch Zecken übertragene Infektionskrankheit in Europa. Die Infektion mit Borrelien erfolgt immer durch den Stich einer infizierten Zecke. Während FSME vor allem in Endemiegebieten in Süddeutschland vorkommt, muss mit Borrelieninfektionen im gesamten Bundesgebiet gerechnet werden. Geschätzt werden etwa sechzigtausend Neuinfektionen mit Borrelien pro Jahr in Deutschland (RKI, 2005).

1.1.3 Morphologie der Borrelienzelle

Borrelien sind spiralförmige gramnegative Stäbchen, die sich mit Hilfe von Endoflagellen bewegen können. Ihr Zelleib misst zwischen 10 und 30 µm in der Länge und 0,2 bis 0,25 µm im Durchmesser (s. Abb. 1.1).

Eine Borrelienzelle ist folgendermaßen aufgebaut: eine 2-10 nm dicke Schleimschicht umgibt eine flexible, dreischichtige Zellmembran. Unter dieser trilaminären Membran liegen bis zu 12 Endoflagellen, die der Zelle Beweglichkeit und Stabilität verleihen. Die Endoflagellen winden sich um den protoplasmatischen Zylinder, der von einer weiteren dreischichtigen Membran umschlossen ist. Im Cytoplasma liegen die DNA und die Zellorganellen (Burgdorfer et al., 1982; Barbour and Hayes, 1986, Kudryashev et al., 2009).

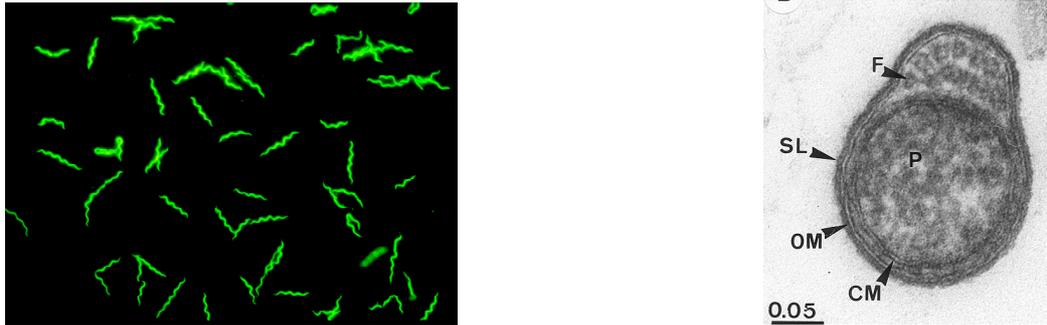


Abb. 1.1: Morphologie von Borrelienzellen. Links: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Borrelienzellen (Vergrößerung 1:1000). Rechts: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Borrelienzelle im Querschnitt mit der charakteristischen, trilaminären Membran, F=Endoflagellen, SL=Schleimschicht, OM=äußere Zellmembran, CM= cytoplasmatische Membran, P=Protoplasma.

1.1.4 Genomstruktur und Genexpression

Das Genom von *B. burgdorferi* besteht aus einem linearen Chromosom von 900 bis 920 kb Länge und mehreren ringförmigen oder linearen Plasmiden (Fraser et al., 1997).

Beim *B. burgdorferi*-Isolat B31 MI ist das gesamte Genom entschlüsselt worden (Fraser et al., 1997). Dieser Stamm besitzt ein lineares Chromosom von 910 975 bp und 24 lineare und zirkuläre Plasmide von mehr als 650 000 bp. Auf diesen bis zu 24 Plasmiden liegt über 40 Prozent der genetischen Information von *B. burgdorferi*. Auffällig ist, dass die Genabschnitte der Plasmide sich zu einem großen Teil wiederholen. Diese genetische Redundanz scheint auf Rekombination der Plasmide zurückzugehen. Schätzungen zufolge gibt es auf den Plasmiden 670 funktionelle Gene und 167 Pseudogene (Fraser et al. 1997; Casjens et al., 2000, Fikrig and Narasimhan, 2006). Es gibt auch Hinweise auf einen horizontalen Genaustausch zwischen dem Chromosom und Plasmiden (Huang et al., 2004).

Während der Kultivierung von Borrelien können Plasmide spontan verloren gehen, ohne dass die Vitalität des Bakteriums beeinflusst wird (Schwan et al. 1988). Allerdings verlieren Borrelien in Langzeitkultur ihre Infektiosität für Mensch und Tier, was durch den Verlust der drei linearen Plasmide lp25, lp28-1 und lp36 bedingt ist (Sadziene et al., 1993; Strother et al., 2005; Jewett et al., 2007).

1.2 Pathogenese der Lyme-Borreliose

1.2.1 Klinischer Verlauf

Beim überwiegenden Teil der an Lyme-Borreliose Erkrankten findet eine Spontanremission statt, wobei die Remissionszeiten stark variieren. Bei den übrigen Infizierten verläuft die Erkrankung in drei Stadien, wobei vor allem die Haut, die Gelenke und das Nervensystem betroffen sind. Die Beschreibung der drei Stadien spiegelt nicht unmittelbar den Krankheitsverlauf wider, denn die Lyme-Borreliose kann sich in jedem der drei Stadien manifestieren und auch Stadien überspringen (Steere et al., 2004).

Stadium I (Tage bis Wochen nach dem Zeckenstich): Erythema migrans unspezifische Krankheitszeichen	Ophthalmologische Manifestationen (Uveitis, Opticusneuritis, Iridozyklitis, Keratitis, Chorioretinitis, Konjunktivitis)
Stadium II (Wochen bis Monate nach dem Zeckenstich): Lymphadenosis cutis benigna Bäferstedt (Borrelien Lymphozytom) akute Neuroborreliose (lymphozytäre Meningoradikulitis, lymphozytäre Meningitis) Lyme-Arthritis Myo-, Peri-, Pancarditis	
Stadium III (Monate bis Jahre nach dem Zeckenstich): Lyme-Arthritis Acrodermatitis chronica atrophicans Herxheimer chronische Neuroborreliose (Encephalomyelitis)	

Tab. 1.2: Stadien der Lyme-Borreliose

1.2.1.1 Stadium I (lokale Infektion)

Als Erstmanifestation entwickeln zwei Drittel der Infizierten einige Tage bis Wochen nach dem Zeckenbiss ein ringförmig sich ausbreitendes Erythem mit zentraler Abblassung, das von der Stelle des Zeckenstichs ausgeht (Erythema migrans). Das Erythem verschwindet schließlich und in ca. 90% der Fälle erfolgt eine Remission auch ohne initiale Antibiotikatherapie. Im Rahmen einer hämatogenen Streuung kann das Erythema migrans auch an anderen Körperstellen auftreten und in lockerem Gewebe (z.B. Ohrläppchen, Mamille) sich als livider Knoten (Lymphadenosis cutis benigna) manifestieren (Bäferstedt, 1944). Bei etwa 20% der Patienten kommt es zu unspezifischen Krankheitszeichen wie Fieber, Myalgien, Arthralgien und Kopfschmerzen.

1.2.1.2 Stadium II (akute Organmanifestation)

Zwischen 2-10 Wochen nach dem Zeckenbiss können Symptome auftreten, welche das Nervensystem, die Meningen, die Gelenke, das Herz und das Auge betreffen. Am häufigsten ist die lymphozytäre Meningoradikulitis (Morbus Bannwarth). Diese Krankheit manifestiert sich mit wandernden, heftigen stechenden oder brennenden Schmerzen, die häufig nachts auftreten. Jeder zweite bis dritte Patient entwickelt in der Folge eine Hirnnervenschädigung, insbesondere eine Facialisparesse. Bei 99% der unbehandelten Patienten kommt es nach wochen- und monatelangem Leiden zur Spontanheilung mit bleibenden Schäden. Bei Kindern und Jugendlichen kann eine lymphozytäre Meningitis mit Kopfschmerzen und Fieber auftreten (Garin et Bujadoux, 1922; Bannwarth 1944; Pfister et al., 1984).

Die mögliche Gelenkbeteiligung äußert sich in Form von wandernden Arthralgien, die Stunden bis Tage andauern können. Die betroffenen Gelenke können Entzündungszeichen und Ergüsse aufweisen (Herzer et al., 1986; Steere, 1989).

In Europa wird die Herzbeteiligung für 0,2 bis 3,3%, in den USA für weniger als 1% der Fälle angegeben (CDC, 2007). Man beobachtet Vorhofflimmern, Extrasystolie und Erregungsleitungsstörungen in Form von AV-Blocks der Grade I bis III. Die Herzbeschwerden remittieren in der Regel vollständig nach wenigen Tagen bis zu sechs Wochen (Van der Linde, 1991).

Ophthalmologische Manifestationen sind sehr selten und können in allen drei Stadien der Lyme-Borreliose auftreten. Sie manifestieren sich als Konjunktivitis, Chorioretinitis, Keratitis, Uveitis und Iridozyklitis sowie als Optikusneuritis. Ohne Behandlung heilt die Erkrankung meistens aus, jedoch können bei Beteiligung der Chorioidea Sehstörungen persistieren (Lesser et al., 1990; Oschmann und Kaiser, 1999).

1.2.1.3 Stadium III (chronische Organmanifestation)

Die Erkrankung wird als Stadium III klassifiziert, wenn sie mehr als sechs Monate progredient verlaufen ist. Bei den meisten Patienten in Stadium III ist der Krankheitsverlauf primär chronisch progredient. In den anderen Fällen zeigt sich vorher ein Stadium I oder ein Stadium II; dass jemand alle drei Stadien nacheinander durchläuft, kommt extrem selten vor. Im Stadium III ist keine Spontanremission mehr möglich.

Die typische chronische Erkrankung im Stadium III ist die Acrodermatitis chronica atrophicans. Sie tritt bei 1 bis 2 % aller Patienten, vor allem bei Erwachsenen, auf. Sie kann aus einem Erythema migrans in Gestalt einer lividen Schwellung der Haut entstehen. Nach monate- bis jahrelangem Verlauf wird die Haut bräunlich-bläulich und dünn

(„zigarettenspapierartig“), wobei die Venen hervortreten (Herxheimer und Hartmann, 1902; Afzelius 1909).

Die Lyme-Arthritis, im Stadium III als Mono- und Oligoarthritis auftretend, manifestiert sich vor allem an den Kniegelenken. Mit Antibiotikatherapie kann man eine Remissionsrate von bis zu 90 % erzielen (Steere, 1989).

Die Neuroborreliose führt im Stadium III in der überwiegenden Anzahl der Fälle zu bleibenden Defekten. Ebenso wie im Stadium II kann es zu Hirnnervenlähmungen kommen. Besonders schwerwiegende Folgen hat die progressive Enzephalomyelitis, deren Verlauf schleichend und schmerzlos ist und zu spastischen Paresen, hirnorganischem Psychosyndrom, Ataxien und Hemi- oder Tetraparesen führen kann (Oschmann et al., 1998; Oschmann und Kaiser, 1999). Durch die Enzephalomyelitis und durch die zerebrovaskuläre Verlaufsform der Neuroborreliose kann es zu Wesensveränderungen und Gedächtnisstörungen kommen. Der Verlauf ist chronisch-rezidivierend.

1.2.2 Diagnose und Therapie der Lyme-Borreliose

Die Infektion mit Borrelien wird bei begründetem Verdacht mit einem hochsensitiven ELISA aus dem Patientenserum nachgewiesen. Der Nachweis von Borrelien-DNA mittels PCR ist noch sensitiver, eignet sich jedoch nicht zur Routinediagnostik (Lebech, 2002; Bunikis and Barbour, 2002). Zur Bestätigung des positiven ELISA-Befundes hat sich ein hochspezifischer Westernblot bewährt. Die Zwei-Stufen-Diagnostik (s. Abb. 1.2) gilt derzeit als Methode der Wahl, um eine Borrelieninfektion zu diagnostizieren (Bacon et al., 2003; Wilske et al., 2007).

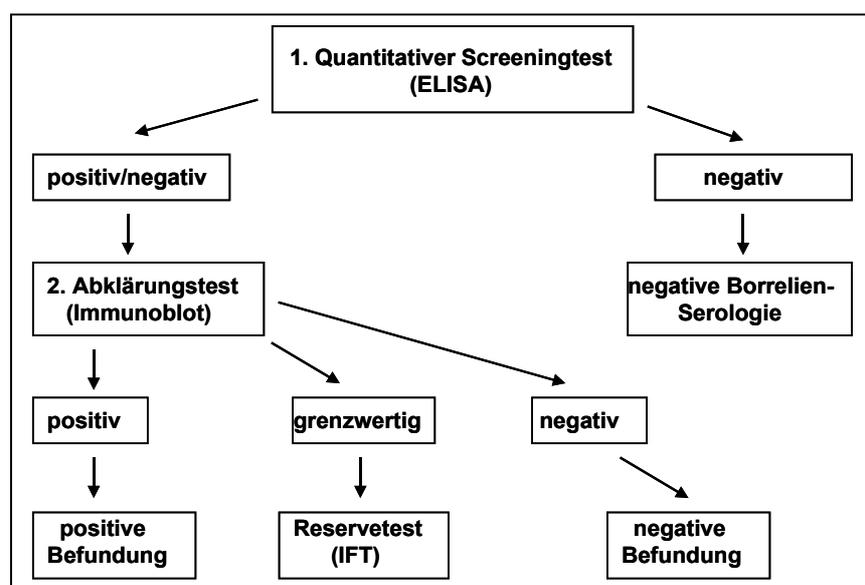


Abb. 1.2: Zwei-Stufen-Schema der Diagnostik bei Verdacht auf Lyme-Borreliose (entnommen aus P. Kraiczy, 2004)

Eine manifeste Lyme-Borreliose sollte immer antibiotisch therapiert werden. Die Auswahl der geeigneten Substanz ist abhängig vom Stadium der Erkrankung. Im Stadium I genügt in der Regel eine orale Antibiose mit Doxycyclin über 14 Tage. Im Stadium II und III empfiehlt sich der Einsatz von Cephalosporinen der dritten Generation. Bei Neuroborreliose, Befall von Auge und Herzmuskel erfolgt von Anfang an eine intravenöse Antibiotikagabe mit Penicillin G oder einem Cephalosporin der dritten Generation. In Stadium III sollte die Therapie über 21 Tage erfolgen (Oschmann und Kaiser, 1999; Simon und Stille, 2000; Fingerle und Wilske, 2006).

1.3 Komplementsystem und Regulatorproteine

Das Komplementsystem ist ein Abwehrsystem, das bei den meisten mehrzelligen Organismen vorhanden ist. Es dient der schnellen, direkten Erkennung eingedrungener Mikroorganismen mit dem Ziel der schnellen Eliminierung durch Opsonisierung und Phagozytose (primäre Immunantwort) und spielt für die angeborene Immunabwehr eine zentrale Rolle. Dieses komplexe System besteht aus einer Reihe von Serumproteinen und Rezeptoren, die auf unterschiedlichen Aktivierungswegen miteinander reagieren und die Abtötung des eindringenden Mikroorganismus zur Folge haben (Joiner 1988; Medzhitov und Janeway, 2000). Das Komplementsystem des Menschen besteht aus etwa 40 Serumproteinen. Man kann seine Komponenten einteilen in Effektorproteine und Regulatorproteine. Effektorproteine reagieren miteinander, um eine Immunreaktion in Gang zu setzen, Regulatorproteine verhindern diese Reaktionskaskade dort, wo sie nicht erwünscht ist, etwa auf der Oberfläche körpereigener Zellen. Bei der Aktivierung des Komplementsystems laufen verschiedene Reaktionskaskaden ab. Man unterscheidet deshalb den klassischen, den alternativen und den Lectin-Aktivierungsweg (s. Abb.1.3).

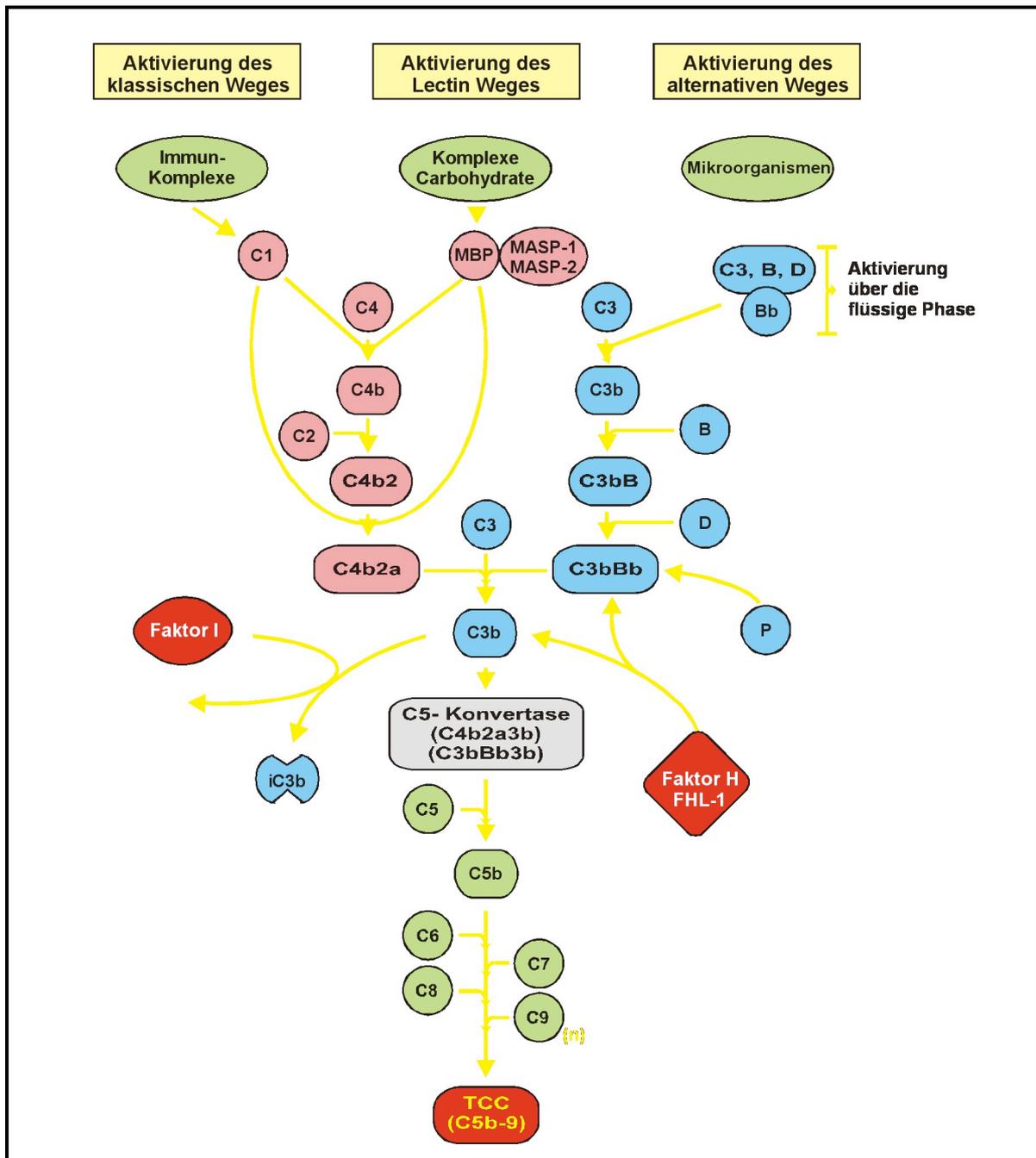


Abb. 1.3: Aktivierungsschritte des Komplementsystems (vereinfacht). Die Initiierung des Komplementsystems erfolgt über drei Aktivierungswege, den klassischen Weg, den Lectinweg und den alternativen Weg. Jeder der drei Wege reguliert die zentrale Komplementkomponente C3, die über spontane Hydrolyse oder über die proteolytische Spaltung durch die C3-Konvertasen aktiviert wird. Diese C3-Konvertasen konstituieren sich nach sequentieller Aktivierung aus den Komponenten des klassischen Weges bzw. Lectinweges (C4b2a) oder des alternativen Weges (C3bBb). Die Regulation der C3-Konvertase erfolgt durch Oberflächen-assoziierte Proteine oder lösliche Proteine (z.B. Faktor H, FHL-1/Reconnectin) in Zusammenarbeit mit weiteren Kofaktoren (z. B. Faktor I) (s. Text). Durch kovalente Bindung von C3b an die C3-Konvertase des klassischen bzw. des alternativen Weges entsteht die C5-Konvertase, die die Schlußphase der Komplementaktivierung einleitet, indem sie die Komplementkomponente C5 in C5a und C5b spaltet. Die weitere Anlagerung von C6 und C7 an C5b führt zur Bildung eines hydrophoben Proteinkomplex (C5b-67), der sich in die Membran inserieren kann. Der endgültige, porenbildende und lytisch-wirkende terminale Komplementkomplex (TCC) entsteht durch die Anlagerung von Komponente C8 und der Polymerisierung von C9.

1.3.1 Alternativer Aktivierungsweg

Hauptkomponenten des alternativen Reaktionsweges, auch Properdin-System genannt, sind die Faktoren Properdin, Faktor B und Faktor D. Die antikörperunabhängige Aktivierung dieses Reaktionsweges wird ausgelöst durch spontan ablaufende Hydrolyse des Effektorproteins C3 in der flüssigen Phase. Dadurch entsteht ständig C3b, das, gemeinsam mit den Faktoren B und D die C3-Konvertase der flüssigen Phase bildet. Die C3-Konvertase spaltet den Komplementfaktor C3 in C3a und C3b. Das instabile C3b kann kovalent an mikrobielle Oberflächen binden. Wenn C3b gebunden ist, kann sich in Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen Faktor B dort anlagern. Der angelagerte Faktor B wird anschließend durch Faktor D in die Fragmente Ba und Bb gespalten, wobei Bb an C3b gebunden bleibt. Es resultiert der enzymatisch aktive C3bBb-Komplex. Properdin lagert sich an den membrangebundenen C3bBb-Komplex an und bewirkt eine Stabilisierung desselben. Dieser Aktivkomplex wird als C3-Konvertase des alternativen Reaktionsweges bezeichnet und spaltet C3-Moleküle aus der flüssigen Phase. Das so entstehende C3b besetzt die Oberfläche pathogener Mikroorganismen (Opsonisierung) und beschleunigt deren Phagozytose. Wenn C3b wiederum an den C3bBb-Komplex bindet, entsteht die stabile C5-Konvertase, welches den Komplementfaktor C5 in C5a und C5b spaltet. Durch sequentielle Anlagerung der Faktoren C6 und C7 an C5b entsteht ein hydrophober Proteinkomplex (C5b-67), der in Lipidmembranen eindringen kann. Mit Anlagerung der Komponenten C8 und C9 entsteht ein porenförmiger Komplex, „terminal complement complex“ (TCC) genannt. Dieser Angriffskomplex dringt in die äußere Membran körperfremder Zellen ein und führt zur Lyse derselben (Müller-Eberhard, 1985).

1.3.2 Klassischer Aktivierungsweg

Die Hauptkomponenten des klassischen Wegs sind die Komplementfaktoren C1 bis C4. Sie werden aktiviert durch die Erkennung von Immunkomplexen mit IgM oder IgG, die auf der Oberfläche von Mikroorganismen gebunden sind. Durch Bindung des Faktors C1q an die Immunglobuline werden C1r und C1s aktiviert, wobei aktiviertes C1s-Molekül C4 zu C4a und C4b hydrolysiert. Zunächst bindet das Spaltprodukt C4b kovalent an die mikrobielle Membranoberfläche und interagiert dort mit C2. Durch Hydrolyse des so gebundenen C2 durch das aktivierte C1s entsteht die C3 Konvertase (C4b2a) des klassischen Reaktionsweges. Zusammen mit C3b aus dem alternativen Reaktionsweg wird die C5-Konvertase gebildet und der Reaktionsweg läuft in derselben Weise wie unter 1.3.1 beschrieben weiter bis zum Membranangriffskomplex (Reid 1983; Walport 2001).

1.3.3 Lectin-Aktivierungsweg

Die Hauptkomponenten des Lectin-Wegs sind MBP (Mannose bindendes Protein), MASP-1 und MASP-2. Der Lectin-Weg wird ebenfalls antikörperunabhängig aktiviert. Dabei bindet das Mannose bindende Lectin (MBP) aus dem Serum an Zuckermoleküle, die sich auf der Oberfläche fremder Mikroorganismen befinden (Kawasaki et al., 1983; Matsushita and Fujita 1992, 1995). Die spezifischen Serinproteasen MASP-1 und MASP-2 interagieren mit dem auf der Oberfläche gebundenen MBP und werden dadurch aktiviert (Matsushita and Fujita 1992; Thiel et al., 1997). Die aktivierten Serinproteasen setzen die Komplementkaskade des alternativen Reaktionswegs ab C4 in Gang (s. 1.3.1) (Matsushita and Fujita, 1995).

1.3.4 Struktur der Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1

Die Faktor H-Familie besteht aus sieben Serumproteinen, die jeweils mehrere Bindungsdomänen für unterschiedliche Bindungspartner enthalten. Dies ermöglicht eine Reihe von Interaktionen mit körpereigenen Proteinen. Faktor H und Faktor H-like protein 1 (FHL-1) sind die am besten untersuchten Mitglieder der Faktor H-Familie. Sie regulieren die Aktivität des Komplementsystems und gelten deshalb als Regulatorproteine. Neben den Faktor H und FHL-1 wurden fünf Faktor H-related proteins (FHR1-5) identifiziert.

Die Proteine der Faktor H-Familie sind aus repetitiven Aminosäureabschnitten aufgebaut, den „short consensus repeats“ (SCR), die hohe Ähnlichkeit in ihrer Aminosäuresequenz besitzen (Zipfel et al., 2002). Die ersten sieben SCR-Domänen von Faktor H und FHL-1 sind identisch (Zipfel und Skerka, 1999). Die beiden Regulatorproteine gehen durch alternatives Spleißen aus unterschiedlichen RNA-Transkripten desselben Gens im Abschnitt q32 auf Chromosom 1 hervor (Diaz-Guillen et al., 1999). Faktor H hat eine ermittelte molekulare Masse von 150 kDa, FHL-1 ist nur 42 kDa groß. Im Unterschied zu Faktor H besitzt FHL-1 am C-Terminus vier zusätzliche Aminosäuren (Friese et al., 1999, Zipfel und Skerka 1999). Die komplementbindenden Domänen beider Proteine liegen in den SCR-Domänen 1-4 (s. Abb. 1.4) (Gordon et al., 1995; Kühn et al., 1995, 1996).

Faktor H besteht aus 20 SCR-Domänen und ist der zentrale flüssige Phase-Inhibitor des alternativen Aktivierungsweges im Komplementsystem. (Whaley and Ruddy, 1976; Pangburn et al., 1977). Körpereigene Zellen tragen auf ihrer Oberfläche Neuraminidasemoleküle, die Faktor H binden, wodurch der Organismus vor einem Angriff des eigenen Komplementsystems geschützt ist. FHL-1 und Faktor H unterscheiden sich in der Serumkonzentration und in der Intensität ihrer Aktivitäten.

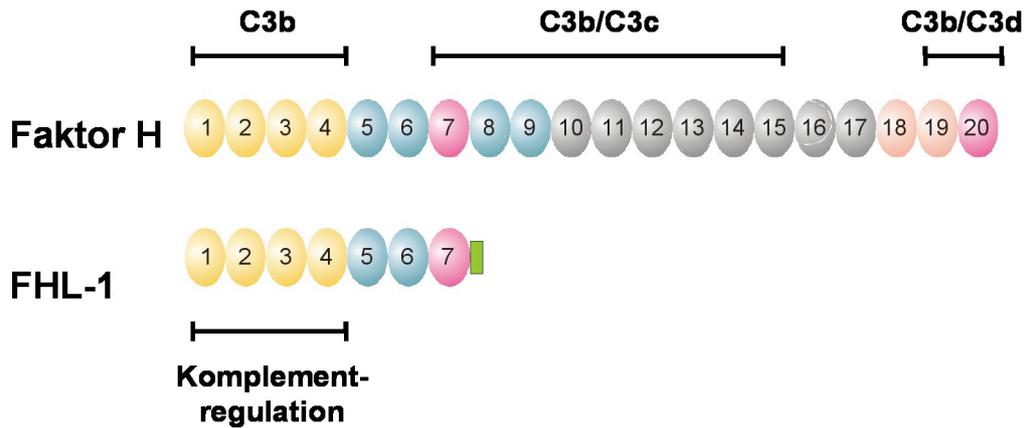


Abb. 1.4 : Struktur von Faktor H und FHL-1. Die komplementbindenden Domänen liegen in den SCR-Domänen 1-4. In SCR 7 liegt eine Bindungsdomäne für das M-Protein von Streptokokken (s. 4.3.1). In den SCR-Domänen 7 bis 15 und 19 bis 20 von Faktor H liegen weitere Bindungsstellen für Komplementfaktoren.

1.3.5 Rolle von Faktor H und FHL-1 für die Regulation des alternativen Aktivierungsweges

Die Regulatorproteine Faktor H und FHL-1 greifen auf zweierlei Art in die Aktivierung des alternativen Weges ein (s. Abb.1.5): Zum einen wirken sie als Kofaktoren für Faktor I, welcher die Inaktivierung von C3b zu iC3b katalysiert (1). Zum anderen kontrollieren Faktor H und FHL-1 die Aktivität der C3- und der C5-Konvertase, indem sie die Dissoziation der dazugehörigen Enzymkomplexe an der Zelloberfläche beschleunigen (Decay-Accelerating activity)(2). Sie hemmen auch die Neubildung dieser Enzymkomplexe (Whaley and Ruddy, 1976; Pangburn et al., 1977; Zipfel und Skerka, 1999). Durch die Inaktivierung von C3b kann die weitere Aktivierung des alternativen Weges und die Bildung des Membranangriffskomplexes unterbunden werden.

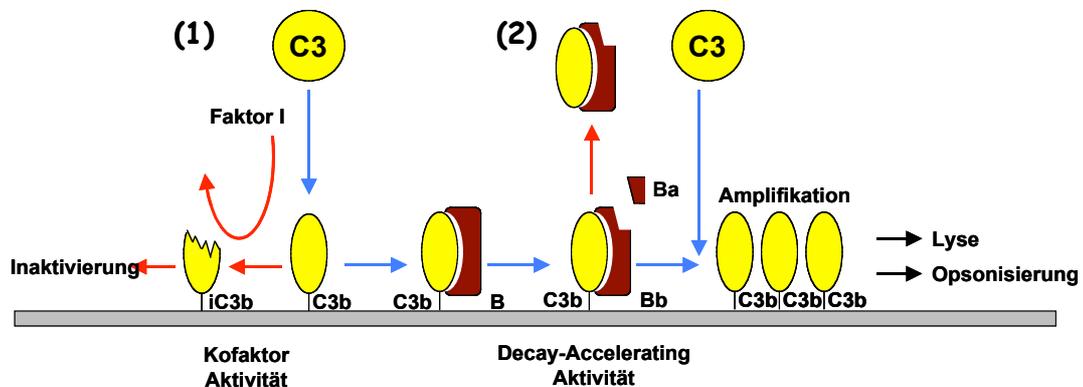


Abb. 1.5 : Schematische Darstellung der Regulation von Komplementaktivierung des alternativen Weges durch Faktor H / FHL-1.

1.4 Immunevasions-Strategien von Borrelien

Humanpathogene Bakterien haben Strategien, mit denen sie die primäre Immunabwehr des Wirtes umgehen (Joiner, 1988). Auch Borrelien verfügen über verschiedene Mechanismen, die ihnen helfen, im infizierten Organismus zu überdauern. Diese Strategien werden unter dem Begriff Immunevasion zusammengefasst.

1.4.1 Antigene Variation

Durch genetische Rekombination entstehen Lipoproteine von hoher Variabilität, die auf der Oberfläche von *B. burgdorferi* präsentiert werden. Diese Diversität unterschiedlicher Antigene trägt zum Überleben der Borrelie im Wirtsorganismus bei. Ein solcher Genlocus bei *B. burgdorferi* s.s. wurde als *vls* bezeichnet und liegt auf dem linearen Plasmid lp28-1 (Fraser et al., 1997). Der Genabschnitt besteht aus einem exprimierten *vlsE*-Gen und 15 stillen *vls*-Kassetten (Zhang et al., 1997). Die Expression des *vls*-Genlocus geschieht durch Kombination des exprimierten Gens mit verschiedenen Segmenten der stillen *vls*-Kassetten. Die resultierenden VlsE-Oberflächenproteine reagieren unterschiedlich mit dem Immunsystem des Wirtes. Borrelien exprimieren VlsE-Protein nur während der Infektion des Wirtes, nicht in der Zecke oder in der Kultur. (Zhang et al., 1998; Indest et al., 2001; Bykowski et al., 2006).

1.4.2 Regulation der Genexpression

Borrelien können sich ihren Umweltbedingungen durch eine koordinierte Genexpression anpassen, so dass sich zum Teil drastische Veränderungen in der Zusammenstellung der auf der Oberfläche exponierten Proteine ergeben. Die Genexpression wird durch Faktoren wie Temperatur, pH, Nährstoffangebot und Zelldichte beeinflusst. Über diesen Mechanismus wird neben dem VlsE-Protein auch die Expression verschiedener weiterer Oberflächenproteine reguliert, darunter OspA und OspC sowie verschiedene Proteine der Erp-Proteinfamilie und CRASP-Proteine (Schwan et al., 1995; Stevenson et al., 1996; de Silva und Fikrig 1997, Obonyo et al., 1999; Fingerle et al., 2000; Yang et al., 2001; Kraiczy et al., 2001; Stevenson et al., 2006; Bykowski et al., 2007).

