

**Rekrutierung von Komplementregulatoren  
der Faktor H Proteinfamilie  
als Mechanismen der Immunevasion humanpathogener Erreger**

**Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades *doctor rerum naturalium* (Dr. rer. nat.)**

**vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Diplom-Biologin Katrin Haupt**

**geboren am 25. Juli 1978 in Dresden**

Gutachter:

**Prof. Dr. Peter F. Zipfel**

Leibniz Institut für Naturstoff-Forschung und  
Infektionsbiologie – Hans-Knöll-Institut  
Beutenbergstr. 11a  
07745 Jena

**Prof. Dr. Thomas Kamradt**

Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität  
Institut für Immunologie  
Leutragraben 3  
07743 Jena

**Prof. Dr. Markus M. Simon**

Max-Planck-Institut für Immunbiologie  
Stübeweg 51  
79108 Freiburg

Tag der Disputation: 1. April 2008

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen</b> .....	<b>3</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>5</b>
<b>Einleitung</b> .....	<b>9</b>
<b>1 Das Komplementsystem</b> .....	<b>9</b>
<b>1.1 Historie und Überblick</b> .....	<b>9</b>
<b>1.2 Aktivierung des Komplementsystems</b> .....	<b>11</b>
<i>Der alternative Komplementweg</i> .....	<i>11</i>
<i>Der klassische Komplementweg</i> .....	<i>12</i>
<i>Der Lektin-Komplementweg</i> .....	<i>13</i>
<i>Der terminale Komplementweg</i> .....	<i>13</i>
<b>1.3 Regulation des Komplementsystems</b> .....	<b>14</b>
<b>1.4 Die Faktor H Proteinfamilie</b> .....	<b>17</b>
<i>Faktor H</i> .....	<i>17</i>
<i>Faktor H-verwandte Proteine</i> .....	<i>20</i>
<i>FHL-1</i> .....	<i>22</i>
<b>2 Wirts-Pathogen Interaktionen</b> .....	<b>22</b>
<b>2.1 Komplementevasionsstrategien humanpathogener Mikroorganismen</b> .....	<b>23</b>
<b>2.2 Pathogene nutzen Komplementregulatoren des Wirtes</b> .....	<b>25</b>
<b>3 Ausgewählte bakterielle Pathogene</b> .....	<b>28</b>
<b>3.1 <i>Borrelia burgdorferi</i></b> .....	<b>28</b>
<i>Biologie</i> .....	<i>28</i>
<i>Pathogenese und Krankheitsbild</i> .....	<i>29</i>
<i>Immunevasion</i> .....	<i>31</i>
<b>3.2 <i>Staphylococcus aureus</i></b> .....	<b>33</b>
<i>Biologie</i> .....	<i>33</i>
<i>Pathogenese und Krankheitsbild</i> .....	<i>34</i>
<i>Immunevasion</i> .....	<i>35</i>
<b>4 Fragestellung</b> .....	<b>40</b>
<b>Übersicht zu den Manuskripten</b> .....	<b>41</b>

<b>Manuskripte .....</b>	<b>44</b>
<b>1 Haupt K, Kraiczy P, Wallich R, Brade V, Skerka C, Zipfel PF. Binding of Human Factor H-Related Protein 1 to Serum-Resistant <i>Borrelia burgdorferi</i> is Mediated by Borrelial Complement Regulator-Acquiring Surface Proteins. J Inf Dis 2007; 196:124-33.....</b>	<b>44</b>
<b>2 Haupt K, Kraiczy P, Wallich R, Brade V, Skerka C, Zipfel PF. FHR-1, an additional human plasma protein, binds to complement regulator-acquiring surface proteins of <i>Borrelia burgdorferi</i>. (zur Publikation angenommen bei International Journal of Medical Microbiology) .....</b>	<b>54</b>
<b>3 Kraiczy P, Schreiber J, Skerka C, Haupt K, Brade V, Wallich R, Zipfel PF. Assessment of the regions within complement regulator-acquiring surface protein (CRASP)-2 of <i>Borrelia burgdorferi</i> required for interaction with host immune regulators FHL-1 and factor H. (zur Publikation angenommen bei International Journal of Medical Microbiology) .....</b>	<b>60</b>
<b>4 Haupt K, van den Elsen J, Burman J, Hälbig S, Reuter M, Richter J, Skerka C, Zipfel PF. The <i>Staphylococcus aureus</i> protein Sbi acts as a complement inhibitor and forms a ternary complex with host complement Factor H and C3b. (in Überarbeitung für PLoS Pathogens).....</b>	<b>64</b>
<b>Diskussion.....</b>	<b>75</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>86</b>
<b>Vorträge und Poster .....</b>	<b>101</b>
<b>Eigenständigkeitserklärung.....</b>	<b>102</b>
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>103</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>104</b>
<b>Anhänge.....</b>	<b>105</b>

## Abkürzungen

Die physikalischen und chemischen Einheiten sind im SI-Standard angegeben. Die Bezeichnung einzelner Aminosäuren erfolgt im Drei-Buchstaben-Code. Es werden Standardabkürzungen für Chemikalien und Verbindungen benutzt.

Å	Ångström (1 Å = 100 pm)
Abb.	Abbildung
AG	Antigen
aHUS	atypisches hämolytisch-urämisches Syndrom
AK	Antikörper
ARMD	„Age-related Macula Degeneration“
C1-INH	C1 Inhibitor
ca.	circa
CEWA	„Combined ELISA Western blot assay“
CD	„Cluster of Differentiation“
CHIPS	„Chemotaxis inhibitory protein of <i>Staphylococcus aureus</i> “
ClfA	„Clumping factor A“
cp	„circular plasmid“
CR	„Complement receptor“
CRASP	„Complement regulator-acquiring surface protein“
CRIT	„Complement C2 Receptor Trispanning“
CRP	C-reaktives Protein
DAF	„Decay accelerating factor“
d.h.	das heißt
Dpb	„Decorin-binding protein“
Eap	„Extracellular adherence protein“
Ecb	„Extracellular complement-binding protein“
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECM	„Extracellular Matrix“
Efb	„Extracellular fibrinogen-binding protein“
Ehp	„Efb homology protein“
ELISA	„Enzyme-linked immunosorbent assay“
FALP	„FHRP-associated lipoprotein particle“
Fba	„Fibrinogen binding protein“
Fhb	„Factor H-binding protein“
FHL-1	„Factor H-like protein“-1
FHR	„Factor H-related protein“
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
gp	Glykoprotein
Gpm1	Phosphoglyceratmutase 1
Hic	„Factor H-binding inhibitor of complement“
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	„Human leukocyte antigen“
hLFA-1	„human leukocyte function-associated antigen“-1

iC3b	inaktiviertes C3b
ICAM-1	„Intercellular Adherence Molecule“-1
IEC	„Immune Evasion Cluster“
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton (1/12 der Masse des Kohlenstoff-Isotops <sup>12</sup> C)
LBP	Lipopolysaccharid bindendes Protein
Len	„Leptospiral endostatin-like protein“
LfhA	„Leptospiral factor H-binding protein A“
lp	„linear plasmid“
MAC	„Membrane Attack Complex“
MAP	„Mitogen-activated protein“
MASP	„MBL-associated serin protease“
Mb	Megabasenpaare
MBL	Mannan bindendes Lektin
MHC	„Major histocompatibility complex“
MCP	„Membrane Cofactor Protein“
MPGNII	Membranproliferative Glomerulonephritis Typ II
MRSA	Methicillinresistente (oder multiresistente) <i>Staphylococcus aureus</i>
MSCRAMM	„Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules“
MW	„molecular weight“
NFκB	Nuklearer Faktor κB
NS1	„Nonstructural protein 1“
PaAP	Alkalinprotease von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PaE	Elastase von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PL	Plasmin
PLG	Plasminogen
Por	Porinprotein
PspC	„Pneumococcal surface protein C“
Omp	„Outer membrane protein“
Osp	„Outer surface protein“
RCA	„Regulators of Complement Activation“
SAK	Staphylokinase
Sbi	„Staphylococcal binder of immunoglobulins“
SCIN	„Staphylococcal complement inhibitor“
Scl1	„Streptococcal collagen-like protein 1“
SCR	„Short Consensus Repeat“
sMAP	„smallMBL-associated protein“
sog.	so genannt
SpA	Protein A
SSL-7	„Staphylococcal Superantigen-like“-7
SSSS	„Staphylococcal scalded skin syndrome“
Tab.	Tabelle
TLR	„Toll-like receptor“
TSST-1	„Toxic shock syndrome toxin“-1
Tuf	Transkriptionselongationsfaktor
u.a.	und andere
VCP	„Vaccinia Virus Complement-Control Protein“
VlsE	„Variable major protein-like sequence E“
Yad	„ <i>Yersinia</i> adhesin“
Yop	„ <i>Yersinia</i> outer protein“

## Zusammenfassung

Das Komplementsystem ist ein wesentlicher Bestandteil der angeborenen Immunität des Menschen. In den Organismus eingedrungene Mikroorganismen werden vom Komplementsystem als „fremd“ erkannt und durch Opsonisierung, Phagozytose oder Lyse eliminiert. Die Aktivierung dieses Effektorsystems erfolgt über drei verschiedene Wege, den alternativen Weg, den klassischen Weg und den Lektin-Weg und führt über den terminalen Weg zur Ausbildung des Membranangriffskomplexes. Um gesunde körpereigene Zellen zu schützen, ist die Aktivierung des Komplementsystems durch Membran gebundene oder im Plasma gelöste Regulatorproteine streng reguliert. Der wichtigste Komplementregulator des alternativen Komplementwegs ist Faktor H. Das Plasmaprotein inhibiert die Komplementkaskade sowohl im Plasma als auch auf körpereigenen Oberflächen, indem es als Kofaktor für die Faktor I vermittelte Spaltung von C3b agiert und den Zerfall der C3-Konvertase des alternativen Wegs, C3bBb, beschleunigt. Pathogene nutzen die Regulationsmechanismen des Komplementsystems zum eigenen Vorteil, um sich vor dem Angriff des Komplementsystems zu schützen, indem sie Wirtsregulatoren, wie z.B. Faktor H und FHL-1 rekrutieren und an Oberflächenproteine binden. Die Komplement inhibitorische Funktion von Faktor H verhindert die Aktivierung der Komplementkaskade auf der Erregeroberfläche und das Pathogen überlebt.

In der vorliegenden Dissertation wurden die Komplementevasionsmechanismen an zwei bedeutenden humanpathogenen Bakterien, *Borrelia burgdorferi* und *Staphylococcus aureus*, untersucht. Zum ersten Mal wurde die Bindung von FHR-1 an Pathogene gezeigt. FHR-1 bindet als weiteres Mitglied der Faktor H Proteinfamilie neben Faktor H und FHL-1 an *B. burgdorferi*. Darüber hinaus wurde die Bindung von zwei FHRs der Maus an die Oberfläche von *B. burgdorferi* gezeigt. *B. burgdorferi* exprimiert fünf verschiedene „Complement regulator-acquiring surface proteins“ (CRASPs), die Faktor H und FHL-1 binden. CRASP-3, CRASP-4 und CRASP-5 wurden als FHR-1 Liganden identifiziert. Vergleichende Bindungsstudien ergaben, dass die drei Wirtsproteine FHR-1, Faktor H und FHL-1 distinkte Bindeprofile für die fünf CRASPs von *B. burgdorferi* aufweisen und unterschiedlich stark binden. FHR-1 bindet an CRASP-3, CRASP-4 und CRASP-5, Faktor H interagiert mit allen fünf CRASPs und FHL-1 bindet an CRASP-1 und CRASP-2. Demzufolge ist *B. burgdorferi* in der Lage ein spezifisches Set an Komplementregulatoren an die Oberfläche zu binden. Des

Weiteren wurden fünf Aminosäuren in drei von insgesamt vier Faktor H/FHL-1 Binderegionen in CRASP-2 durch *in-vitro* Mutagenese identifiziert, die für die Faktor H und FHL-1 Bindung entscheidend sind. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Interaktion mit Faktor H wie bei CRASP-1 diskontinuierlich ist und mehrere über CRASP-2 verteilte Binderegionen involviert sind. Die Komplement regulatorische Funktion von CRASP gebundenem Faktor H korreliert mit der Bindungsstärke und ist am stärksten, wenn Faktor H an CRASP-1 und CRASP-5 gebunden hat. FHR-1 bindet mit der gleichen C-terminalen Bindedomäne an CRASPs wie Faktor H, konkurriert mit Faktor H um die Bindung an CRASP-3 und CRASP-5 und vermindert dadurch die Faktor H vermittelte Spaltung von C3b. FHR-1 hat somit eine inhibierende Wirkung auf die Komplement regulatorische Funktion von Faktor H bei der Bindung an CRASPs von *B. burgdorferi*.

Erstmalig wurde in dieser Arbeit die Bindung von Faktor H und FHR-1 an *S. aureus* gezeigt und das bakterielle Protein Sbi als Bindeprotein identifiziert. Das multifunktionale *S. aureus* Protein Sbi bindet Faktor H über einen neuen Mechanismus. Sbi formt mit den Komplementproteinen Faktor H und den C3 Spaltprodukten C3b oder C3d einen ternären Komplex. Faktor H hat innerhalb dieses Komplexes Kofaktoraktivität für Faktor I bei der Degradation von C3b. Sbi agiert als Komplementinhibitor des alternativen Wegs. Das Staphylokokkenprotein verhindert die Lyse von Kaninchenerythrozyten in humanem Serum über den alternativen Weg. Dieser inhibitorische Effekt zeigt, dass Faktor H gebunden an Sbi die C3-Konvertase des alternativen Weges inhibiert.

Diese Arbeit gibt Aufschluss über die Interaktion zwischen den Komplementregulatoren Faktor H, FHR-1 und FHL-1 und bakteriellen Proteinen der Krankheitserreger *B. burgdorferi* und *S. aureus* und identifiziert die Rekrutierung wirtseigener Regulatorproteine als allgemeines Prinzip der Komplementevasion von Krankheitserregern.



## Summary

The complement system is an important part of the human innate immunity. Invading microorganisms are recognized by the complement system as foreign and are eliminated by opsonization, phagocytosis and lysis. The complement system is activated through three different pathways, the alternative, the classical and the lectin pathway and leads to the formation of the membrane attack complex via the terminal pathway. To protect intact host cells the activation of complement is tightly regulated by membrane bound and soluble regulators. The most important complement regulator of the alternative pathway is factor H. The plasma protein inhibits the complement cascade in fluid phase and on host surfaces by acting as cofactor for factor I mediated cleavage of C3b and by accelerating the decay of the C3 convertase of the alternative pathway, C3bBb. Pathogens utilize the regulatory mechanisms of the complement system to protect themselves from complement attack by acquisition of the host regulators Factor H and FHL-1 to the surface of a pathogen. Bound Factor H and FHL-1 retain their complement inhibitory function and prevent activation of the complement cascade on the surface of a pathogen, which leads to survival of the pathogen.

In this thesis complement evasion mechanisms of the two important human pathogenic bacteria *Borrelia burgdorferi* and *Staphylococcus aureus* have been studied. For the first time binding of FHR-1 to the surface of a pathogen was shown. FHR-1, an additional member of the Factor H protein family, binds to *B. burgdorferi*. In addition, two murine FHRs bind to the surface of *B. burgdorferi*. *B. burgdorferi* expresses five distinct complement regulator-acquiring surface proteins (CRASPs), which bind Factor H and FHL-1. CRASP-3, CRASP-4 and CRASP-5 have been identified as ligands for FHR-1. Comparative binding studies revealed distinct binding profiles of the three host proteins FHR-1, Factor H and FHL-1 to the five CRASPs of *B. burgdorferi*. FHR-1 binds to CRASP-3, CRASP-4 and CRASP-5, Factor H interacts with all five CRASPs and FHL-1 binds to CRASP-1 and CRASP-2. Therefore, *B. burgdorferi* can attach a specific set of complement regulators to its surface. Besides, five amino acid residues were identified in the CRASP-2 sequence using site-directed mutagenesis, which are located in three of four Factor H/FHL-1 binding regions and which are essential for Factor H and FHL-1 binding. These results show, that interaction with Factor H is discontinuous and several binding sites on the CRASP-2 sequence are involved similar as in CRASP-1. The complement regulatory function of CRASP-bound Factor H correlates with

the binding intensity and was most prominent for Factor H bound to CRASP-1 and CRASP-5. The C-terminus of both FHR-1 and Factor H is involved in CRASP binding. FHR-1 competes with Factor H for binding to CRASP-3 and CRASP-5 and thereby inhibits Factor H mediated cleavage of C3b. Thus, FHR-1 affects the complement regulatory function of Factor H in binding to CRASPs of *B. burgdorferi*.

For the first time binding of Factor H and FHR-1 to intact *S. aureus* was shown. The bacterial protein Sbi was identified as ligand for Factor H and FHR-1. The multifunctional Sbi protein binds Factor H by a new mechanism. Sbi and the complement proteins Factor H and the C3 cleavage products C3b or C3d form a ternary complex. Factor H retains functional active within the ternary complex. Sbi is a complement inhibitor of the alternative pathway. The staphylococcal protein inhibits the alternative pathway mediated lysis of rabbit erythrocytes in human serum. This inhibitory effect shows, that Factor H bound to Sbi inhibits the C3 convertase of the alternative pathway.

Taken together, this thesis contributes to shed light on the interaction between the complement regulators Factor H, FHR-1 and FHL-1 and bacterial proteins of the pathogens *B. burgdorferi* and *S. aureus* and identifies the acquisition of host regulators as a common principle of complement evasion of pathogens.

## Einleitung

### 1 Das Komplementsystem

#### 1.1 Historie und Überblick

Das Komplementsystem des Menschen ist Teil der angeborenen Immunabwehr und kann innerhalb weniger Sekunden in den Organismus eingedrungene Mikroorganismen oder veränderte körpereigene Zellen erkennen und beseitigen. Die Existenz dieses zentralen und entscheidenden humoralen Effektorsystems ist seit über einem Jahrhundert bekannt. Im Jahre 1888 machte der britische Parasitologe George H. F. Nuttall die Beobachtung, dass Schafsblut eine bakterizide Wirkung gegen *Bacillus anthracis*, den Erreger des Milzbrandes, aufwies, die jedoch durch Hitzeinaktivierung verloren ging (12). Diese hitzelabile bakterizide Aktivität wurde als „Alexin“ bezeichnet. Im Gegensatz dazu hatte Hitze inaktiviertes Serum von Meerschweinchen, die an Cholera erkrankt und genesen waren, eine schützende Wirkung auf gesunde Tiere, die gleichzeitig mit dem Choleraerreger *Vibrio cholerae* infiziert wurden. Der belgische Biologe Jules J. B. V. Bordet schlussfolgerte daraufhin, dass die antibakterielle Aktivität zum einen von hitzestabilen Substanzen aus Immuserum, die heute als Antikörper bekannt sind, und von hitzelabilen Komponenten aus Präimmuserum oder Immuserum, dem sog. „Alexin“ abhängig ist (9). Er gilt als Entdecker des Komplementsystems, ein Begriff der von Paul Ehrlich geprägt wurde, da es die antibakterielle Wirkung von Antikörpern komplementiert. Bald darauf wurde bekannt, dass das Komplementsystem auch durch Hefen oder das Gift der Kobra unabhängig von Antikörpern aktiviert werden konnte. In den 20er Jahren des 20. Jhd. wurden vier Komplementproteine (C1, C2, C3, C4) identifiziert, die nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung durchnummeriert wurden (18).

Bis heute sind mehr als 30 Plasma- und membranständige Proteine bekannt. Einige von ihnen sind Serinproteasen, die selbst durch enzymatische Spaltung aktiviert werden. Somit wird das Komplementsystem über sog. „triggered-enzyme“ Kaskaden analog zur Blutgerinnungskaskade sequentiell aktiviert. Die Aktivierung des Komplementsystems kann über drei verschiedene Reaktionswege erfolgen, den klassischen Weg, welcher als erstes entdeckt wurde und durch die Bindung von Antikörpern an Zelloberflächen eingeleitet wird, den Lektin-Weg, bei dem als Initiationsschritt Lektin an Mannose-Reste auf Bakterien bindet,

und den alternativen Weg, der durch spontane Hydrolyse von C3 ausgelöst wird. Alle drei Aktivierungswege konvergieren auf der Ebene der zentralen Komplementkomponente C3, führen zur enzymatischen Spaltung von C3 durch die C3-Konvertase und münden in den terminalen Komplementweg. An dessen Ende steht der Aufbau eines lipophilen Multiproteinkomplexes, der Membranangriffskomplex (MAC, „Membrane Attack Complex“), welcher eine Pore in der Membran der Zielzelle bildet und so zur osmotischen Lyse führt. Die drei Aktivierungswege und die Termination der Komplementkaskade sind in Abb. 1 dargestellt. Die biochemischen Abläufe dieser Reaktionswege werden in Kapitel 1.2 ausführlich beschrieben.