Die Erp-Proteinfamilie ist heterogen und wird durch mehrere Genloci auf unterschiedlichen ringförmigen cp32-Plasmiden von *B. burgdorferi* kodiert (Stevenson et al., 1996). Die an Faktor H-bindenden CRASP-Proteine BbCRASP-3, -4 und -5 sind identisch mit ErpP, ErpC und ErpA und zählen daher auch zur Erp-Proteinfamilie (Kraiczy et al., 2003, 2004a). Diese Proteine werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Migration der Borrelien vom

Zeckendarm in die Speicheldrüse und anschließend im Wirt hoch- bzw. herunterreguliert. Durch diese Variabilität der Borrelienoberfläche, sind Borrelien in der Lage, der adaptiven Immunabwehr des Wirtes zu entkommen (Seshu and Skare, 2000).

1.4.3 Komplementresistenz von Mikroorganismen

Auch andere Bakterien, Pilze, Parasiten und Viren verfügen über Escape-Mechanismen, mit denen sie die Abwehr durch das Komplementsystem umgehen. Diese Escape-Mechanismen stellen einen weiteren Pathogenitätsfaktor dar (Joiner, 1988; Cooper 1991, Jokiranta et al., 1995, Würzner 1999). Einige Bakterien tarnen sich mit Kapseln oder Polysacchariden gegen die Erkennung durch das Komplementsystem (Rautemaa und Meri, 1999). Die Schleimschicht, die die Borrelienzelle umgibt, hat wahrscheinlich diese Funktion (Kraiczky et al., 2002). Humanpathogene Keime wie *S. pyogenes* (Blackmore et al., 1998; Kotarsky et al., 1998), *S. pneumoniae* (Neeleman et al., 1999; Hammerschmidt et al., 2007), *Neisseria gonorrhoeae* (Ram et al., 1998), *Pseudomonas aeruginosa* (Kunert et al., 2007) und *Leptospira interrogans* (Verma et al., 2006) binden wie *B. burgdorferi* Regulatorproteine der Faktor H-Familie, um sich vor Komplement zu schützen (Würzner, 1999).

1988 konnte erstmals gezeigt werden, dass Borrelien in Gegenwart von Humanserum überleben, obwohl eine Komplementaktivierung stattgefunden hatte (Kochi und Johnson 1988). Diese Komplementresistenz ließ sich überwinden, wenn Seren spezifische IgG-Antikörper gegen Borrelien enthielten. Spätere Arbeiten zeigten, dass abhängig von der Genospezies Unterschiede in der Komplementresistenz auftraten: *B. afzelii* zeigte eine ausgeprägte Resistenz, während *B. burgdorferi* s.s.-Isolate überwiegend einen intermediär komplement-resistenten Phänotyp aufwiesen und *B. garinii* in kurzer Zeit durch Komplement abgetötet wurde und daher als komplement-sensibel gilt (Brade et al., 1992; Breitner-Ruddock et al., 1997; van Dam et al., 1997). Weitere Untersuchungen ergaben, dass insbesondere komplement-resistente und intermediär komplementresistente Borrelien die Regulatorproteine Faktor H und FHL-1 auf ihrer Oberfläche binden und sich damit gegen die Lyse durch Komplement schützen (Alitalo et al., 2001; Hellwage et al., 2001; Kraiczky et al., 2001).

1.5 Bedeutung der CRASP-Proteine für die Komplementresistenz von *B. burgdorferi*

CRASP steht für **C**omplement **r**egulator **a**cquiring **s**urface **p**roteins. CRASPs sind Lipoproteine, die auf der Membran von komplementresistenten Borrelienarten lokalisiert sind und Faktor H und FHL-1 binden (Hellwage et al., 2001; Kraiczky et al., 2001). Auf

B. burgdorferi s.s. und *B. afzelii* wurden fünf verschiedene CRASP-Proteine identifiziert (Kraiczky et al., 2001, 2002; 2003, Hartmann et al., 2006).

1.5.1 Charakteristika von CRASP-Proteinen

Bisher wurden CRASP-Proteine nur bei *B. afzelii* und *B. burgdorferi* s.s. nachgewiesen, was mit der Komplementresistenz von *B. afzelii* und *B. burgdorferi* s.s. ebenso korreliert wie mit der Komplementsensibilität von *B. garinii*, die keine CRASP-Proteine besitzt (Kraiczky et al., 2002). CRASP-Proteine von *B. afzelii* werden mit BaCRASP, die von *B. burgdorferi* s.s. mit BbCRASP bezeichnet. Sie lassen sich nach ihrem Bindungsverhalten in drei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe beinhaltet die Proteine, die sowohl an FHL-1 als auch an Faktor H binden. Die zweite Gruppe umfasst CRASP-Proteine, die nicht an FHL-1, aber an Faktor H binden. Die dritte Gruppe bindet nur an FHL-1 und nicht an Faktor H.

In die erste Gruppe der an FHL-1 und an Faktor H-bindenden CRASP-Proteine gehören BaCRASP-1 und BaCRASP-2, BbCRASP-1 und BbCRASP-2. Zur zweiten Gruppe zählen BaCRASP-4, BaCRASP-5, sowie die *B. burgdorferi*-Proteine BbCRASP-3 bis -5 (Kraiczky et al., 2001). Die dritte Gruppe beinhaltet BaCRASP-3, welches nur an FHL-1 bindet. Ein Vergleich verschiedener Isolate von *B. afzelii* und *B. burgdorferi* s.s. zeigt, dass BaCRASP-1, BbCRASP-1 sowie BbCRASP-3 und -5 in nahezu allen Isolaten exprimiert wurden, während BaCRASP-2 und BbCRASP-2 bei einigen Isolaten nachzuweisen waren und BaCRASP-3, -4 und -5 ebenso wie BbCRASP-4 selten auftraten (Kraiczky et al., 2001, 2002) (s. Abb. 1.6).

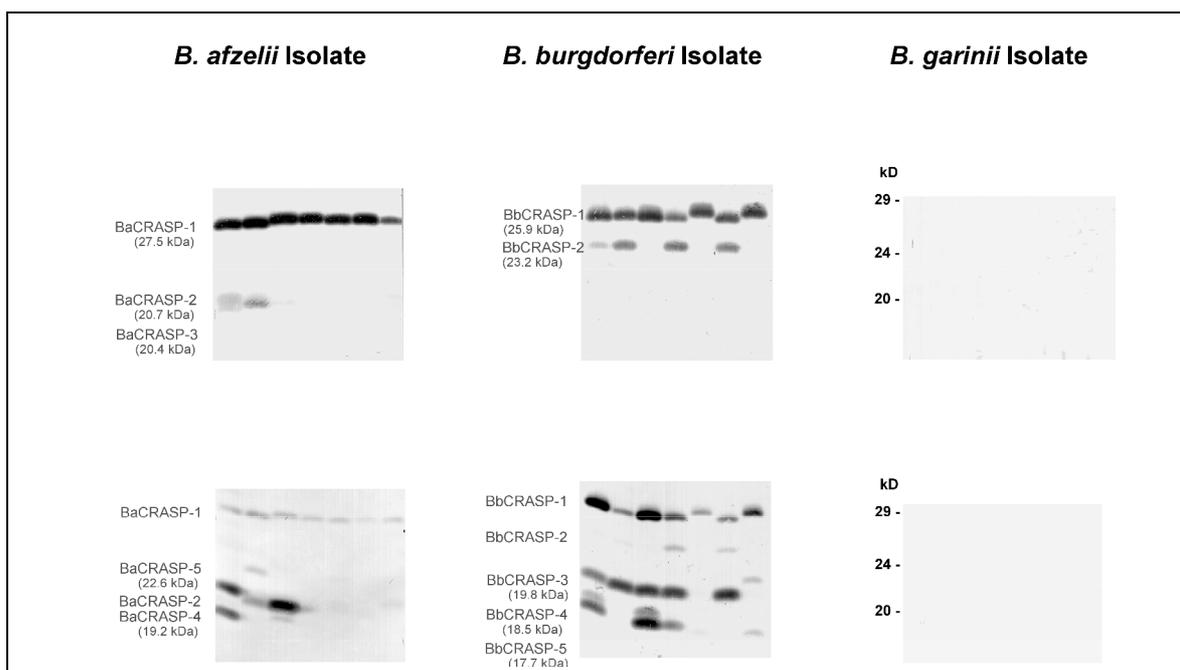


Abb. 1.6 : Identifizierung der CRASP-Proteine bei *B. afzelii* und *B. burgdorferi* s.s. sowie *B. garinii* mittels Ligandenaffinitätsblot-Analyse (entnommen aus Kraiczky et al., 2001).

BaCRASP-1, -2 und -5 sowie BbCRASP-1 unterliegen einer temperaturabhängigen Genexpression (Kraiczky et al., 2002; von Lackum et al., 2005). BbCRASP-1 wird zudem pH-abhängig exprimiert (von Lackum et al., 2005).

BbCRASP-1 scheint für die Serumresistenz von *B. burgdorferi* eine übergeordnete Rolle zu spielen. Das Vorhandensein von BbCRASP-1 zeigte sich *in vitro* als entscheidender Faktor für die Serumresistenz verschiedener Borrelienstämme in Humanserum (Brooks et al., 2005; Kenedy et al., 2009). Dieses Protein ist auf dem linearen Plasmid lp54 kodiert und gehört mit weiteren 13 Proteinen zur gbb54 paralogen Proteinfamilie (Wallich et al., 2005). BbCRASP-1 unterscheidet sich dadurch deutlich von den anderen CRASP-Proteinen (Kraiczky et al., 2004b).

1.5.1.1 Charakteristika von BbCRASP-2

BbCRASP-2 gehört zusammen mit BbCRASP-1 zur Gruppe der FH und FHL-1-bindenden Proteine von *B. burgdorferi*, ist jedoch genetisch einzigartig. Es konnte keinerlei Ähnlichkeit mit den anderen CRASP-Proteinen oder irgendeinem anderen bekannten Faktor H und FHL-1-bindenden Protein festgestellt werden. Das für BbCRASP-2 kodierende Gen ist beim *B. burgdorferi*-Isolat B31 auf dem linearen Plasmid lp28-3 lokalisiert, welches als H-Plasmid von *B. burgdorferi* Stamm B31 (BBH) in der Genbank zu finden ist. Nachdem gezeigt werden konnte, dass der offene Leserahmen BBH06 für CRASP-2 kodiert, wurde das Gen in *cspZ* (Z für: CRASP-zwei) umbenannt (Hartmann et al., 2006). Daten weisen darauf hin, dass das *cspZ*-Gen in verschiedenen *B. burgdorferi*-Stämmen aus Europa und Nordamerika hochgradig konserviert ist (Rogers und Marconi, 2007, Kraiczky et al., 2008b).

BbCRASP-2 ist auf der äußeren Membran lokalisiert, besteht aus 236 Aminosäuren und hat eine ermittelte molekulare Masse von 27,2 kDa. Am N-Terminus weist BbCRASP-2 signifikante Ähnlichkeit zu den Signalsequenzen von Lipoproteinen anderer Spirochäten auf (Haake et al., 2000). Nach Abspaltung der N-terminalen Signalsequenz entsteht ein Lipoprotein von ca. 23,2 kDa.

Die Expression von BbCRASP-2 wird von Temperatur und pH-Wert beeinflusst. Untersuchungen an infizierten Mäusen und Zecken zeigten, dass BbCRASP-2 während der Infektion in der Maus exprimiert wird (Bykowski et al., 2007). Im Zusammenhang mit der Expression von BbCRASP-2 konnte bei einem ansonsten sensiblen Borrelienstamm eine vermehrte Serumresistenz nachgewiesen werden (Hartmann et al., 2006; Siegel et al., 2008).

1.5.1.2 Faktor H und FHL-1-Bindungsdomänen von BbCRASP-2

Anhand einer Pepspot-Analyse mit Faktor H und FHL-1 als Liganden ließen sich vier potenziellen FHL-1-Bindungsregionen und drei Bindungsregionen für Faktor H innerhalb des BbCRASP-2-Proteins identifizieren (Hartmann et al., 2006) (s. Abb. 1.7).

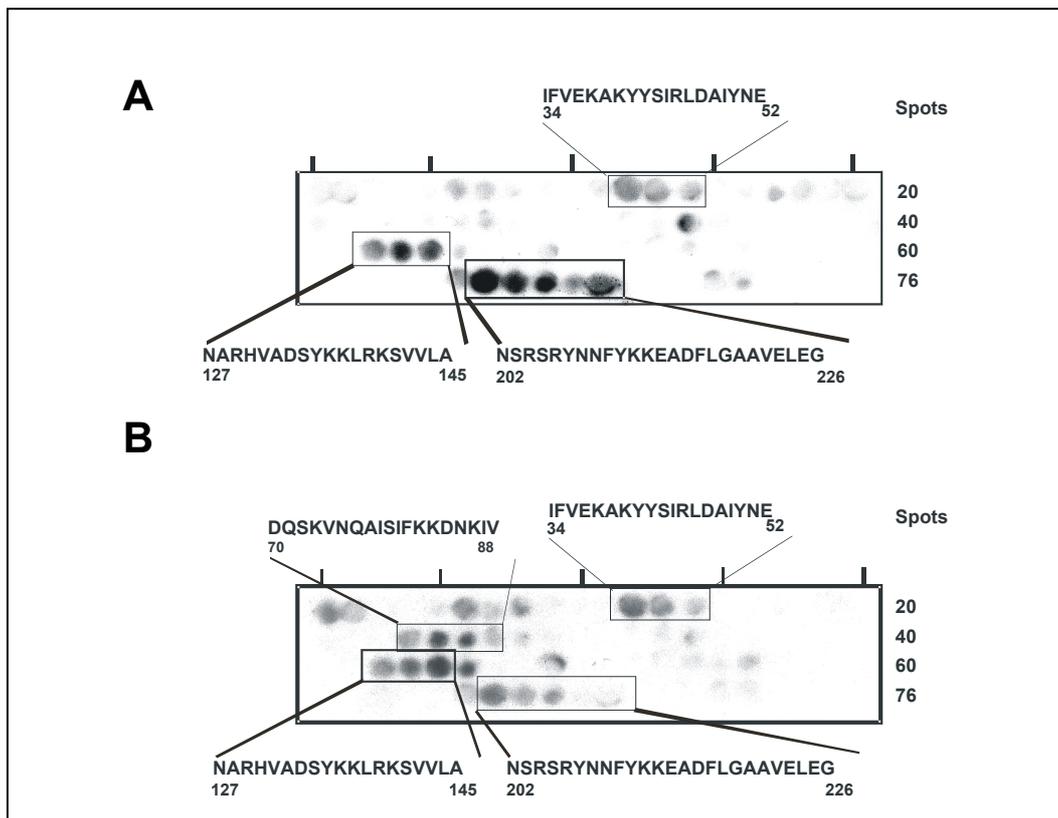


Abb. 1.7 : Identifizierung von potenziellen Bindungsregionen für Faktor H und FHL-1 im BbCRASP-2 Protein (entnommen aus Hartmann et al., 2006). **A:** Eine Bindung von Faktor H konnte innerhalb der Aminosäurepositionen 34-52 (Region 1), 127-145 (Region 3), und 202-226 (Region 4) nachgewiesen werden. **B:** Mit FHL-1 wurde an den gleichen Stellen eine Bindung beobachtet, jedoch konnte innerhalb der Aminosäuren 70-88 noch eine zusätzliche Bindungsregion für FHL-1 identifiziert werden (Region 2).

Eine detaillierte Analyse ergab, dass die einzelnen Regionen zahlreiche positiv (Lysin, Asparagin, Histidin) als auch negativ geladene Aminosäuren (Glutaminsäure, Asparaginsäure) enthalten.

1.5.1.3 BbCRASP-2-Bindungsregionen innerhalb von Faktor H und FHL-1

Faktor H und FHL-1 besitzen verschiedene SCR-Bindungsdomänen, die teilweise physiologischen Funktionen zugeordnet werden konnten (s. 1.3.4), teilweise mit speziellen

Oberflächenproteinen humanpathogener Mikroorganismen interagieren (s. 1.4.3). Die wichtigsten dieser Interaktionen sind an die SCR-Domäne 7 von Faktor H und FHL-1 sowie an SCR-Domäne 20 von Faktor H gekoppelt.

Untersuchungen zur Bestimmung der mit BbCRASP-2 interagierenden Bindungsdomänen innerhalb der beiden Regulatorproteine zeigten, dass vor allem die Domänen SCR 6 und 7 in dieser Interaktion involviert sind (Hartmann et al., 2006) (s. Abb. 1.8).

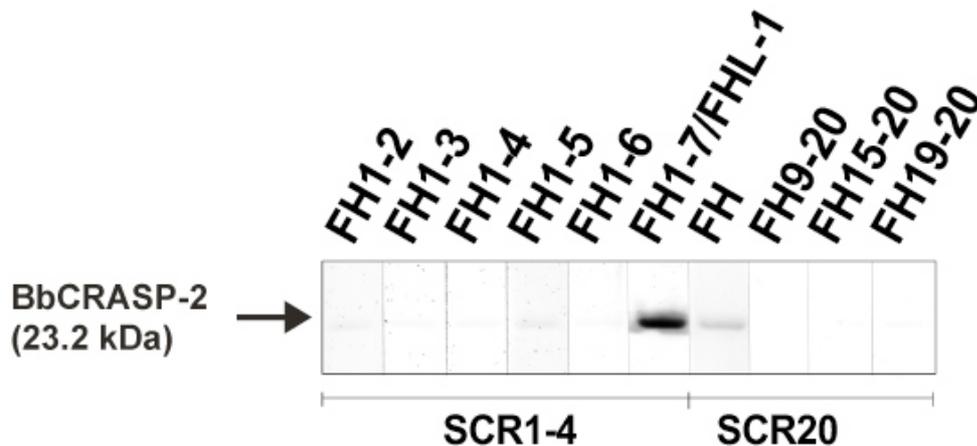


Abb. 1.8 : Identifizierung der mit BbCRASP-2 interagierenden SCR-Domänen von Faktor H und FHL-1 (entnommen aus Hartmann et al., 2006).

Die Interaktion dieser Domänen mit BbCRASP-2 ermöglicht beiden Komplementregulatoren im gebundenen Zustand ihre biologische Funktion bei der Inaktivierung von C3b aufrecht zu erhalten, da die am N-Terminus liegenden Domänen SCR1-4 nicht involviert sind. Experimentelle Untersuchungen zur Kofaktoraktivität von Faktor H und FHL-1 (Hartmann et al., 2006) bestätigen diese Hypothese.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

B. burgdorferi exprimiert bis zu fünf verschiedene membranständige Lipoproteine, die entweder mit Faktor H und FHL-1 (BbCRASP-1 und BbCRASP-2) oder ausschließlich mit Faktor H (BbCRASP-3, BbCRASP-4 und BbCRASP-5) interagieren (Kraiczy et al., 2001). Untersuchungen zur Relevanz der Faktor H und FHL-1 bindenden CRASP-Proteine für die natürliche Komplementresistenz von *B. burgdorferi* haben gezeigt, dass BbCRASP-1 und BbCRASP-2 die wichtigsten Liganden für die Protein-Protein Interaktion darstellen (Brooks et al., 2005, Hartmann et al., 2006; Siegel et al., 2008; Kenedy et al., 2009). Insbesondere dem Protein BbCRASP-2, das in der Phase der Transmission von der Zecke in den Wirt exprimiert

wird (Bykowski et al., 2007) und damit die Spirochäten vor der komplement-abhängigen Lyse zu schützen vermag, scheint eine wesentliche Rolle im Immunescape zuzukommen. Dadurch, dass BbCRASP-2 von nur einem einzelnen Gen (*cspZ*) kodiert wird und keine Homologie zu anderen Borrelienproteinen aufweist, nimmt es eine Sonderstellung innerhalb der CRASP-Proteinfamilie ein. Ausgehend von vergleichenden Sequenzanalysen des BbCRASP-2 Proteins aus *B. burgdorferi*-Isolaten verschiedener geographischer Herkunft konnte zudem ein sehr hoher Grad an Sequenzhomologie nachgewiesen werden (Rogers and Marconi, 2007; Kraiczy et al., 2008b). Aus diesem Grund wird BbCRASP-2 auch als hochspezifischer Marker für eine Infektion mit *B. burgdorferi* diskutiert (Kraiczy et al., 2008a). Damit stellt BbCRASP-2 ein vielversprechendes Molekül für die weitere Erforschung des molekularen Mechanismus der Immunevasion bei diesem Erreger dar.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Identifizierung solcher Aminosäurereste, die an der Bindung der beiden Regulatorproteine Faktor H und FHL-1 an BbCRASP-2 beteiligt sind. Auf der Basis der von Hartmann et al. lokalisierten Faktor H und FHL-1 interagierenden Domänen sollten zielgerichtet in drei der vier putativen Bindungsregionen hauptsächlich geladene Aminosäuren durch die neutrale Aminosäure Alanin substituiert werden. Darüber hinaus wurde eine in Computeranalysen als coiled-coil identifizierte Region mit in die Mutagenesestudie einbezogen. Mit einer gezielten Substitution sollte eine Destabilisierung der coiled-coil Struktur hervorgerufen werden, um herauszufinden, ob diese Region an der Protein-Protein-Wechselwirkung beteiligt ist. Die mittels in vitro Mutagenese erzeugten BbCRASP-2 Punktmutanten sollten als GST-Fusionsproteine rekombinant hergestellt und affinitätschromatographisch aufgereinigt werden. Die Charakterisierung des Faktor H und FHL-1 Bindungsverhaltens der einzelnen Proteine erfolgte mittels Ligandenaffinitätsblot-Analyse und ELISA.

Die so gewonnenen Ergebnisse aus der Mutagenesestudie sollten Aufschluss über die molekulare Natur der Protein-Protein-Wechselwirkung und der daran beteiligten Aminosäuren geben. Die Kenntnis des zugrundeliegenden molekularen Mechanismus kann für die Entwicklung neuer Therapeutika von Bedeutung sein.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Bakterienstamm

Für die Überexpression von rekombinanten Proteinen wurde der folgende *E. coli*-Stamm verwendet:

Stamm	Selektionsmarker	Genotyp
<i>E. coli</i> DH5 α TM -T1 ^R	Ampicillin	F ⁻ ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA</i>

Tabelle der durch in vitro Mutagenese generierten Mutanten:

Transformante	veränderte Nukleotidposition	Nukleotidaustausch	Aminosäureaustausch
DH5 α /pCSPZ D70A	209	A→C	D →A
DH5 α /pCSPZ Q71A	211, 212	C→G, A→C	Q →A
DH5 α /pCSPZ S72A	214, 215	A→G, G→C	S →A
DH5 α /P CSPZ K73A	217, 218	A→G, A→C	K →A
DH5 α /P CSPZ N75A	223, 224	A→G, A→C	N →A
DH5 α /pCSPZ Q76A	226, 227	C→G, A→C	Q →A
DH5 α /pCSPZ S79A	235	T→G	S →A
DH5 α /pCSPZ F81A	241, 242	T→G, T→C	F →A
DH5 α /pCSPZ K82A	244, 245	A→G, A→C	K →A
DH5 α /pCSPZ K83A	247, 248	A→G, A→C	K →A
DH5 α /pCSPZ D84A	251	A→C	D →A
DH5 α /pCSPZ N85A	253, 254	A→G, A→C	N →A
DH5 α /pCSPZ K86A	256, 257	A→G, A→C	K →A
DH5 α /pCSPZ F91A	271, 272	T→G, T→C	F →A
DH5 α /pCSPZ L94A	280, 281	C→G, T→C	L →A

Transformante	veränderte Nukleotidposition	Nukleotidaustausch	Aminosäureaustausch
DH5 α /pCSPZ I98A	292, 293	A→G, T→C	I →A
DH5 α /pCSPZ Y101A	301, 302	T→G, A→C	Y →A
DH5 α /pCSPZ R129A	385, 386	A→G, G→C	R →A
DH5 α /pCSPZ H130A	388, 389	C→G, A→C	H →A
DH5 α /pCSPZ D133A	398	A→C	D →A
DH5 α /pCSPZ K136A	406, 407	A→G, A→C	K →A
DH5 α /pCSPZ K137A	409, 410	A→G, A→C	K →A
DH5 α /pCSPZ R139A	415, 416	A→G, G→C	R →A
DH5 α /pCSPZ K140A	418, 419	A→G, A→C	K →A
DH5 α /pCSPZ R204A	610, 611	A→G, G→C	R →A
DH5 α /pCSPZ R206A	616, 617	A→G, G→C	R→A
DH5 α /pCSPZ Y207A	619, 620	T→G, A→C	Y →A
DH5 α /pCSPZ F210A	628,629	T→G, T→C	F →A
DH5 α /pCSPZ Y211A	631, 632	T→G, A→C	Y →A
DH5 α /pCSPZ K212A	634, 635	A→G, A→C	K →A
DH5 α /pCSPZ K213A	637, 638	A→G, A→C	K→A
DH5 α /pCSPZ E214A	641	A→C	E →A
DH5 α /pCSPZ D216A	647	A→C	D →A
DH5 α /pCSPZ E223An	668, 670, 672	A→C, C→T, T→A	E →A
DH5 α /pCSPZ E225An	672, 674	T→A, A→C	E →A

Tab 2.1: Tabelle der durch in vitro Mutagenese generierten Mutanten

2.1.2 Vektoren

2.1.2.1 Basisvektoren

Bezeichnung	Selektionsmerkmal	Verwendung	Referenz
pGEX-6P-1	Ampicillin	Überexpression von GST	Fa. GE Healthcare, Freiburg
pGEX B31 BBH06	Ampicillin	Überexpression des GST-BbCRASP-2-Fusionsproteins	K. Hartmann, 2005

Tab 2.2: Tabelle der Basisvektoren

2.1.2.2 Generierte Vektoren

Die generierten Vektoren wurden mit pCSPZ (beinhaltet das Ursprungsplasmid pGEX B31 BBH06) und dem entsprechenden Aminosäureaustausch bezeichnet:

Bezeichnung	Selektionsmerkmal	Verwendung	Referenz
pCSPZ D70A	Ampicillin	Überexpression von Mutante GST-BbCRASP-2 _{D70A}	Diese Arbeit
pCSPZ Q71A	Ampicillin	Überexpression von Mutante GST-BbCRASP-2 _{Q71A}	Diese Arbeit
pCSPZ S72A	Ampicillin	Überexpression von Mutante GST-BbCRASP-2 _{S72A}	Diese Arbeit
pCSPZ K73A	Ampicillin	Überexpression von Mutante GST-BbCRASP-2 _{K73A}	Diese Arbeit
pCSPZ N75A	Ampicillin	Überexpression von Mutante GST-BbCRASP-2 _{N75A}	Diese Arbeit
pCSPZ Q76A	Ampicillin	Überexpression von Mutante GST-BbCRASP-2 _{Q76A}	Diese Arbeit
pCSPZ S79A	Ampicillin	Überexpression von Mutante GST-BbCRASP-2 _{S79A}	Diese Arbeit
pCSPZ F81A	Ampicillin	Überexpression von Mutante GST-BbCRASP-2 _{F81A}	Diese Arbeit

Bezeichnung	Selektionsmerkmal	Verwendung	Referenz
pCSPZ K82A	Ampicillin	Überexpression von Mutante GST-BbCRASP-2 _{K82A}	Diese Arbeit
pCSPZ K83A	Ampicillin	Überexpression von Mutante GST-BbCRASP-2 _{K83A}	Diese Arbeit
pCSPZ D84A	Ampicillin	Überexpression von Mutante GST-BbCRASP-2 _{D84A}	Diese Arbeit
pCSPZ N85A	Ampicillin	Überexpression von Mutante GST-BbCRASP-2 _{N85A}	Diese Arbeit
pCSPZ K86A	Ampicillin	Überexpression von Mutante GST-BbCRASP-2 _{K86A}	Diese Arbeit
pCSPZ F91A	Ampicillin	Überexpression von Mutante GST-BbCRASP-2 _{F91A}	Diese Arbeit
pCSPZ L94A	Ampicillin	Überexpression von Mutante GST-BbCRASP-2 _{L94A}	Diese Arbeit
pCSPZ I98A	Ampicillin	Überexpression von Mutante GST-BbCRASP-2 _{I98A}	Diese Arbeit
pCSPZ Y101A	Ampicillin	Überexpression von Mutante GST-BbCRASP-2 _{Y101A}	Diese Arbeit
pCSPZ R129A	Ampicillin	Überexpression von Mutante GST-BbCRASP-2 _{R129A}	Diese Arbeit
pCSPZ H130A	Ampicillin	Überexpression von Mutante GST-BbCRASP-2 _{H130A}	Diese Arbeit
pCSPZ D133A	Ampicillin	Überexpression von Mutante GST-BbCRASP-2 _{D133A}	Diese Arbeit
pCSPZ K136A	Ampicillin	Überexpression von Mutante GST-BbCRASP-2 _{K136A}	Diese Arbeit
pCSPZ K137A	Ampicillin	Überexpression von Mutante GST-BbCRASP-2 _{K137A}	Diese Arbeit
pCSPZ R139A	Ampicillin	Überexpression von Mutante GST-BbCRASP-2 _{R139A}	Diese Arbeit
pCSPZ K140A	Ampicillin	Überexpression von Mutante GST-BbCRASP-2 _{K140A}	Diese Arbeit
pCSPZ R204A	Ampicillin	Überexpression von Mutante GST-BbCRASP-2 _{R204A}	Diese Arbeit
pCSPZ R206A	Ampicillin	Überexpression von Mutante GST-BbCRASP-2 _{R206A}	Diese Arbeit
pCSPZ Y207A	Ampicillin	Überexpression von Mutante GST-BbCRASP-2 _{Y207A}	Diese Arbeit
pCSPZ F210A	Ampicillin	Überexpression von Mutante GST-BbCRASP-2 _{F210A}	Diese Arbeit

Bezeichnung	Selektionsmerkmal	Verwendung	Referenz
pCSPZ Y211A	Ampicillin	Überexpression von Mutante GST-BbCRASP-2 _{Y211A}	Diese Arbeit
pCSPZ K212A	Ampicillin	Überexpression von Mutante GST-BbCRASP-2 _{K212A}	Diese Arbeit
pCSPZ K213A	Ampicillin	Überexpression von Mutante GST-BbCRASP-2 _{K213A}	Diese Arbeit
pCSPZ E214A	Ampicillin	Überexpression von Mutante GST-BbCRASP-2 _{E214A}	Diese Arbeit
pCSPZ D216A	Ampicillin	Überexpression von Mutante GST-BbCRASP-2 _{D216A}	Diese Arbeit
pCSPZ E223A	Ampicillin	Überexpression von Mutante GST-BbCRASP-2 _{E223A}	Diese Arbeit
pCSPZ E225A	Ampicillin	Überexpression von Mutante GST-BbCRASP-2 _{E225A}	Diese Arbeit

Tab. 2.3: Tabelle der generierten Vektoren

2.1.3 Oligonukleotide

Die aufgeführten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich synthetisiert. Für die in vitro Mutagenese wurden ausschließlich HPLC-gereinigte Oligonukleotide verwendet, mit Ausnahme der Primer pGEX(+) und pGEX (-). Die veränderten Nukleotidpositionen gegenüber der Ursprungsequenz sind durch rote Schrift gekennzeichnet.

Bezeichnung	Sequenz (von 5' nach 3')	Verwendung
pGEX(+)	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG	Sequenzierung
pGEX(-)	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG	Sequenzierung
BbCRASP-2 D70A(+)	G ACT TAT TCG GAA GGT ACA TTT TCT GCT CAA AGT AAG GTT AAT CAA G	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 D70A(-)	C TTG ATT AAC CTT ACT TTG AGC AGA AAA TGT ACC TTC CGA ATA AGT C	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 Q71A(+)	CG GAA GGT ACA TTT TCT GAT GCA AGT AAG GTT AAT CAA GCT ATA TC	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 Q71A(-)	GA TAT AGC TTG ATT AAC CTT ACT TGC ATC AGA AAA TGT ACC TTC CG	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 S72A(+)	GAA GGT ACA TTT TCT GAT CAA GCT AAG GTT AAT CAA GCT ATA TC	in vitro Mutagenese

Bezeichnung	Sequenz (von 5' nach 3')	Verwendung
BbCRASP-2 S72A(-)	GA TAT AGC TTG ATT AAC CTT AGC TTG ATC AGA AAA TGT ACC TTC	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 K73A (+)	GT ACA TTT TCT GAT CAA AGT GCG GTT AAT CAA GCT ATA TCT ATA	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 K73A (-)	TAT AGA TAT AGC TTG ATT AAC CGC ACT TTG ATC AGA AAA TGT AC	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 N75A (+)	CT GAT CAA AGT AAG GTT GCT CAA GCT ATA TCT ATA TTT AAA AAA G	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 N75A (-)	C TTT TTT AAA TAT AGA TAT AGC TTG AGC AAC CTT ACT TTG ATC AG	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 Q76A (+)	CT GAT CAA AGT AAG GTT AAT GCA GCT ATA TCT ATA TTT AAA AAA G	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 Q76A (-)	C TTT TTT AAA TAT AGA TAT AGC TGC ATT AAC CTT ACT TTG ATC AG	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 S79A (+)	GT AAG GTT AAT CAA GCT ATA GCT ATA TTT AAA AAA GAC AAT AAA ATT G	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 S79A (-)	C AAT TTT ATT GTC TTT TTT AAA TAT AGC TAT AGC TTG ATT AAC CTT AC	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 F81A (+)	GTT AAT CAA GCT ATA TCT ATA GCT AAA AAA GAC AAT AAA ATT G	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 F81A (-)	C AAT TTT ATT GTC TTT TTT AGC TAT AGA TAT AGC TTG ATT AAC	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 K82A (+)	GTT AAT CAA GCT ATA TCT ATA TTT GCA AAA GAC AAT AAA ATT GTT AAT AAG	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 K82A (-)	CTT ATT AAC AAT TTT ATT GTC TTT TGC AAA TAT AGA TAT AGC TTG ATT AAC	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 K83A (+)	CAA GCT ATA TCT ATA TTT AAA GCA GAC AAT AAA ATT GTT AAT AAG	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 K83A (-)	CTT ATT AAC AAT TTT ATT GTC TGC TTT AAA TAT AGA TAT AGC TTG	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 D84A (+)	CT ATA TCT ATA TTT AAA AAA GCC AAT AAA ATT GTT AAT AAG	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 D84A (-)	CTT ATT AAC AAT TTT ATT GGC TTT TTT AAA TAT AGA TAT AG	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 N85A (+)	CT ATA TCT ATA TTT AAA AAA GAC GCT AAA ATT GTT AAT AAG TTT AAG	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 N85A (-)	CTT AAA CTT ATT AAC AAT TTT AGC GTC TTT TTT AAA TAT AGA TAT AG	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 K86A (+)	CT ATA TTT AAA AAA GAC AAT GCA ATT GTT AAT AAG TTT AAG GAG	in vitro Mutagenese

Bezeichnung	Sequenz (von 5' nach 3')	Verwendung
BbCRASP-2 K86A (-)	CTC CTT AAA CTT ATT AAC AAT TGC ATT GTC TTT TTT AAA TAT AG	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 F91A (+)	GAC AAT AAA ATT GTT AAT AAG GCT AAG GAG CTT GAA AAG ATT ATA G	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 F91A (-)	C TAT AAT CTT TTC AAG CTC CTT AGC CTT ATT AAC AAT TTT ATT GTC	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 L94A (+)	GTT AAT AAG TTT AAG GAG GCT GAA AAG ATT ATA GAA GAA TAC	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 L94A (-)	GTA TTC TTC TAT AAT CTT TTC AGC CTC CTT AAA CTT ATT AAC	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 I98A (+)	GAG CTT GAA AAG ATT GCA GAA GAA TAC AAA CCT ATG	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 I98A (-)	CAT AGG TTT GTA TTC TTC TGC AAT CTT TTC AAG CTC	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 Y101A (+)	GAA AAG ATT ATA GAA GAA GCC AAA CCT ATG TTT TTA AG	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 Y101A (-)	CT TAA AAA CAT AGG TTT GGC TTC TTC TAT AAT CTT TTC	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 R129A (+)	GAT AAT GAT GTG TCT AAT GCC GCA CAT GTT GCT GAT TCT TAT AAA AAA C	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 R129A (-)	G TTT TTT ATA AGA ATC AGC AAC ATG TGC GGC ATT AGA CAC ATC ATT ATC	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 H130A (+)	GAT GTG TCT AAT GCC AGA GCT GTT GCT GAT TCT TAT AAA AAA C	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 H130A (-)	G TTT TTT ATA AGA ATC AGC AAC AGC TCT GGC ATT AGA CAC ATC	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 H130An (+)	GAT AAT GAT GTG TCT AAT GCC AGA GCT GTT GCT GAT TCT TAT AAA AAA C	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 H130An (-)	G TTT TTT ATA AGA ATC AGC AAC AGC TCT GGC ATT AGA CAC ATC ATT ATC	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 D133A (+)	CT AAT GCC AGA CAT GTT GCT GCT TCT TAT AAA AAA CTT AG	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 D133A (-)	CT AAG TTT TTT ATA AGA AGC AGC AAC ATG TCT GGC ATT AG	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 K136A (+)	GA CAT GTT GCT GAT TCT TAT GCA AAA CTT AGA AAA TCT GTT G	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 K136A (-)	C AAC AGA TTT TCT AAG TTT TGC ATA AGA ATC AGC AAC ATG TC	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 K137A (+)	GTT GCT GAT TCT TAT AAA GCA CTT AGA AAA TCT GTT GTA TTA G	in vitro Mutagenese

Bezeichnung	Sequenz (von 5' nach 3')	Verwendung
BbCRASP-2 K137A (-)	C TAA TAC AAC AGA TTT TCT AAG TGC TTT ATA AGA ATC AGC AAC	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 R139A (+)	CT GAT TCT TAT AAA AAA CTT GCA AAA TCT GTT GTA TTA GCC	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 R139A (-)	GGC TAA TAC AAC AGA TTT TGC AAG TTT TTT ATA AGA ATC AG	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 K140A (+)	GAT TCT TAT AAA AAA CTT AGA GCA TCT GTT GTA TTA GCC TAC	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 K140A (-)	GTA GGC TAA TAC AAC AGA TGC TCT AAG TTT TTT ATA AGA ATC	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 R204A (+)	GAT AGG GAA ATA AAT TCA GCA AGC AGG TAT AAT AAT TTT TAT AAA AAA G	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 R204A (-)	C TTT TTT ATA AAA ATT ATT ATA CCT GCT TGC TGA ATT TAT TTC CCT ATC	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 R206A (+)	GG GAA ATA AAT TCA AGA AGC GCG TAT AAT AAT TTT TAT AAA AAA G	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 R206A (-)	C TTT TTT ATA AAA ATT ATT ATA CGC GCT TCT TGA ATT TAT TTC CC	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 Y207A(+)	GG GAA ATA AAT TCA AGA AGC AGG GCT AAT TTT TAT AAA AAA G	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 Y207A (-)	C TTT TTT ATA AAA ATT ATT AGC CCT GCT TGA ATT TAT TTC CC	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 F210A (+)	CA AGA AGC AGG TAT AAT AAT GCT TAT AAA GAA GCA GAT TTT TTA G	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 F210A (-)	C TAA AAA ATC TGC TTC TTT TTT ATA AGC ATT ATA CCT GCT TCT TG	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 Y211A (+)	GC AGG TAT AAT AAT TTT GCT AAA AAA GCA GAT TTT TTA G	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 Y211 (-)	C TAA AAA ATC TGC TTC TTT TTT AGC AAA ATT ATA CCT GC	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 K212A (+)	GC AGG TAT AAT AAT TTT TAT GCA AAA GAA GCA GAT TTT TTA GGT G	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 K212A (-)	C ACC TAA AAA ATC TGC TTC TTT TGC ATA AAA ATT ATT ATA CCT GC	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 K213A (+)	GG TAT AAT AAT TTT TAT AAA GCA GAA GCA GAT TTT TTA GGT GC	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 K213A (-)	GC ACC TAA AAA ATC TGC TTC TGC TTT ATA AAA ATT ATT ATA CC	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 E214A (+)	G TAT AAT AAT TTT TAT AAA AAA GCA GCA GAT TTT TTA GGT GCT GC	in vitro Mutagenese

Bezeichnung	Sequenz (von 5' nach 3')	Verwendung
BbCRASP-2 E214A (-)	GC AGC ACC TAA AAA ATC TGC TGC TTT TTT ATA AAA ATT ATT ATA C	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 E214An (+)	AAT AAT TTT TAT AAA AAA GCA GCA GAT TTT TTA GGT G	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 E214An (-)	C ACC TAA AAA ATC TGC TGC TTT TTT ATA AAA ATT ATT	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 D216A (+)	AAT TTT TAT AAA AAA GAA GCA GCT TTT TTA GGT GCT GCT GTA G	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 D216A (-)	C TAC AGC AGC ACC TAA AAA AGC TGC TTC TTT TTT ATA AAA ATT	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 E223An (+)	TTT TTA GGT GCT GCT GTA GCA TTA GAG GGG GCT TAT AAA G	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 E223An (-)	C TTT ATA AGC CCC CTC TAA TGC TAC AGC AGC ACC TAA AAA	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 E225An (+)	TTA GGT GCT GCT GTA GAA CTA GCG GGG GCT TAT AAA GCT ATT A	in vitro Mutagenese
BbCRASP-2 E225An (-)	T AAT AGC TTT ATA AGC CCC CGC TAG TTC TAC AGC AGC ACC TAA	in vitro Mutagenese

Tab. 2.4: Tabelle der Oligonukleotide

2.1.4 Medien zur Kultivierung von *E. coli*

Die *E. coli*-Stämme wurden in Flüssigmedium und auf Festnährböden angezüchtet.

- 2xYT-Flüssigmedium (Sambrook et al., 1989)

NaCl	10,0 g
Yeast extract	10,0 g
Tryptone	16,0 g
Aq. dest.	ad 1,0 l

Einstellung auf pH 7,5; Autoklavierung bei 121°C für 20 min., Lagerung bei ZT.

- LB-Agar (Sambrook et al., 1989)

NaCl	10,0 g
Yeast extract	5,0 g
Tryptone	10,0 g
Agar	20,0 g
Aq. dest.	ad 1,0 l

Einstellung auf pH 7,0 und Autoklavierung bei 121°C für 20 min. Nach Abkühlen auf 55°C wurde der Agar in Petrischalen gegossen. Diese wurden bei 4°C gelagert und waren für zwei Wochen verwendbar.

- Ampicillin-haltiges 2xYT-Flüssigmedium und Agar

Zur Herstellung von Ampicillin-supplementierten Medium wurde Ampicillin (s. 2.1.5.6) im Verhältnis 1:1000 hinzugegeben (Endkonzentration 100 µg/ml).

2.1.5 Puffer und Lösungen

2.1.5.1 Puffer und Lösungen für die Tris/Tricin-SDS-Gelelektrophorese:

- 3fach konz. Gelpuffer

Tris	363,3 g
konzentrierte HCl	85 ml
20% SDS	15 ml
mit Aq. dest. ad 1l	

Einstellung auf pH 8,45; Autoklavierung bei 121°C für 20 min., Lagerung bei ZT.

- Acrylamid-Lösung (48 : 1,5)

Acrylamid	240 g
Bisacrylamid	7,5 g
mit Aq. dest. ad 500 ml	

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4° C gelagert.

- Ammoniumpersulfat-Lösung (10%ige Lösung)

Ammoniumpersulfat	0,16 g
Aq. dest.	1,6 ml
Lagerung bei -20° C.	

- Kathodenpuffer

Tris	24,2 g
Tricin	35,8 g
20% SDS	10ml
mit Aq. dest. ad 2,0 l	

Einstellung auf pH 8,25; Lagerung bei ZT.

- Anodenpuffer

Tris	24,2 g
------	--------

mit Aq. dest. ad 2,0 l

Einstellung auf pH 8,9; Lagerung bei ZT.

- Inkubationspuffer

Glycerol	3g
----------	----

20%SDS	6 ml
--------	------

1M Tris-HCl (pH 7,0)	1,5 ml
----------------------	--------

Serva Blau G	8 mg
--------------	------

Mercaptoethanol	600 µl
-----------------	--------

mit Aq. dest. ad 10 ml

Lagerung bei ZT.

2.1.5.2 Puffer und Lösungen für die Westernblot- und Ligandenaffinitätsblot-Analyse:

- Kathodenpuffer

Aminocaprinsäure	78,7 g
------------------	--------

Tris	7,2 g
------	-------

mit Aq. dest. ad 2,0 l

Einstellung auf pH 8,6 - 8,7; Lagerung bei ZT.

- Anodenpuffer

Tris	72,7 g
------	--------

Tricin	35,8 g
--------	--------

mit Aq. dest. ad 2,0 l

Einstellung auf pH 8,7 - 8,8; Lagerung bei ZT.

- EDTA-Puffer

0,05M EDTA

Einstellung auf pH 8,0; Lagerung bei ZT.

- TBS

Tris	20 mM
NaCl	150 mM

Einstellung auf pH 7,5; Autoklavierung bei 121°C für 20 min., Lagerung bei ZT.

- Waschpuffer I

TBS mit 0,1% Tween 20

Lagerung bei ZT.

- Blockierungspuffer für Westernblot-/ Ligandenaffinitätsblot-Analyse

Waschpuffer I mit 5% Milchpulver

Der Puffer wurde vor Gebrauch hergestellt.

- Waschpuffer II

TBS mit 0,2 % Tween 20

Lagerung bei ZT.

- Waschpuffer für die Antikörper-Detektion (RecomBlot-Waschpuffer)

Zum Verdünnen der sekundären Antikörper in der Westernblot-Analyse wurde der RecomBlot Waschpuffer der Firma Mikrogen verwendet.

2.1.5.3 Lösung für die PCR:

- Nukleosid-Mix

ATP	10 µl
CTP	10 µl
GTP	10 µl
TTP	10 µl
Aq. dest.	460 µl

Der Nukleosid-Mix wurde bei -20°C gelagert.

2.1.5.4 Puffer und Lösung für die Überexpression und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen

- Bindungspuffer

NaCl	140 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	1,8 mM

Nach Einstellen auf pH 7,3 wurde der Puffer sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

- Glutathion-Elutionspuffer

Es wurde der GST-Elutionspuffer aus dem MicroSpin™ GST Purification Module (GE Healthcare, Kat.Nr. 27457003) verwendet. Der Puffer wurde in Aliquots zu 5ml bei -20°C aufbewahrt.

- PBS

Na ₂ HPO ₄	1,364 g
NaH ₂ PO ₄	0,318 g
NaCl	9,0 g

mit Aq.dest. ad 1l

Einstellung auf pH 7,4; Lagerung bei 4°C.

2.1.5.5 Puffer und Lösungen für ELISA

- Coating-Puffer

Na ₂ CO ₃	2,65 g
NaN ₃	0,02%
Aq. dest.	500 ml

Einstellung auf pH 9,6; Lagerung bei ZT.

- Blockierungspuffer für ELISA

PBS mit 0,1 % Gelatine

Lagerung bei ZT.

- Waschpuffer

PBS mit 0,1% Tween 20

Lagerung bei ZT.

- Substratpuffer

KH_2PO_4 6,8 g

Aq. dest. 500 ml

Einstellung auf pH 6,0 mit KOH; Lagerung bei ZT.

- Substratlösung

OPD 20 mg

H_2O_2 20 μl

Substratpuffer 20 ml

H_2O_2 wurde erst kurz vor Beginn hinzugefügt.

- Stopplösung

H_2SO_4 (konz.) 36 ml

mit Aq. dest. ad 500 ml

2.1.5.6 Sonstige Puffer und Lösungen

- Ampicillinlösung (100mg/ml)

Ampicillin wurde in Aq. dest. gelöst, sterilfiltriert und bei -20°C gelagert.

- Färbelösung

Zum Anfärben der Nitrocellulosemembran wurde das Reversibel Proteine Detection Kit der Firma Sigma verwendet (Nr. 14143/2/98).

- IPTG-Stammlösung

0,5 M Isopropylthiogalactosid-Lösung wurde mit Aq. dest. hergestellt, sterilfiltriert und bei -20°C im Dunklen gelagert.

- CaCl_2 -Lösung

Eine 50mM Calciumchlorid-Lösung aus 1M Stammlösung hergestellt und bei 4°C gelagert.

2.1.6 Chemikalien und Substanzen

Bezeichnung	Kat.Nr.	Firma
6-Aminocapronsäure	70260	Fluka
Acrylamid 2K	A1089	Applichem
Agar BACTO™	214010	BD
Ammoniumpersulfat	9592.2	Roth
Ampicillin Natriumsalz	A951825G	Sigma-Aldrich
Bisacrylamid 2K	A1096	Applichem
Calciumchlorid	A3587	Applichem
di-Natriumhydrogenphosphat	A1046	Applichem
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	A11D4	Applichem
Glycerin	3783.1	Roth
Hydrochloric acid min. 37%	30721	Riedel-de- Haën
Isopropylthiogalactosid	2316.3	Roth
Kalilauge	A2180	Applichem
Kaliumchlorid	31248	Riedel-de- Haën
Kaliumdihydrogenphosphat	P-5379	Sigma-Aldrich
Mercaptoethanol	A1108	Applichem
Milchpulver		Töpfer
Natriumazid	6688	Merck
Natriumcarbonat	1.06392	Merck
Natriumchlorid	1.03404	Merck
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	6346	Merck
Natriumhydroxid Plätzchen	30620	Riedel-de-Haën
Natronlauge 1M	01830	Bernd Kraft GmbH
o-Phenyldiamin	P5412	Sigma-Aldrich
Salzsäure 1M	35328	Riedel-de- Haën
Schwefelsäure (konz.)	1.00731	Merck
SDS Lauryl Sulfate	L5750	Sigma-Aldrich
Servablau	G3580.1	Serva
TEMED	2367.3	Roth
3,3', 5,5' Tetramethylbenzidin	TMB0406	Mikrogen
Tricin	A1085,0500	AppliChem
Tris	T1503	Sigma-Aldrich

Bezeichnung	Kat.Nr.	Firma
Tween 20	9127.1	Roth
Tryptone BACTO™	211705	BD Biosciences
Yeast extract BACTO™	212750	BD Biosciences

Tab. 2.5: Tabelle der Chemikalien und Substanzen

2.1.7 Geräte

Gerät	Firma
Pipetten:	
Pipetten	Eppendorf
Beheizbare Magnetrührer:	
IKAmag ret	IKA
IKA-Combimag-RCO	IKA
Waagen:	
Analysewaage 822	Kern
pH-Meter:	
pH-Meter 654	Metrohm
Schüttler:	
Rocky	LTF
Schüttler E5	E. Bühler
Vortexer VF2	IKA
Intelli-Mixer	LTF
Thermomixer comfort	Eppendorf
Temperierbarer Schüttler Novotron	INFORS HT

Zentrifugen:

Varifuge 3.0R (400-5000 rpm)	Heraeus
Superspeed RC2-B	Sorvall
Tischzentrifuge 5402 (bis 14000 rpm)	Eppendorf
Tischzentrifuge 5702R (bis 13000 rpm)	Eppendorf

Brutschrank:

Brutschrank B5060	Heraeus
-------------------	---------

Sterilwerkbank:

Herasafe HS12	Heraeus
---------------	---------

PCR-Cycler:

Progene	Techne
Gene Amp PCR System 2400	Perkin-Elmer

Agarosegel-Zubehör:

Gel-Kammer, Gel Casting System 11.14	Gibco
--------------------------------------	-------

Spannungsgeber:

Netzgerät Modell E 835	Consort
------------------------	---------

Tiefkühltruhe / Gefrierschrank

Economic (-20°C)	Bosch
Ultima II (-80°C)	Revco Scientific Inc.

Becherresonator mit Kühlgerät:

Sonifier B12 mit Resonanzbecher	Branson/ G.Heinemann
Kühlgerät Multistar	Fryka

Blotgerät:

Semi-dry Blotter	LTF
------------------	-----

Temperierbares Wasserbad:

Wasserbad 1083

GFL

ELISA-Reader mit Software:

PowerWave 200

Bio-Tek Instruments

MikroWin 3.0

Mikrotek

Laborsysteme

GmbH

2.1.8 Sonstige Reagenzien und Materialien**2.1.8.1 Enzyme**

- DpnI (20 U/ μ l), Restriktionsendonuklease aus *Diplococcus pneumoniae* G41, New England Biolabs

- Pfu-DNA-Polymerase (2,5 U/ μ l) aus *Pyrococcus furiosus*, Stratagene

2.1.8.2 Antikörper

primäre Antikörper:

Bezeichnung	Zielprotein	Eigenschaften	Referenz
SCR 1-4	FHL-1	polyklonal, Kaninchen	Kühn et al.
IVG8	Faktor H	monoklonal	Prodinger et al.
anti-GST	GST	polyklonal, Ziege	GE Healthcare
anti-FH	FH	polyklonal, Ziege	Calbiochem

Tab. 2.6: Tabelle der primären Antikörper

sekundäre Antikörper:

Bezeichnung	Zielprotein	Eigenschaften	Referenz
Anti-Maus-IgG HRP	IVG8	polyklonal	DAKO Cytomation
Anti-Kaninchen-IgG HRP	SCR 1-4	polyklonal	DAKO Cytomation
Anti-Ziege-IgG HRP	anti-GST	polyklonal	DAKO Cytomation

Tab. 2.7: Tabelle der sekundären Antikörper

2.1.8.3 Humanserum

Als Faktor H-Quelle wurde Humanserum (NHS) von Borreliose-negativen Blutspendern verwendet.

Nach der Blutabnahme wurden die Seren für 30 min bei Raumtemperatur aufbewahrt und anschließend bei 4°C und 3000 rpm zentrifugiert. Diejenigen Seren, welche im ELISA und im Immunoblot keine Hinweise auf Borrelieninfektion oder Infektion mit anderen Spirochäten zeigten, wurden einem Serumpool zugeführt, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.1.8.4 Verschiedenes

2.1.8.4.1 Proteinstandard

Als Proteinstandard wurden Precision Plus Protein TM Standards All Blue der Firma BIO-RAD verwendet, Kat. Nr. 161-0373.

2.1.8.4.2 Faktor H

Gereinigtes Faktor H-Protein (1mg/ml) wurde von der Firma Calbiochem bezogen, Kat.Nr. 341274.

2.1.8.4.3 FHL-1

FHL-1 wurde freundlicherweise von Prof. Peter F. Zipfel (Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie, Jena) zur Verfügung gestellt.

2.1.8.4.4 Nitrocellulose-Membran

Für den Transfer von Proteinen wurde die Nitrocellulosemembran Protran BA 83 der Firma Schleicher & Schuell verwendet, Kat.Nr. 10402468.

2.1.8.4.5 Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Isolierung von Plasmid-DNA wurde das Plasmid Mini Prep Kit I der Firma Peqlab verwendet, Kat.Nr. 12-6942-02.

2.1.8.4.6 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Für die PCR-basierte Sequenzierung wurde das BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit der Firma Applied Biosciences verwendet, Kat.Nr. 4336917.

2.1.8.4.7 Säulen für die Affinitätschromatographische Aufreinigung von rekombinanten Proteinen

Zur Reinigung der rekombinanten Proteine wurde das MicroSpin™ GST Purification Module der Firma GE Healthcare verwendet, Kat.Nr. 27 45 70 03.

2.1.8.4.8 Reagenzien und Materialien für ELISA

Im ELISA wurde die Mikrotiterplatte Nunc Immobilizer Glutathione F96 Clear der Firma Nunc verwendet, Kat. Nr. 436032.

Zur Auswertung der Daten diente die Software MikroWin 3.0 der Firma Mikrotek Laborsysteme GmbH.

2.2. Methoden

2.2.1 Bakteriologische Methoden

2.2.1.1 Herstellung einer Übernachtskultur von *E. coli*-Zellen

Ausgehend von einem Transformationsansatz (s. 2.2.2.2) wurde eine mit je 200µl 2xYT/Amp-Medium beschickte Mikrotiterplatte mit einzelnen Klonen angeimpft und diese über Nacht bei 37°C bebrütet. Anschließend wurden 5 ml 2xYT/Amp-Medium mit je 10µl einer Übernachtskultur aus der Mikrotiterplatte angeimpft und diese Kulturen bei 37°C und 200 rpm über mindestens 8 h im Schüttelinkubator inkubiert. Aus den Übernachtskulturen wurde entweder Plasmid-DNA isoliert oder 10µl für einen Einzelkolonieausstrich auf Ampicillin-Nährböden verwendet. Für die Anzucht von *E. coli*-Zellen ohne Plasmide wurden Nährböden und 2xYT-Medium ohne Ampicillin verwendet.

2.2.1.2 Kultivierung von plasmidtragenden *E. coli*-Zellen für die Langzeitaufbewahrung

Nach erfolgter Sequenzierung, wurde aus den Einzelkolonieausstrichen der ausgewählten Klone Übernachtskulturen angeimpft. Die Übernachtskultur wurde 1:1 mit 2xYT/Glycerin-Medium versetzt, eine Stunde bei Raumtemperatur stengelassen, in Kryoröhrchen zu 1 ml aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Herstellen von kompetenten *E. coli*-Zellen

Aus einer 5ml Übernachtskultur von *E. coli* DH5 α (s. 2.1.1) wurden 300 μ l entnommen und 30ml 2xYT-Medium angeimpft. Die Bakterienkultur wurde für 2-3 h bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert, bis die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase waren. Bei einer Extinktion (OD₆₀₀) von 0,7-0,8 wurden die Zellen in ein 50 ml Röhrchen überführt und bei 5000 rpm und 4°C für 10 min abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 30 ml eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert; nach wiederholter Zentrifugation wurde das Sediment nochmals in 30 ml eiskalter 50 mM CaCl₂-Waschlösung resuspendiert. Dann wurden die Bakterienzellen für 30 min auf Eis inkubiert und erneut abzentrifugiert (5000 rpm, 4°C, 10 min). Das Sediment wurde in 3ml 50mM CaCl₂ mit 20% Glycerin resuspendiert und in Aliquots zu je 200 μ l bei -80°C gelagert.

2.2.2.2 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA

Ein Aliquot von 200 μ l kompetenter DH5 α -Zellen wurde mit 5 μ l des in vitro Mutagenese-Ansatz gemischt und zur Aufnahme der DNA sofort für 30 min auf Eis gestellt. Die Zellen wurden anschließend für 3 min bei 43°C im Thermomixer inkubiert. Danach wurden die DH5 α -Zellen für weitere 30 min auf Eis gestellt, mit 1 ml 2xYT-Medium versetzt und für 1-3 h bei 37°C und 200 rpm kultiviert. Die Zellen wurden 2 min bei 3000 rpm anzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Sediment in 200 μ l 2xYT-Medium resuspendiert. Anschließend wurden je 100 μ l der Suspension auf einem 2xYT/Ampicillin-Selektivnährboden ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet. Die gewachsenen Einzelkolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher abgeimpft und in 200 μ l 2xYT/Ampicillin-Medium in einer Mikrotiterplatte angeimpft. Zur Langzeitaufbewahrung wurden die Mikrotiterplatten mit je 50 μ l Glycerin versetzt, eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und bei -80°C eingefroren.

Um die Klone mit dem entsprechenden mutierten Plasmiden zu identifizieren, wurden aus der Mikrotiterplatte 5 ml-Übernachtskulturen angelegt (s. 2.2.1.1) und daraus Plasmid-DNA isoliert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA für die Sequenzierung (s. 2.2.2.5) verwendet.

2.2.2.3 In vitro Mutagenese mittels PCR

Zur Generierung einzelner Nukleotidsubstitutionen an den ausgewählten Positionen im BbCRASP-2 kodierenden *cspZ*-Gen wurden jeweils komplementäre Oligonukleotide eingesetzt (s. 2.1.3), welche die gewünschte Mutation trugen. Als Basisplasmid für die in vitro Mutagenese diente pGEX B31 BBH06 (K. Hartmann, 2005, s. 2.1.2.1)

Die PCR wurde wie folgt durchgeführt:

Reaktionsansatz für die PCR:

100 ng pGEX B31 BBH06
 1,25 µl Oligonukleotid A (125ng)
 1,25 µl Oligonukleotid B (125ng)
 1 µl Nukleosidmix (10x konzentriert)
 5 µl PCR-Puffer (10x konzentriert)
 1 µl Pfu-DNA-Polymerase (2,5 U/ml)

ad 50 µl mit Aq. dest.

Bedingungen für die in vitro Mutagenese mittels PCR:

1. Zyklus	95°C	30 sec	
2.-18. Zyklus	95°C	30 sec	
		55°C	1 min
		68°C	13 min

Der erste Zyklus beinhaltete eine Denaturierung von 30 Sekunden bei 95°C, damit sämtliche Plasmide zu Beginn der PCR in Einzelsträngen vorlagen.

Die Zyklen 2 bis 18 bestanden aus folgenden Schritten: Zunächst wurden die DNA-Stränge für 30 Sekunden bei 95°C denaturiert. Anschließend erfolgte die Anlagerung der Oligonukleotide an die komplementären DNA-Stränge für eine Minute bei 55°C. Um die vollständige Amplifikation des 5,6 kb-Plasmids zu ermöglichen, wurde eine 13-minütige Polymerisation (Amplifikation) bei 68°C durchgeführt.

Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der Reaktionsansatz mit 1 µl DpnI (20 U/µl) für eine Stunde bei 37°C inkubiert, um das als Matrize für die Reaktion eingesetzte methylierte pGEX B31 BBH06-Plasmid zu degradieren. Das Enzym DpnI hydrolysiert ausschließlich methylierte DNA-Stränge, wodurch das aus *E. coli* isolierte Basisplasmid aus dem Reaktionsansatz entfernt werden konnte, aber die de novo amplifizierte DNA aus der PCR nicht hydrolysiert wurde.

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

Zur Plasmidisolierung wurde das Plasmid Mini Prep Kit I (s. 2.1.8.4.5) verwendet. Zu Beginn wurden aus einer Übernachtskultur 2 ml entnommen und bei 13000 rpm für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, weitere 2 ml aus der Übernachtskultur zum Sediment dazugegeben und nochmals zentrifugiert. Nach erneutem Dekantieren des Überstandes wurde das Sediment nach den Herstellerangaben lysiert und die Zelltrümmer abzentrifugiert. Der DNA-haltige Überstand wurde vorsichtig abgenommen und auf eine Aufreinigungssäule gegeben. Nach Zentrifugation bei 13000 rpm und mehreren Waschgängen nach Herstellerangaben wurden die Plasmide mit 50 µl Aq. dest. eluiert und bei -20°C gelagert.

2.2.2.5 Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurde das BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (s. 2.1.8.4.6) verwendet. Die auf einer PCR basierende Sequenzierung wurde wie folgt durchgeführt:

Reaktionsansatz für die PCR:

1,5 – 8 µl Plasmid-DNA (300 ng)
 1 µl Primer pGEX (+) oder pGEX (-)
 8 µl Premix (Fa. Applied Biosciences)

ad 20 µl mit Aq. dest.

Bedingungen für die Sequenzierung mittels PCR:

1. - 25. Zyklus	Denaturation bei 96°C	10 sec
	Hybridisierung bei 50°C	5 sec
	Elongation bei 60°C	4 min

Zur Trennung der DNA-Stränge wurden diese für 10 Sekunden bei 96°C erhitzt, es folgte eine Phase von 5 Sekunden bei 50°C zur Anlagerung der Primer und anschließend die Polymerisation über 4 min bei 60°C. Nach erfolgter PCR wurden die Proben mit 10 µl Aq. dest. versetzt und zur weiteren Bearbeitung an einen kommerziellen Anbieter verschickt.

Die Analyse der Plasmid-DNA-Sequenzen wurde mit dem Programm DNASTAR von Lasergene, Version 99 vorgenommen. Von jeder Mutante wurden (soweit möglich) jeweils zwei Klone ausgewählt, die die gewünschte Mutation trugen. Zur Bestätigung wurden für jede ausgewählte Mutation beide DNA-Stränge sequenziert.

2.2.3 Biochemische Methoden

2.2.3.1 Expression rekombinanter GST-Fusionsproteine in *E. coli*

Mit einer Einzelkolonie der ausgewählten Klone (s. 2.2.2.5) wurde eine Übernachtskultur angeimpft. Für die Überexpression rekombinanter GST-Fusionsproteine wurden 10 ml 2xYT-Kultur mit 200 µl der frischen Übernachtskultur angeimpft und unter Schütteln bei 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 bei 37°C inkubiert. Dann wurde die Proteinexpression mit 2 µl IPTG (0,5M Stammlösung) induziert und die Zellen für weitere 3 h bei 21°C geschüttelt. Anschließend wurde durch Ultraschallbehandlung aus der Kultur ein Bakterienextrakt hergestellt.

2.2.3.2 Herstellung von Bakterienextrakten für die Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Herstellung von *E. coli*-Zellysaten wurde die 10 ml Zellkultur (s. 2.2.3.1) für 20 min bei 5000 rpm sedimentiert und das Zellsediment anschließend in 500 µl PBS mit 5 µl 1M DTT-Lösung resuspendiert. Dann wurden die Zellen im Becherresonator (s. 2.1.7) fünfmal für 45 Sekunden bei 4°C beschallt, um eine vollständige Lyse der *E. coli*-Zellen zu erreichen. Das Zellsediment wurde 10 min bei 13000 rpm und 4°C abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und bei -20°C gelagert.

2.2.3.3 Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die elektrophoretische Auftrennung von Bakterienextrakten wurden generell 10%ige Tris/Tricin-Gele (Schägger und von Jagow, 1987; H. Schägger, 2006) verwendet.

Vor dem Auftragen wurden 10 µl Proteinsuspension mit Inkubationspuffer im Verhältnis 1:4 versetzt und für 30 min bei 40°C inkubiert. Der für Laemmli-SDS-Gele vorgesehene Molekulargewichtsstandard (s. 2.1.8.4.1) wurde 1:1 mit Aq. dest. verdünnt und ebenfalls für 30 min bei 40°C inkubiert.

Als Laufpuffer dienten Kathoden- und Anodenpuffer. Die Proben wurden auf das 4%ige Sammelgel appliziert und für 2 h bei 40V separiert. Nach Erreichen der Trenngelschicht wurde die Spannung auf 75V erhöht und die Proben für 14 bis 16 h aufgetrennt. Anschließend wurden die Tris/Tricin-Gele für die Westernblot- (s. 2.2.3.4) oder Ligandenaffinitätsblot-Analyse (s. 2.2.3.5) vorbereitet.