Da die Komplementwege aus einer Abfolge von Proteasen aufgebaut sind und somit jedes einzelne Enzym mehrere Substratmoleküle umsetzt, birgt das Komplementsystem ein enormes Amplifikationspotential. Des Weiteren muss gewährleistet sein, dass das Komplementsystem ausschließlich auf Mikroorganismen und abgestorbenen oder veränderten Zellen aktiviert wird. Um eine Über- oder Fehlreaktion zu verhindern, ist eine strenge Regulation bestimmter Aktivierungsschritte durch Kontrollproteine, die auf Zelloberflächen gebunden sind oder gelöst im Plasma vorliegen, essenziell. Auf die Regulationsmechanismen im Komplementsystem wird in Kapitel 1.3 umfassend eingegangen. Da das Hauptaugenmerk dieser Arbeit auf den Regulatoren der Faktor H Proteinfamilie liegt, werden diese Plasmaproteine in Kapitel 1.4 explizit beschrieben.

Das Komplementsystem gehört als humorales Effektorsystem zur ersten Verteidigungslinie gegen Infektionen. Dessen Aktivierung führt zur Markierung (Opsonisierung) von Zielzellen, z.B. Mikroorganismen, für Phagozyten, zur direkten Lyse von Zielzellen und zur Aktivierung und Mobilisierung inflammatorischer Zellen, z.B. Makrophagen und Neutrophilen. Darüber hinaus verbindet das Komplementsystem die angeborene mit der adaptiven Immunabwehr, indem es die Antikörperantwort von B-Lymphozyten sowie das immunologische Gedächtnis verstärkt und zusammen mit den Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLR, „Toll-like receptor“) die Zytokinantwort moduliert (69). Komplement ist ebenso daran beteiligt Immunkomplexe und apoptotische Zellen aus dem Gewebe zu entfernen (18, 226).

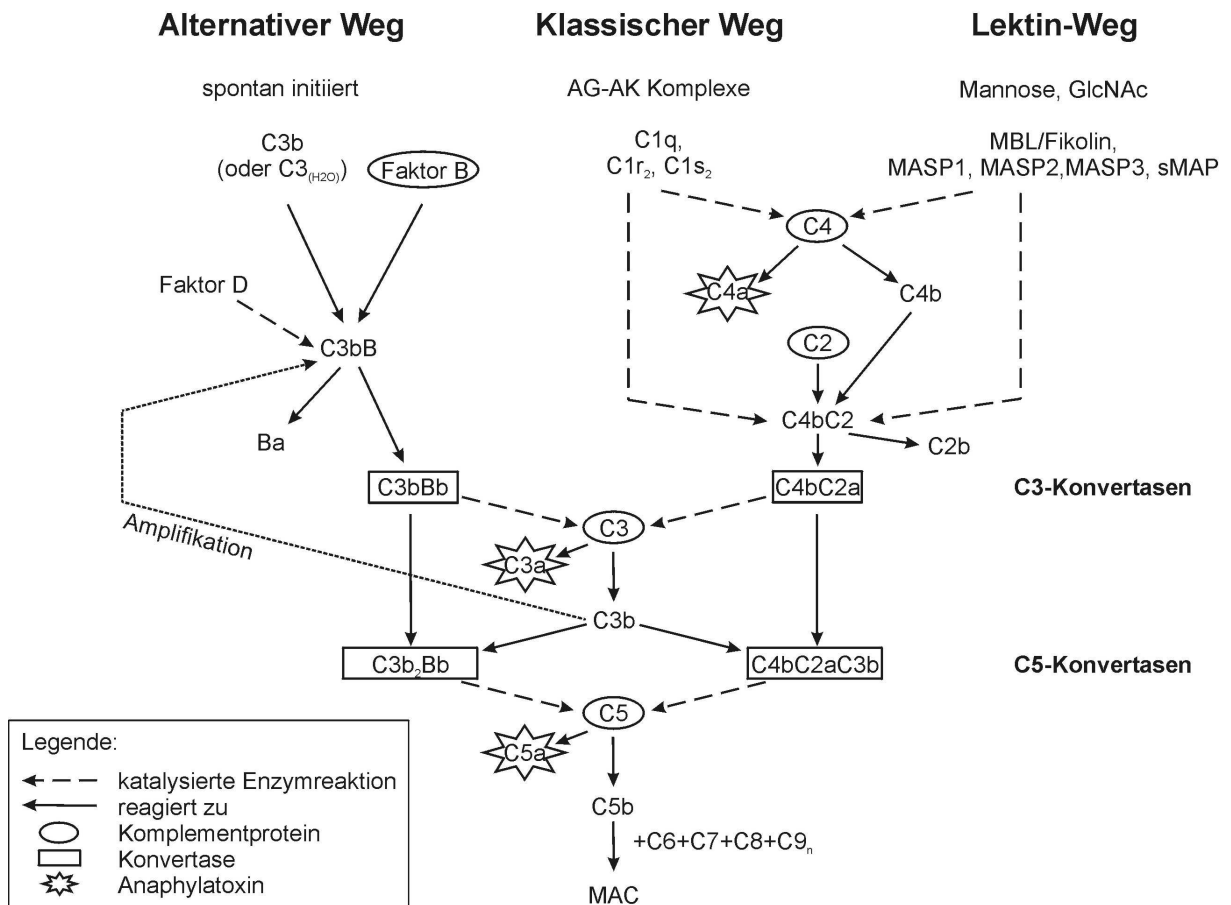


Abbildung 1: Die Komplementkaskade. Die drei Wege der Komplementaktivierung unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Initiation, konvergieren jedoch auf Ebene der C3 Aktivierung zu C3b und leiten die Bildung des Membranangriffskomplexes (MAC) ein. AG-AK Komplexe: Antigen-Antikörper Komplexe, GlcNAc: N-Acetylglukosamin, MBL: Mannan bindendes Lektin, MASP: Mannan assoziierte Serinprotease

## 1.2 Aktivierung des Komplementsystems

### Der alternative Komplementweg

Der alternative Komplementweg wurde ursprünglich von Louis Pillemer als Properdin-Weg bezeichnet, da er entdeckt hatte, dass Properdin gebunden an Bakterien oder Hefezellen unabhängig von Antikörpern Komplement aktiviert (166). Später wurde dieser Aktivierungsweg in alternativer Weg umbenannt, da er als zweiter nach dem klassischen Weg entdeckt wurde. Der alternative Weg wird im Plasma spontan initiiert und ist deshalb kontinuierlich aber in geringer Rate aktiv (155). Die Enzymkaskade des alternativen Weges beginnt direkt mit dem zentralen 190-kDa Komplementprotein C3, das aus zwei Proteinketten, der 110-kDa  $\alpha$ -Kette und der 75-kDa  $\beta$ -Kette besteht. Beide Ketten sind über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden. C3 liegt im Plasma in einer Konzentration von

1000-1600  $\mu\text{g/ml}$  vor (143). Durch die spontane Hydrolyse der Thioesterbindung in C3 entsteht C3(H<sub>2</sub>O), welches durch seine veränderte Konformation die Bindung von Faktor B ermöglicht (156). Dieser Prozess ist Mg<sup>2+</sup>-abhängig. Innerhalb des Proteinkomplexes wird Faktor B durch die Plasmaserinprotease Faktor D in die Fragmente Bb and Ba gespalten, wobei Bb an C3(H<sub>2</sub>O) im Plasma gebunden bleibt und so eine lösliche C3-Konvertase, C3(H<sub>2</sub>O)Bb, bildet. Diese Konvertase ist in der Lage C3 in C3b und C3a zu spalten. Letzteres ist ein sog. Anaphylatoxin, das als N-terminales Fragment von der C3  $\alpha$ -Kette abgespalten wird (84). C3a wird schnell durch Abspaltung der C-terminalen Aminosäure Arginin in seine inerte Form, C3a-desArg, umgewandelt. Gebildetes C3b wird ebenfalls unverzüglich durch Hydrolyse der Thioestergruppe inaktiviert oder bindet kovalent über die reaktive Thioestergruppe, deren Halbwertszeit 60  $\mu\text{s}$  beträgt, an Oberflächen (197). Ist C3b dabei an Aktivatoroberflächen, z. B. mikrobielle Oberflächenstrukturen (LPS, Teichonsäuren, Zymosan u.a.), Erythrozyten von Kaninchen, Hühnern und Mäusen oder Kohlehydrate (18), gebundenen, akquiriert C3b Faktor B, der wiederum durch Faktor D gespalten wird. Die so auf der Oberfläche gebildete C3-Konvertase des alternativen Weges, C3bBb, wandelt weiter C3 Moleküle in aktives C3b um, das sich in großer Zahl auf der Zelloberfläche ablagert und wiederum C3-Konvertasen generieren kann (117, 144). Properdin stabilisiert die C3-Konvertase des alternativen Weges und verhindert so den intrinsischen Abbau des C3bBb Komplexes (46). Dadurch ist das Enzym länger aktiv und der Effekt der positiven Rückkopplungsreaktion wird verstärkt (138). Innerhalb von fünf Minuten kann eine Oberfläche von mehr als zwei Millionen C3b Molekülen beladen sein (18).

### *Der klassische Komplementweg*

Die Aktivierung des klassischen Komplementwegs wird durch die Antigen spezifische Bindung von Antikörpern an Oberflächenstrukturen induziert. Gebundene Antikörper werden von dem hexameren Initiator-molekül C1q erkannt, das mit je zwei C1r und C1s Molekülen assoziiert ist (123, 236). Die Stabilität des C1-Komplexes ist Ca<sup>2+</sup>-abhängig. Dabei bindet die globuläre Kopffregion einer C1q-Untereinheit an den Fc Teil eines Immunglobulins (IgM, IgG). Die sechs Untereinheiten sind über Kollagen ähnliche Domänen miteinander verbunden und bilden eine „Tulpenstrauß“ förmige Struktur. Haben mehr als eine Kopffregion eines C1q Moleküls Kontakt zu Immunglobulinen, kommt es zur Konformationsänderung und autokatalytischen Aktivierung von C1r, welches wiederum C1s spaltet und aktiviert (39). Die Substrate der aktivierten Serinprotease C1s sind die Komplementkomponenten C4 und C2. Durch die Spaltung von C4 wird C4b, das kovalent an Aktivatoroberflächen bindet, und der

schwach wirksame Entzündungsmediator C4a gebildet (38, 130). An das gebundene C4b heftet sich ein C2 Molekül, welches durch C1s in das größere C2a und das kleinere C2b Fragment umgewandelt wird (145, 147). Dabei entsteht die C3-Konvertase des klassischen Wegs, C4bC2a, die für die Spaltung von C3 und die damit verbundene Ablagerung des Oponins C3b auf der Oberfläche zum Beispiel eines Pathogens verantwortlich ist (24). Wie auch im alternativen Weg entsteht hierbei das Anaphylatoxin C3a.