2.2.3.4 Westernblot-Analyse

Für die Westernblot-Analyse wurden die mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteingemische auf eine Nitrocellulose-Membran (s. 1.8.4.4) im Semi-dry-blot-Verfahren über 2 h bei Anlegen einer Stromstärke von 1 mA/cm^2 transferiert. Dazu wurden in einem Blotgerät der Firma LTF 200mA Stromstärke und 75V Spannung angelegt, wenn Membranen der Größe 14,5 x 17 cm verwendet wurden. Die Nitrocellulose-Membran wurde zunächst für 5 min in Anodenpuffer, anschließend in Aq. dest. gewaschen und mit Färbelösung (Reversible Protein Detection Kit, Fa. Sigma-Aldrich) angefärbt. Die Entfärbung erfolgte durch mehrfaches Waschen mit 0,05M EDTA-Lösung. Danach wurde die Membran mit Aq. dest. komplett entfärbt, bevor sie für mindestens eine Stunde mit Blockierungs-Lösung inkubiert wurde. Nach viermaligem Waschen für acht bis 10 min mit Waschpuffer I wurde die Membran zur Detektion von GST-Fusionsproteinen mit einem polyklonalen anti-GST-Antikörper inkubiert (Verdünnung 1:2000). Nach einer Inkubation von 1 h bei Raumtemperatur wurde viermal für 8 min mit Waschpuffer II gewaschen und die Membran mit einem polyklonalen, HRP-konjugierten anti-Ziege-Antiserum inkubiert. Dieses zweite Antiserum wurde im Verhältnis 1:1000 mit RecomBlot-Waschpuffer (Fa. Mikrogen) verdünnt. Nach einer weiteren Inkubation von einer Stunde wurde viermal für 8 min mit Waschpuffer II gewaschen und die Antigen/Antikörper-Komplexe mit TMB als Substrat visualisiert.

2.2.3.5 Ligandenaffinitätsblot-Analyse

Für den Nachweis der Bindung der Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1 wurde die Nitrocellulosemembran nach dem Blockieren für eine Stunde mit Blockierungs-Lösung viermal für 8 min mit Waschpuffer I gewaschen und für eine Stunde mit Humanserum als Faktor H-Quelle oder mit rekombinantem FHL-1-Überstand inkubiert. Nach viermaligem Waschen für 8 min mit Waschpuffer II wurde die Membran mit dem monoklonalen Antiserum VIG8 (für die Detektion der Faktor H-Bindung) oder mit polyklonalem anti-SCR 1-4 Antiserum (zur Detektion der FHL-1-Bindung) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden anschließend durch viermaliges Waschen für 8 min mit Waschpuffer II entfernt. Die Membranen wurden danach entweder mit HRP-konjugiertem Anti-Maus bzw. HRP-konjugiertem Anti-Kaninchen Antiserum (Verdünnung jeweils 1:1000 in RecomBlot-Waschpuffer) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach viermaligem Waschen für 8 min mit Waschpuffer II erfolgte die Zugabe von TMB als Substrat, um die Antigen-Antikörper-Komplexe zu detektieren.

2.2.3.6 Aufreinigung rekombinanter GST-Fusionsproteine

Zur Aufreinigung der rekombinanten GST-Fusionsproteine aus *E. coli* wurde das für die Zentrifuge einsetzbare MicroSpin™ GST Purification Modul (s. 2.1.8.4.7) verwendet. Hierzu wurden 600 µl des *E. coli*-Zellextrakts (s. 2.2.3.2) auf eine Säule gegeben und nach Herstellerangaben vorgegangen. Die aufgereinigten Proteine wurden in zwei Schritten mit je 75 µl Glutathion-Elutionspuffer (s. 2.1.5.4) eluiert und bei -20°C gelagert.

2.2.4 Immunologische Methoden

2.2.4.1 ELISA

Eine mit Glutathion beschichtete Mikrotiterplatte (Nunc Immobilizer Glutathione F96 Clear) wurde mit je 500 ng aufgereinigten BbCRASP-2, mutierten BbCRASP-2-Proteinen oder GST Protein, verdünnt in 100 µl Coating-Puffer (Endkonzentration: 5ng/µl), beschickt und über Nacht bei 4° C unter leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte dreimal mit Waschpuffer (s. 2.1.5.5) gewaschen. Dann wurde die Platte mit 200 µl Blocking-Puffer beschickt und über mindestens 6 h bei Raumtemperatur bei 200 rpm geschüttelt. Anschließend wurde die Platte ausgeschlagen, gereinigtes Faktor H oder FHL-1 (jeweils 500 ng/ Kavität) appliziert und der Reaktionsansatz über Nacht bei 4° C geschüttelt. Es folgten wiederum drei Waschungen mit Waschpuffer. Nach dem Ausschlagen der Platte wurde polyklonales anti-FH-Antiserum (Verdünnung 1:1000 in Waschpuffer) hinzugegeben und die Mikrotiterplatte für 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Es folgten drei Waschgänge und die Applikation des HRP-konjugierten anti-Ziege IgG (Verdünnung 1:5000 in Waschpuffer). Die Mikrotiterplatte wurde für weitere 3 h bei Raumtemperatur geschüttelt, dreimalig mit Waschpuffer gewaschen und anschließend 100 µl Substratlösung pro Kavität hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 8 min wurde die Reaktion mit je 50 µl Stopplösung abgestoppt und umgehend die Extinktion mit 490 gegen 562 nm gemessen.

2.2.5 Varianzanalyse

Die erhaltenen Daten aus den ELISA-Messungen wurden mittels Einweg-Varianzanalyse und Scheffe-Test analysiert (Sachs, 1997), um Signifikanzen in den Bindungsunterschieden von Faktor H und FHL-1 an BbCRASP-2 Mutanten zu ermitteln. Als Grundlage dienten Messungen aus einem Versuchsansatz, der aus insgesamt drei parallel durchgeführten Test bestand. Für jede Proteinmutante wurden zwei Versuche an zwei unabhängigen Tagen durchgeführt. Als Negativkontrolle diente gereinigtes GST-Protein. Parallel wurden ebenfalls Reaktionen mit Puffer statt Faktor H bzw. FHL-1 durchgeführt und die erhaltenen Werte („Hintergrund“) von den Ergebnissen mit Faktor H bzw. FHL-1 subtrahiert.

3. Ergebnisse

3.1 Bindung von Faktor H und FHL-1 an GST-fusioniertes BbCRASP-2 Protein

Zu Beginn der Studie wurde überprüft, ob der *E. coli* Stamm mit pGEX B31 BBH06 als Ausgangsplasmid (Hartmann et al., 2006) für die *in vitro* Mutagenese nach IPTG-Induktion ein funktionell aktives BbCRASP-2 Fusionsprotein exprimiert. Nach Überexpression des BbCRASP-2 Fusionsproteins in *E. coli* (s. 2.2.3.1) und Herstellung von Zelllysaten (s. 2.2.3.2) wurden die Proteine mittels Tris/Tricin-SDS-PAGE separiert (s. 2.2.3.3) und diese auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert (s. 2.2.3.4 und 2.2.3.5). Der Nachweis der Bindung von Faktor H und FHL-1 erfolgte anschließend über eine Ligandenaffinitätsblot-Analyse mit spezifischen Antikörpern wie unter 2.2.3.5 beschrieben. Wie in Abb. 3.1 zu sehen, bindet das an GST fusionierte BbCRASP-2 Protein an beide Komplementregulatoren, wobei eine stärkere Bindung von FHL-1 als von Faktor H an BbCRASP-2 beobachtet werden konnte. Das heißt, das rekombinante BbCRASP-2 Fusionsprotein zeigt die gleiche Bindungseigenschaft mit den Regulatorproteinen wie das native von Borrelien exprimierte BbCRASP-2 Protein (Kraiczky et al., 2001; Hartmann et al., 2006).

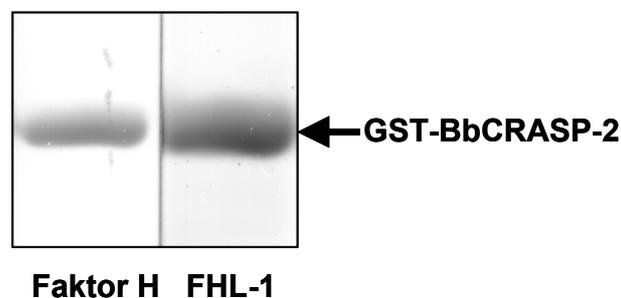


Abb. 3.1: Nachweis der Bindung von Faktor H und FHL-1 an rekombinantes BbCRASP-2 Fusionsprotein. Gesamtzellhomogenat (15 µg) von *E. coli* pGEX B31 BBH06 wurden in einem 10%igem Tris/Tricin-SDS-Gel separiert und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Membranen wurden anschließend mit rekombinantem FHL-1/Reconnectin oder mit NHS als Faktor H-Quelle inkubiert. Die Detektion des GST-BbCRASP-2 Proteins erfolgte durch Verwendung eines spezifisch reagierenden Antikörpers gegen die Domänen SCRs 1-4 von FHL-1 (aSCR 1-4) und eines monoklonalen Antikörpers, der spezifisch an die C-terminale Domäne SCR 20 von Faktor H bindet (VIG8).

In allen nachfolgenden Ligandenaffinitätsblot-Analysen mit den GST-BbCRASP-2-Mutanten diente das unveränderte GST-BbCRASP-2 Fusionsprotein als Positivkontrolle und gereinigtes GST Protein als Negativkontrolle.

5' - TATATAAAAATCGAAACAAAAAATTAAGATATAGTAAAATGTATT

[-10] RBS

TGTAGCAATTACTTTGTGCTAGAGGCTATGAATCTCTAAAGATTTTAGCAGGGGAGAAAA

ATGAAAAAAGTTTTTTATCAATATACATGTTAATTTCAATAAGTTTATTATCATGTGAT 60

M K K S F L S I Y M L I S I S L L S C D 20

GTTAGTAGATTAAATCAGAGAAATATTAATGAGCTTAAAATTTTTGTGAAAAGGCCAAG 120

V S R L N Q R N I N E L K I F V E K A K 40

TATTATTCTATAAGATTAGACGCTATTTATAACGAATGTACAGGAGCATATAATGATATT 180

Y Y S I R L D A I Y N E C T G A Y N D I 60

Region 1

ATGACTTATTCGGAAGGTACATTTTTCTGATCAAAGTAAGGTTAATCAAGCTATATCTATA 240

M T Y S E G T F S D Q S K V N Q A I S I 80

Region 2

TTTAAAAAAGACAATAAAATTTGTTAATAAGTTTAAGGAGCTTGAAAAGATTATAGAAGAA 300

F K K D N K I V N K F K E L E K I I E E 100

coiled coil-Region

TACAAACCTATGTTTTTAAGTAAATTAATTGATGATTTTGCTATAGAATTAGACCAAGCT 360

Y K P M F L S K L I D D F A I E L D Q A 120

GTAGATAATGATGTGTCTAATGCCAGACATGTTGCTGATTCCTATAAAAAACTTAGAAAA 420

V D N D V S N A R H V A D S Y K K L R K 140

Region 3

TCTGTTGTATTAGCCTACATTGAGAGTTTTGATGTTATATCTTCTAAGTTTGTGATAGT 480

S V V L A Y I E S F D V I S S K F V D S 160

AAGTTTGTGAAAGCTTCTAAAAATTTGTCAATAAAGCTAAAGAGTTTGTAGAGGAAAAAT 540

K F V E A S K K F V N K A K E F V E E N 180

GATCTTATAGCTCTTGAGTGTATTGTGAAAACCTATTGGAGATATGGTTAATGATAGGGAA 600

D L I A L E C I V K T I G D M V N D R E 200

ATAAATTCAAGAAGCAGGTATAATAATTTTTATAAAAAAGAAGCAGATTTTTTAGGTGCT 660

I N S R S R Y N N F Y K K E A D F L G A 220

Region 4

GCTGTAGAACTTGAGGGGGCTTATAAAGCTATTAAGCAAACCTTATTATAGATCACAAGG 720

A V E L E G A Y K A I K Q T L L * 236

TATAAATTAAGGCTTAAGCCAATTTATCAAAAGAGAGG - 3'

Abb. 3.2: Nukleotid- und Aminosäuresequenz des BbCRASP-2 kodierenden *ospZ* Gens mit Darstellung der vier potenziellen Faktor H/FHL-1 Bindungsregionen. Die Nukleotide wurden relativ zum ATG Startkodon nummeriert. Der offene Leserahmen enthält 708bp und kodiert für ein Protein von 236 Aminosäuren. Das TAG Stopkodon ist durch einen Stern am Ende der Sequenz gekennzeichnet. Die Ribosomenbindungsstelle RBS und die potentiellen -10 und -35-Promotorsequenzen sind ebenfalls dargestellt sowie eine für die Bindung von Faktor H diskutierte coiled coil-Region.

3.2 Lokalisation der Faktor H/FHL-1 Bindungsregionen innerhalb des BbCRASP-2 Proteins

Mittels Pepspot-Analyse konnten vier potenzielle Faktor H/FHL-1 Bindungsregionen innerhalb des BbCRASP-2 Proteins identifiziert werden (Hartmann et al., 2006). Außerdem wird für einen kurzen Aminosäureabschnitt im Anschluss an die Bindungsregion 2 eine coiled-coil-Region diskutiert (Rogers and Marconi, 2007) (s. Abb. 3.2).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe gezielter *in vitro* Mutagenese systematisch verschiedene Aminosäuren in den Bindungsregionen 2, 3 und 4 sowie vier Aminosäuren innerhalb der coiled coil-Region durch die neutrale Aminosäure Alanin ausgetauscht, um die mit Faktor H und FHL-1 interagierenden Aminosäuren des BbCRASP-2 Proteins zu identifizieren.

3.2.1 Charakterisierung der potenziellen Bindungsregion 2 von BbCRASP-2

Die Bindungsregion 2 umfasst die Aminosäuren von Position 70-88 (s. Abb. 3.2). In dieser Region wurde in der Pepspot-Analyse ausschließlich eine Bindung an FHL-1 nachgewiesen.



Abb. 3.3: Potenzielle Bindungsregion 2 von BbCRASP-2. Die für die *in vitro* Mutagenese ausgewählten Aminosäurereste sind markiert sowie die Ladungsverteilung innerhalb dieser Domäne.

Es ist bekannt, dass Faktor H bzw. FHL-1 mit dem polyanionischen Heparinmolekül über die N-terminale SCR-Domäne 7 (SCR7), die SCR-Domäne 13 und die C-terminale SCR-Domäne

20 interagieren (Hellwage et al. 1997; Zipfel und Skerka, 1999). Um zu untersuchen, ob ebenfalls geladene Aminosäurereste bei der Interaktion mit den beiden Komplementregulatoren involviert sind, wurden in der Bindungsregion 2 sämtliche geladenen sowie polaren Aminosäuren durch Alanin ausgetauscht. Die Bindungsregion 2 enthält die beiden negativ geladenen Aminosäurereste Asparaginsäure an Position 70 und 84 sowie vier positiv geladene Lysine an Position 73, 82, 83 und 86. Ebenso wurden die sechs polaren Aminosäuren Glutamin (Q71, Q76), Serin (S72, S79) und Asparagin (N75, N85) durch Alanin ersetzt. Die neutrale, unpolare Aminosäure Phenylalanin an Position 81 wurde aufgrund der aromatischen Seitenkette ebenfalls mit in die Analyse einbezogen.

3.2.1.1 Analyse des Bindungsverhaltens der in Bindungsregion 2 mutierten BbCRASP-2

Proteine

In Anlehnung an das QuickChange™ Site-directed Mutagenesis Kit (Fa. Stratagene) wurden mit spezifischen Primerpaaren (s. 2.1.3) und dem Plasmid pGEX B31 BBH06 an den ausgewählten Positionen in der Bindungsregion 2 Mutationen mittels PCR eingeführt. Nach Transformation von *E. coli* mit den in vitro Mutagenese-Ansätzen wurden von selektionierten Kolonien Plasmide isoliert, sequenziert und auf Vorhandensein der Mutation durch Vergleich mit der parentalen BbCRASP-2 Sequenz analysiert (s. 2.2.2.5). Diejenigen Klone, deren Plasmide die erwartete Mutation aufwiesen, wurden für die Herstellung von rekombinanten, mutierten BbCRASP-2 Fusionsprotein ausgewählt. Um zu gewährleisten, dass sich die mutierten Proteine aus einem Mutagenese-Ansatz identisch in ihrem Bindungsverhalten gegenüber FHL-1 und Faktor H verhielten, erfolgte die Ligandenaffinitätsblot-Analyse jeweils mit zwei zufällig ausgewählten Klone (s. Abb. 3.4).



Abb. 3.4: Beispiel einer Western- und Ligandenaffinitätsblot-Analyse von drei verschiedenen Mutagenese-Ansätzen. *E. coli* Zellextrakte mit überexprimierten BbCRASP-2 Mutanten wurden in einem 10% Tris/Tricin-SDS-Gel separiert und das Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Identifikation der BbCRASP-2-Mutanten erfolgte durch Verwendung eines mit GST reagierenden Antikörpers. Der Nachweis der Bindung an die beiden Komplementregulatoren erfolgte nach Inkubation mit rekombinanten FHL-1 bzw. NHS als Faktor H-Quelle unter Verwendung eines

spezifisch reagierenden Antikörpers gegen die Domänen SCR 1-4 von FHL-1 und eines monoklonalen Antikörpers, der spezifisch an die C-terminale SCR-Domäne 20 von Faktor H bindet (VIG8). Um den Einfluss der eingeführten Mutationen auf die Faktor H/FHL-1-Bindung in Bindungsregion 2 im Vergleich mit dem parentalen BbCRASP-2 Protein zu beurteilen, wurden alle rekombinanten BbCRASP-2 Proteine affinitätschromatographisch über eine GST-Säule aufgereinigt (s. 2.2.3.6) und vergleichbare Mengen an Proteinsuspensionen auf drei Tris/Tricin-SDS-Gele aufgetragen und separiert. Anschließend wurden die Gele auf Nitrocellulosemembranen transferiert und eine Western- bzw. Ligandenaffinitätsblot-Analyse durchgeführt.

Wie in Abbildung 3.5 zu erkennen, zeigten die Substitutionen der geladenen Aminosäuren Asp70, Lys73, Lys82, Lys83 und Lys86 keinen Einfluss auf die Bindung von FHL-1 oder Faktor H. Ebenso wenig wirkten sich die Austausche der polaren Aminosäuren Gln71, Asn75, Gln76, Ser79 und Asn85 auf die Bindung der beiden Komplementregulatoren aus. Beim Austausch des polaren Serins an Position 72 fällt jedoch eine deutlich schwächere Bindung von FHL-1 und Faktor H auf, als dies in der Westernblot-Analyse mit GST der Fall ist. Nach Austausch der negativ geladenen Asparaginsäure an Position 84 konnte eine etwas schwächere Bindung an FHL-1 und Faktor H im Vergleich zum Kontroll-Westernblot mit GST beobachtet werden.

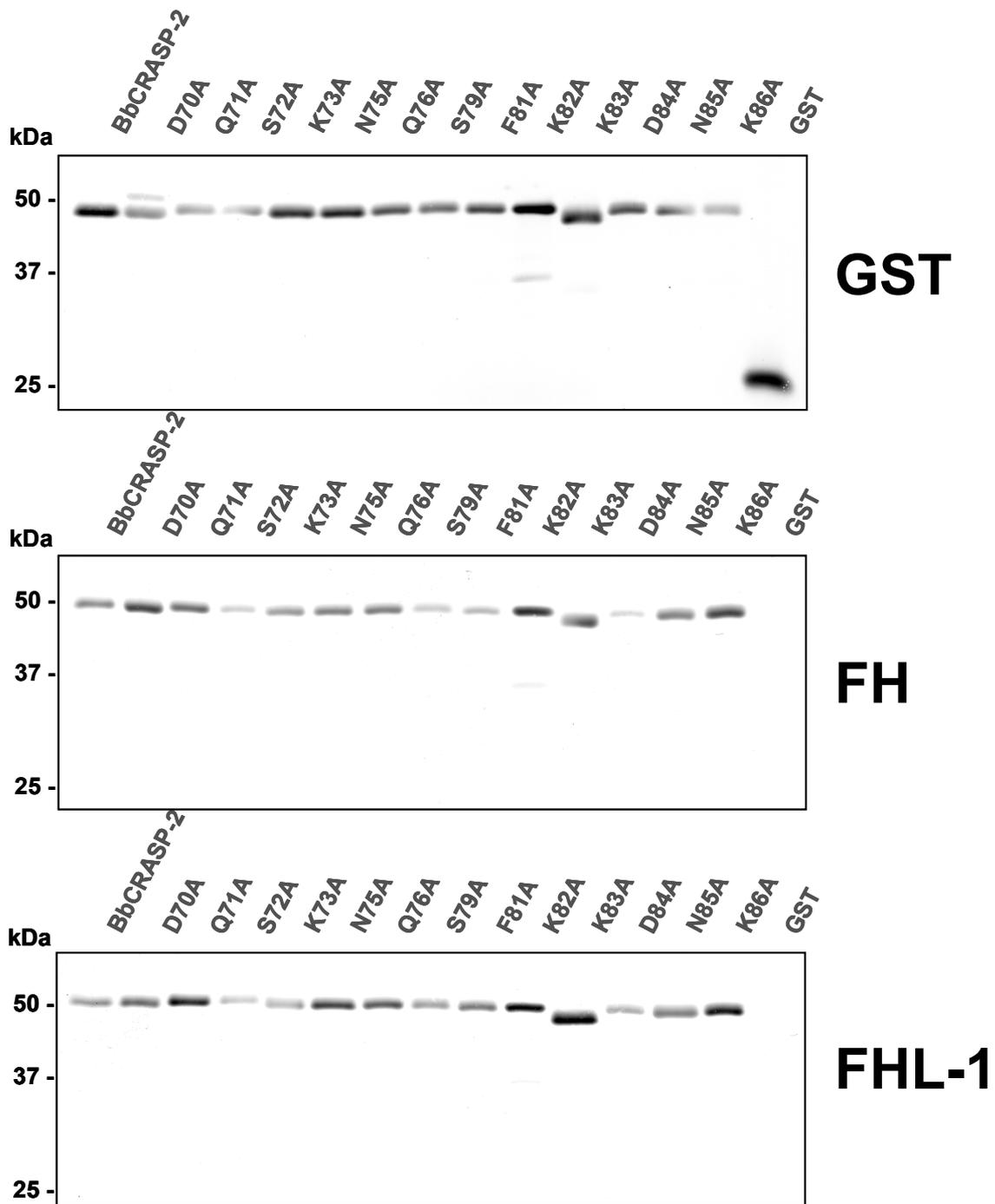


Abb. 3.5: Western- und Ligandenaffinitätsblot-Analyse der Bindungsregion 2 in BbCRASP-2.

Die Identifikation der BbCRASP-2-Mutanten erfolgte durch Verwendung eines mit GST reagierenden Antikörpers (obere Abbildung). Der Nachweis der Bindung an die beiden Komplementregulatoren erfolgte nach Inkubation mit rekombinanten FHL-1 bzw. NHS als Faktor H-Quelle unter Verwendung eines spezifisch reagierenden Antikörpers gegen die Domänen SCR 1-4 von FHL-1 und eines monoklonalen Antikörpers, der spezifisch an die C-terminale SCR-Domäne 20 von Faktor H bindet (VIG8). Der Größenstandard ist links angegeben.

Als Bestätigungstest diente ein ELISA, um die Bindung von Faktor H und FHL-1 an gereinigte Fusionsproteine zu analysieren. Dazu wurden die GST-Fusionsproteine an eine Mikrotiterplatte immobilisiert und die Proben mit gereinigten Komplementregulatoren inkubiert (s. 2.2.2.4.1). Die Bindung von Faktor H und FHL-1 an die betreffenden BbCRASP-2 Mutanten wurde mit einem polyklonalen anti-Faktor H Antikörper nachgewiesen. Die Mutanten BbCRASP-2_{F81A} und BbCRASP-2_{D84A} zeigten eine stark verminderte Bindung gegenüber beiden Komplementregulatoren (Abb. 3.6). Die Substitutionen an Positionen Q71 und N75 führten zu einer abgeschwächten Bindung von FHL-1 und an Position S79 von Faktor H. Für Mutante BbCRASP-2_{S72A} ließ sich im ELISA im Gegensatz zum Ligandenaffinitätsblot weder in Bezug auf Faktor H noch für FHL-1 eine abgeschwächte Bindung feststellen.

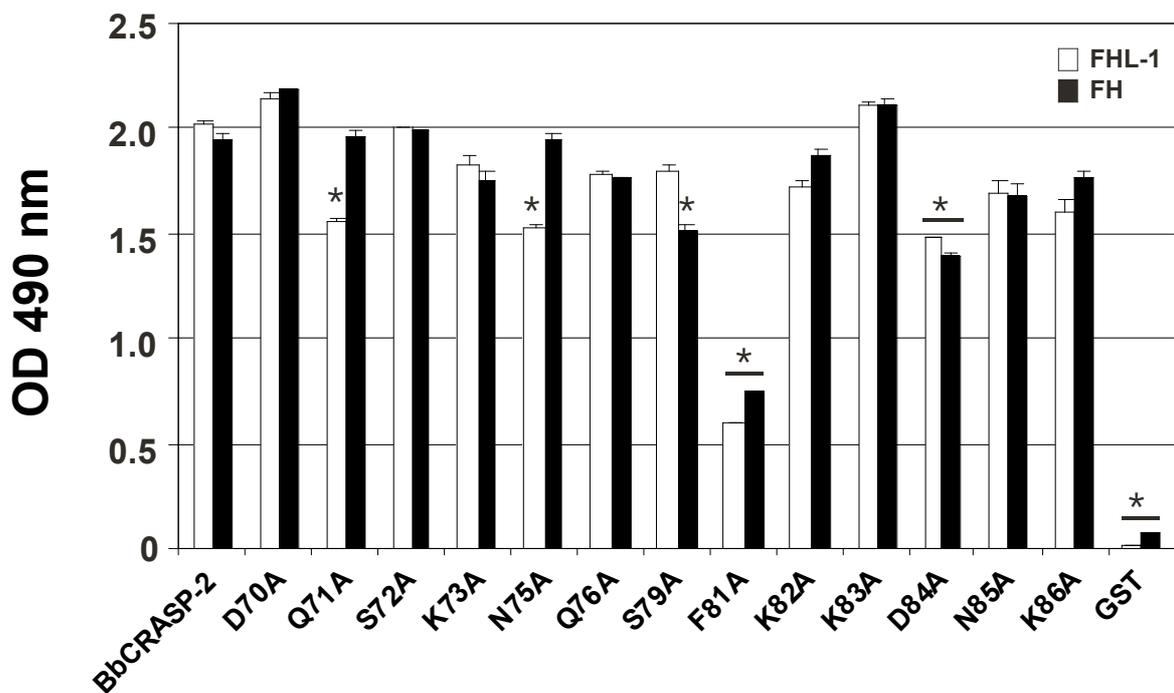


Abb. 3.6: Analyse der Bindung von Faktor H und FHL-1 an BbCRASP-2 Mutanten mittels ELISA (putative Bindungsregion 2). Gereinigte GST-Fusionsproteine (BbCRASP-2 bzw. BbCRASP-2 Mutanten) sowie gereinigtes GST Protein (jeweils 500ng) wurden an eine Mikrotiterplatte immobilisiert und die entsprechenden Proteine separat mit gereinigtem Faktor H oder FHL-1 (jeweils 500ng) inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit einem polyklonalen anti-Faktor H Antikörpers (1:1000) und einem Peroxidase-gekoppelten anti-Ziege Sekundärantikörper (1:5000). Durch Zugabe von OPD als Substrat konnte die Reaktion visualisiert werden. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von insgesamt drei separat durchgeführten Tests. Als Negativkontrolle diente gereinigtes GST-Protein. Parallel wurden Reaktionen mit Puffer statt Faktor H bzw. FHL-1 durchgeführt und die erhaltenen Werte von den Ergebnissen mit Faktor H bzw. FHL-1 subtrahiert. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. p-Werte von $\leq 0,001$ wurden nach erfolgter Einweg-Varianzanalyse und Scheffe-Test als statistisch signifikant angesehen.

3.2.2 Charakterisierung der potenziellen Bindungsregion 3 von BbCRASP-2

Die Bindungsregion 3 umfasst 19 Aminosäuren an Position 127-145 (s. Abb. 3.2). Mittels der Pepsin-Analyse konnte eine Bindung von beiden Komplementregulatoren, FHL-1 und Faktor H, nachgewiesen werden (Hartmann et al., 2006).

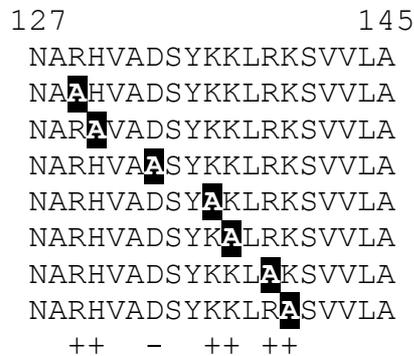


Abb. 3.7: Potenzielle Bindungsregion 3 von BbCRASP-2. Die für die in vitro Mutagenese ausgewählten Aminosäurereste sind markiert sowie die Ladungsverteilung innerhalb dieser Domäne.

Die Bindungsregion 3 ist charakterisiert durch die überwiegende Anzahl an positiv geladenen Aminosäuren (s. Abb. 3.7). An der Position 129 und 139 befinden sich die positiv geladenen Argininreste und an Position 136, 137 und 140 die positiv geladenen Lysinreste. Das ebenfalls positiv geladene Histidin ist an Position 130 lokalisiert. Zwischen den positiv geladenen Aminosäuren befindet sich die negativ geladene Asparaginsäure an Position 133. Sämtliche, in dieser Region lokalisierten geladenen Aminosäuren wurden durch Alanin ausgetauscht. Die vier polaren ungeladenen (Asp127, Ser134, Tyr135, Ser141) und acht unpolare aliphatischen Aminosäuren (Ala128, Val131, Ala132, Leu138, Val142, Val143; Leu144, Ala145) der Bindungsregion 3 wurden nicht in die Mutagenese einbezogen.

3.2.2.1 Analyse des Bindungsverhaltens der in Bindungsregion 3 mutierten BbCRASP-2 Proteine

Wie bereits unter 3.2.1.1 beschrieben, wurden an den ausgewählten Positionen zielgerichtete Mutationen eingeführt, um die geladenen Aminosäurereste durch Alanin auszutauschen. Die nach in vitro Mutagenese erhaltenen Klone wurden auf Korrektheit der Mutation durch Sequenzierung der isolierten Plasmide (beide DNA-Stränge) überprüft und die GST-Fusionsproteine in *E. coli* überexprimiert. Der Einfluss der eingeführten Mutationen auf die Bindung von Faktor H und FHL-1 an wurde, wie bereits unter 3.2.1.1 beschrieben, mittels durch Western- bzw. Ligandenaffinitätsblot-Analyse nachgewiesen (s. Abb. 3.8).

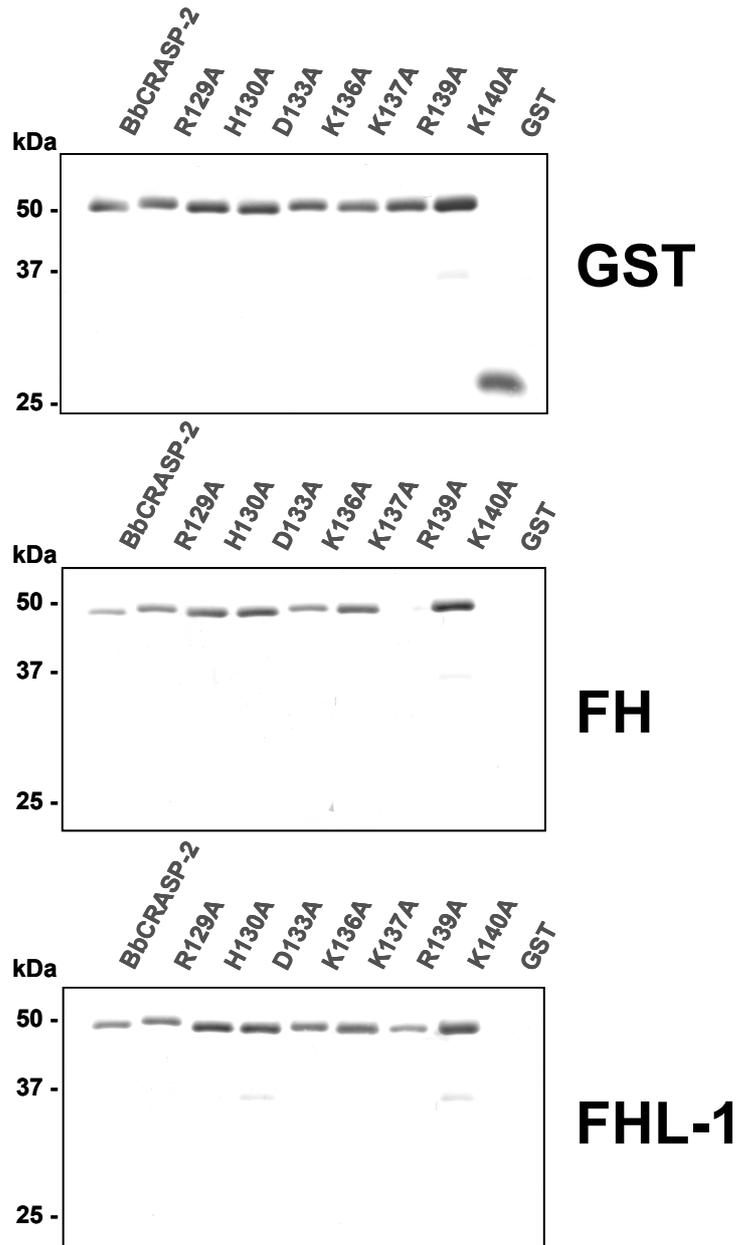


Abb. 3.8: Western- und Ligandenaffinitätsblot-Analyse der Bindungsregion 3 in BbCRASP-2.

Die Identifikation der BbCRASP-2-Mutanten erfolgte durch Verwendung eines mit GST reagierenden Antikörpers (obere Abbildung). Der Nachweis der Bindung an die beiden Komplementregulatoren erfolgte nach Inkubation mit rekombinanten FHL-1 bzw. NHS als Faktor H-Quelle unter Verwendung eines spezifisch reagierenden Antikörpers gegen die Domänen SCR 1-4 von FHL-1 und eines monoklonalen Antikörpers, der spezifisch an die C-terminale SCR-Domäne 20 von Faktor H bindet (VIG8). Der Größenstandard ist links angegeben.

Die Austausch der geladenen Aminosäuren Arg129, His130, Asp133, Lys137 und Lys140 hatten keinen Einfluss auf die Bindung von FHL-1 oder Faktor H (s. Abb. 3.8). Die Mutante BbCRASP-2_{K136A} mit dem Austausch des Lysinrestes an Position 136 zeigt im Ligandenaffinitätsblot jedoch eine etwas abgeschwächte Bindung an Faktor H im Vergleich zur Westernblot-Analyse mit anti-GST. Beim Austausch der positiv geladenen Aminosäure Arginin an Position 139 fällt im Vergleich zur GST-Kontrolle eine deutlich schwächere Bindung an FHL-1 auf, für Faktor H ist keine Bindung nachweisbar.

Im ELISA ließ sich für die Mutanten BbCRASP-2_{R129A} und BbCRASP-2_{R139A} eine signifikant reduzierte Bindung von beiden Komplementregulatoren nachweisen (s. Abb.3.9). Ein leicht abgeschwächtes Signal, das im Ligandenaffinitätsblot nicht feststellbar ist, zeigt die Mutante BbCRASP-2_{H130A}. Eine abgeschwächte Faktor H-Bindung bei BbCRASP-2_{K136A} ließ sich im ELISA nicht beobachten.

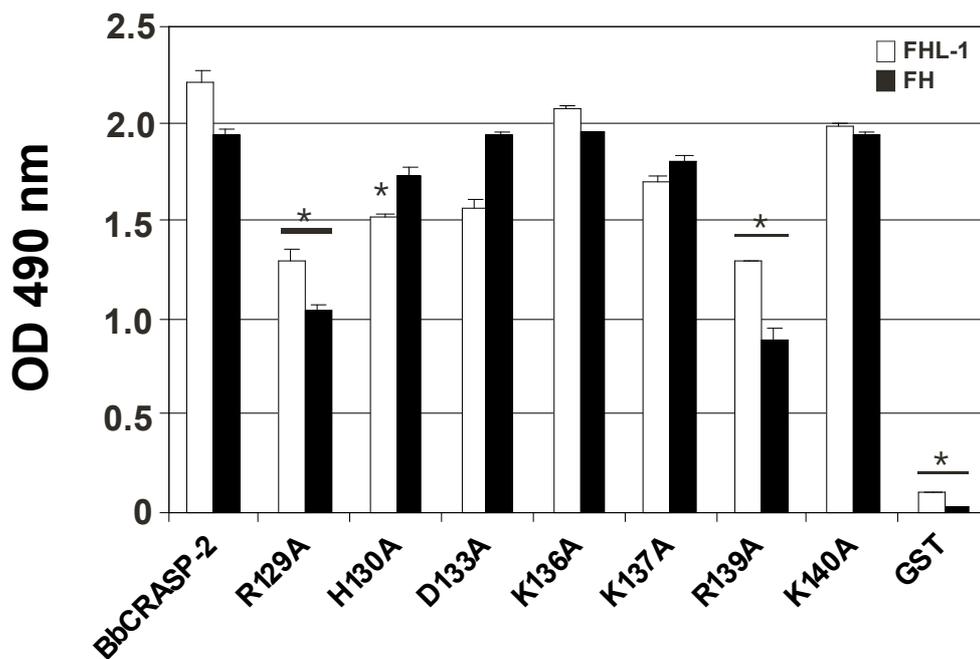


Abb. 3.9: Analyse der Bindung von Faktor H und FHL-1 an BbCRASP-2 Mutanten mittels ELISA (putative Bindungsregion 3). Gereinigte GST-Fusionsproteine (BbCRASP-2 bzw. BbCRASP-2 Mutanten) sowie gereinigtes GST Protein (jeweils 500ng) wurden an eine Mikrotiterplatte immobilisiert und die entsprechenden Proteine separat mit gereinigtem Faktor H oder FHL-1 (jeweils 500ng) inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit einem polyklonalen anti-Faktor H Antikörpers (1:1000) und einem Peroxidase-gekoppelten anti-Ziege Sekundärantikörper (1:5000). Durch Zugabe von OPD als Substrat konnte die Reaktion visualisiert werden. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von insgesamt drei separat durchgeführten Tests. Als Negativkontrolle diente gereinigtes GST-Protein. Parallel wurden Reaktionen mit Puffer statt Faktor H bzw. FHL-1 durchgeführt und die erhaltenen Werte von den Ergebnissen mit Faktor H bzw. FHL-1 subtrahiert. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. p-Werte von $\leq 0,001$ wurden nach erfolgter Einweg-Varianzanalyse und Scheffe-Test als statistisch signifikant angesehen.

3.2.3 Charakterisierung der potenziellen Bindungsregion 4 von BbCRASP-2

Die Bindungsregion 4 umfasst die Aminosäurepositionen 202-226 und wurde in der Pepspot-Analyse als weitere Bindungsdomäne für beide Komplementregulatoren identifiziert (Hartmann et al., 2006). Außerdem konnte anhand von sequentiellen Deletionen am C-Terminus von BbCRASP-2 nachgewiesen werden, dass die letzten 16 Aminosäuren eine wichtige Rolle für die Bindung von Faktor H und FHL-1 spielen.

In dieser Bindungsdomäne wurden sämtliche geladenen Aminosäuren gegen Alanin sowie die drei Aminosäurereste an Position 207, 210 und 211 für die in vitro Mutagenese ausgewählt (Abb. 3.10).

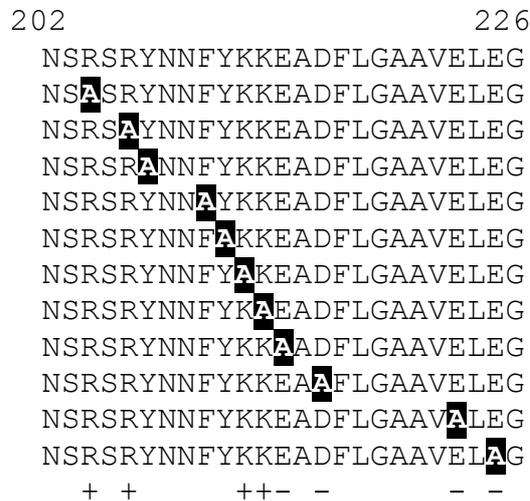


Abb. 3.10: Potenzielle Bindungsregion 4 von BbCRASP-2.

Die für die in vitro Mutagenese ausgewählten Aminosäurereste sind markiert sowie die Ladungsverteilung innerhalb dieser Domäne.

Bindungsregion 4 enthält drei negativ geladene Glutaminsäurereste an den Positionen 214, 223 und 225 sowie die negativ geladene Aminosäure Asparaginsäure an Position 216. Darüber hinaus befinden sich an Positionen 204 und 206 zwei positiv geladene Argininreste und zwei benachbarte, positiv geladene Lysinreste an Position 212 und 213. Die beiden polaren Tyrosine an Position 207 und Y211 als auch die unpolare aliphatische Aminosäure Phenylalanin an Position 210 wurden wegen ihrer aromatischen Seitenketten für die Mutagenese ausgewählt um zu demonstrieren, ob sich der Austausch zu einer räumlich, weniger Platz beanspruchenden Aminosäure auf die Konformation des BbCRASP-2 Proteins und so auf die Bindung der beiden Komplementregulatoren auswirkt.

3.2.3.1 Analyse des Bindungsverhaltens der in Bindungsregion 4 mutierten BbCRASP-2-Proteine

Wie unter 3.2.1.1 beschrieben, wurden an den ausgewählten Positionen zielgerichtete Mutationen eingeführt, um die geladenen Aminosäurereste durch Alanin auszutauschen. Die nach in vitro Mutagenese erhaltenen Klone wurden auf Korrektheit der Mutation durch Sequenzierung der isolierten Plasmide (beide DNA-Stränge) überprüft und die GST-Fusionsproteine in *E. coli* überexprimiert. Der Einfluss der eingeführten Mutationen auf die Bindung von Faktor H und FHL-1 an die mutierten Proteine wurde durch eine Western- bzw. Ligandenaffinitätsblot-Analyse nachgewiesen.

In Abbildung 3.11 ist deutlich zu erkennen, dass die Austausch der positiv und negativ geladenen Aminosäuren Arg204, Arg206, Lys212, Lys213, Glu214, Asp216, Glu223 und Glu225 keinen Einfluss auf die Bindung von Faktor H und FHL-1 hatten. Auch der Austausch des neutralen, unpolaren Phenylalanins an Position 210 wirkte sich nicht auf die Bindung an Faktor H und FHL-1 aus. Auffällig zeigten sich die Mutanten BbCRASP-1_{Y207A} und BbCRASP-2_{Y211A}, bei denen die Tyrosinreste durch Alanin ausgetauscht wurden. Der Austausch von Tyr207 gegen Alanin führte zu einem deutlich reduzierten Bindungsverhalten gegenüber FHL-1 und einer sehr schwachen Bindung von Faktor H. Bei Mutante BbCRASP-2_{Y211A} ließ sich keine Bindung von Faktor H nachweisen, die Bindung von FHL-1 war kaum nachweisbar.

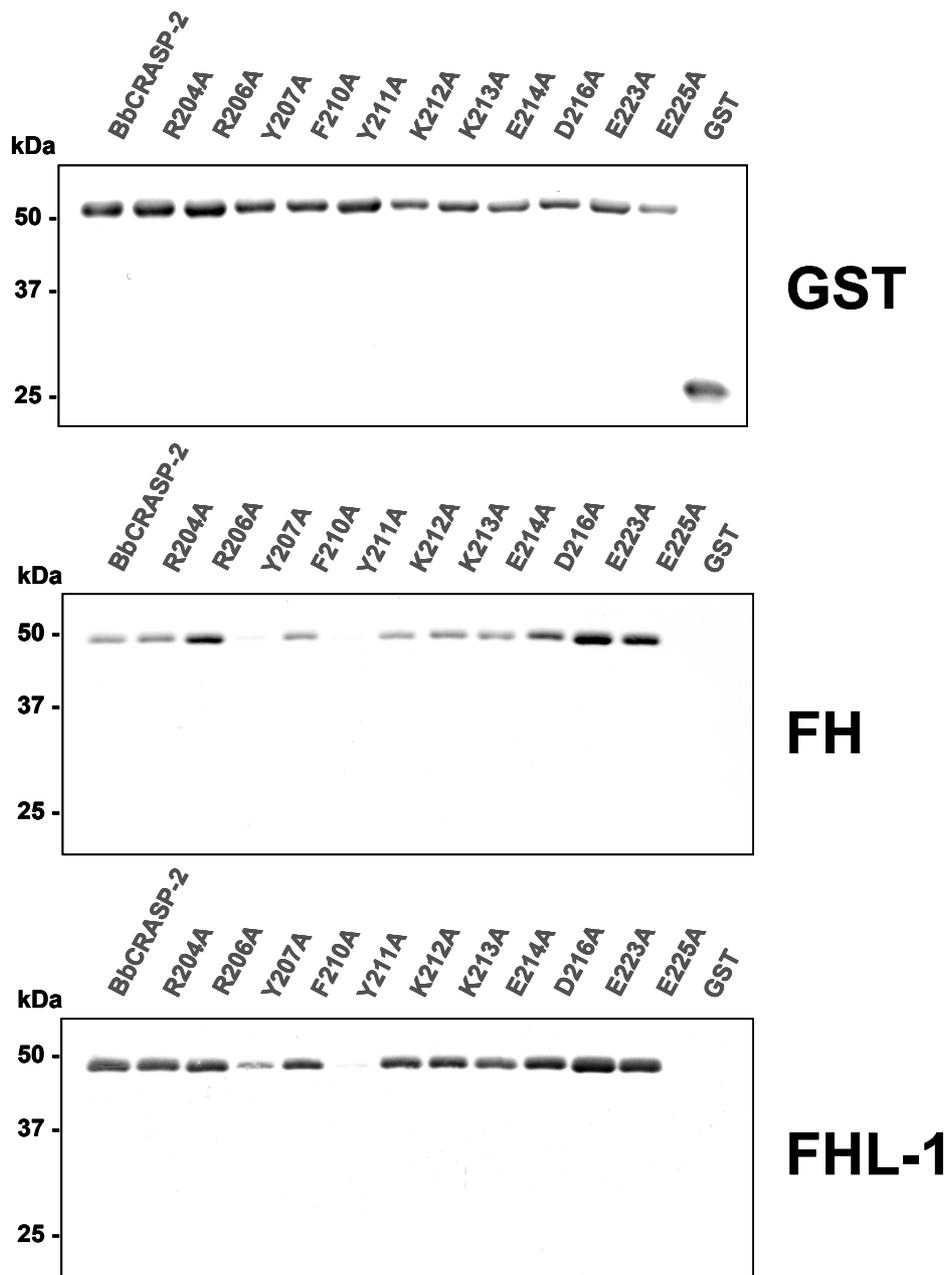


Abb. 3.11: Westernblot- und Ligandenaffinitätsblot-Analyse der Region 4 in BbCRASP-2. Die Identifikation der BbCRASP-2-Mutanten erfolgte durch Verwendung eines mit GST reagierenden Antikörpers (obere Abbildung). Der Nachweis der Bindung an die beiden Komplementregulatoren erfolgte nach Inkubation mit rekombinanten FHL-1 bzw. NHS als Faktor H-Quelle unter Verwendung eines spezifisch reagierenden Antikörpers gegen die Domänen SCR 1-4 von FHL-1 und eines monoklonalen Antikörpers, der spezifisch an die C-terminale SCR-Domäne 20 von Faktor H bindet (VIG8). Der Größenstandard ist links angegeben.

Abb. 3.12 fasst die Ergebnisse der durchgeführten Bindungsstudien mittels ELISA zusammen. Die Mutanten BbCRASP-2_{Y207A} und BbCRASP-2_{Y211A} zeigten, wie bereits im Ligandenaffinitätsblot nachgewiesen, eine stark verminderte bzw. keine Bindung gegenüber Faktor H und FHL-1. Zudem ließ sich im ELISA eine abgeschwächte Bindung von beiden Komplementregulatoren an die Mutanten BbCRASP-2_{R204A}, BbCRASP-2_{R206A}, BbCRASP-2_{F210A} und BbCRASP-2_{E214A} feststellen.

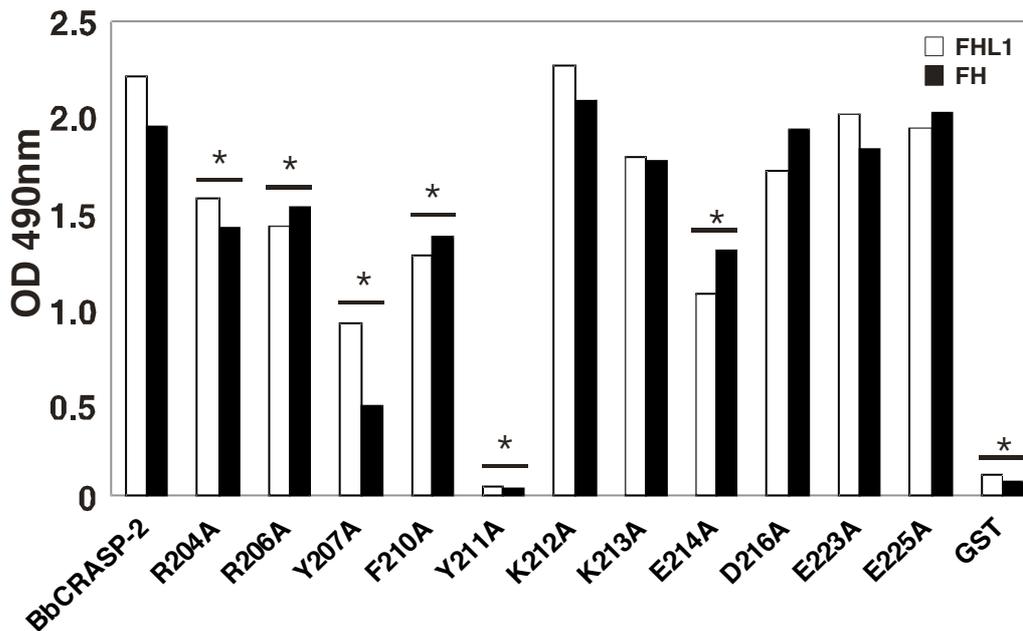


Abb. 3.12: Analyse der Bindung von Faktor H und FHL-1 an BbCRASP-2 Mutanten mittels ELISA (putative Bindungsregion 4). Gereinigte GST-Fusionsproteine (BbCRASP-2 bzw. BbCRASP-2 Mutanten) sowie gereinigtes GST Protein (jeweils 500ng) wurden an eine Mikrotiterplatte immobilisiert und die entsprechenden Proteine separat mit gereinigtem Faktor H oder FHL-1 (jeweils 500ng) inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit einem polyklonalen anti-Faktor H Antikörpers (1:1000) und einem Peroxidase-gekoppelten anti-Ziege Sekundärantikörper (1:5000). Durch Zugabe von OPD als Substrat konnte die Reaktion visualisiert werden. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von insgesamt drei separat durchgeführten Tests. Als Negativkontrolle diente gereinigtes GST-Protein. Parallel wurden Reaktionen mit Puffer statt Faktor H bzw. FHL-1 durchgeführt und die erhaltenen Werte von den Ergebnissen mit Faktor H bzw. FHL-1 subtrahiert. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. p-Werte von $\leq 0,001$ wurden nach erfolgter Einweg-Varianzanalyse und Scheffe-Test als statistisch signifikant angesehen.

3.2.4 Charakterisierung der potenziellen coiled-coil-Region innerhalb von BbCRASP-2

Die Region, in der aufgrund von Computeranalysen eine aus zwei alpha-Helices bestehende coiled-coil Struktur postuliert wird (Rogers und Marconi, 2007), umfasst die Aminosäuren 89-102 (s. Abb. 3.13). Es konnte für verschiedene Proteine, wie z.B. Hämagglutinin des Influenza-Virus oder das M-Protein von *Staphylococcus aureus* nachgewiesen werden, dass sich ein Bündel von α -Helices zu einer coiled-coil Struktur bzw. Superhelix formieren können. Solche coiled coil-Strukturen sind in der Lage mit anderen Proteinen zu interagieren (Lupas 1996).

Damit stellt sich die Frage, ob diese Region ebenfalls eine Rolle für die Interaktion zwischen BbCRASP-2 und den beiden Komplementregulatoren spielt, die nicht mittels Pepspot-Analyse identifiziert werden konnte.

```

89                               102
NKFKELEKIIEEYK
NKAKELEKIIEEYK
NKFKEAEKIIEEYK
NKFKELEKIAEEYK
NKFKELEKIIEEAK

```

Abb. 3.13: Potenzielle coiled-coil-Region innerhalb des BbCRASP-2-Proteins. Die für die in vitro Mutagenese ausgewählten Aminosäurereste sind hervorgehoben.

Entscheidend für die Auswahl der auszutauschenden Aminosäuren waren die Positionen, die innerhalb des hydrophoben Zentrums einer coiled coil die Positionen „a“ und „d“ einnehmen und die für die Faltung und Stabilität der Superhelix verantwortlich sind (Kwok und Hodges, 2004). Die Aminosäuren an diesen stabilisierenden „Kontaktstellen“ wurden gezielt für die Mutagenese ausgewählt. Hierzu zählten die drei neutralen, unpolaren Aminosäuren Phenylalanin an Position 91, Leucin an Position 94 und Isoleucin an Position 98. An Position 101 wurde die polare ungeladene Aminosäure Tyrosin durch Alanin ersetzt.

3.2.4.1 Analyse des Bindungsverhaltens der in der coiled-coil-Region mutierten BbCRASP-2-Proteine

Wie in Abbildung 3.14 zu erkennen, konnten beim Aminosäureaustausch an den Positionen Leu94, Ile98 und Tyr101 keine wesentlichen Veränderungen in der Bindung von Faktor H und FHL-1 bei den mutierten Proteine im Ligandenaffinitätsblot beobachtet werden. Lediglich der Austausch der Aminosäure Phenylalanin an Position 91 führt bei Vergleich zur GST-Kontrolle zu einer leicht abgeschwächten Bindung von Faktor H und FHL-1.

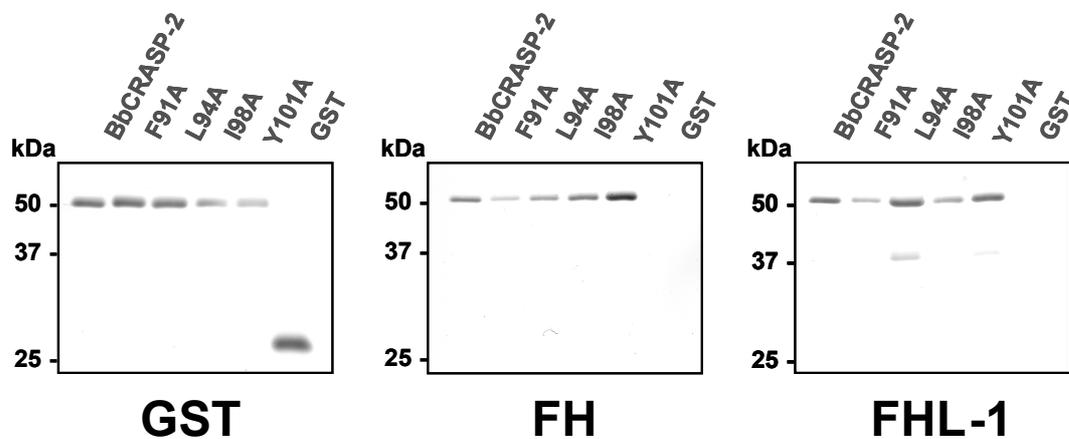


Abb. 3.14: Westernblot- und Ligandenaffinitätsblot-Analyse der putativen coiled-coil-Region in BbCRASP-2. Die Identifikation der BbCRASP-2-Mutanten erfolgte durch Verwendung eines mit GST reagierenden Antikörpers (obere Abbildung). Der Nachweis der Bindung an die beiden Komplementregulatoren erfolgte nach Inkubation mit rekombinanten FHL-1 bzw. NHS als Faktor H-Quelle unter Verwendung eines spezifisch reagierenden Antikörpers gegen die Domänen SCR 1-4 von FHL-1 und eines monoklonalen Antikörpers, der spezifisch an die C-terminale SCR-Domäne 20 von Faktor H bindet (VIG8). Der Größenstandard ist links angegeben.

In Abb. 3.15 ist zu erkennen, dass der Austausch der Aminosäure F91 zu einer besonders starken Abnahme der Bindung im ELISA führt. Eine deutliche Abschwächung der Bindung von FHL-1 und Faktor H ließ sich auch bei den anderen Mutanten BbCRASP-2_{L94A}, BbCRASP-2_{I98A} und BbCRASP-2_{Y101A} feststellen.

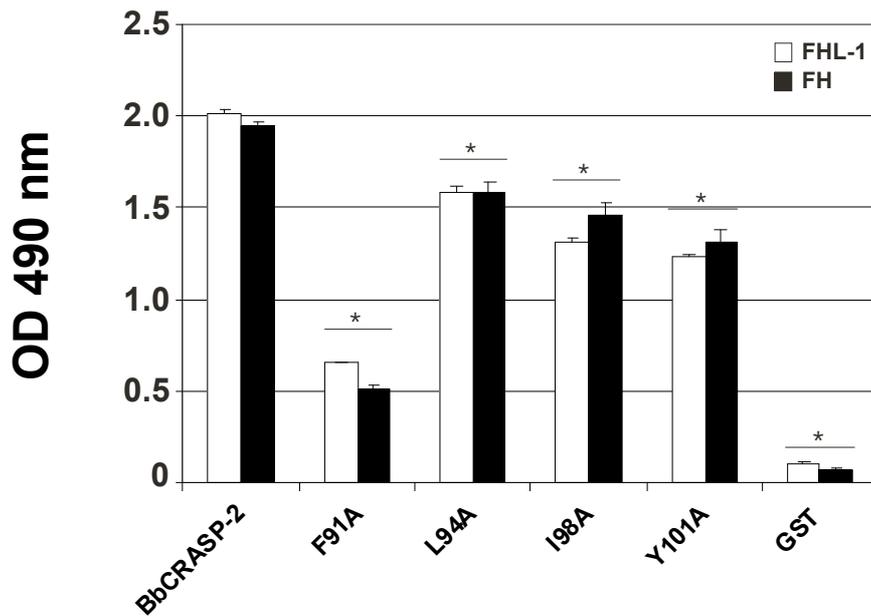


Abb. 3.15: Nachweis der Bindung von Faktor H und FHL-1 an BbCRASP-2 Mutanten mittels ELISA (putative coiled-coil-Region). Gereinigte GST-Fusionsproteine (BbCRASP-2 bzw. BbCRASP-2 Mutanten) sowie gereinigtes GST Protein (jeweils 500ng) wurden an eine Mikrotiterplatte immobilisiert und die entsprechenden Proteine separat mit gereinigtem Faktor H oder FHL-1 (jeweils 500ng) inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit einem polyklonalen anti-Faktor H Antikörpers (1:1000) und einem Peroxidase-gekoppelten anti-Ziege Sekundärantikörper (1:5000). Durch Zugabe von OPD als Substrat konnte die Reaktion visualisiert werden. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von insgesamt drei separat durchgeführten Tests. Als Negativkontrolle diente gereinigtes GST-Protein. Parallel wurden Reaktionen mit Puffer statt Faktor H bzw. FHL-1 durchgeführt und die erhaltenen Werte von den Ergebnissen mit Faktor H bzw. FHL-1 subtrahiert. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. p-Werte von $\leq 0,001$ wurden nach erfolgter Einweg-Varianzanalyse und Scheffe-Test als statistisch signifikant angesehen.

Die mittels Ligandenaffinitätsblot-Analyse und ELISA erhaltenen Ergebnisse für die Bindung von Faktor H und FHL-1 an die mutierten BbCRASP-2 Proteine sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Proteine	Lokalisation der Aminosäuresubstitutionen	Bindung von			
		FHL-1		Faktor H	
		LAB	ELISA	LAB	ELISA
Bindungsregion 2 (aa 70-88)					
BbCRASP-2	DQSKVNQAI SIFKKDNKIV	+++	+++	++	++
BbCRASP-2 _{D70A}	A QSKVNQAI SIFKKDNKIV	+++	+++	++	++
BbCRASP-2 _{Q71A}	D A SKVNQAI SIFKKDNKIV	+++	++	++	++
BbCRASP-2 _{S72A}	DQ A KVNQAI SIFKKDNKIV	++	+++	+	++
BbCRASP-2 _{K73A}	DQSA V NQAI SIFKKDNKIV	+++	+++	++	+
BbCRASP-2 _{N75A}	DQSAV A QAI SIFKKDNKIV	+++	++	++	++
BbCRASP-2 _{Q76S}	DQSKVN A AISIFKKDNKIV	+++	+++	++	++
BbCRASP-2 _{S79A}	DQSKVNQAI I AIFKKDNKIV	+++	+++	++	+
BbCRASP-2 _{F81A}	DQSKVNQAI S I AKKDNKIV	+++	+	++	+/-
BbCRASP-2 _{K82A}	DQSKVNQAI SIF A KDNKIV	+++	+++	++	++
BbCRASP-2 _{K83A}	DQSKVNQAI SIFK A DNKIV	+++	+++	++	++
BbCRASP-2 _{D84A}	DQSKVNQAI SIFKK A NKIV	++	++	+	+/-
BbCRASP-2 _{N85A}	DQSKVNQAI SIFKKD A KIV	+++	+++	++	+
BbCRASP-2 _{K86A}	DQSKVNQAI SIFKKDN A IV	+++	+++	++	++
Bindungsregion 3 (aa 127-145)					
BbCRASP-2	NARHVADSYKCLRKSVVLA	+++	+++	++	++
BbCRASP-2 _{R129A}	N A ARHVADSYKCLRKSVVLA	+++	++	++	+
BbCRASP-2 _{H130A}	NAR A VADSYKCLRKSVVLA	+++	++	++	++
BbCRASP-2 _{D133A}	NARHV A ASVYKCLRKSVVLA	+++	+++	++	++
BbCRASP-2 _{K136A}	NARHVADSY A KLRKSVVLA	+++	+++	+	++
BbCRASP-2 _{K137A}	NARHVADSYK A LKLRKSVVLA	+++	+++	++	++
BbCRASP-2 _{R139A}	NARHVADSYKCLR A KSVVLA	+/-	+	-	+
BbCRASP-2 _{K140A}	NARHVADSYKCLR A SVVLA	+++	+++	++	++
Bindungsregion 4 (aa 202-226)					
BbCRASP-2	NSRSRYNNFYKKEADFLGAAVELEG	+++	+++	++	++
BbCRASP-2 _{R204A}	NS A RSRYNNFYKKEADFLGAAVELEG	+++	++	++	+
BbCRASP-2 _{R206A}	NSRS A YNNFYKKEADFLGAAVELEG	+++	++	++	+
BbCRASP-2 _{Y207A}	NSRSR A NNFYKKEADFLGAAVELEG	+/-	+	+	+/-
BbCRASP-2 _{F210A}	NSRSRYNN A KYKKEADFLGAAVELEG	+++	++	++	+
BbCRASP-2 _{Y211A}	NSRSRYNN F AKKEADFLGAAVELEG	+/-	-	+/-	-
BbCRASP-2 _{K212A}	NSRSRYNNFY A KEADFLGAAVELEG	+++	+++	++	++
BbCRASP-2 _{K213A}	NSRSRYNNFYK A EADFLGAAVELEG	+++	+++	++	++
BbCRASP-2 _{E214A}	NSRSRYNNFYK K AADFLGAAVELEG	+++	++	++	+
BbCRASP-2 _{D216A}	NSRSRYNNFYKKE A FLGAAVELEG	+++	+++	++	++
BbCRASP-2 _{E223A}	NSRSRYNNFYKKEADFLGAAV A LEG	+++	+++	++	++
BbCRASP-2 _{E225A}	NSRSRYNNFYKKEADFLGAAVEL A G	+++	+++	++	++
coiled coil-Region (aa 89-102)					
BbCRASP-2	NKFKELEKIIIEEYK	+++	+++	++	++
BbCRASP-2 _{F91A}	N K AKELEKIIIEEYK	+	+	+	+
BbCRASP-2 _{L94A}	NKFKE A EKIIIEEYK	+++	++	+	+
BbCRASP-2 _{I98A}	NKFKELEK I AEEYK	+++	++	++	+
BbCRASP-2 _{Y101A}	NKFKELEKIIIE E AK	+++	++	++	+

Tabelle 3.1: Zusammenfassung der Bindungsintensitäten aller mutierten BbCRASP-2 Proteine.

Die Positionen der Alaninsubstitutionen sind hervorgehoben. Der Effekt auf die Bindung von Faktor H/FHL-1 an BbCRASP-2 wurde für die FHL-1-Bindung wie folgt bewertet: (+++) sehr starke Bindungsintensität; (++) leicht abgeschwächte Bindungsintensität; (+) schwache Bindungsintensität; (+/-) sehr schwache Bindungsintensität; (-) keine Bindung. Für die Faktor H-Bindung wurden folgende Kriterien angewendet: (++) sehr starke Bindungsintensität; (+) schwache Bindungsintensität; (+/-) sehr schwache Bindungsintensität; (-), keine Bindung.

4. Diskussion

4.1 Charakteristika des BbCRASP-2-Proteins

Die Ergebnisse vorausgegangener Arbeiten weisen darauf hin, dass das BbCRASP-2 Protein von *B. burgdorferi* s.s. durch seine Interaktion mit den beiden Regulatoren Faktor H und FHL-1 des alternativen Komplementweges wesentlich zur Serumresistenz beiträgt und deshalb auch für den Immunescape eine ganz wesentliche Rolle spielt (Hartmann et al., 2006). Untersuchungen zur Regulation der Expression verschiedener Borrelienproteine unterstreichen die besondere Rolle von BbCRASP-2 während des Zecke-Wirt-Infektionszyklus, da dieses Protein während der Übertragung von Borrelien aus der Zecke auf in die Maus auf der Oberfläche der Borrelien nachzuweisen ist (Bykowski et al., 2007). Außerdem unterscheidet sich das BbCRASP-2-Protein von den anderen vier bereits identifizierten CRASP-Proteinen durch Besonderheiten bezüglich der genetischen Herkunft und Konservierung, der Expression unter bestimmten Umweltbedingungen und der Bindungseigenschaften mit den Regulatorproteinen Faktor H und FHL-1. Aufgrund dieser Charakteristika rückt BbCRASP-2 in den Fokus weiterer Studien.

4.1.1 Molekulargenetische und proteinspezifische Merkmale von BbCRASP-2

Während das BbCRASP-1 kodierende *cspA* Gen zusammen mit 13 weiteren Genen der paralogen Genfamilie gbb54 zugerechnet wird (Fraser et al., 1997; Kraiczy et al., 2004) und BbCRASP 3, -4 und -5 mit insgesamt 17 paralogen Genen der gbb162-Genfamilie zugeordnet werden (Casjens et al., 2000), lässt sich BbCRASP-2 als einziges CRASP-Protein keiner bekannten Genfamilie zuordnen (Hartmann et al., 2006). Während das BbCRASP-2 kodierende *cspZ*-Gen und das BbCRASP-1 kodierende *cspA*-Gen auf linearen Plasmiden lokalisiert sind (lp28-3 bzw. lp54) lassen sich BbCRASP-3 (*erpP*) und BbCRASP-4 (*erpC*) auf den zirkulären Plasmiden cp32-9 und cp32-2 finden. BbCRASP-5 wird von drei identischen Genen kodiert, nämlich *erpA*, *erpI* und *erpN*, die auf den drei zirkulären Plasmiden cp32-1, cp32-5 und cp32-8 lokalisiert sind (s. Abb. 4.1).