### *Der Lektin-Komplementweg*

Der Lektin-Komplementweg wurde als dritter Aktivierungsweg des Komplementsystems identifiziert, ist aber entwicklungsgeschichtlich betrachtet älter als der klassische Weg (37). Mannose-bindendes Lektin (MBL) erkennt spezifisch endständige Mannosestrukturen auf mikrobiellen Oberflächen (127, 151). Homolog zu C1q besteht MBL aus zwei bis sechs globulären Kopfdomänen, die einen Komplex mit drei verschiedenen MBL-assoziierten Serinproteasen (MASP-1, MASP-2 und MASP-3) und einem verkürzten MASP-2 Protein, dem „smallMBL-associated protein“ (sMAP), bilden (29, 132, 215, 218). Es ist anzunehmen, dass C1r, C1s und die MASPs durch Genduplikation aus einem gemeinsamen Vorläufermolekül entstanden sind. Im Gegensatz zu C1r ist die Funktion von MASP-1, MASP-3 und sMAP noch unklar. Es ist bekannt, dass MASP-1 *in vitro* C3 spaltet. Im Tiermodell spielen MASP-1 und MASP-3 eine wichtige Rolle bei der Ablagerung von C3b auf Oberflächen (216). Wenn der MBL-Komplex an eine mikrobielle Oberfläche gebunden hat, ist MASP-2 vergleichbar mit C1s für die Spaltung von C4 und C2 verantwortlich (188). Auf ähnliche Art und Weise wie im klassischen Weg entsteht so die C3-Konvertase, C4bC2a (133). Alternativ zu MBL kann der Lektin Weg auch über Fikolin aktiviert werden, das ebenfalls Kohlehydratstrukturen erkennt und mit MASPs assoziiert vorliegt. Fikolin hat eine Fibrinogen-ähnliche Kohlehydrat bindenden Domäne und unterscheidet sich damit strukturell von MBL (118, 131).

### *Der terminale Komplementweg*

Alle drei Komplementaktivierungswege führen zur Bildung einer C3-Konvertase, C3bBb oder C4bC2a, und damit zur Oponisierung von Oberflächen mit aktiviertem C3b. Bindet C3b an den C3bBb- oder C4bC2a-Komplex, entsteht die C5-Konvertase des alternativen Weges, C3b<sub>2</sub>Bb oder des klassischen und des Lektin-Weges, C4bC2aC3b (99, 217). C5 bindet über C3b an diese Komplexe und wird daraufhin in C5b und den potenten Entzündungsmediator C5a gespalten (224). C5a sowie die weniger wirksamen niedermolekularen Spaltprodukte C3a

und C4a sind wichtige proinflammatorische Mediatoren, da sie die Kontraktion der glatten Muskulatur induzieren, die Ausschüttung von Histaminen verursachen und die Permeabilität der Blutgefäße erhöhen. C3a und C5a stimulieren Immunzellen zur Freisetzung von Zytokinen und Endothelzellen zur Expression von Adhäsionsmolekülen (34, 223). Durch Bindung von C5a an seinen Rezeptor C5aR werden Monozyten, Neutrophile und Eosinophile stimuliert und migrieren zum Infektionsherd (48). Kürzlich wurde die Thrombin-vermittelte Bildung von C5a unabhängig von einer C5-Konvertase beschrieben und als möglicher vierter C3-unabhängiger Komplementweg postuliert (79). Aktiviertes C5b bindet nicht wie C3b oder C4b kovalent an die Zelloberfläche, sondern verbleibt an der C5-Konvertase und hat eine hohe Spezifität für C6. Bindet C6 an C5b, reagiert das Molekül mit C7. Der ternäre Komplex C5b-7 fixiert sich über die hydrophoben Bindestellen des aktivierten C7 Moleküls in der Zellmembran und fungiert als Rezeptor für C8 (170, 171). Der C5b-8 Komplex verankert sich noch tiefer in der Lipid-Doppelschicht und bildet eine ~30 Å große Pore, deren Durchmesser sich auf ~100 Å vergrößert, sobald sich mehrere C9 Proteine an den Komplex anlagern. Dabei assoziiert das erste C9 Molekül direkt mit dem Komplex (143). Die Polymerisation von bis zu 17 weiteren C9 Molekülen verläuft C5b-8-unabhängig. Die dadurch entstehende transmembrane Pore wird als Membranangriffskomplex (MAC, „Membrane Attack Complex“) bezeichnet und führt zur osmotischen Lyse der Zelle. Für die Lyse veränderter Körperzellen ist bereits der C5b-8 Komplex ausreichend, die Poly-C9 Pore ist für das Abtöten von Bakterien essentiell.

### 1.3 Regulation des Komplementsystems

Das Komplementsystem wird sehr schnell aktiviert und hat ein enormes Amplifikationspotential mit destruktiver Wirkung. Um die Aktivierung zeitlich sowie räumlich zu begrenzen und damit einen kompletten Verbrauch der Komplementkomponenten zu verhindern, und um gesunde körpereigene Zellen zu schützen, wird das Komplementsystem auf mehreren Ebenen der Enzymkaskade reguliert. Dies geschieht zum einen durch die unverzügliche Inaktivierung reaktiver Gruppen, wenn aktivierte Proteine, wie C3b, nicht an Oberflächen binden, und zum anderen durch membrangebundene oder im Plasma gelöste Regulatorproteine, die in Abb. 2 dargestellt sind.



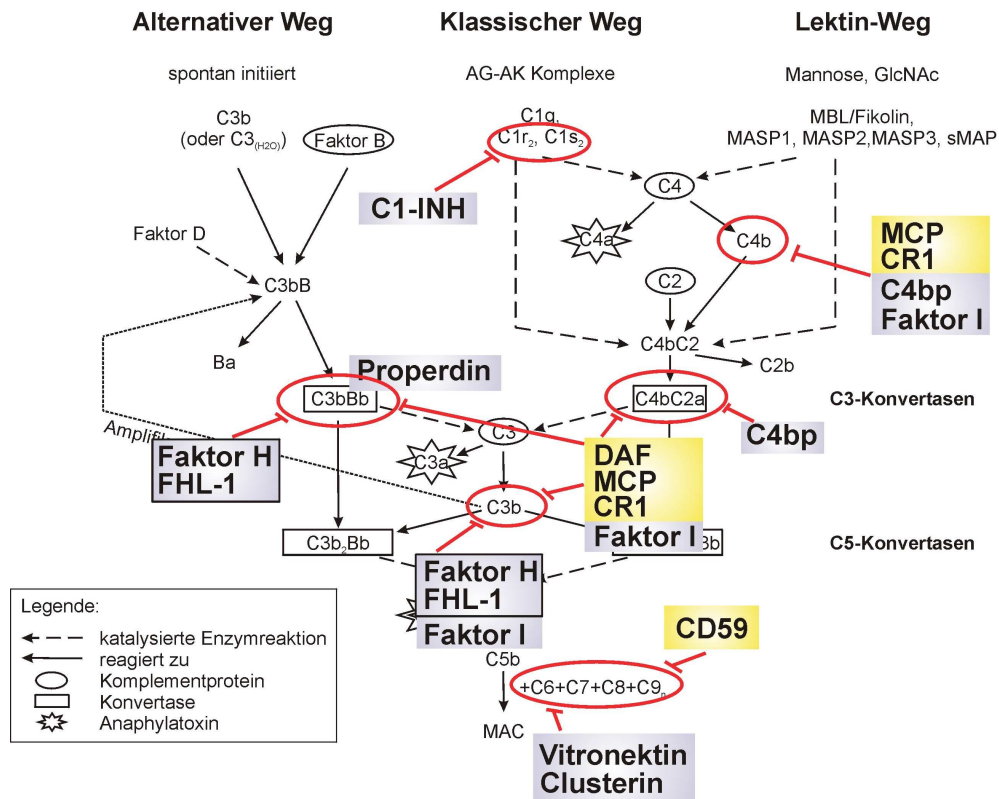


Abbildung 2: Regulatoren des Komplementsystems und ihre Angriffspunkte in der Komplementkaskade. Plasmaproteine sind blau unterlegt und membranständige Regulatoren sind gelb gekennzeichnet. C1-INH: C1 Inhibitor, DAF: „Decay accelerating factor“, MCP: „Membrane Cofactor Protein“, CR1: „Complement Receptor 1“, C4bp: „C4-binding protein“, FHL-1: „Factor H-like protein“-1

Besonders auf Ebene des zentralen Komplementproteins C3 ist eine strenge Kontrolle der Komplementaktivierung entscheidend. Die Thioesterbindung von C3b und C4b ist sehr reaktiv und unterscheidet bei der Bindung an Oberflächenmoleküle nicht zwischen körpereigenen und mikrobiellen Strukturen. Aus diesem Grund und der bereits erwähnten positiven Rückkopplungsreaktion, die besonders im alternativen Weg eine Rolle spielt, wird die Bildung der C3- und der C5-Konvertase durch mehrere Regulatorproteine kontrolliert. Diese strengen Regulationsmechanismen laufen auf Nicht-Aktivatoroberflächen, d.h. gesunden körpereigenen Oberflächen, sehr schnell ab, verhindern die Aktivierung und tragen so zum Erhalt der zellulären Integrität bei, aber auf Aktivatoroberflächen, wie Mikroorganismen oder veränderten Zellen, setzen sie stark verlangsamt ein. Auf diese Weise kann das Komplementsystem zwischen „Selbst“ und „Nicht-Selbst“ unterscheiden (18).

Die Aktivität der C3-Konvertase wird auf drei verschiedene Arten inhibiert. Erstens kann die Bindung von Faktor B an C3b oder C2 an C4b kompetitiv durch Regulatorproteine gehemmt

werden. Zweitens wird die Dissoziation der Komponenten des Konvertasekomplexes beschleunigt, was als Zerfall beschleunigende Aktivität (sog. „decay accelerating activity“) bezeichnet wird. Der dritte Mechanismus zur Inhibierung der Konvertase ist die Spaltung von C3b oder C4b durch die Serinprotease Faktor I mit Hilfe eines Kofaktors. Faktor I ist eine entscheidende Serinprotease, die sowohl im alternativen wie auch im klassischen Weg aktiv ist und in Gegenwart des entsprechenden Kofaktors C3b oder C4b an spezifischen Stellen schneidet und damit inaktiviert (190). C3b wird zu iC3b abgebaut. Dabei wird die  $\alpha$ -Kette zwei Mal geschnitten und es entstehen die Fragmente  $\alpha'68$ ,  $\alpha'46$  und  $\alpha'43$  (65). Faktor I spaltet die  $\alpha$ -Kette von C4b. Das Komplementsystem verfügt über ein breites Spektrum an membranständigen und im Plasma gelösten Regulatorproteinen, die an den Konvertasen angreifen (Tab. 1). Die Regulatoren der flüssigen Phase haben sowohl Zerfall beschleunigende Aktivität als auch Kofaktoraktivität und agieren spezifisch entweder im alternativen oder im klassischen Weg. Hingegen sind die auf Zellmembranen exprimierte Regulatoren sowohl im alternativen als auch im klassischen Weg aktiv.