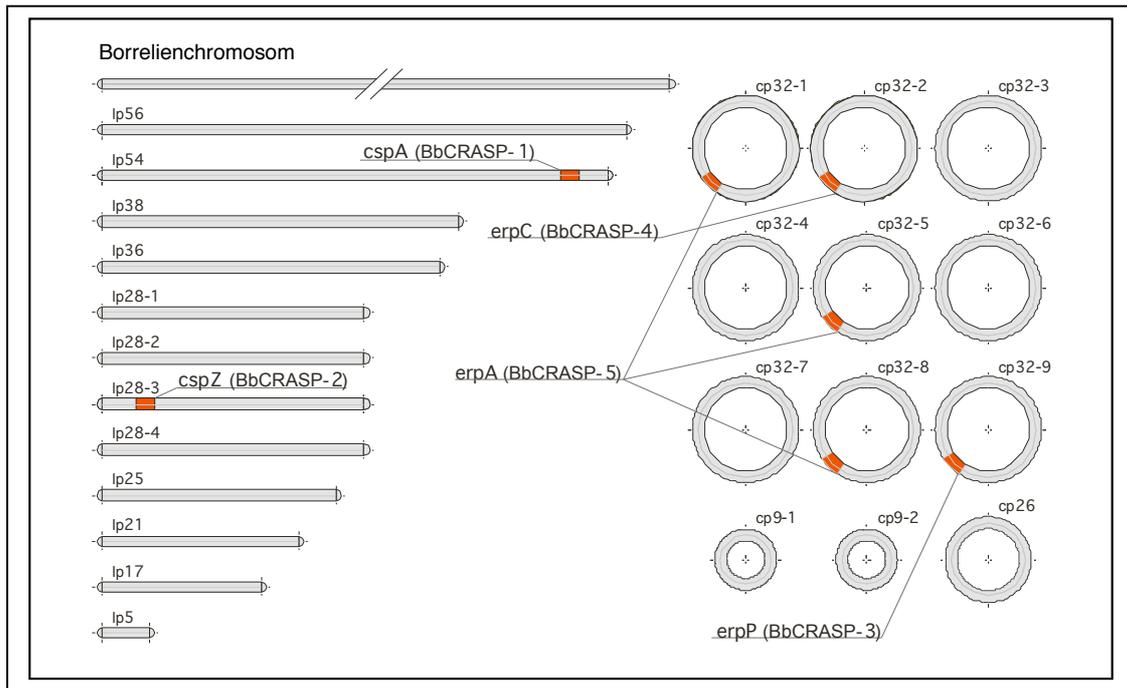


Abb. 4.1 : Lokalisation der CRASP kodierenden Gene von *B. burgdorferi* s.s. B31.

Auf dem linearen Plasmid lp28-3 stellt das *cspZ*-Gen bisher das einzige Gen dar, dessen Funktion bekannt ist. Ein Aminosäuresequenzvergleich von BbCRASP-2 aus Borrelien verschiedener geographischer Herkunft und Genospezies zeigt deutlich, dass dieses CRASP-Protein sehr hoch konserviert ist (Rogers und Marconi, 2007, Kraiczy et al., 2008b) (Abb.4.2). Die BbCRASP-2 Sequenzen innerhalb der gleichen Genospezies zeigten die prozentual höchsten Homologien auf: $\geq 97,2\%$ bei *B. burgdorferi*; $\geq 90,4\%$ bei *B. garinii* und $\geq 90,8\%$ bei *B. afzelii* (Rogers und Marconi, 2007). Unter verschiedenen Spezies von *Borrelia burgdorferi* s.l. lassen sich Unterschiede von 81,9 bis 96,6% für *B. garinii* und 90,8% für *B. afzelii* feststellen, was im Vergleich zu anderen Borrelienproteinen auf eine hohe Konservierung dieses Gens schließen lässt. Ein speziesspezifischer Polymorphismus zwischen den einzelnen BbCRASP-2 Sequenzen zeigt sich am N-Terminus des Proteins: Die BbCRASP-2 orthologen Proteine von *B. garinii*, *B. afzelii* und *B. spielmanii* besitzen eine zusätzliche Sequenz von 42 Aminosäuren am N-Terminus, die bei allen BbCRASP-2 Sequenzen von *B. burgdorferi*-Isolaten fehlt (Rogers und Marconi, 2007; Kraiczy et al., 2008b).

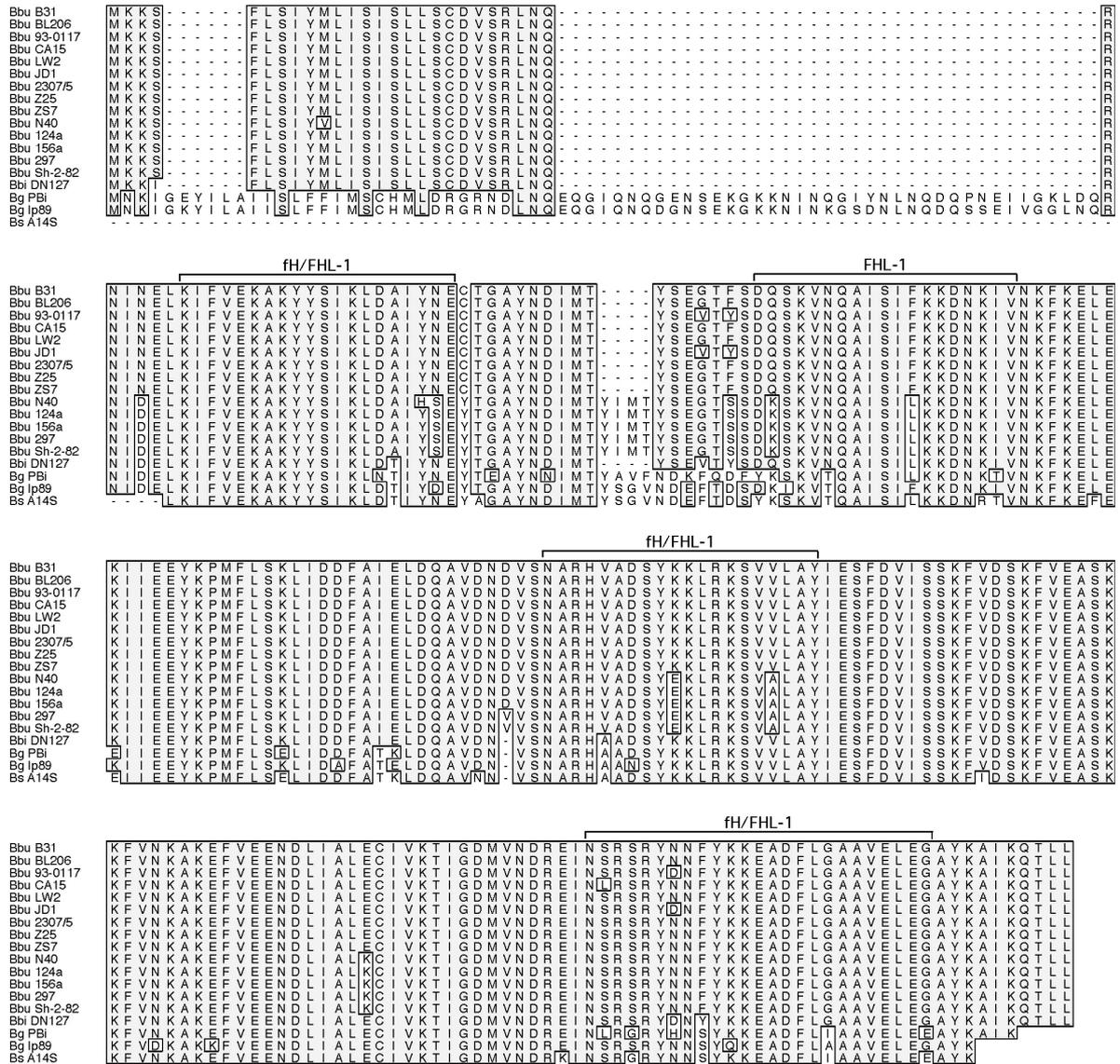


Abb. 4.2 : Vergleich der Aminosäuresequenz von BbCRASP-2-Proteinen verschiedener Borrelienisolate. Von oben nach unten sind die BbCRASP-2 Sequenzen verschiedene Isolate der Genospezies *Borrelia burgdorferi* (Bbu), *Borrelia bissettii* (Bbi), *Borrelia garinii* (Bg), und *Borrelia spielmanii* (Bs) aufgeführt. Bereiche mit identischen Aminosäuren sind grau hinterlegt. Die putativen Faktor H- und FHL-1-Bindungsregionen sind ebenfalls gekennzeichnet (entnommen aus Kraiczy et al., 2008b).

Die Analyse des BbCRASP-2 Expressionsmusters während des Infektionszyklus von der Zecke zum Säugetierwirt und vice versa lieferte weitere Anhaltspunkte für die Bedeutung von BbCRASP-2 in Bezug auf den zugrundeliegenden Immunevasionsmechanismus. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass BbCRASP-2 in vivo vor allem während der Infektion des Wirtes mit Borrelien exprimiert wird (Bykowski et al., 2007). In dieser Studie wurde auch festgestellt, dass die Expression von BbCRASP-2 in vivo um das Zwanzigfache der in vitro

Expression ansteigt. Die Transkription des *cspZ*-Gens in vitro scheint von Temperatur und pH-Wert beeinflusst zu werden. Bei einem pH-Wert von 8,0 und einer Kultivierungstemperatur von 23°C bzw. 34°C wurde eine signifikante Zunahme der mRNA detektiert im Vergleich zu pH 7,0 bei denselben Temperaturen. Eine Veränderung der Kultivierungstemperatur von 23°C auf 34°C führte zu einer Erniedrigung der Expression von BbCRASP-2, was jedoch nur mittels der sehr sensitiven quantitativen RT-PCR Methode nachgewiesen werden konnte (Bykowski et al., 2007).

Ein weiteres Indiz für die Expression von BbCRASP-2 nach Infektion des Wirtes ist die serologische Analyse von Seren natürlich infizierter Mäuse sowie von Seren von Patienten in allen Stadien der Lyme-Borreliose (Hartmann et al., 2006; Kraiczy et al., 2008a, 2008b). Sowohl in den Mäusen als auch bei den Patientenseren ließen sich BbCRASP-2-spezifische Antikörper nachweisen.

4.1.2 Proteinbiochemische Merkmale von BbCRASP-2 im Vergleich mit BbCRASP-1

BbCRASP-2 ist ebenso wie BbCRASP-1 in der Lage, beide Komplementregulatoren zu binden. Wie schon für BbCRASP-1 nachgewiesen (Kraiczy et al., 2004) besitzt BbCRASP-2 eine stärkere Bindungskapazität zu FHL-1 als zu Faktor H (s. Abb. 3.1) (Kraiczy et al., 2001; Hartmann et al., 2006). Durch Bindungsanalysen mit Deletionsmutanten von FHL-1 und Faktor H wurden die mit BbCRASP-1 und BbCRASP-2 interagierenden Domänen lokalisiert und als teilweise identisch identifiziert (Kraiczy et al., 2001). Demzufolge bindet BbCRASP-1 an die SCR-Domänen 5 bis 7 und BbCRASP-2 interagiert über die SCR-Domänen 6 und 7 mit beiden Komplementregulatoren. Während Faktor H zusätzlich auch über die C-terminale Domäne SCR19 und 20 an BbCRASP-1 bindet, konnte für BbCRASP-2 keine Bindung an den C-Terminus von Faktor H nachgewiesen werden (Hartmann et al., 2006). Computerbasierte Strukturanalysen der Aminosäuresequenz lassen jedoch annehmen, dass sich BbCRASP-1 und BbCRASP-2 in ihrer Tertiärstruktur voneinander unterscheiden.

Ähnlich wie für BbCRASP-1 wurde auch für BbCRASP-2 gezeigt, dass der C-Terminus für die Bindung der Regulatorproteine entscheidend ist. So ließ sich nach Deletieren von 16 Aminosäuren am C-Terminus von BbCRASP-2 die Bindung von Faktor H oder FHL-1 völlig unterbinden (Hartmann et al., 2006). Weiterführende Analysen konnten zeigen, dass die ersten 40 N-terminalen Aminosäuren des BbCRASP-2-Proteins ebenfalls eine Bedeutung für die Bindung der beiden Komplementregulatoren haben (Rogers und Marconi, 2007). Darüber hinaus weisen die identifizierten vier potenziellen Bindungsregionen 1-4 innerhalb von BbCRASP-2 auf eine diskontinuierliche Bindungsstelle hin (Hartmann et al., 2006)(s. Abb.

1.7). Es kann angenommen werden, dass sich die Bindungsregion, ähnlich wie bei BbCRASP-1, erst durch korrekte Faltung des BbCRASP-2-Proteins *in vivo* konstituiert.

In diesem Zusammenhang wurde auch die Möglichkeit von coiled-coil Strukturen bei der Formation eines molekularen Bindungszentrum in Anlehnung an das Faktor H/FHL-1 bindende BbCRASP-1 Protein von *B. burgdorferi* diskutiert (McDowell et al., 2005; Rogers und Marconi, 2007). Eine coiled-coil oder Superhelix besteht aus zwei bis fünf ineinander verdrehten alpha-Helices. Die Architektur einer coiled-coil wird stabilisiert, indem hydrophobe Aminosäurereste in die Zwischenräume der einzelnen Helices zu liegen kommen, die von den Aminosäureresten der gegenüberliegenden alpha-Helix gebildet werden (Lupas, 1996). Bereits der Austausch der an Positionen „a“ und „d“ lokalisierten Aminosäuren gegen ein neutrales Alanin kann zur Destabilisierung der coiled-coil Struktur führen (Kwok und Hodges, 2004). Innerhalb von BbCRASP-2 wurden durch Computeranalysen zwei Regionen identifiziert, die eine solche Superhelix ausbilden könnten (Rogers und Marconi, 2007). Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls eine potentielle coiled-coil Region im Bereich von Aminosäure 89-102 gezielt durch Substitutionen mit Alanin an den „a“ und „d“ Positionen verändert, um einen Einfluss auf die Konformation von BbCRASP-2 bzw. die Bindung von Faktor H oder FHL-1 nachzuweisen. Für BbCRASP-1 kann eine Beteiligung von coiled-coil Strukturen an der Interaktion von Faktor H und FHL-1 und BbCRASP-1 aufgrund der dreidimensionalen Kristallstruktur jedoch ausgeschlossen werden (Cordes et al., 2005, 2006; Kraiczy et al., 2009).

Der Fokus der vorliegenden Arbeit richtete sich auf die putativen Bindungsregionen 2, 3 und 4 des BbCRASP-2 Proteins von *B. burgdorferi*. Die Bindungsregion 1 (aa 34 - 52) wurde nicht in die Untersuchungen mit eingeschlossen, da angenommen wurde, dass diese am N-Terminus lokalisierte Region *in vivo* räumlich schwer von beiden Komplementregulatoren zugänglich sein sollte. Besonderes Interesse bestand an der Analyse der Aminosäuren, die in der Region 2 (aa 70 – 88) lokalisiert sind. Für diese Region ließ sich in der Arbeit von Hartmann et al. nur eine Bindung von FHL-1 nachweisen, nicht jedoch von Faktor H. Bezogen auf die Bindungsregionen 3 (aa 127-145) und 4 (aa 202-226) ergab die Pepspot-Analyse keine Anhaltspunkte für ein unterschiedliches Bindungsverhalten beider Regulatorproteine (s. Abb. 1.7).

4.2 Analyse der Aminosäuresubstitutionen und ihres Einflusses auf die Interaktion von BbCRASP-2 mit Faktor H und FHL-1

4.2.1 Analyse der Aminosäuresubstitutionen innerhalb der Bindungsregion 2 von BbCRASP-2

Die putative Bindungsregion 2 (Position 70-88) des BbCRASP-2-Proteins umfasst insgesamt 19 Aminosäuren inklusive sechs positiv bzw. negativ geladener Aminosäuren, die jeweils an den beiden Enden der Region 2 lokalisiert sind (s. Abb. 3.3). Drei der vier positiv geladenen Lysinreste befinden sich am C-terminalen Bereich der Region 2 an Positionen 82, 83 und 86. Eine Substitution dieser positiv geladenen Lysine sowie der polaren Aminosäuren Glutamin (Position 71 und 76), Serin (Position 72 und 79) und Asparagin (Position 75 und 85) führte jedoch zu keiner Änderung der Bindung von Faktor H oder FHL-1 (s. Tab. 3.1). Einen Einfluss auf das Bindungsverhalten von beiden Komplementregulatoren zeigte der Austausch der negativ geladenen Asparaginsäure an Position 84. Für Faktor H konnte mit dieser Mutante eine deutlich reduzierte Bindung und für FHL-1 eine verminderte Bindung im Ligandenaffinitätsblot beobachtet werden (s. Abb. 3.5). Auch im ELISA ließ sich eine Abnahme in der Bindungskapazität beider Komplementregulatoren an die Mutante BbCRASP-2_{D84A} bestätigen (s. Abb. 3.6). Laut Ligandenaffinitätsblot führt der Austausch des polaren Serinrestes gegen Alanin an Position 72 ebenfalls zu einer Abnahme der Bindungsintensität von Faktor H und FHL-1. Im ELISA zeigt sich jedoch ein unverändertes Bindungsverhalten der Mutante BbCRASP-2_{S72A} im Vergleich zu BbCRASP-2 (s. Abb. 3.6). Ein Grund für diese Diskrepanz könnte darin bestehen, dass die Proteine auf der Membran im denaturiertem Zustand fixiert sind, während die Proteine auf der ELISA-Platte in einem eher physiologischen, gefalteten Zustand vorliegen. Möglicherweise wirken sich einige Substitutionen im Ligandenaffinitätsblot stärker aus als im ELISA und vice versa. Dies zeigt sich insbesondere beim Austausch von Phenylalanin an Position 81: während im Ligandenaffinitätsblot keine Veränderung in der Bindungskapazität für FHL-1 und eine schwache Bindung bei Faktor H beobachtet werden konnte, lassen die ELISA-Ergebnisse auf eine signifikante Reduktion durch die Substitution schließen (s. Abb. 3.5 und 3.6). Die Molekülstruktur des ungeladenen und unpolaren Phenylalanins lässt vermuten, dass diese Aminosäure nicht direkt bei der Protein-Protein Interaktion beteiligt, sondern Veränderungen in der Proteinstruktur durch den Austausch des Imidazolringes in der Seitengruppe indirekt die Bindung beider Komplementregulatoren beeinflusst. Gewissheit über die genaue

räumliche Lage der bei der Interaktion involvierten Aminosäuren kann jedoch erst die Kristallstruktur des BbCRASP-2 Proteins geben.

Die im Vergleich zum parentalen BbCRASP-2 Protein verminderte Bindungseigenschaft der Mutante BbCRASP-2_{D84A} könnte mit den veränderten Ladungsverhältnissen einhergehen, so dass eine Beteiligung von ionischen Wechselwirkungen vermutet werden kann. Des Weiteren scheinen auch hydrophobe Wechselwirkungen an der Interaktion von FHL-1/Faktor H und BbCRASP-2 involviert zu sein, da die Substitution des neutral-polaren Serinrestes an Position 72 ebenfalls eine Auswirkung auf die Bindung von Faktor H und FHL-1 zeigt.

Die Ergebnisse der Pepspot-Analyse (s. Abb. 1.7) lassen erwarten, dass BbCRASP-2 in der putativen Bindungsregion 2 ausschließlich FHL-1 bindet. In der Ligandenaffinitätsblot-Analyse und im ELISA wirken sich jedoch Mutationen in der Region 2 auch auf die Bindung von Faktor H aus. Dies könnte folgende Ursachen haben:

1. Um die FHL-1/Faktor H-Bindungsregion(en) innerhalb des BbCRASP-2 Proteins zu identifizieren, wurde ursprünglich eine Pepspot-Analyse mit 13 Aminosäuren-langen Peptiden durchgeführt (Hartmann et al., 2006). Die Austausch an Position 72 (Mutante BbCRASP-2_{S72A}) und 84 (Mutante BbCRASP-2_{D84A}) könnten zu einer Konformationsveränderung Proteine führen, durch die die Bindung von Faktor H beeinflusst wird.
2. Strukturelle Unterschiede zwischen Faktor H und FHL-1 könnten bei dieser Nachweismethode ein unterschiedliches Bindungsverhalten vortäuschen. Faktor H mit einem Molekulargewicht von 150 kDa ist ein wesentlich größeres Molekül als FHL-1 (42 kDa), so dass es aufgrund unterschiedlicher Tertiärstruktur nicht optimal an die betreffenden Peptidfragmente im Pepspot binden kann. Zudem besitzt FHL-1, im Gegensatz zu Faktor H, am C-terminalen Ende vier zusätzliche, hydrophobe Aminosäuren, die zu einer verstärkten Bindung an kurze Peptidfragmente beitragen könnten. Schließlich zeigt auch der Ligandenaffinitätsblot eine intensivere Bindung von BbCRASP-2 an FHL-1 als an Faktor H. Diese Ergebnisse machen die Bindungsregion 2 zu einem Kandidaten für weitere Analysen. Festzuhalten ist, dass für die Bindung mit Faktor H die sterische Konformation des BbCRASP-2-Proteins wahrscheinlich ein entscheidender Faktor ist.

4.2.2 Analyse der Aminosäuresubstitutionen innerhalb der Bindungsregion 3 von BbCRASP-2

Die putative Bindungsregion 3 umfasst ebenfalls 19 Aminosäuren, wovon vier polar ungeladen, acht unpolar aliphatisch und sieben geladene Seitenketten aufweisen. Von den neun geladenen Aminosäureresten besitzen acht eine positive Ladung (s. Kap. 3.2.2). Einen

Einfluss auf die Bindung der beiden Komplementregulatoren konnte eindeutig für zwei Mutanten, BbCRASP-2_{R129A} und BbCRASP-2_{R139A} nachgewiesen werden. Der Austausch der Arginine an Position 129 und 139 resultierte im ELISA in einer signifikant reduzierten Bindungskapazität von Faktor H und FHL-1 (s. Abb. 3.9). Im Ligandenaffinitätsblot zeigt sich allerdings für die Mutante BbCRASP-2_{R129A} nur ein leicht veränderte Bindungsintensität für beide Komplementregulatoren im Vergleich zu BbCRASP-2, während für Mutante BbCRASP-2_{R139A} eine reduzierte Bindungsintensität gegenüber FHL-1 beobachtet werden konnte und die Faktor-H-Bindung komplett aufgehoben wurde (s. Abb. 3.8).

Eine geringfügige Veränderung in der Bindungskapazität zeigt im ELISA auch Mutante BbCRASP-2_{H130A} (s. Abb. 3.9). Die Differenzen zwischen den Ergebnissen beider Testsysteme lassen sich, wie schon unter 4.2.1 ausgeführt, am ehesten mit der These vereinbaren, dass die zu analysierenden Proteine in unterschiedlichen Konformationen vorgelegen haben. Interessanterweise spielen auch in dieser Region hauptsächlich ionische Wechselwirkung die entscheidende Rolle bei der Protein-Protein Interaktion.

4.2.3 Analyse der Aminosäuresubstitutionen innerhalb der Bindungsregion 4 von BbCRASP-2

Die putative Bindungsregion 4 liegt 10 Aminosäuren vom C-Terminus des nativen BbCRASP-2-Proteins entfernt und umfasst insgesamt 25 Aminosäuren (s. Abb. 3.2). Zu dieser Region gehören 8 geladene, fünf polare ungeladene Aminosäuren, und 12 neutrale, unpolare Aminosäuren (4 Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten und 8 Aminosäuren mit unpolaren aliphatischen Seitenketten). Auffällig ist eine strikt getrennte Ladungsverteilung innerhalb dieser Region: die vier positiv geladenen Aminosäurereste liegen im N-terminalen Bereich, die vier negativ geladenen Aminosäuren zum C-Terminus hin (s. Abb. 3.10). Die Substitutionen der geladenen Aminosäuren an den Positionen 204, 206, 212, 213, 214, 216, 223 und 225 zeigten im Ligandenaffinitätsblot keine Auswirkung auf die Bindung der beiden Komplementregulatoren (s. Abb. 3.11). Von diesen Mutanten zeigten im ELISA jedoch BbCRASP-2_{R204A}, BbCRASP-2_{R206A} und BbCRASP-2_{E214A} erniedrigte Bindungskapazitäten für Faktor H und FHL-1 (s. Abb. 3.12).

Sowohl in der Ligandenaffinitätsblot-Analyse als auch im ELISA wirkte sich die Punktmutation bei BbCRASP-2_{Y207A} und BbCRASP-2_{Y211A} erheblich auf die Bindung beider Komplementregulatoren aus (s. Abb. 3.11 und 3.12). Bei beiden Mutanten wurde die ungeladene, polare Aminosäure Tyrosin durch Alanin substituiert. Die Substitution einer aromatischen Seitenkette an diesen Positionen könnte zu einer erheblichen Veränderung der

Proteinarchitektur führen und die komplette bzw. teilweise Inhibierung der Wechselwirkung von Faktor H und FHL-1 mit BbCRASP-2 erklären. Da im ELISA die Bindungskapazität der Mutante BbCRASP-2_{F210A} ebenfalls deutlich beeinträchtigt war, kann davon ausgegangen werden, dass diese Region besonders sensitiv auf Mutationen reagiert. Möglicherweise bilden diese Aminosäuren gemeinsam eine Art Bindungstasche aus, in die die SCR-Domänen von Faktor H und FHL-1 genau hineinpassen. Anscheinend spielen für die Interaktion an dieser Stelle verschiedene nichtkovalente Wechselwirkungen eine Rolle, insbesondere hydrophobe Wechselwirkungen der aromatischen Seitenkette des Phenylalanin (Position 210) und die Bildung von Wasserstoffbrücken bei den beiden Tyrosinresten.

4.2.4 Analyse der Aminosäuresubstitutionen innerhalb der coiled-coil-Region von BbCRASP-2

Die putative coiled-coil-Region umfasst einen Bereich von 14 Aminosäuren bestehend aus zwei heptameren „repeats“, die mit den Buchstaben „a - g“ gekennzeichnet werden (Lupas, 1996). An Position „a“ und „d“ liegen hydrophobe Aminosäuren, die die Interphase der Helix bilden und für die Stabilisierung der coiled-coil-Struktur verantwortlich sind. Innerhalb der coiled-coil Region von BbCRASP-2 sind an diesen Positionen folgende Aminosäuren lokalisiert: Phenylalanin (Position 91), Leucin (Position 94), Isoleucin (Position 98) und Tyrosin (Position 101) (s. Abb. 3.13). Alle vier Aminosäuren wurden mittels in vitro Mutagenese durch Alanin ersetzt. Eine deutliche Wirkung auf die Bindung von Faktor H und FHL-1 zeigte sich im Ligandenaffinitätsblot und im ELISA beim Austausch von Phenylalanin an Position 91 (s. Abb. 3.15). Für beide Komplementregulatoren ließ sich eine Abnahme in der Bindungsintensität feststellen. Die Mutante BbCRASP-2_{L94A} fiel im Ligandenaffinitätsblot ebenfalls durch ihr schwächeres Bindungsverhalten gegenüber Faktor H auf, während die Mutanten BbCRASP-2_{I98A} und BbCRASP-2_{Y101A} keine Veränderungen aufwiesen (s. Abb. 3.14). Allerdings konnte im ELISA für die beiden letztgenannten Mutanten nur eine geringfügige Beeinflussung in der Bindung gegenüber beiden Komplementregulatoren nachgewiesen werden. Rogers und Marconi (2007) berichteten, dass eine Punktmutation in dieser coiled-coil Region an den Positionen 91 und 94 mit einem kompletten Abbruch der Faktor H-Bindung einhergeht. Die offensichtliche Diskrepanz zu den in dieser Studie erhobenen Daten lässt sich damit erklären, dass in der Arbeit von Rogers und Marconi eine Doppelmutante verwendet wurde, bei der Phenylalanin an Position 91 gegen ein polares Serin und Leucin an Position 94 gegen ein positiv geladenes Arginin substituiert worden war. Womöglich reicht eine einzelne Mutation nicht aus, um die Interaktion zwischen

BbCRASP-2 und den beiden Komplementregulatoren in dieser Region vollständig zu inhibieren.

Die Tatsache, dass einzelne oder multiple Mutationen in diesem Bereich des BbCRASP-2 Proteins die Bindung von beiden Komplementregulatoren beeinflussen bzw. komplett blockieren, weisen darauf hin, dass auch Aminosäuren außerhalb der bereits identifizierten Bindungsregion für die Interaktion eine Rolle spielen. Über eine direkte Beteiligung dieser Aminosäuren an der Bindung kann jedoch vorerst nur spekuliert werden, denn mehrere Mutationen könnten ebenso die Konformation von BbCRASP-2 verändern und dadurch indirekt einen Einfluss auf die Faktor H/FHL-1 Bindung ausüben.

4.3 Interaktion von Faktor H und FHL-1 mit verschiedenen bakteriellen Oberflächenproteinen

Die Bindung von Regulatorproteinen des Komplementsystems, insbesondere Faktor H und FHL-1 an bakterielle Oberflächenproteine ist bei humanpathogenen Mikroorganismen ein häufig beobachteter Immunescape-Mechanismus (Joiner 1988; Rautemaa and Meri, 1999; Kraiczy and Würzner, 2006; Lambris et al., 2008). Durch zahlreiche Studien konnten die Bindungsdomänen, die bei der Interaktion der verschiedenen bakteriellen Proteine mit FHL-1 und/oder Faktor H beteiligt sind, identifiziert werden (s. Tab. 4.3.1).

Eines der am besten untersuchten Beispiele für die molekulare Interaktion zwischen humanpathogenen Bakterien und den Komplementregulatoren des alternativen Aktivierungsweges, Faktor H und FHL-1, sind die M-Proteine von *Streptococcus pyogenes*, die die wichtigsten Virulenzfaktoren von A-Streptokokken darstellen und den Bakterienzellen Schutz vor komplementvermittelter Lyse und Phagozytose verleihen (Lancefield 1962; Horstmann und Fischetti 1987). M-Proteine binden Faktor H und FHL-1 über die Domänen SCR 6 und 7 (Fischetti et al., 1995; Blackmore et al., 1998; Johnsson et al., 1998; Kotarsky et al., 1998; 2001). Innerhalb der SCR-Domäne 7 befindet sich zusätzlich eine Bindungsstelle für Heparin, ein chemisch mit Glycosaminoglycanen (GAG) verwandtes negativ geladenes Molekül. Da Heparin Faktor H von seiner Bindungsstelle am M-Protein verdrängt werden kann, scheinen ionische Wechselwirkungen eine wesentliche Rolle für die Protein-Protein Interaktion zu spielen (Blackmore et al., 1998; Kotarsky et al., 1998; Giannakis et al., 2003). Untersuchungen zur Lokalisation der Faktor H und FHL-1 Bindungsregion in M Proteinen von Streptokokken ergaben weiterhin, dass beide Komplementregulatoren an eine zentrale, konservierte C-, „repeat“-Domäne binden (Fischetti et al., 1995). Eine weitere Bindungsstelle liegt in der hypervariablen A-Region am N-Terminus des M-Proteins (Sharma und Pangburn,

1997; Johnsson et al., 1998; Kotarsky et al., 1998). Dies unterstreicht die Komplexität der Interaktion zwischen M-Proteinen und Faktor H bzw. FHL-1. Eine solche Bindung, die sich auf Seiten beider Bindungspartner aus mehreren Domänen zusammensetzt und nur partiell aus ionischen Wechselwirkungen besteht, wurde bei einer Reihe von humanpathogenen Bakterien beobachtet.

Spezies	interagierendes bakterielles Protein	Bindungsdomänen	Literatur
<i>Borrelia burgdorferi</i>	BbCRASP-1 BbCRASP-2 BbCRASP-3 BbCRASP-4 BbCRASP-5 OspE	SCR 5-7 von FH und FHL-1; SCR 19-20 von FH SCR 6-7 von FH und FHL-1 SCR19-20 von FH SCR19-20 von FH SCR19-20 von FH	Kraiczky et al., 2001 Altialo et al., 2004
<i>Borrelia hermsii</i>	BhCRASP-1	SCR 20 von FH	Hovis et al., 2006; Rossmann et al., 2007
<i>Borrelia recurrentis</i>	HcpA	SCR 20 von FH	Grosskinsky et al., 2009
<i>Haemophilus influenzae</i>	32 u. 40 kD-Protein	SCR 6-7 von FH u. FHL-1, SCR 18-20 von FH	Hallström et al., 2008
<i>Leptospira interrogans</i>	LfhA	SCR18-20	Verma et a., 2006
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Por 1A NANA	SCR 6 und 18-20 von FH, SCR 16-20 von FH	Ngampasutadol et al., 2008; Ram et al., 1998a, b
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Tuf	SCR 6-7 und 19-20 von FH	Kunert et al., 2007
<i>Staphylococcus aureus</i>	Sbi-Protein	SCR19-20	Haupt et al., 2008
<i>Streptococcus agalactiae</i>	beta-Protein	SCR8-11 und 12-14 von FH	Jarva et al. 2004
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	PspC-Protein Hic-Protein	SCR6-10, 13-15 von FH SCR 8-11 und 12-14 von FH	Duthy et al., 2002 ; Dave et al., 2004 a, b; Jarva et al. 2002, 2004;
<i>Streptococcus pyogenes</i>	M-Protein Scl1	SCR 7 von FH und FHL-1 SCR18-20	Kotarsky et al., 1998 Clayton et al., 2008
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Ail YadA	SCR 6-7 von FH SCR1-20 von FH	Biedska-Sarek et al., 2008

Tab.4.1: Interaktion bakterieller Oberflächenproteine mit Faktor H und FHL-1.