Tabelle 1: Komplementregulatoren des RCA-Genclusters, die auf Ebene der C3-Konvertasen die Komplementaktivität regulieren

Regulator	Kofaktoraktivität	Zerfall beschleunigende Aktivität	Alternativer Weg	Klassischer Weg	Referenz
im Plasma gelöst					
<b>Faktor H</b>	+	+	+	-	227, 230
<b>FHL-1</b>	+	+	+	-	111, 112
C4bp	+	+	-	+	56
membrangebunden					
CR1	+	+	+	+	45, 80
DAF	-	+	+	+	148
MCP	+	-	+	+	193

FHL-1: „Factor H-like protein“-1, C4bp: „C4-binding protein“, CR1: „Complement Receptor 1“, DAF: „Decay accelerating factor“, MCP: „Membrane Cofactor Protein“

Der C1 Inhibitor (C1-INH) ist ein Serinproteasen inhibierendes Plasmaprotein, das an den C1r:C1s Komplex bindet und dessen Dissoziation von C1q bewirkt (64, 196, 237). Somit wird die spontane Aktivierung von C1 im Plasma verhindert und die Aktivität des C1 Komplexes, C4 und C2 zu spalten, limitiert.

Auch der terminale Komplementweg wird durch mehrere Regulatorproteine streng kontrolliert. Die im Plasma gelösten Regulatoren Vitronektin (S-Protein) und Clusterin (SP-40,40) verhindern die Bindung des C5b-7 Komplexes an die Zellmembran (146, 167). Im Falle von Vitronektin lagern sich die weiteren Komponenten C8 und C9 an, der MAC kann jedoch nicht in die Membran inserieren (Preissner, 1989). Protektin (CD59), das auf allen Zellen exprimiert wird, bindet an den C5b-8 Komplex, verhindert aber nicht die Bindung des ersten C9 Moleküls an den Komplex, sondern inhibiert die Polymersiation weiterer C9 Moleküle und blockiert so die Bildung des MAC (184, 213, 214). CD59 ist ebenso wie DAF über Glykosylphosphatidylinositol (GPI) in der Zellmembran verankert, das den Regulatoren erlaubt sich schneller als andere membrangebundene Proteine in der Membran zu bewegen (31, 139).

### 1.4 Die Faktor H Proteinfamilie

#### *Faktor H*

Der Komplementregulator Faktor H wurde 1965 erstmalig isoliert und ursprünglich als  $\beta$ 1 H Globulin beschrieben (149). Seine regulatorischen Eigenschaften wurden jedoch erst 10 Jahre später entdeckt (227, 229, 230). Das Faktor H Gen (*cfh1*) ist zusammen mit den Genen der Regulatorproteine C4bp, CR1, DAF und MCP im RCA-Gencluster („Regulators of Complement Activation“) auf dem Chromosom 1 (1q32) lokalisiert (183). Das 150-kDa Glykoprotein wird hauptsächlich in der Leber von Hepatozyten und Kupfferzellen, aber auch von zahlreichen anderen Zellen exprimiert und in den Blutkreislauf sezerniert. Faktor H liegt im Plasma in einer Konzentration von  $\sim 500 \mu\text{g/ml}$  vor (53, 191, 227).

Faktor H besteht im Unterschied zu den anderen RCA Proteinen aus einer einzigen Polypeptidkette und ist ausschließlich aus 20 tandemartig angeordneten Einheiten, den „Short Consensus Repeats“ (SCRs), aufgebaut. Ein SCR besteht aus 60 Aminosäuren, die in fünf antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern angeordnet sind. Diese Peptidstränge bestimmen zusammen mit vier konservierten Cysteinresten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind, die globuläre Tertiärstruktur jedes einzelnen SCRs (4, 5, 181). Damit ergibt sich eine perlschnurartige Struktur des Gesamtmoleküls. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen Faktor H als lang gestrecktes, flexibles Molekül (33).

Faktor H ist der wichtigste Komplementregulator der flüssigen Phase im alternativen Weg. Zum einen konkurriert Faktor H mit Faktor B um die Bindung an C3b und inhibiert auf diese Weise die Bildung der C3-Konvertase, C3bBb (230). Zum anderen kann Faktor H den Zerfall des C3bBb-Komplexes beschleunigen, so dass die C3-Konvertase ihre Aktivität verliert (227). Weiterhin agiert Faktor H als Kofaktor für Faktor I bei der proteolytischen Spaltung von C3b (157, 227, 230). Sowohl die Zerfall beschleunigende Aktivität als auch die Kofaktoraktivität wird über die ersten vier N-terminalen SCRs vermittelt (58, 111, 112). Um diese Funktionen ausführen zu können, interagiert Faktor H über drei Bindestellen mit bestimmten Regionen im C3b Molekül. Die erste Bindestelle wurde im N-Terminus des Proteins lokalisiert und befindet sich in den SCRs 1-4. Über die SCRs 12-14 bindet Faktor H an C3c. Der C-Terminus bindet C3d (91, 194).

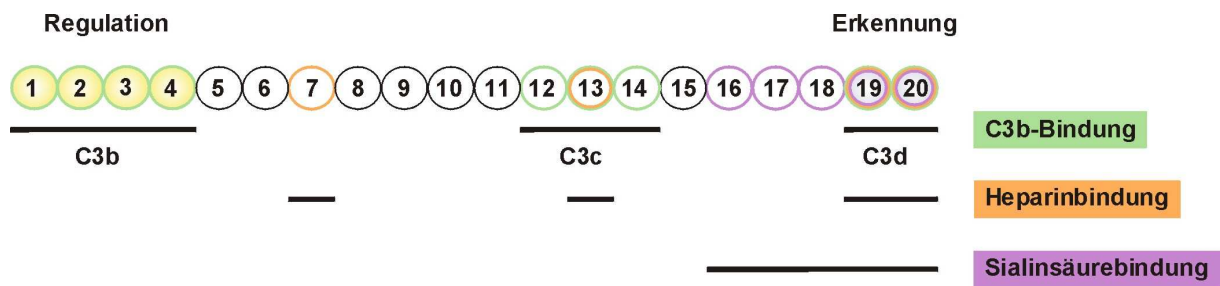


Abbildung 3: Struktur von Faktor H und funktionelle Proteindomänen. Faktor H besteht aus 20 „Short Consensus Repeats“ (SCRs). Die Komplement regulatorische Funktion liegt in den N-terminalen SCRs 1-4 (gelb unterlegt) und die Erkennungsfunktion ist im C-Terminus, SCRs 19 und 20 (blau unterlegt) lokalisiert. Die Bindedomänen für Faktor H Liganden sind mit Balken gekennzeichnet. Faktor H bindet C3b in den SCRs 1-4, 12-13 sowie 19 und 20 (grün umrandet), hat ebenfalls drei Bindestellen für Heparin (SCRs 7, 13 sowie 19 und 20, orange umrandet) und interagiert mit Sialinsäure über die SCRs 16-20 (violett umrandet).

Faktor H ist das einzige Molekül des alternativen Wegs, das zwischen Aktivator- und Nicht-Aktivatoroberflächen unterscheiden kann und die spontan ablaufende Aktivierung des alternativen Weges auf gesunden körpereigenen Strukturen, den Nicht-Aktivatoroberflächen, auf einem niedrigen Niveau hält. Zu diesem Zweck bindet Faktor H an Polyanionen, wie Sialinsäure und Glykosaminoglykane (Heparansulfat, Heparin), auf Zellmembranen oder der Extrazellulären Matrix (ECM). Innerhalb des Faktor H Moleküls sind die SCRs 16-20 für die Bindung an Sialinsäure verantwortlich (175). Für Heparin wurden drei Bindestellen identifiziert: SCRs 7, 13 und 19-20 (7, 8, 90, 154). Ist Faktor H an diese negativ geladenen Strukturen gebunden, kann das Protein seine Komplement regulatorischen Eigenschaften ausüben und hat eine höhere Affinität für gebundenes C3b (140). Die Bindung von Faktor H

an Polyanionen schützt körpereigene Zellen vor der Komplementaktivierung, denn die Modifizierung oder das Entfernen von Sialinsäure auf Zellmembranen wandelt eine Nicht-Aktivatoroberfläche in einen Aktivator (44). Für die Bindung an körpereigene Zellen ist der C-Terminus von Faktor H von entscheidender Bedeutung und wird daher als Erkennungsdomäne bezeichnet. Zahlreiche Untersuchungen zur Faktor H Bindung an Pathogene zeigten, dass dieser Bereich auch bei der Faktor H Bindung an pathogene Oberflächenmoleküle eine Rolle spielt. Abb. 3 zeigt die schematische Struktur des Faktor H Moleküls mit den funktionalen Proteindomänen und Bindestellen für Liganden.

Darüber hinaus interagiert Faktor H mit weiteren Liganden. Faktor H bindet über CR3 (CD11b/CD18), der auch als Rezeptor für iC3b und ICAM-1 bekannt ist, an Neutrophile und kann somit die Bindung der Granulozyten an Endothelzellen vermitteln (35). Außerdem wurde die Bindung von Faktor H an L-Selektin von Leukozyten, das Sialoprotein der Knochen, Osteopontin und an das C-reaktive Protein (CRP) beschrieben (47, 88, 128).

Faktor H ist von entscheidender Bedeutung bei der Regulation der Komplementaktivierung auf Nicht-Aktivatoroberflächen und genetische Defekte oder eine Faktor H Defizienz können zu unterschiedlichen Krankheiten führen. Vor allem in SCR 20 wurden vermehrt Punktmutationen identifiziert, die zur Ausbildung des atypischen hämolytisch-urämischen Syndroms (aHUS) führen, einer schweren thrombotischen Mikroangiopathie der Niere (129). Der C-Terminus von Faktor H ist sowohl für die Bindung an Oberflächen als auch für die C3b Bindung verantwortlich. Demzufolge führen Veränderungen in dieser Region zum Verlust der Funktionalität von Faktor H und zur unkontrollierten Aktivierung des alternativen Wegs auf Zelloberflächen, die mit der Zerstörung des Endothels in den Glomeruli der Niere und der Abnahme der C3 Plasmakonzentration einhergeht. Auch heterozygote Mutationen, die eine verminderte Faktor H Konzentration im Plasma zur Folge haben oder die Funktion des Regulators beeinträchtigen, resultieren in aHUS. Im Gegensatz dazu führen homozygote Faktor H Genmutationen, die in einer defekten Faktor H Sekretion resultieren, zur Entstehung der seltenen Nierenerkrankung Membranproliferative Glomerulonephritis Typ II (MPGN II) (239). Bei dieser Erkrankung kommt es in Folge der fehlenden Faktor H Regulation u.a. zu Ablagerungen in der glomerulären Basalmembran, die vor allem aus C3c und C3d bestehen. Faktor H defiziente Mäuse entwickeln MPGN II, da die Aktivierung von C3 unkontrolliert abläuft und C3b vermehrt abgelagert wird (165). Aber auch Autoantikörper gerichtet gegen SCR3 in Faktor H können die Ursache für MPGNII sein, da sie die regulatorische Domäne

blockieren (92). Kürzlich wurde auf genetischer Ebene gezeigt, dass der Polymorphismus Tyr402His im Faktor H Protein ein erhöhtes Risiko birgt, an altersabhängiger Makuladegeneration (ARMD) zu erkranken (40, 100, 231). Die Aminosäure 402 ist in SCR 7 lokalisiert, in dem eine Bindestelle für Heparin und CRP liegt. Bisher wurde gezeigt, dass die Risikovariante Faktor H 402His vermindert an Heparin, CRP und Pigmentzellen der Retina bindet (201), was auf eine eingeschränkte Komplementregulation im Zusammenhang mit ARMD schließen lässt.