Auf der Oberfläche von B-Streptokokken beispielweise wurden sogenannte beta-Proteine identifiziert, die durch Bindung von Faktor H und FHL-1 die komplementvermittelte Lyse verhindern. Die gleiche Funktion erfüllt das Hic-Protein auf der Oberfläche von

Streptococcus pneumoniae. Obwohl das Hic-Protein ein völlig anderes Molekül darstellt als das beta-Protein, binden beide mit großer Wahrscheinlichkeit über denselben Mechanismus an Faktor H, und zwar in den SCR-Domänen 8-10 und 12-14. Für beide Bakterienproteine wurden mittels Pepspot-Analyse multiple Bindungsregionen identifiziert, die homologe Sequenzen aufweisen und durchweg einen hohen Anteil an geladenen Aminosäuren enthalten. Selbst wenn nur einige dieser putativen Bindungsregionen an der Faktor H-Bindung beteiligt sind, kann man folgern, dass die Interaktion zwischen dem Hic- bzw. beta-Protein und Faktor H zum wesentlichen Teil auf ionische Wechselwirkungen beruht. Durch Zugabe des geladenen Heparin-Moleküls in steigenden Konzentrationen lässt sich die Bindung des beta- und Hic-Proteins jedoch nur teilweise inhibieren, was darauf hinweist, dass auch hydrophobe Wechselwirkungen an der Bindung beteiligt sind (Jarva et al., 2002, 2004).

Darüber hinaus exprimiert *Streptococcus pneumoniae* das Faktor H-bindende PspC-Protein (Dave et al., 2001). Im Faktor H Molekül erfolgt diese Bindung sowohl über die SCR-Domänen 8-11 als auch 13-15. Faktor H Deletionsmutanten, die nur eine dieser beiden Regionen enthielten, wiesen eine abgeschwächte Bindung auf. Innerhalb des PspC-Moleküls scheint die Faktor H-Bindungsstelle in einer Region lokalisiert zu sein, die überdurchschnittlich viele Prolin-Reste aufweist. Dass nach Zugabe von steigenden Konzentrationen an NaCl eine unverändert starke Bindung nachgewiesen werden konnte, deutet auf einen eher hydrophoben Bindungsmechanismus hin (Duthy et al., 2002).

Innerhalb des Faktor H Moleküls konnten die SCR-Domänen 6-10, 8-11 sowie 19-20 identifiziert werden, die mit dem PspC Protein interagieren (Dave et al., 2004a, 2004b; Hammerschmidt et al., 2007). Die PspC-Proteine diverser Serovare von *S. pneumoniae* (PspC, Hic, CbpA) interagieren dabei alle gemeinsam mit der hypervariablen, alpha-helikalen N-terminalen Region, zwischen den Aminosäuren 38-158 mit Faktor H (Lu et al., 2006, Hammerschmidt et al., 2007). Interessanterweise lässt sich die Interaktion von PspC mit Faktor H durch steigende Heparinkonzentrationen inhibieren, was wiederum für eine ionische Wechselwirkung zwischen beiden Proteinen spricht (Hammerschmidt et al., 2007).

Komplementresistente Stämme von *Neisseria gonorrhoeae* binden Faktor H mittels SCRs 16-20 an Neuraminsäuremoleküle (NANA) auf ihrer Oberfläche. Es wurde festgestellt, dass NANA exprimierende Stämme viermal soviel Faktor H binden konnten wie ein Stamm, der kein NANA produziert. Durch Heparin konnte die Bindung in vitro jedoch nicht inhibiert werden (Ram et al., 1998a, 1999). Diese Befunde lassen darauf schließen, dass die Interaktion zwischen Faktor H und den sialysierten Neisserienstämmen anders als bei PspC von

S. pneumoniae über andere Wechselwirkungen erfolgt, die möglicherweise hydrophober Natur sind.

Andererseits konnte nachgewiesen werden, dass nicht-sialysierte Stämme von *Neisseria gonorrhoeae* Faktor H über das Por1A Protein binden, was ihnen einen serumresistenten Phänotyp verleiht. Die Bindungsstellen für Por1A wurden in den SCR-Domänen 6 und 18-20 lokalisiert (Ram et al., 1998b, 1999; Ngampasutadol 2008).

Pseudomonas aeruginosa interagiert mit Faktor H über die Domänen SCR6-7 und SCR19-20 durch den auf der Bakterienoberfläche lokalisierten Elongationsfaktor Tuf (Kunert et al., 2007). Für den Immunescape von *P. aeruginosa* scheint die Bindung von Faktor H zentral wichtig zu sein, da in Abwesenheit dieses Regulators die Bakterien nicht vor der Komplement-vermittelten Lyse geschützt sind und somit abgetötet werden. Tuf bindet darüber hinaus Plasminogen, was einen weiteren Virulenzfaktor von *P. aeruginosa* darstellt. Faktor H und Plasminogen konkurrieren in bestimmten Konzentrationsverhältnissen um die Bindungsstelle am Tuf-Protein. Die Interaktion zwischen Plasminogen und dem Tuf-Protein wird durch positiv geladene Lysinreste vermittelt, so dass angenommen werden kann, dass auch für die Bindung von Faktor H an Tuf ionische Wechselwirkungen eine Rolle spielen (Kunert et al., 2007). Allerdings bleibt ungeklärt, ob im Faktor H-Molekül nur eine der beiden bekannten Bindungsstellen oder beide mit Plasminogen um die Bindung am Tuf-Protein konkurrieren.

Staphylococcus aureus verfügt über verschiedene Mechanismen des Immunescape, zu denen auch die Sekretion eines Proteins zählt, das an den Fc-Teil von menschlichen Immunglobulinen der Klasse IgG bindet. Aufgrund dieser Eigenschaft zur Hemmung der humoralen Immunantwort wurde das Protein als *Staphylococcus aureus* binder of IgG bezeichnet - abgekürzt Sbi-Protein (Zhang et al., 1998). In einer neueren Arbeit konnte für das Sbi-Protein ebenfalls eine Komplement-inhibitorische Wirkung durch die Bindung von Faktor H gezeigt werden. Hierzu geht das Sbi-Protein offensichtlich einen trimeren Komplex mit C3 und Faktor H ein, ein bisher noch nicht beobachteter Bindungsmechanismus, bei dem sowohl das C3 Spaltprodukt C3b als auch das Sbi-Protein als Bindungspartner von Faktor H fungieren. Im Faktor H-Molekül wurde die Bindungsstelle in den SCR-Domänen 19 und 20 lokalisiert (Haupt et al., 2008).

Mit Ausnahme von BbCRASP-2, interagieren alle anderen CRASP-Proteine von *Borrelia burgdorferi* mit den SCR-Domänen 19 und 20 von Faktor H. Im BbCRASP-3-Molekül wurde eine C-terminale Faktor-H-Bindungsstelle lokalisiert, die insgesamt neun Aminosäuren enthält, von denen fünf geladene Aminosäuren sind, davon drei Lysine. Durch die Zugabe

von Heparin ließ sich die Bindung mit steigender Konzentration inhibieren (Kraiczky et al., 2003). Eine dosisabhängige Wechselwirkung mit Heparin ließ sich auch bei der Bindung von Faktor H mit dem BbCRASP-3 orthologen OspE Protein beobachten (Hellwage et al., 2001). Die diversen OspE-Proteine haben gemeinsam, dass sie Faktor H u.a. über den C-Terminus binden, die zahlreiche geladene Aminosäureresten, vor allem Lysine aufweisen (Alitalo et al., 2004).

Borrelia hermsii, der Erreger des Zecken-Rückfallfiebers, exprimiert ein oberflächenständiges Protein, BhCRASP-1, welches in einen komplementsensiblen Borrelienstamm transformiert, zu einer partiellen Serumresistenz führt. BhCRASP-1 bindet Faktor H in der SCR-Domäne 20 (Rossmann et al., 2007). Zum Schutz gegen Lyse durch Komplement des Wirtes exprimieren die Rückfallfieberborrelien außerdem das FhbA-Protein. In Mutagenese-Experimenten mit dem FhbA-Protein zeigten sich eine Reihe von Aminosäureresten unterschiedlicher Ladungseigenschaften in der C-terminalen Region als bindungsrelevant. Eine kontinuierliche Bindungsstelle konnte jedoch nicht identifiziert werden, weshalb die Autoren von einem Bindungsmechanismus ausgehen, der verschiedene Bereiche des FhbA umfasst (Hovis et al., 2006). Ebenso konnte für *Borrelia recurrentis*, dem Erreger des Läuse-Rückfallfiebers ein Faktor H-bindendes Protein, HcpA identifiziert werden, das in gleicher Weise über SCR20 mit diesem Komplementregulator interagiert und ebenfalls Serumresistenz verleiht (Grosskinsky et al., 2009).

4.4 Bedeutung der Bindung von Heparin an Faktor H und FHL-1 für die Interpretation des molekularen Reaktionsmechanismus

Wie in Kapitel 4.3 bereits erwähnt, sind hauptsächlich die Domänen SCR6-7 und SCR19-20 im Faktor H bzw. FHL-1 Molekül an der Interaktion mit verschiedenen Oberflächenproteinen humanpathogener Mikroorganismen beteiligt. Faktor H besitzt insgesamt drei Bindungsstellen für Heparin (SCR 7, SCR 8-15 und SCR 20) und FHL-1 eine Heparinbindungsstelle in SCR 7 (Blackmore et al., 1996; 1998; Pangburn et al., 1991). Jede dieser drei Regionen enthält zahlreiche positiv geladene Aminosäuren, die an der Interaktion mit dem polyanionischen, negativ geladenen Heparinmolekül beteiligt sind. Für die SCR-Domäne 7 wurde gezeigt, dass Heparin an verschiedene, hauptsächlich positiv geladene Aminosäuren, die als „cluster“ zusammenwirken, bindet (Giannakis et al., 2003). In den c-terminal gelegenen SCR-Domänen 19-20 wurden ebenfalls positiv geladene Lysine und Arginine identifiziert, die für die Heparinbindung von essentieller Bedeutung sind (Hellwage et al., 2002; Jokiranta et al.,

2006). Der Heparinbindungsstelle am C-Terminus von Faktor H benachbart liegt außerdem eine Region, die für die Bindung von C3b und C3d verantwortlich ist und damit entscheidend die Funktion des Moleküls determiniert. Diese C3-Bindungsstelle besteht aus einer alpha-Helix und einigen positiv geladenen Aminosäureresten und kann ihre Funktion nur in einer bestimmten sterischen Konformation ausüben (Jokiranta et al., 2006). Diese Region innerhalb SCR 20 muss also bei der Interaktion mit bakteriellen Oberflächenproteinen zugänglich sein, damit das Faktor H-Molekül seine komplementregulierende Funktion nicht vollständig verliert. Da verschiedene bakterielle Proteine (s. Tab 4.3.1) bevorzugt an SCR 6-7 bzw. SCR 19-20 binden, könnte man vermuten, dass der Protein-Protein Interaktion auf molekularer Ebene der gleiche Reaktionsmechanismus zugrunde liegt. Allerdings zeigen die Ergebnisse zahlreicher Studien, dass sich die Interaktion zwischen bakteriellen Oberflächenproteinen und Faktor H weitaus komplexer darstellt als angenommen. Kompetitive Bindungsanalysen mit Heparin bewiesen, dass bei der Mehrzahl der Protein-Protein Interaktionen ionische Wechselwirkungen eine Rolle spielen, dass sich das Reaktionsmuster jedoch von Protein zu Protein unterscheidet. Eine nahezu vollständige Inhibition der Bindung von Faktor H durch Heparin ist z.B. für das M-Protein (Giannakis et al., 2003), OspE (Alitalo et al., 2002), BbCRASP-3 (Kraiczy et al., 2003), PspC von *S. pneumoniae* (Hammerschmidt et al., 2007) gezeigt worden. Bei anderen Proteinen, wie z.B. beim BbCRASP-1 Protein von *B. burgdorferi* (P. Kraiczy, persönliche Mitteilung), beim beta- und Hic-Protein von *S. pneumoniae* (Jarva et al., 2002, 2004), lässt sich die Interaktion anscheinend nicht vollständig durch Heparin unterbinden. So ließ sich mittlerweile nachweisen, dass Heparin ebenfalls einen inhibitorischen Einfluss auf die Bindung von Faktor H an BbCRASP-2 besitzt, was wiederum vermuten lässt, dass geladene Aminosäuren an der Interaktion beteiligt sind (Siegel et al., 2008). Dass tatsächlich positiv geladene Aminosäuren innerhalb des BbCRASP-2-Moleküls eine Rolle für die Interaktion spielen, belegt die vorliegende Arbeit: die BbCRASP-2-Mutanten, bei denen das positiv-geladene Arginin an den Positionen 129, 139, 204 und 206 durch Alanin substituiert wurde, weisen im ELISA deutlich veränderte Bindungseigenschaften von Faktor H und FHL-1 auf (s. Abbildungen 3.9 und 3.12). Eine unvollständige Inhibition durch Heparin lässt auf eine Beteiligung weiterer molekularer Wechselwirkungen bei der Interaktion zwischen BbCRASP-2 und Faktor H schließen, die wahrscheinlich hydrophober Natur sind (Siegel et al., 2008). Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie, dass Substitutionen von hydrophoben bzw. polaren Aminosäuren in den Bindungsregionen 3 und 4 an den Positionen 81 (Mutante BbCRASP-2_{F81A}), 207 (Mutante BbCRASP-2_{Y207A}), 210 (Mutante BbCRASP-2_{F210A}) und 211

(Mutante BbCRASP-2_{Y211A}) einem Einfluss auf die Bindung von Faktor H und FHL-1 aufweisen.

Ohne Kenntnis der dreidimensionalen Struktur bleibt weiterhin ungeklärt, ob die in dieser Studie identifizierten Aminosäuren tatsächlich direkt an der Protein-Protein Interaktion beteiligt sind oder zur Aufrechterhaltung der räumlichen Struktur beitragen. Eine Veränderung der räumlichen Struktur des BbCRASP-2 Proteins durch eine Aminosäuresubstitution könnte somit ebenfalls indirekt zu einem Bindungsverlust führen. Da BbCRASP-2 mehrere Faktor H und FHL-1-Bindungsstellen besitzt (Hartmann et al., 2006; Rogers und Marconi, 2007) ist zu postulieren, dass sich räumlich auseinander liegende Regionen zu einer Bindungsstelle formieren, so dass sowohl ionische als auch hydrophobe Wechselwirkungen zum Tragen kommen. D.h., dass der Tertiärstruktur eines Proteins eine wesentliche Rolle bei der Interaktion zukommt, wie dies auch beim BbCRASP-1 Protein der Fall ist (Cordes et al., 2005, Kraiczky et al., 2009).

4.5 Bedeutung der Interaktion von Komplementregulator C4BP mit Oberflächenproteinen anderer Mikroorganismen

Das C4b-binding protein (C4BP) repräsentiert den wichtigsten Immunregulator des klassischen Komplementweges, der ebenfalls mit Oberflächenproteinen von humanpathogenen Bakterien wechselwirken kann. Durch die Bindung von C4b beschleunigt C4BP im klassischen Aktivierungsweg den Zerfall der C3-Konvertase (C4b2a) und verhindert die Bildung der C5-Konvertase auf der Oberfläche von Zellen sowie die folgenden Reaktionen des terminalen Aktivierungsweges (s. Kap. 1.3.3). Außerdem dient das C4b-bindende Protein in analoger Weise zu FHL-1 und Faktor H als Kofaktor für Faktor I, der die Inaktivierung des C4b-Komplexes zu iC4b katalysiert. C4BP spielt also im klassischen Aktivierungsweg des Komplementsystems die gleiche Rolle wie FHL-1 und Faktor H im alternativen Aktivierungsweg (Fujita et al., 1978 und 1979).

Auch im Aufbau ähneln sich die beiden Regulatorproteine: C4BP setzt sich aus sieben alpha-Ketten und einer beta-Kette zusammen, die wie bei Faktor H aus einzelnen SCR-Domänen bestehen. Die sieben alpha-Ketten von C4BP sind aus 8 SCR-Domänen und die beta-Kette aus drei SCR-Domänen aufgebaut und bilden zusammen eine Spinnen-ähnliche Struktur (Scharfstein et al., 1978). Die Bindung von C4BP durch Oberflächenproteine humanpathogener Bakterien wurde unter anderem für *Neisseria gonorrhoeae*, *Bordetella pertussis*, *Escherichia coli* und *Streptococcus pyogenes* nachgewiesen (Blom, 2002).

4.5.1 Molekulare Grundlage für die Interaktion von Komplementregulator C4BP mit Oberflächenproteinen anderer Mikroorganismen

Streptococcus pyogenes interagiert mit C4BP über oberflächenständige M-Proteine verschiedener Serotypen (Thern et al., 1995; Johnsson et al., 1996a, 1997; Blom et al., 2000; Berggard et al., 2001, Morfeldt et al., 2001). Die Bindungsstelle ist zwischen den SCR-Domänen 1 und 2 von C4BP lokalisiert und dient gleichzeitig teilweise als Bindungsstelle für den Komplementkomponente C4b. Wie bei Faktor H und FHL-1 bindet auch bei dieser Interaktion das M-Protein in einer konservierten Region des Regulatorproteins, die für dessen regulative Funktion unentbehrlich ist. Als essentiell für die Bindung von M-Protein und C4BP wurde ein Cluster positiv geladener Aminosäuren innerhalb der SCR-Domänen 1 und 2 identifiziert, was auf einen Bindungsmechanismus über ionische Wechselwirkung hindeutet (Blom et al., 2000). Diese Vermutung ließ sich durch Inhibitionsstudien mit ansteigenden Konzentrationen von NaCl bestätigen, die zeigten, dass die Interaktion von C4BP mit dem M-Protein Arp4 selbst bei 1,5M NaCl nur geringfügig beeinflusst wurde, jedoch eine Abnahme der Bindung von bis zu 50% bei 1M NaCl beim M-Protein Sir22 beobachtet werden konnte. Es lässt sich daher vermuten, dass auf molekularer Ebene sowohl ionische als auch hydrophobe Wechselwirkungen für die Interaktion des C4BP mit den verschiedenen M-Proteinen verantwortlich sind. Die beobachteten Unterschiede im molekularen Mechanismus der Interaktion von Arp4 und Sir22 lassen sich anhand der Heterogenität innerhalb der Sequenz beider M-Proteine erklären.

Alle bisher untersuchten M-Proteine binden C4BP, im Gegensatz zu Faktor H, ausschließlich in einer hoch variablen Domäne (HVR), die in der Nähe des N-Terminus aller M-Proteine lokalisiert ist. Trotz der hohen Sequenzdivergenz ist die Bindung von C4BP an die M-Proteine sehr spezifisch. Diese hochgradige Spezifität wird auf die ähnliche dreidimensionale Struktur der unterschiedlichen HVRs zurückgeführt (Morfeldt et al., 2001). Interessanterweise finden sich in diesen völlig verschiedenen HVRs dieselben Aminosäuren in den gleichen Abständen. Dieses Aminosäuremotiv lässt sich ebenfalls in der N-terminalen Region des M5-Proteins nachweisen, einem Mitglied der M-Protein Familie, welches aber nicht an C4BP bindet. Computeranalysen weisen darauf hin, dass das M5-Protein, anders als die C4BP-bindenden M-Proteine, in dieser Region eine coiled-coil Struktur ausbildet (Johnsson et al., 1996). Es ist denkbar, dass die Ausbildung einer coiled-coil Struktur in diesem Fall eine Bindung nicht etwa begünstigt, wie für BbCRASP-2 angenommen wurde (Rogers und Marconi, 2007), sondern diese vielmehr verhindert. Außerdem scheinen die verschiedenen M-

Proteine trotz geringer Übereinstimmung der Bindungsstelle in der Primärstruktur am C4BP die identische Bindungsstelle zu nutzen (Johnsson et al. 1996, Morfeldt et al. 2001). Es ist daher davon auszugehen, dass die Bindung essentiell von der räumlichen Struktur der diversen Proteine abhängt. So war die Bindung der hypervariablen Region im M-Protein an C4BP *in vitro* nur rekonstruierbar, wenn das Protein als Dimer vorlag (Akerström et al. 1992; Morfeldt et al. 2001).

Auch beim Erreger des Keuchhustens, *Bordetella pertussis*, stellt die Bindung von C4BP ein Pathogenitätsfaktor dar. Untersuchungen zur molekularen Interaktion dieser Bindung ergaben, dass die Bindung von C4BP an *B. pertussis* durch steigende Konzentrationen von NaCl vollständig inhibiert werden konnte und daher vorwiegend auf ionischen Wechselwirkungen beruht (Berggard et al., 2001).

Die Untersuchungen zum molekularen Mechanismus der Bindung von C4BP und den verschiedenen bakteriellen Proteinen weisen deutliche Parallelen zur Interaktion von Faktor H und den zahlreichen bakteriellen Liganden auf. Bei der Interaktion spielen vornehmlich ionische Wechselwirkungen eine Rolle, was durch die negative Ladungsverteilung der an der Bindung beteiligten SCR-Domänen beider Komplementregulatoren begründet ist. Sofern Bindungskonstanten ermittelt wurden, ist von einer sehr starken Protein-Protein Interaktion auszugehen, die nur durch hohe Konzentrationen an Salz oder drastischer pH-Wert-Verschiebungen im Puffer beeinflusst werden kann.

4.6 Zusammenfassung

Die Bindung von regulatorischen Proteinen an die Zelloberfläche ist eine wirkungsvolle Strategie, die sich humanpathogene Bakterien, insbesondere *B. burgdorferi*, dem Erreger der Lyme-Borreliose, zu eigen gemacht haben, um der bakteriolytischen Wirkung von Komplement zu entgehen. Die Grundlage der Serumresistenz bei *B. burgdorferi* besteht vornehmlich in der Interaktion der Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1 mit fünf verschiedenen Borrelienproteinen, die als **C**omplement **R**egulator-**A**cquiring **S**urface **P**roteins bezeichnet werden. Bei der Genospezies *B. burgdorferi* s.s. nimmt das BbCRASP-2 Protein aufgrund seines spezifischen Bindungsverhaltens gegenüber Faktor H und FHL-1 eine Sonderstellung ein. In früheren Untersuchungen konnten vier potenzielle Bindungsregionen von Faktor H und FHL-1 im BbCRASP-2 Protein lokalisiert werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der detaillierten Charakterisierung der an der Bindung mit Faktor H und FHL-1 beteiligten Aminosäuren von BbCRASP-2 innerhalb der

putativen Bindungsregionen 2, 3 und 4 sowie in einer Region, die eine coiled-coil Struktur aufweist. Dazu wurden selektiv Aminosäuren mittels gerichteter Mutagenese durch die neutrale Aminosäure Alanin ausgetauscht und das Bindungsverhalten der mutierten BbCRASP-2 Proteine untersucht. Mittels Ligandenaffinitätsblot-Analyse und ELISA konnten insgesamt 17 Aminosäuren – geladen, neutral polar, neutral unpolar - identifiziert werden, die nach Mutagenese eine erniedrigte Bindungskapazität oder keine Bindung gegenüber Faktor H und FHL-1 in mindestens einem der beiden Testmethoden aufwiesen. Von diesen Mutanten zeigen 6 Proteine (BbCRASP-2_{S72A}, BbCRASP-2_{D84A}, BbCRASP-2_{F91A}, BbCRASP-2_{R139A}, BbCRASP-2_{Y207A}, BbCRASP-2_{Y211A}) in beiden Testsystemen ein deutlich verändertes Bindungsverhalten. 12 weitere BbCRASP-2 Mutanten fielen im ELISA durch ihre reduzierte Bindungskapazität auf, verhielten sich jedoch im Ligandenaffinitätsblot im Vergleich zu BbCRASP-2 in ihrer Bindungseigenschaft unverändert. Die für die Faktor H/FHL-1 Bindung relevanten Aminosäuren verteilten sich in allen der drei untersuchten Bindungsregionen, wobei Austausch in der C-terminal gelegenen Region 4 den größten Effekt auf die Bindung zeigten. Dies deutet darauf hin, dass dem C-Terminus eine essentielle Rolle bei der Interaktion zugeordnet werden kann. In Bezug auf die Ladungseigenschaften der identifizierten Aminosäuren ergab sich ebenfalls ein sehr heterogenes Bild. Da sowohl geladene als auch polare und unpolare Aminosäuren an der Bindung von Faktor H und FHL-1 partizipieren, ist davon auszugehen, dass gleichermaßen elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen an der Bindung beteiligt sind.

Zusätzlich konnte in der putativen coiled-coil Region eine Aminosäure (Phe91) identifiziert werden, die direkt oder indirekt an der Bindung von BbCRASP-2 und Faktor H/FHL-1 beteiligt ist. Für die Hypothese einer an der Interaktion beteiligten coiled-coil Struktur spricht, dass Aminosäuresubstitutionen an drei weiteren Positionen (Leu-94, Ile-98 und Tyr-101) eine reduzierte Bindung bewirkten.

Die räumlich weit auseinander liegenden Positionen der als bindungsrelevant identifizierten Aminosäuren deuten darauf hin, dass sich der Bindungsmechanismus von BbCRASP-2 an Faktor H und FHL-1 komplexer darstellt, als zunächst vermutet. Es ist ferner zu erwarten, dass noch weitere Aminosäuren außerhalb der putativen Bindungsregionen die Interaktion von BbCRASP-2 mit den Regulatorproteine beeinflussen, da in dieser Studie gezeigt werden konnte, dass die Substitution von Phenylalanin an Position 91 einen deutlichen Einfluss auf die Bindung von Faktor H und FHL-1 aufwies, obwohl sie außerhalb der ermittelten Bindungsregionen lokalisiert ist. Mit großer Wahrscheinlichkeit stellt die genaue Topologie des BbCRASP-2 Proteins ebenfalls einen entscheidenden Faktor für die Bindung dar. Deshalb

sollte mit Kenntnis der dreidimensionalen Struktur des BbCRASP-2 Moleküls eine genauere Beschreibung des molekularen Bindungsmechanismus möglich sein.

Die vorliegenden Untersuchungen zum molekularen Mechanismus der Serumresistenz von *B. burgdorferi* tragen wesentlich zum Verständnis der komplexen Interaktion zwischen BbCRASP-2 mit Faktor H und FHL-1, den beiden Komplementregulatoren des alternativen Weges bei. Diese Erkenntnisse könnten langfristig gesehen für die Entwicklung eines Impfstoffs genutzt werden.

4.7 Summary

Binding of regulatory proteins to bacterial surfaces is a sophisticated escape strategy used by diverse human pathogenic bacteria in order to avoid complement-mediated bacteriolysis, in particular *Borrelia burgdorferi*, the etiologic agent of Lyme disease. Serum resistance of *B. burgdorferi* is mainly based on the interaction of complement regulators factor H and FHL-1 with up to five distinct bacterial molecules, collectively termed as CRASPs (Complement Regulator-Acquiring Surface Proteins). Due to its specific factor H/FHL-1 binding properties, BbCRASP-2 is a unique protein among CRASPs of *B. burgdorferi* sensu stricto. In a previous study, four potential binding regions within the BbCRASP-2 molecule have been identified.

The aim of the present study was to identify amino acid residues within these putative binding regions that are responsible for the binding of factor H and FHL-1. A separate region that potentially forms a coiled-coil structure was also characterized in this study. This was done by systematical substitution of single amino acid residues by a neutral alanine using site-directed mutagenesis. The respective BbCRASP-2 mutants were analyzed for their ability to bind factor H and/or FHL-1. Applying ligand affinity blotting and ELISA, up to 18 amino acid residues (charged, neutral polar and neutral non-polar) have been identified that showed a reduced binding capacity or no binding at all to factor H and FHL-1. Six of the BbCRASP-2 mutants, BbCRASP-2_{S72A}, BbCRASP-2_{D84A}, BbCRASP-2_{F91A}, BbCRASP-2_{R139A}, BbCRASP-2_{Y207A}, and BbCRASP-2_{Y211A}, displayed an altered binding property in both test systems. In addition, a reduced binding capacity could be demonstrated for 12 mutants using ELISA while binding was unchanged when the ligand affinity blot was employed on the same mutated proteins. The identified binding-relevant amino acid residues were distributed within the three putative binding regions whereby substitutions within the C-terminal binding region 4 showed the strongest effect on binding. Hence, the C-terminus of BbCRASP-2

appears to play an essential role in this interaction. A heterogeneous picture concerning the charge properties of the identified amino acid residues was observed. As charged, polar, and non-polar amino acid residues participate in binding of factor H and FHL-1 it has been suggested that both, electrostatic and hydrophobic forces are involved in this protein-protein interaction.

Furthermore, an additional amino acid residue, Phe-91, within the putative coiled-coil region was identified to be either directly or indirectly involved in binding of factor H and FHL-1. Substitutions at three distinct positions (Leu-94, Ile-98, and Tyr-101) within the studied coiled-coil region also affected binding of both complement regulators, thus, it cannot be completely ruled out that this region might have an impact on the interaction. Resolving the crystal structure of the BbCRASP-2-Protein will be necessary to fully understand the way of interaction with complement regulators of the alternative pathway.

5. Literaturverzeichnis

Afzelius A. 1909. Verhandlungen der Dermatologischen Gesellschaft zu Stockholm. 28. Oktober 1909. Arch Derm Syph. **101**: 403-406.

Akerström B, Lindahl G, Björck L, Lindqvist A. 1992. Protein Arp and protein H from group A streptococci. Ig binding and dimerization are regulated by temperature. J Immunol. **148**: 3238-3243.

Alitalo A, Meri T, Rämö L, Jokiranta TS, Heikkilä T, Seppälä IJ, Oksi J, Viljanen M, Meri S. 2001. Complement evasion by *Borrelia burgdorferi*: Serum-resistant strains promote C3b inactivation. Infect Immun. **69**: 3685-3691.

Alitalo A, Meri T, Lankinen H, Seppälä IJ, Lahdenne P, Hefty PS, Akins DR, Meri S. 2002. Complement inhibitor factor H binding to Lyme disease spirochete is mediated by inducible expression of multiple plasmid-encoded outer surface protein E paralogs. J Immunol. **169**: 3847-3853.

Alitalo A, Meri T, Chen T, Lankinen H, Cheng ZZ, Jokiranta TS, Seppälä IJ, Lahdenne P, Hefty PS, Akins DR, Meri S. 2004. Lysine-dependent multipoint binding of the *Borrelia burgdorferi* virulence factor outer surface protein E to the C terminus of factor H. J Immunol. **172**:6195-6201.

Bacon RM, Biggerstaff BJ, Schriefer ME, Gilmore RD, Jr., Philipp MT, Steere AC, Wormser GP, Marques AR, Johnson BJ. 2003. Serodiagnosis of Lyme disease by kinetic enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant VlsE 1 or peptide antigens of *Borrelia burgdorferi* compared with 2-tiered testing using whole-cell lysates. J Infect Dis. **187**: 1187-1199.

Bäferstedt B. 1944. Über Lymphadenosis benigna cutis. Eine klinische und pathologische-anatomische Studie. Acta Derm Venerol. **24**: 1-202 (Supplement).

Bannwarth H. 1941. Chronische lymphozytäre Meningitis, entzündliche Polyneuritis und „Rheumatismus“. Arch Psychiat Nervenkr. **117**: 161-185.

- Barbour AG and Hayes SF.** 1986. Biology of *Borrelia* species. *Microbiol Rev.* **50**: 381-400.
- Berggard K, Lindahl G, Dahlbäck B, Blom AM.** 2001. *Bordetella pertussis* binds to human C4b-binding protein (C4BP) at a site similar to that used by the natural ligand C4b. *Eur J Immunol.* **31**: 2771-2780.
- Biedska-Sarek M, Jarva H, Hyytiäinen H, Meri S, Skurnik M.** 2008. Characterization of complement factor H binding to *Yersinia enterocolitica* serotype O:3. *Infect Immun.* **76**: 4100-4109.
- Blackmore TK, Fischetti VA, Sadlon TA, Ward HM, Gordon DL.** 1998. M protein of the group A *Streptococcus* binds to the seventh short consensus repeat of human complement factor H. *Infect Immun.* **66**: 1427-1431.
- Brade V, Kleber I, Acker G.** 1992. Differences of two *Borrelia burgdorferi* strains in complement activation and serum resistance. *Immunobiology* **185**: 453-465.
- Breitner-Ruddock S, Würzner R, Schulze J, Brade V.** 1997. Heterogeneity in the complement-dependent bacteriolysis within the species of *Borrelia burgdorferi*. *Med Microbiol Immunol.* **185**: 253-260.
- Brooks CS, Vuppala SR, Jett AM, Alitalo A, Meri S, Akins DR.** 2005. Complement Regulator-Acquiring Surface Protein 1 imparts resistance to human serum in *Borrelia burgdorferi*. *J Immunol.* **175**: 3299-3308.
- Bunikis J, Barbour AG.** 2002. Laboratory testing for suspected Lyme disease. *Med Clin North Ann.* **86**: 311-340.
- Burgdorfer W, Barbour A G, Hayes S F, Benach J, Grunwaldt E, Davis J.** 1982. Lyme Disease – a tick-borne spirochetosis? *Science* **216**: 1317-1319.
- Bykowski T, Babb K, von Lackum K, Riley SP, Norris SJ, Stevenson B.** 2006. Transcriptional regulation of the *Borrelia burgdorferi* antigenically variable VlsE surface protein. *J Bacteriol.* **188**: 4879-4889.