### *Faktor H-verwandte Proteine*

Die fünf Faktor H-verwandten Proteine (FHR-1, FHR-2, FHR-3, FHR-4 und FHR-5, „Factor H-related protein“) werden durch eigenständige Gene kodiert, die direkt neben dem Faktor H Gen im RCA-Gencluster lokalisiert sind (136, 240, 242). Die einzelnen FHRs sind aus vier, fünf oder neun SCRs aufgebaut und weisen eine hohe Sequenzhomologie vor allem zu den SCRs 6-7 und den C-terminalen SCRs 18-20 des Faktor H Proteins auf (244). In Abb. 4 sind die Strukturen der fünf FHRs dargestellt. Die einzelnen SCRs sind basierend auf der maximalen Homologie vertikal angeordnet. Evolutionsbiologisch sind die FHRs konserviert und wurden aus der Maus, der Ratte und dem Gestreiften Sandbarsch isoliert (70, 177, 241).

FHR-1 besteht aus fünf SCRs (200). Die C-terminalen SCRs 3-5 sind bis auf zwei Aminosäuren in SCR 5 mit den SCRs 18-20 von Faktor H identisch (42). FHR-1 ist das einzige FHR, das eine so hohe Sequenzübereinstimmung zu Faktor H aufweist. Diese strukturellen Gemeinsamkeiten spiegeln sich in überlappenden Eigenschaften zwischen FHR-1 und Faktor H wider. FHR-1 bindet an humane Endothelzellen und Erythrozyten. Über den C-Terminus interagiert FHR-1 mit C3b, C3d und Heparin und lässt die Fähigkeit zur Diskriminierung in Aktivator- und Nicht-Aktivatoroberflächen vermuten. Darüber hinaus ist FHR-1 in der Lage mit Faktor H um die Bindung an C3b zu konkurrieren (126). Jedoch wird für FHR-1 eine direkte Komplement regulatorische Funktion in Form von Kofaktoraktivität und Zerfall beschleunigender Aktivität ausgeschlossen (219). Bindungsstudien mit unterschiedlichen humanpathogenen Mikroorganismen haben die Bindung von FHR-1 gezeigt, was auf einen Einfluss von FHR-1 auf die Komplementaktivierung auf Aktivatoroberflächen hinweist (245). FHR-1 kommt im Plasma in zwei Glykosylierungsformen vor. Das 37 kDa Protein FHR-1 $\alpha$  ist einfach glykosyliert. FHR-1 $\beta$  hat zwei Kohlehydratketten gebunden und hat eine Mobilität von 43 kDa (219, 242). Die Plasmakonzentration von FHR-1 beträgt 20-50  $\mu$ g/ml. Park und Wright haben gezeigt, dass

FHR-1 mit anderen FHRs Bestandteil von Lipoproteinpartikeln im Plasma ist. Diese Partikel bestehen zusätzlich aus Phospholipiden, Apolipoprotein A-I, dem Lipopolysaccharid bindenden Protein (LBP) und Fibrinogen, wobei FHR-1 die dominierende Proteinkomponente stellt und sie daher als „FHRP-associated lipoprotein particle“ (FALP) bezeichnet werden. Das gesamte FHR-1 des Plasma liegt an FALPs assoziiert vor (158, 159). Die Funktion dieser neu identifizierten Lipoproteinpartikel ist bisher noch unbekannt. Kürzlich wurde bei mehreren aHUS-Patienten eine FHR-1/FHR-3 Defizienz entdeckt, die auf einer ausgedehnten Deletion im Faktor H Genlokus beruht (238). Bei aHUS Patienten korreliert diese Mutation im RCA-Cluster darüber hinaus mit dem Vorhandensein von Faktor H spezifischen Autoantikörpern (94).

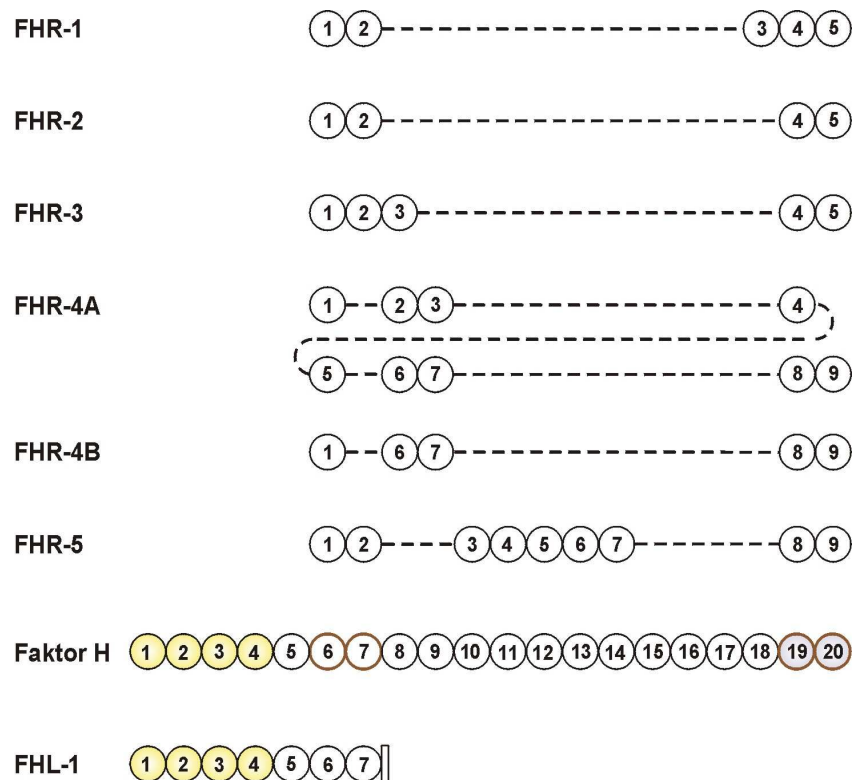


Abbildung 4: Die Faktor H Proteinfamilie. Die sekretierten Proteine bestehen ausschließlich aus „Short Consensus Repeats“ (SCRs), deren Anzahl sich jedoch unterscheidet. Die einzelnen SCRs der Proteine sind basierend auf der maximalen Homologie vertikal angeordnet. Die Sequenzen der FHRs und Faktor H zeigen zwei konservierte Regionen in den SCRs 6 und 7 und in den C-terminalen SCRs 19 und 20 von Faktor H (braun umrandet). FHL-1 geht durch alternatives Spleißen aus dem gleichen Gen hervor wie Faktor H und ist deshalb mit den N-terminalen SCRs 1-7 von Faktor H identisch. Der helle Balken am C-Terminus von FHL-1 repräsentiert die vier Aminosäuren, in denen sich FHL-1 von Faktor H unterscheidet. Die Komplement regulatorische Domäne in Faktor H und FHL-1 (SCRs 1-4) ist gelb gekennzeichnet, die Erkennungsdomäne in Faktor H (SCRs 19 und 20) blau.

FHR-2 ist ebenfalls ein Plasmaprotein, das aus vier SCRs aufgebaut ist und in einer unglykolysierten  $\alpha$ -Form und in einer einfach glykolysierten  $\beta$ -Form vorliegt. FHR-3 bestehend aus fünf SCRs, zeigt im N-Terminus eine hohe Homologie zu Faktor H und bindet an Heparin und das Protein M6 von *Streptococcus pyogenes* (102). Von FHR-4 sind zwei verschiedene Spleißvarianten bekannt, FHR-4A und FHR-4B. FHR-4B, das zuvor als FHR-4 bezeichnet wurde, ist die verkürzte Form und besteht aus vier SCRs. Das lange Transkript, FHR-4A bestehend aus neun SCRs, stellt ein „natürliches Dimer“ dar, da vier SCRs dupliziert und tandemförmig angeordnet sind (95). Ebenso wie FHR-1 und FHR-2 liegt FHR-4 assoziiert mit Lipoproteinpartikeln im Plasma vor (159, 199). Das kürzlich isolierte FHR-5 bindet C3b, Heparin und CRP (136, 137). FHR-5 ist ebenfalls Bestandteil von Lipoproteinpartikeln. Anders als die FHRs 1-4 hat FHR-5 Kofaktoraktivität und beeinträchtigt die Aktivität der C3-Konvertase, indem es die Bildung von C3a inhibiert (137).

### *FHL-1*

Das 42-kDa Faktor H-ähnliche Protein 1 (FHL-1, „Factor H-like protein“-1) wird von einem Transkript kodiert, das sich von einer Spleißvariante des Faktor H Gens ableitet (43, 242). Das Plasmaprotein besteht aus sieben SCRs, die mit den N-terminalen SCRs 1-7 von Faktor H identisch sind, und vier zusätzlichen Aminosäuren am C-Terminus. FHL-1 besitzt die gleiche komplementregulatorische Domäne (SCRs 1-4) wie Faktor H und hat ebenso Kofaktoraktivität bei der Faktor I-abhängigen Spaltung von C3b und beschleunigt den Zerfall der C3-Konvertase im alternativen Weg (58, 111, 112, 142). Die strukturelle und funktionelle Verwandtschaft zu Faktor H wird in Abb. 4 verdeutlicht. Im Plasma liegt FHL-1 in einer Konzentration von 10-50  $\mu\text{g/ml}$  vor. FHL-1 bindet über SCR-7 an Heparin und mikrobielle Oberflächenproteine (8, 244). FHL-1 wird auch als Rekonektin bezeichnet, da es in ähnlicher Weise wie Fibronektin an Zellen adhärert (243). Die Arg-Gly-Asp (RGD)-Domäne in SCR-4 ist ein typisches Motiv von Matrixproteinen, wie Fibronektin und Fibrinogen, und vermittelt die Bindung adhärenter Zellen an FHL-1. Obwohl Faktor H ebenfalls über die RGD-Domäne verfügt, ist diese Eigenschaft für FHL-1 einzigartig (72).