Bykowski T, Woodman ME, Cooley AE, Brissette CA, Brade V, Wallich R, Kraiczky P, Stevenson B. 2007. Coordinated expression of *Borrelia burgdorferi* complement regulator-acquiring surface proteins during the Lyme disease spirochete's mammal-tick infection cycle. *Infect Immun.* **75**: 4227-4236.

Casjens S, Palmer N, van Vugt R, Huang WM, Stevenson B, Rosa P, Lathigra R, Stutton G, Peterson J, Dodson RJ, Haft D, Hickey E, Gwinn M, White O, Fraser CM. 2000. A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Mol Microbiol.* **35**: 490-516.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2007. Lyme disease - United States, 2003-2005. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* **56**: 573-576.

Cooper NR. 1991. Complement evasion strategies of microorganisms. *Immunol Today.* **12**: 327-331.

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

Cordes FS, Kraiczky P, Roversi P, Simon MM, Brade V, Jahraus O, Wallis R, Goodstadt L, Ponting CP, Skerka C, Zipfel PF, Wallich R, Lea S. 2006. Structure-function mapping of BbCRASP-1, the key complement factor H and FHL-1 binding protein of *Borrelia burgdorferi*. *Int J Med Microbiol.* **295**: 177-184.

Da Franca I, Santos L, Mesquita T, Collares Pereira M, Baptista S, Vieira L, Viana I, Vale E, Prates C. 2005. Lyme borreliosis in Portugal caused by *Borrelia lusitaniae*? Clinical report on the first patient with a positive skin isolate. *Wien Klin Wochenschr.* **117**: 429-432.

Dave S, Brooks-Walter A, Pangburn MK, Mc Daniel LS. 2001. PspC, a pneumococcal surface protein, binds human factor H. *Infect Immun.* **65**: 3435-3437.

Dave S, Pangburn MK, Pruitt C, Mc Daniel LS. 2004a. Interaction of human factor H with PspC of *Streptococcus pneumoniae*. Indian J Med Res. **119**: 66-73.

Dave S, Carmicle S, Hammerschmidt S, Pangburn MK, Mc Daniel LS. 2004b. Dual roles of PspC, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, in binding human secretory factor H. J Immunol. **173**: 471-477.

De Silva AM and Fikrig E. 1997. *Borrelia burgdorferi* genes selectively expressed in ticks and mammals. Parasitology Today. **13**: 267-270.

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

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

Duthy TG, Ormsby RJ, Giannakis E, Ogunniyi AD, Strocher UH, Paton JC, Gordon DL. 2002. The human complement regulator factor H binds pneumococcal surface protein PspC via short consensus repeats 13 to 15. Infect Immun. **70**: 5604-5611.

Escudero R, Barral M, Perez A, Mar Vitutia MM, Garcia-Perez AL, Jimenez S, Sellek RE, Anda P. 2000. Molecular and pathogenic characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates from Spain. J Clin Microbiol. **38**: 4026-4033.

Fikrig E, Narasimhan S. 2006. *Borrelia burgdorferi* – Traveling incognito? J Microb Infect. **8**: 1390-1399.

Fingerle V, Wilske B. 2006. Stage-oriented treatment of Lyme-Borreliosis. MMW Fortschr Med. **148**: 39-41.

Fingerle, V, Bergmeister H, Liegl G, Petko B, Vanek E, Wilske B. 1994. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* in southern Germany. J Spiroch Tick-borne Dis. **1**: 41-45.

Fingerle V, Laux H, Munderloh U G, Schulte-Spechtel U, Wilske B. 2000. Differential expression of outer surface proteins A and C by individual *Borrelia burgdorferi* in different genospecies. *Med Microbiol Immunol.* **189**: 59-66.

Fischetti VA, Horstmann RD, Pancholi V. 1995. Location of the complement factor H binding site on streptococcal M6 protein. *Infect Immun.* **63**: 149-53.

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

Friese MA, Hellwage J, Jokiranta TS, Meri S, Peter HH, Eibel H, Zipfel PF. 1999. FHL-1/reconectin and Factor H: two human complement regulators which are encoded by the same gene are differently expressed and regulated. *Mol Immunol.* **36**: 809-818.

Garin C, Bujadoux B. 1922. Paralyse par les tiques. *J Méd Lyon* **71**: 765-767.

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

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

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

Hallström T, Zipfel PF, Blom AM, Lauer N, Forsgren A, Riesbeck K. 2008. *Haemophilus influenzae* interacts with the human complement inhibitor factor H. *J Immunol.* **181**: 537-545.

Hammerschmidt S, Agarwal V, Kunert A, Haelbich S, Skerka C, Zipfel PF. 2007. The host immune regulator factor H interacts via two contact sites with the PspC Protein of *Streptococcus pneumoniae* and mediates adhesion to host epithelial cells. *J Immunol.* **178**: 5848-5858.

Hartmann K, Corvey C, Skerka C, Kirschfink M, Karas M, Brade V, Miller JC, Stevenson B, Wallich R, Zipfel PF, Kraiczy P. 2006. Functional characterization of BbCRASP-2, a distinct outer membrane protein of *Borrelia burgdorferi* that binds host complement regulators factor H and FHL-1. *Mol Microbiol.* **61**: 1220-1236.

Haupt K, Reuter M, van den Elsen J, Burman J, Hälbich S, Richter J, Skerka C, Zipfel PF. 2008. The *Staphylococcus aureus* protein Sbi acts as a complement inhibitor and forms a tripartite complex with host complement factor H and C3b. *PLoS Pathog.* **4**: e1000250.

Hellwage J, Meri T, Heikkilä T, Alitalo A, Panelius J, Lahdenne P, Seppälä IJ, Meri S. 2001. The complement regulator factor H binds to the surface protein OspE of *Borrelia burgdorferi*. *J Biol Chem.* **276**: 8427-8435.

Hellwage J, Jokiranta TS, Friese MA, Wolk TU, Kampen E, Zipfel PF, Meri S. 2002. Complement C3b/C3d and cell surface polyanions are recognized by overlapping binding sites on the most carboxyl-terminal domain of complement factor H. *J Immunol.* **169**: 6935-6944.

Herxheimer K und Hartmann K. 1902. Über Acrodermatitis chronica atrophicans. *Arch Dermatol Syph.* **143**: 365-374.

Herzer P, Wilske B, Preac-Mursic V, Schierz G, Schattenkirchner M, Zollner N. 1986. Lyme arthritis: clinical features, serological and radiographic findings of cases in Germany. *Klin. Wochenschr.* **64**: 206-215.

Horstmann RD and Fischetti VA. 1987. M-protein, the major virulence factor of group A streptococci, inhibits alternative pathway activation by selectively binding factor H. *Complement* **4**: 170.

Hovis KM, Jones JP, Sadlon T, Raval G, Gordon DL, Marconi RT. 2006. Molecular analyses of the interaction of *Borellia hermsii* FhbA with the complement regulatory proteins factor H and factor H-like protein 1. *Infect Immun.* **74**: 2007-2014.

Huang, W M, Robertson M, Aron J, Casjens S. 2004. Telomere exchange between linear replicons of *Borrelia burgdorferi*. *J Bacteriol.* **186**: 4134-4141.

Hubalek Z, Halouzka J. 1997. Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe, a review. *Eur J Epidemiol.* **13**: 951-957.

Indest KJ, Howell JK, Jacobs MB, Scholl-Meeker D, Norris SJ, Philipp MT. 2001. Analysis of *Borrelia burgdorferi* *vlsE* gene expression and recombination in the tick vector. *Infect Immun.* **69**:7083-7090.

Jarva H, Jokiranta TS, Hellwage J, Zipfel PF, Meri S. 1999. Regulation of complement activation by C-reactive protein: targeting the complement inhibitory activity of factor H by an interaction with short consensus repeat domains 7 and 8-11. *J Immunol.* **163**: 3957-3962.

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

Jarva H, Jokiranta TS, Würzner R, Meri S. 2003. Complement resistance mechanisms of streptococci. *Mol Immunol.* **40**: 95-107.

Jarva H, Hellwage J, Jokiranta TS, Lehtinen MJ, Zipfel PF, Meri S. 2004. The group B streptococcal beta and pneumococcal Hic proteins are structurally related immune evasion molecules that bind the complement inhibitor factor H in an analogous fashion. *J Immunol.* **172**: 3111-3118.

Jewett MW, Lawrence K, Bestor AC, Tilly K, Grimm D, Shaw P, Van radem M, Gherardini F, Rosa PA. 2007. The critical role of the linear plasmid lp36 in the infectious cycle of *Borrelia burgdorferi*. *Mol Microbiol.* **64**:1358-1374.

Johnsson E, Thern A, Dahlbäck B, Hedén L, Wikström M, Lindahl G. 1996. A highly variable region in members of the streptococcal M protein family binds the human complement regulator C4BP. *J Immunol.* **157**: 3021-3029.

Johnsson E, Berggard K, Kotarsky H, Hellwage J, Zipfel PF, Sjöbring U, Lindahl G. 1998. Role of the hypervariable region in streptococcal M proteins: Binding of a human complement inhibitor. *J Immunol.* **161**: 4894-4901.

Joiner KA.1988. Complement evasion of Bacteria and parasites. *Ann Rev Microbiol.* **42**: 201-230.

Jokiranta TS, Zipfel PF, Hakulinen J, Kühn S, Pangburn MK, Tamerius JD, Meri S. 1996. Analysis of the recognition mechanism of the alternative pathway of complement by monoclonal anti-factor H antibodies: Evidence for multiple interactions between H and surface bound C3b. *FEBS Lett.* **393**: 297-302.

Jokiranta TS, Jokpii L, Meri S. 1995. Complement resistance of parasites. *Scand J Immunol.* 1995. **42**: 9-20.

Jokiranta TS, Jaakola VP, Lehtinen MJ, Pärepallo M, Meri S, Goldman A. 2006. Structure of complement factor H carboxyl-terminus reveals molecular basis of atypical haemolytic uremic syndrome. *Eur Mol Biol Org J.* **25**: 1784-1794.

Kawasaki N, Kawasaki T, Yamashina I. 1983. Isolation and characterization of a mannan-binding protein from human serum. *J Biochem.* **94**: 937-947.

Kenedy MR, Vuppala SR, Siegel C, Kraiczy P, Akins DR. 2009. *CspA*-mediated binding of human factor H inhibits complement deposition and confers serum resistance in *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun.* **77**: 2773-2782.

Kochi SK und Johnson RC. 1988. Role of immunoglobulin G in killing of *Borrelia burgdorferi* by the classical complement pathway. *Infect Immun.* **56**: 314-321.

Kotarsky H, Hellwage J, Johnsson E, Skerka C, Svensson HG, Lindahl G, Sjöbring U, Zipfel PF. 1998. Identification of a domain in human factor H and factor H-like protein-1 required for the interaction with streptococcal M proteins. *J Immunol.* **160**: 3349-3354.

Kotarsky H, Gustafsson M, Svensson HG, Zipfel PF, Truedsson L, Sjöbring U. 2001. Group A streptococcal phagocytosis resistance is independent of complement factor H and factor H-like protein 1 binding. *Mol Microbiol.* **41**: 817-826.

Kraiczy P, Skerka C, Brade V, Zipfel P. 2001. Further characterization of complement regulator-acquiring surface proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun.* **69**: 7800-7809.

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

Kraiczy P, Hellwage J, Skerka C, Kirschfink M, Brade V, Zipfel PF, Wallich R. 2003. Immune evasion of *Borrelia burgdorferi*: mapping of a complement-inhibitor factor H-binding site of BbCRASP-3 a novel member of the Erp-Protein family. *Eur J Immunol.* **33**: 697-707.

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

Kraiczy P, Hellwage J, Skerka C, Becker H, Kirschfink M, Simon MM, Brade V, Zipfel PF, Wallich R. 2004b. Complement resistance of *Borrelia burgdorferi* correlates with the expression of BbCRASP-1, a novel linear plasmid-encoded surface protein that interacts with human factor H and FHL-1 and is unrelated to Erp-proteins. *J Biol Chem.* **279**: 2421-2429.

Kraiczy P and Würzner R. 2006. Complement escape of human pathogenic bacteria by acquisition of complement regulators. *Mol Immunol.* **43**: 31-44.

Kraiczy P, Hanssen-Hübner C, Kiliratschky V, Brenner C, Besier S, Brade V, Simon MM, Skerka C, Roversi P, Lea SM, Stevenson B, Wallich R, Zipfel PF. 2009. Mutational analysis of the BbCRASP-1 protein of *Borrelia burgdorferi* identify the residues relevant for the architecture and binding of host complement regulators FHL-1 and Factor H. *Int J Med Microbiol.* **299**: 255-268.

Kraiczy P, Seling A, Brisette CA, Rossmann E, Hunfeld K, Bykowski T, Burns LH, Troese MJ, Cooley AE, Miller JC, Brade V, Wallich R, Casjens S, Stevenson B. 2008a. *Borrelia burgdorferi* Complement regulator-acquiring surface protein 2 (CspZ) as a serological marker of human Lyme disease. *Clin Vacc Immunol.* **15**: 484-491.

Kraiczy P, Schreiber J, Skerka C, Haupt K, Brade V, Wallich R, Zipfel PF. 2008b. Assessment of the regions within complement regulator-acquiring surface protein (CRASP)-2 of *Borrelia burgdorferi* required for interaction with host immune regulators FHL-1 and factor H. *Int J Med Microbiol.* **298 S1**: 268-271.

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

Kudryashev M, Cyrklaff M, Baumeister W, Simon MM, Wallich R, Frischknecht F. 2009. Comparative cryo-electron tomography of pathogenic Lyme disease spirochetes. *Mol Microbiol.* **71**: 1415-1434.

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

Kunert A, Losse J, Gruszin C, Hühn M, Kaendler K, Mikkat S, Volke D, Hoffmann R, Jokiranta TS, Seeberger H, Moellmann U, Hellwage J, Zipfel PF. 2007. Immune evasion of the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*: Elongation factor Tuf is a factor H and plasminogen binding protein. *J Immunol.* **179**: 2979-2988.

Kwok SC and Hodges RS. 2004. Stabilizing and destabilizing clusters in the hydrophobic core of long two-stranded α -helical coiled-coils. *J Biol Chem.* **279**: 21576-21588.

Lambris DL, Ricklin D, Geisbrecht BV. 2008. Complement evasion by human pathogens. *Nat Rev Microbiol.* **6**: 132-142.

Lancefield RC. 1962. Current knowledge of type-specific M antigens of group A streptococci. *J Exp Med.* **89**: 307-313.

Lebech AM. 2002. Polymerase chain reaction in diagnosis of *Borrelia burgdorferi* infections and studies on taxonomic classification. *APMIS Suppl.* **105**: 1-40.

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

Lesser R L, Kornmehl E W, Pachner A R, Kattah J, Hedges T R, Newman N M, Ecker P A, Glassman M I. 1990. Neuro-ophthalmologic manifestations of Lyme disease. *Ophthalmology.* **97**: 699-706.

Lu L, Ma Y, Zhang JR. 2006. *Streptococcus pneumoniae* recruits complement factor H through the amino terminus of CbpA. *J Biol Chem* **281**:15464-15474.

Lupas A. 1996. Coiled coils: new structures and new functions. *TIBS* **21**:375-382.

Matsushita M and Fujita T. 1992. Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. *J Exp Med.* **176**: 1497-1502.

Matsushita M and Fujita T. 1995. Cleavage of the third component of complement (C3) by mannose-binding protein-associated serine protease (MASP) with subsequent complement activation. *Immunobiology.* **194**: 443-448.

McDowell JV, Matthew EH, Roger EA, Marconi RT. 2005. Putative coiled-coil structural elements of the BBA68 Protein of Lyme disease spirochetes are required for formation of its factor H binding site. *J Bacteriol.* **187**: 1317-1323.

McDowell JV, Wolfgang J, Senty L, Sundy CM, Noto MJ, Marconi RT. 2004. Demonstration of the involvement of outer surface protein E coiled coil structural domains and higher order structural elements in the binding of infection-induced antibody and the complement-regulatory protein, factor H. *J Immunol.* **173**: 7471-7480.

Medzhitov R and Janeway C Jr. 2000. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev.* **173**: 89-97.

Morfeldt E, Berggard K, Persson J, Drakenberg T, Johnsson E, Lindahl E, Linse S, Lindahl G. 2001. Isolated hypervariable regions derived from streptococcal M proteins specifically bind human C4b-binding protein: Implications for antigenic variation. *J Immunol.* **167**: 3870-3877.

Müller Eberhard HJ. 1985. Introduction and overview. In: *Complement*. Eds. H. J.-Müller Eberhard and P.A.: Miescher, Springer, Berlin, S. 1-5.

Neeleman C, Geelen SP, Aerts PC, Daha MR, Mollnes TE, Roord JJ, Posthuma G, van Dijk H, Fleer A. 1999. Resistance to both complement activation and phagocytosis in type 3 pneumococci is mediated by the binding of complement regulatory protein factor H. *Infect Immun.* **67**: 4517-4524.

Ngampasutadol J, Ram S, Gulati S, Agarwal S, Li C, Visintin A, Monks B, Madico G, Rice PA. 2008. Human factor H interacts selectively with *Neisseria gonorrhoeae* and results in species-specific complement evasion. *J Immunol.* **180**: 3426-3435.

Obonyo M, Munderloh UG, Fingerle V, Wilske B, Kurtti TJ. 1999. *Borrelia burgdorferi* in tick cell culture modulates expression of outer surface proteins A and C in response to temperature. *Infect Immun.* **67**: 443-445.

Oschmann P, Dorndorf W, Wellensiek HJ, Hornik C, Pflughaupt KW. 1998. Stages and syndromes of neuroborreliosis. *J Neurol.* **245**: 262-272.

Oschmann P and Kaiser R. 1999. Clinical Symptoms. In: Lyme Borreliosis and Tick-borne encephalitis, Eds. P. Oschmann, P. Kraiczy, J. Halperin and V. Brade, Uni-Med, Bremen, S. 52-54.

Pangburn MK, Schreiber RD, Müller-Eberhard HJ. 1977. Human complement C3b inactivator: isolation, characterization and demonstration of an absolute requirement for the serum protein beta1H for cleavage of C3b and C4b in solution. *J Exp Med.* **146:** 257-270.

Postic D, Assous MV, Grimont PAD, Baranton G. 1994. Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of *rrf*(5S)-*rrl*(23S) intergenic spacer amplicons. *Int Sys Bacteriol.* **44:** 743-752.

Postic D, Garnier M, Baranton G. 2007. Multilocus sequence analysis of atypical *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates – Description of *Borrelia californiensis* sp. nov., and genomospecies 1 and 2. *Int J Med Microbiol.* **297:** 263-271.

Pfister, H.W., K.W. Einhäupl, V. Preac-Mursic, B. Wilske und G. Schierz. 1984. The spirochetal etiology of lymphocytic meningoradikulitis of Bannwarth (Bannwarth syndrome). *J. Neurol.* **231:** 141-144.

Piesman, J. 1993. Dynamics of *Borrelia burgdorferi* transmission by nymphal *Ixodes dammini* ticks. *J Infect Dis.* **167:** 1082-1085.

Ram S, Sharma AK, Simpson SD, Gulati S, McQuillen DP, Pangburn MK, Rice PA. 1998a. A novel sialic acid binding site on factor H mediates serum resistance of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Exp Med.* **187:** 743-752.

Ram S, McQuillen DP, Gulati S, Elkins C, Pangburn MK, Rice PA. 1998b. Binding of complement factor H to loop 5 of porin protein 1A: A molecular mechanism of serum resistance of nonsialylated *Neisseria gonorrhoeae*. *J Exp Med.* **188:** 671-680.

Ram S, Mackinnon FG, Gulati S, McQuillen DP, Vogel U, Frosch M, Elkins C, Guttormsen HK, Wetzler LM, Oppermann M, Pangburn MK, Rice PA. 1999. The

contrasting mechanisms of serum resistance of *Neisseria gonorrhoeae* and group B *Neisseria meningitidis*. *Mol Immunol.* **36**: 915-928.

Rauteema R and Meri S. 1999. Complement-resistance mechanisms of bacteria. *Microbes Infect.* **1**: 785-794.

Reid KB.1983. Proteins involved in the activation and control of the two pathways of human complement. *Biochem Soc Trans.* **11**:1-12.

Richter D, Schlee D B, Allgöwer R, Matuschka F. 2004. Relationships of a novel Lyme Disease spirochete, *Borrelia spielmanii* sp. nov., with its hosts in central Europe. *Appl. and Envir. Microbiol.* **70**: 6414-6419.

Robert-Koch-Institut. 2005. Neuerkrankungen an Lyme-Borreliose im Jahr 2004 – Analyse auf Basis der Meldedaten aus den sechs östlichen Bundesländern. *Epidemiol Bull.* **32**: 285-288.

Rogers EA, Marconi RT. 2007. Delineation of species-specific binding properties of the CspZ protein (BBH06) of the Lyme disease spirochetes: Evidence for new contributions to *Borrelia* pathogenesis. *Infect Immun.* **11**: 5272-5281.

Rossmann E, Kraiczy P, Herzberger P, Skerka C, Kirschfink M, Simon MM, Zipfel PF, Wallich R. 2007. Dual binding specificity of a *Borrelia hermsii*-associated complement regulator-acquired surface protein for factor H and plasminogen discloses a putative virulence factor of relapsing fever spirochetes. *J Immunol.* **178**: 7292-7301.

Sachs L. 1997. *Angewandte Statistik*, 8. Auflage. Springer Verlag

Sadziene A, Barbour AG, Rosa P, Thomas DD. 1993. An OspB mutant of *Borrelia burgdorferi* has reduced invasiveness in vitro and reduced infectivity in vivo. *Infect Immun.* 1993. **61**: 3590-3596.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.

Schäfer C, Hahn M, Oschmann P. 1999. Tick ecology and epidemiology. In: Lyme Borreliosis and Tick-borne encephalitis, Eds. P. Oschmann, P. Kraiczy, J. Halperin and V. Brade, Uni-Med, Bremen.

Sharma AK, Pangburn MK. 1997. Localization by site-directed mutagenesis of the site in human complement factor H that binds to *Streptococcus pyogenes* M protein. *Infect Immun.* **65**: 484-487.

Schwan TG, Burgdorfer W, Garon CF. 1988. Changes in infectivity and plasmid profile of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, as a result of in vitro cultivation. *Infect Immun* **56**: 1831-1836.

Schwan TG, Piesman J, Golde WT, Dolan MC, Rosa PA. 1995. Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. *Proc Natl Acad Sci USA.* **92**: 2909-2913.

Seshu J and Skare JT. 2000. The many faces of *Borrelia burgdorferi*. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **2**: 463-472.

Siegel C, Schreiber J, Haupt K, Skerka C, Brade V, Simon MM, Stevenson B, Wallich R, Zipfel PF, Kraiczy P. 2008. Deciphering the ligand-binding sites in the *Borrelia burgdorferi* complement regulator-acquiring surface protein 2 required for interactions with the human immune regulators factor H and factor H-like protein 1. *J Biol Chem.* **283**: 34855-34863.

Sigal LH and Curran AS. 1991. Lyme disease: A multifocal worldwide epidemic. *Annu Rev Publ Health.* **12**: 85 –109.

Simon C und Stille W. 2000. Antibiotika-Therapie in Klinik und Praxis. 10. Aufl., Schattauer, Stuttgart, New York.

Steere A C. 1989. Lyme disease. *New Engl J Med.* **9**: 586-596.

Steere A C, Coburn J, Glickstein L. 2004. The emergence of Lyme disease. *J Clin Invest* **113**: 1093-1101.

Stevenson B, Tilly K, Rosa PA. 1996. A family of genes located on four separate 32-kilobase circular plasmids in *Borrelia burgdorferi* B31. *J Bacteriol.* **178**: 3508-3516.

Stevenson B, von Lackum K, Riley SP, Cooley AE, Woodman ME, Bykowski T. 2006. Evolving models of Lyme disease spirochete gene regulation. *Wien Klin Wochenschr.* **118**: 643-652.

Strother KO, Broadwater A, de Silva A. 2005. Plasmid requirements for infection of ticks by *Borrelia burgdorferi*. *Vector Borne Zoonotic Dis* **5**: 237-245.

Thiel S, Vorup-Jensen T, Stover CM, Schwaeble W, Laursen SB, Poulsen K, Willis AC, Eggleton P, Hansen S, Holmskov U, Reid KB, Jensenius JC. 1997. A second serine protease associated with manna-binding lectin that activates complement. *Nature.* **386**: 506-510.

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

Verma A, Hellwage J, Artiushin S, Zipfel PF, Kraiczy P, Timoney JF, Stevenson B. 2006. LfhA, a novel factor H-binding protein of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun.* **74**: 2659-2666.

Von Lackum K, Miller JC, Bykowski T, Riley SP, Woodman ME, Brade V, Kraiczy P, Stevenson B, Wallich R. 2005. *Borrelia burgdorferi* regulates expression of complement regulator acquiring surface-proteine 1 during the mammal-tick infecton cycle. *Infect Immun.* **73**: 7398-7405.

Walport MJ. 2001. Complement. *N Engl J Med.* **344**: 1058-1066.

Wallich R, Pattathu J, Kitiratschky V, Brenner C, Zipfel PF, Brade V, Simon MM, Kraiczy P. 2005. Identification and functional characterization of complement regulator-acquiring surface protein 1 of the Lyme disease spirochetes *Borrelia afzelii* and *Borrelia garinii*. *Infect Immun.* **73**: 2351-2359.

Wang G, van Dam A P, Schwartz I, Dankert J. 1999. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: Taxonomic, epidemiological and clinical implications. *Clin Microbiol Rev.* **12**: 633-653.

Whaley K and Ruddy S. 1976. Modulation of C3b hemolytic activity by a plasma protein distinct from C3b inactivator. *Science* **193**: 1011-1013.

Wikel SK, RN Ramachandra, Bergman DK, Burkot TR, Piesman J. 1997. Infestation with pathogen-free nymphs of ticks *Ixodes scapularis* induces host resistance to transmission of *Borrelia burgdorferi* by ticks. *Infect. Immun.* **65**: 335 -338.

Wilske B, Fingerle V und Schulte-Spechtel U. 2007. Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **49**: 13-21.

Würzner R. 1999. Evasion of pathogens by avoiding recognition or eradication by complement, in part via molecular mimicry. *Mol Immunol.* **36**: 249-260.

Yang X, Popova TG, Goldberg MS, Norgard MV. 2001. Influence of cultivation media on genetic regulatory patterns in *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun.* **69**: 4159-4163.

Zhang JR, Hardham JM, Barbour AG, Norris SJ. 1997. Antigenic variation in Lyme disease borreliae by promiscuous recombination of *Vmp*-like sequence cassettes. *Cell* **89**: 275-285.

Zhang JR and Norris SJ. 1998. Genetic variation of the *Borrelia burgdorferi* gene *vlsE* involves cassette specific, segmental gene conversion. *Infect Immun.* **66**: 3698-3704.

Zipfel PF, Skerka C. 1999. FHL-1/reconectin: A human complement and immune regulator with cell-adhesive function. *Immunol Today* **15**: 121-126.

Zipfel PF, Skerka C, Hellwage J, Jokiranta ST, Meri S, Brade V, Kraiczy P, Noris M, Remuzzi G. 2002. Structure-function studies of the complement system. *Biochem Soc Transactions* **30**: 971-978.

6. Abkürzungsverzeichnis

2 K	2-fach kristallisiert
aa	Aminosäuren
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
Aq. dest.	aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin
cl	zirkuläres Plasmid
CRASP	complement regulator acquiring surface protein
CTP	Cytosintriphosphat
Dpn	<i>Diplococcus pneumoniae</i>
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent Assay
Erp	OspE/F-related protein
FH	Faktor H
FHL-1	Faktor H-like Protein 1
GST	Gluthathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HPLC	high pressure liquid chromatography
HRP	horseradish peroxidase
I.	<i>Ixodes</i>
IPTG	Isopropylthiogalactosid
Kat.Nr.	Katalog-Nummer
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
lp	lineares Plasmid
MASP	MBL-associated serin protease
MBL	mannose binding lectin
NHS	normales humanes Serum
OD	optische Dichte
Osp	outer surface protein
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
rpm	rotations per minute
s.l.	sensu lato
s.s.	sensu stricto
SCR	Short consensus repeat
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TBS	Tris buffered saline
TCC	Terminal complement complex
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMB	3,3',5,5' Tetramethylbenzidin
TTP	Thymidintriphosphat
YT	Yeast Tryptone
ZT	Zimmertemperatur

7. Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

7.1 Tabellen

Tab. 1.1: Taxonomie der Borrelien

Tab. 1.2: Stadien der Lyme-Borreliose

Tab. 2.1: Tabelle der durch in vitro Mutagenese generierten Mutanten

Tab. 2.2: Tabelle der Basisvektoren

Tab. 2.3: Tabelle der generierten Vektoren

Tab. 2.4: Tabelle der Oligonukleotide

Tab. 2.5: Tabelle der Chemikalien und Substanzen

Tab. 2.6: Tabelle der primären Antikörper

Tab. 2.7: Tabelle der sekundären Antikörper

Tab. 3.1: Zusammenfassung der Bindungsintensitäten aller mutierten BbCRASP-2 Proteine

Tab. 4.1: Interaktion bakterieller Oberflächenproteine mit Faktor H und FHL-1

7.2 Abbildungen

Abb. 1.1: Morphologie von Borrelienzellen

Abb. 1.2: Zwei-Stufen-Schema der Diagnostik bei Verdacht auf Lyme-Borreliose

Abb. 1.3: Aktivierungsschritte des Komplementsystems (vereinfacht).

Abb. 1.4: Struktur von Faktor H und FHL-1

Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Regulation von Komplementaktivierung des alternativen Weges durch Faktor H / FHL-1

Abb. 1.6: Identifizierung der CRASP-Proteine bei *B. afzelii* und *B. burgdorferi* s.s. sowie *B. garinii* mittels Ligandenaffinitätsblot-Analyse

Abb. 1.7: Identifizierung von potenziellen Bindungsregionen für Faktor H und FHL-1 im BbCRASP-2 Protein

Abb. 1.8: Identifizierung der mit BbCRASP-2 interagierenden SCR-Domänen von Faktor H und FHL-1

Abb. 3.1: Nachweis der Bindung von Faktor H und FHL-1 an rekombinantes BbCRASP-2 Fusionsprotein

Abb. 3.2: Nukleotid- und Aminosäuresequenz des BbCRASP-2 kodierenden *cspZ* Gens mit Darstellung der vier potenziellen Faktor H/FHL-1 Bindungsregionen

Abb. 3.3: Potenzielle Bindungsregion 2 von BbCRASP-2

Abb. 3.4: Beispiel einer Western- und Ligandenaffinitätsblot-Analyse von drei verschiedenen Mutagenese-Ansätzen

Abb. 3.5: Western- und Ligandenaffinitätsblot-Analyse der Bindungsregion 2 in BbCRASP-2.

Abb. 3.6: Analyse der Bindung von Faktor H und FHL-1 an BbCRASP-2 Mutanten mittels ELISA (putative Bindungsregion 2)

Abb. 3.7: Potenzielle Bindungsregion 3 von BbCRASP-2

Abb. 3.8: Western- und Ligandenaffinitätsblot-Analyse der Bindungsregion 3 in BbCRASP-2

Abb. 3.9: Analyse der Bindung von Faktor H und FHL-1 an BbCRASP-2 Mutanten mittels ELISA (putative Bindungsregion 3)

Abb. 3.10: Potenzielle Bindungsregion 4 von BbCRASP-2

Abb. 3.11: Westernblot- und Ligandenaffinitätsblot-Analyse der Region 4 in BbCRASP-2

Abb. 3.12: Analyse der Bindung von Faktor H und FHL-1 an BbCRASP-2 Mutanten mittels ELISA (putative Bindungsregion 4)

Abb. 3.13: Potenzielle coiled-coil-Region innerhalb des BbCRASP-2-Proteins

Abb. 3.14: Westernblot- und Ligandenaffinitätsblot-Analyse der putativen coiled-coil-Region in BbCRASP-2

Abb. 3.15: Nachweis der Bindung von Faktor H und FHL-1 an BbCRASP-2 Mutanten mittels ELISA (putative coiled-coil-Region)

Abb. 4.1: Lokalisation der CRASP kodierenden Gene von *B. burgdorferi* s.s. B31

Abb. 4.2: Vergleich der Aminosäuresequenz von BbCRASP-2-Proteinen verschiedener Borrelienisolate

8. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. phil. nat. Peter Kraiczky, der mich hervorragend anleitete und stets mit Rat und Unterstützung zur Seite stand. Seiner Förderung ist das Gelingen dieser Arbeit zu verdanken.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. med Volker Brade, Leiter des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der Universität Frankfurt, derzeit im Ruhestand, der mein Interesse für das Thema Borrelien weckte und die Arbeit an seinem Institut ermöglichte.

Außerdem möchte ich mich bei Christa Hanssen-Hübner bedanken, die mich in Labortechniken anleitete und stets zur Verfügung stand, sowie Denia Frank, die mir bei der Einarbeitung sehr behilflich war.

Ferner möchte ich Prof. Dr. Peter.F. Zipfel, Prof. Dr. Brian Stevenson, PD Dr. Christine Skerka, PD Dr. Bettina Wilske, Dr. Volker Fingerle und Corinna Siegel danken für die vielen zur Verfügung gestellten Informationen und Materialien.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich immer wieder durch ihr Interesse bestärkt haben.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

„Analyse des molekularen Bindungsmechanismus zwischen BbCRASP-2 von *Borrelia burgdorferi* und den Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1“

im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

unter der Leitung von Professor Peter Kraiczy

mit Unterstützung durch Professor Peter Kraiczy

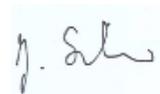
ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde in keinem Publikationsorgan veröffentlicht.

Frankfurt, den 04.03.2011



Unterschrift

Lebenslauf