## **2 Wirts-Pathogen Interaktionen**

Die Oberfläche eines Krankheitserregers ist die zentrale Schnittstelle zwischen Wirt und Pathogen. Die Erkennung dieser exponierten Oberfläche durch das Immunsystem des Wirtes



führt zur Aktivierung von Abwehrmechanismen, die den Erreger eliminieren. Die Abwehr des Angriffs des Immunsystems ist eine Schlüsselfunktion der Virulenz eines Pathogens.

Aus diesem Grund interagieren Pathogene auf vielfältige Art und Weise mit dem Wirtsorganismus, um der Immunantwort auszuweichen, sie zu verhindern oder gar zum eigenen Vorteil auszunutzen und im Wirt zu überleben und sich auszubreiten. So haben Neisserien mehrere unterschiedliche Mechanismen der Antigenvariation entwickelt, z.B. die Expression hoch variabler Pilinproteine auf der Oberfläche, um dem Immunsystem immer wieder neue Oberflächenantigene zu präsentieren (75). Damit ist der Erreger in der Lage entweder eine Infektion unerkannt aufrechtzuerhalten oder den Wirt aufgrund fehlender Immunität neu zu infizieren. *Bacillus anthracis* unterdrückt Entzündungsreaktionen, indem der Lethalitätsfaktor des Anthraxtoxins mit dem MAP Kinase- und dem NFκB-Signalstransduktionsweg interferiert (160). *Y. pestis* verhindert die Phagozytose durch Injizieren des Effektormoleküls YopH über das Typ III Sekretionssystem in Phagozyten. YopH dephosphoryliert Proteine des Aktinzytoskeletts (222). Außerdem exprimieren *Yersinia* Spezies das Virulenzantigen LcrV, das über TLR-2 und CD14 die Sekretion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 stimuliert (198). Dies ist eine begrenzte Auswahl an Beispielen mikrobieller Immunevasionsstrategien. Im folgenden Kapitel wird speziell auf Mechanismen der Komplementevasion eingegangen.

### 2.1 Komplementevasionsstrategien humanpathogener Mikroorganismen

Mikroorganismen werden innerhalb weniger Sekunden vom Komplementsystem erkannt und angegriffen. Um eine Infektion zu etablieren, müssen erfolgreiche Pathogene diese erste wirksame Verteidigungslinie des Immunsystems abwehren oder umgehen. Deshalb haben Pathogene unterschiedliche Mechanismen entwickelt, mit denen sie der Komplementattacke des Wirtes entgehen. In den letzten Jahren wurden zahlreiche Komplementevasionsstrategien und die daran beteiligten mikrobiellen Proteine identifiziert. Exemplarisch werden einige komplementevasive Mechanismen vorgestellt.

Krankheitserreger sind der Lage allein durch die Beschaffenheit ihrer Oberfläche den Zugang von Komplementkomponenten und die Aktivierung der Komplementkaskade abzuwehren. Zum Beispiel verhindert die Peptidoglykanschicht grampositiver Bakterien die Insertion des MAC in die Zellmembran (89).

Eine andere Strategie basiert auf der Eliminierung von Komplementproteinen in der flüssigen Phase durch proteolytische Degradation. Das gramnegative Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* sekretiert die beiden aktiven Enzyme Alkalinprotease PaAP und Elastase PaE, die Immunglobuline, C1q und C3 spalten und damit die Aktivierung über den klassischen Weg sowie die Ablagerung von C3b verhindern (76, 192).

Die Aktivierung des Komplementsystems ist abhängig von einem abgestimmten Zusammenspiel der einzelnen Komponenten. Bakterielle Pathogene, Parasiten und Viren exprimieren Inhibitoren, die an Proteine des Komplementsystems binden, deren Funktion blockieren und letztendlich den Ablauf der Enzymkaskade aus dem Gleichgewicht bringen. Das M-Protein von *Streptococcus pyogenes*, ein Vertreter der  $\beta$ -hämolyisierenden Streptokokken der Serogruppe A, ist ein stark antiphagozytär wirkender Virulenzfaktor, der in vielen verschiedenen Serovarietäten vorkommt. Das M5-Protein interagiert mit CR3 auf Neutrophilen und verhindert damit die Phagozytose des Bakteriums (228). Der Trematode *Schistosoma mansoni*, der Erreger der Bilharziose, und der Einzeller *Trypanosoma cruzi*, der die Chagas-Krankheit verursacht, exprimieren das „Complement C2 Receptor Trispanning“ Protein (CRIT). CRIT verhindert die Bindung von C2 an C4b und inhibiert so die Bildung der C3-Konvertase des klassischen Wegs (81, 82).

Intrazelluläre Erreger entgehen dem Komplementsystem, indem sie die Aktivierung zu ihrem Vorteil nutzen und die Komplementrezeptoren auf Wirtszellen als Eintrittspforte gebrauchen. *T. cruzi* nutzt C1q, das an die Oberfläche gebunden ist, um über den C1q Rezeptor in mononukleäre Phagozyten und Fibroblasten einzudringen (180). Das Epstein-Barr-Virus (EBV) exprimiert das Glykoprotein gp350/220, das spezifisch an CR2 auf B-Lymphozyten bindet, um in die Zellen zu gelangen und dadurch die infektiöse Mononukleose (Pfeiffer'sches Drüsenfieber) hervorzurufen (49).

Ein weiterer Evasionsmechanismus besteht darin, die Erkennung als Aktivatoroberfläche zu verhindern. Zum Beispiel haben Gruppe B-Streptokokken eine Kapsel, die Sialinsäure enthält. Sialinsäure ist normalerweise Bestandteil von wirtseigenen Zellmembranen und kennzeichnet diese für den alternativen Weg der Komplementaktivierung als Nicht-Aktivatoroberflächen. *S. agalactiae* imitiert damit Strukturen des Wirtes und präsentiert dem Komplementsystem eine Nicht-Aktivatoroberfläche, um die Aktivierung des alternativen Weges zu inhibieren (41). *Neisseria gonorrhoeae* trägt sialylierte Lipooligosaccharide auf der Oberfläche, die Faktor H

binden und Serumresistenz vermitteln, da die Faktor H Bindung zu einer verstärkten Inaktivierung von C3b führt (175).

Einige Pathogene, darunter viele Viren, exprimieren Proteine, die die Struktur und Funktion von Wirtsregulatoren nachahmen und auf diese Weise die Aktivierung des Komplements verhindern. Die strukturelle Ähnlichkeit gegenüber den Wirtsregulatoren lässt darauf schließen, dass die Virus eigenen Regulatoren humanen Ursprungs sind. Das „Vaccinia Virus Complement-Control Protein“ (VCP) des Vaccinia Virus besteht aus vier SCRs und wird von infizierten Zellen sekretiert. VCP hat sowohl Kofaktoraktivität als auch Zerfall beschleunigende Aktivität (135). Der virale Komplementregulator weist eine sehr hohe Ähnlichkeit zu dem Membran gebundenen Wirtsregulator DAF auf (115).

Darüber hinaus binden viele humanpathogene Erreger Regulatorproteine des Wirtes an ihre Oberfläche und tarnen sich so, z.B. vor dem Angriff des Komplementsystems. Die gebundenen Regulatoren verhindern die Aktivierung des Komplementsystems auf der Erregeroberfläche. Dieser Mechanismus der Komplementevasion ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit und wird im nächsten Kapitel ausführlich beschrieben.

## **2.2 Pathogene nutzen Komplementregulatoren des Wirtes**

Zahlreiche pathogene Mikroorganismen binden die im Plasma gelösten Komplementregulatoren Faktor H, FHL-1 und C4bp, die auf Ebene der C3-Konvertase agieren, an ihre Oberfläche. Die gebundenen Regulatoren sind funktional aktiv und greifen inhibierend in die Aktivierung des Komplementsystems auf Erregeroberfläche ein, indem sie die Opsonisierung mit C3b sowie den Ablauf der Komplementkaskade blockieren und so die Phagozytose und/oder Lyse des Pathogens verhindern. Auf dieses Weise ist die pathogene Oberfläche maskiert und die Erreger sind vor dem Angriff des Komplementsystems geschützt und überleben. In Abb. 5 wird diese wichtige Strategie der Komplementevasion veranschaulicht.

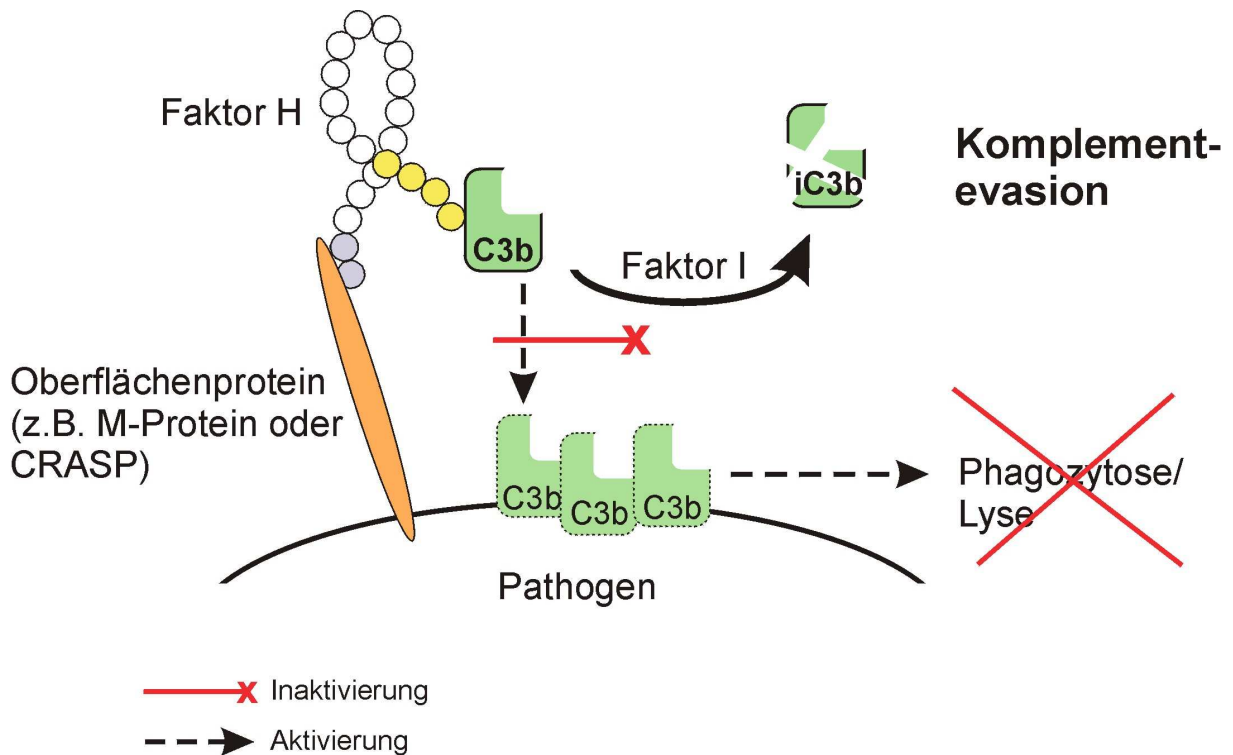


Abbildung 5: Komplementevasion durch die Bindung von Faktor H. Pathogene Mikroorganismen exprimieren Oberflächenproteine, die Komplementregulatoren des Wirtes, z.B. Faktor H, binden. Die Komplement regulatorische Domäne ist zugänglich und vermittelt die Spaltung von C3b zu inaktivierten C3b (iC3b) durch Faktor I. Auf diese Weise wird die Beladung der Erregeroberfläche mit aktiven C3b und die nachfolgende Phagozytose und/oder Lyse verhindert (verändert nach 244).

Die Akquirierung von Komplementregulatoren des Wirtes hat mehrere Vorteile für den Erreger. Diese Wirtsproteine sind in ihrer Funktion die Komplementaktivierung zu inhibieren optimal abgestimmt und in ausreichender Menge vorhanden. Des Weiteren bestehen die RCA-Proteine aus SCRs und sind sich untereinander strukturell ähnlich. Daraufhin können unterschiedliche Regulatoren von ein und dem selben Erregerprotein rekrutiert werden (115).

Eine zunehmende Anzahl von Pathogenen, wie grampositive Bakterien (*S. pneumoniae* und *S. pyogenes*), gramnegative Bakterien (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Borrelia burgdorferi* s.l., *Borrelia hermsii*, *Escherichia coli*, *Leptospira interrogans*, *Moraxella catarrhalis*, *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae* und *P. aeruginosa*), humanpathogene Pilze (*Aspergillus fumigatus* und *Candida albicans*), Parasiten (*Echinococcus granulosus* und *Onchocerca volvulus*) und Viren (HIV und Westnilvirus) nutzen den gleichen Mechanismus der Komplementevasion. Jedes dieser Pathogene bindet die Komplementregulatoren Faktor H, FHL-1, FHR-1 und/oder C4bp an ihre Oberfläche. In vielen Fällen wurden bereits die Liganden auf der Pathogenoberfläche identifiziert und charakterisiert (244). Die Tab. 2 gibt

eine Übersicht zu den bekannten Komplementevasionsproteinen, die Mitglieder der Faktor H Proteinfamilie binden. Die Oberflächenproteine sind polymorph zeichnen sich jedoch durch die gleiche Funktion aus Komplementregulatoren zu binden, die mit der Komplementaktivierung auf der Erregeroberfläche interferieren. Die Binderegionen in Faktor H wurden bereits für einige dieser Proteine lokalisiert. Bindungsstudien mit Faktor H Fragmenten zeigen, dass vor allem der C-Terminus für die Bindung an Oberflächenproteine entscheidend ist.

Tabelle 2: Mikrobielle Oberflächenproteine, die Komplementkomponenten der Faktor H Proteinfamilie binden.

Pathogen	Oberflächenprotein	Interagierende Proteine der Faktor H Familie	SCRs, die in die Bindung involviert sind	Referenz
<b>Bakterien</b>				
<i>Actinobacillus sp</i>	Omp100	Faktor H	unbekannt	2
<i>Borrelia afzelii</i>	BaCRASP-1	Faktor H, FHL-1	SCRs 5-7	107, 225
	BaCRASP-2	Faktor H, FHL-1	SCRs 6 und 7	
	BaCRASP-3	FHL-1	SCRs 6 und 7	
	BaCRASP-4	Faktor H	SCRs 19 und 20	
	BaCRASP-5	Faktor H	SCRs 19 und 20	
<i>Borrelia burgdorferi s.s.</i>	BbCRASP-1	Faktor H, FHL-1	SCRs 5-7, 19 und 20	1, 73, 103, 107
	BbCRASP-2	Faktor H, FHL-1	SCRs 5-7, 19 und 20	
	BbCRASP-3	Faktor H	SCRs 19 und 20	
	BbCRASP-4	Faktor H	SCRs 19 und 20	
	BbCRASP-5	Faktor H	SCRs 19 und 20	
	OspE	Faktor H	SCRs 15-20	
<i>Borrelia hermsii</i>	p21	Faktor H	SCRs 19-20	
	FhbA	Faktor H, FHL-1	SCRs 1-7, 16-20	78, 189
	BhCRASP-1	Faktor H, <b>FHR-1</b>	SCR 20	
<i>Leptospira interrogans</i>	LenA (LfhA)	Faktor H, <b>FHR-1</b>	unbekannt	210, 220
	LenB	Faktor H	unbekannt	
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Por1A	Faktor H	unbekannt	125, 174
	Por1B	Faktor H	unbekannt	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Tuf	Faktor H, <b>FHR-1</b>	SCRs 6 und 7, 19 und 20; SCRs 3-5	113
<i>Streptococcus agalactiae</i>	β-Protein	Faktor H	SCRs 8-11, 12-14	86
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	PspC	Faktor H	SCRs 8-11, 19 und 20	30, 63, 85-87
	Hic	Faktor H	SCRs 8-11, 12-14	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	M-Protein	Faktor H, FHL-1	SCR-7	6, 16, 77, 102, 152,
	Fba	Faktor H, FHL-1	SCR-7	153
	Scl1	Faktor H, <b>FHR-1</b>	unbekannt	
<i>Treponema denticola</i>	FhbB	FHL-1	unbekannt	134
<i>Yersinia enterocolitica</i>	YadA	Faktor H	unbekannt	20
<b>Pilze</b>				
<i>Candida albicans</i>	Gpm1	Faktor H, FHL-1	SCRs 6 und 7, 19 und 20	168
<b>Viren</b>				
HIV	gp41	Faktor H	unbekannt	211
	gp120	Faktor H	unbekannt	
Westnilvirus	NS 1	Faktor H	unbekannt	21

In den letzten zwei Jahren wurde eine Reihe von Oberflächenproteinen identifiziert, die neben dem Wirtsregulator Faktor H das verwandte Protein FHR-1 binden aber nicht FHL-1, wie z.B. das Membranprotein LfhA von *L. interrogans*, CRASP-1 von *B. hermsii*, der auf der Oberfläche nachgewiesene Transkriptionselongationsfaktor Tuf von *P. aeruginosa* und das Scl1 Protein von *S. pyogenes* Serovar M6 (16, 113, 189, 220). Für Tuf von *P. aeruginosa* und CRASP-1 von *B. hermsii* wurde die Binderegion in Faktor H bestimmt und der C-Terminus identifiziert, der in Faktor H und FHR-1 eine hohe Sequenzübereinstimmung aufweist aber in FHL-1 fehlt (113, 189). Auf Grund der Homologie in den drei C-terminalen SCRs akquirieren diese Erregerprotein FHR-1 zusätzlich zu Faktor H, was auf eine Bedeutung von FHR-1 für die Komplementregulation auf der Erregeroberfläche hinweist.

### 3 Ausgewählte bakterielle Pathogene

In der vorliegenden Arbeit wurden gezielt die Komplementeversionsstrategien der humanpathogenen Bakterien *B. burgdorferi* und *Staphylococcus aureus* untersucht. Beide Erreger sind vorwiegend extrazellulär und durchlaufen bei der Disseminierung im Wirtsorganismus eine ausgeprägte bakteriämische Phase und sind dabei dem Angriff des Komplementsystems ausgesetzt, können jedoch überleben und eine Infektion etablieren. In den letzten Jahren hat die epidemiologische Bedeutung von *B. burgdorferi* und *S. aureus* stark zugenommen. Die Gesamtinzidenz der Lyme-Borreliose stieg in dem 5-Jahreszeitraum von 2002 bis 2006 in den östlichen Bundesländern der Bundesrepublik Deutschland um ca. 100 % (2002 17,8 und 2006 37,3 Erkrankungsfälle pro 100 000 Einwohner) (182). Gegenwärtig liegt der Anteil von Methicillinresistenten *S. aureus* (MRSA)-Stämmen an *S. aureus* Infektionen in Krankenhäusern in Deutschland bei über 20 % (110). Aus diesen Gründen ist die Aufklärung der Interaktion zwischen dem humanen Komplementsystem und den Erregern *B. burgdorferi* und *S. aureus* von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung neuer Therapeutika.

#### 3.1 *Borrelia burgdorferi*

##### *Biologie*

*Borrelia burgdorferi* ist ein flexibles, schraubenförmiges, gramnegatives Bakterium, das obligat parasitisch lebt und zur Familie der Spirochaetaceae gehört. Zu dieser Familie zählen

weitere bedeutende Pathogene, z.B. die Rückfallfieber Borrelien *B. hermsii* und *B. recurrentis*, *Treponema pallidum*, der Erreger der Syphilis und *L. interrogans*, der Erreger der Leptospirose. Alle Spirochäten zeichnen sich durch ihre Gestalt und ihre Beweglichkeit aus, die in dem Aufbau der Zelle begründet liegt. Diese Bakterien verfügen über helikale Filamente, sog. Endoflagellen, die an den Zellpolen verankert sind und sich im periplasmatischen Raum zwischen dem Zytoplasmamembran-Zellwand Komplex und der äußeren Membran um den Zellzylinder winden. Die Rotation der Endoflagellen induziert Veränderungen in der Zellmorphologie und treibt damit die Zelle voran. *B. burgdorferi* ist ein relativ großes Bakterium mit einem Durchmesser von 0,33 µm und einer Länge von 10-20 µm (57). Es trägt an beiden Enden 7-11 Endoflagellen, die sich in der Mitte der Zelle überlappen (3). Die äußere Membran von *B. burgdorferi* ist anders als bei typischen gramnegativen Bakterien eher labil und enthält kein LPS, sondern ist reich an Lipoproteinen, wie z.B. die „Outer surface proteins“ (Osp) A-F. Das Genom von *B. burgdorferi* ist ein weiteres außergewöhnliches Merkmal. Die Sequenz des *B. burgdorferi* Stammes B31 wurde 1997 veröffentlicht (52). Es besteht aus einem linearen ca. 1 Mb großen Chromosom, welches hauptsächlich „Housekeeping“ Gene kodiert, und 12 linearen sowie neun zirkulären Plasmiden, die 40 % des DNA Gehalts ausmachen (15). Auf den Plasmiden liegen die Gene für Lipoproteine, die mehr als 8 % der kodierenden Sequenz umfassen, und zahlreiche offene Leserahmen mit unbekannter Funktion der Proteine. Insgesamt wurden im Genom 105 potentielle Lipoproteine identifiziert (52). Viele dieser Lipoproteine sind als wichtige Virulenzfaktoren bekannt, die sich durch ihre hohe Antigenvariabilität auszeichnen. Einerseits besitzt *B. burgdorferi* wenige Gene mit biosynthetischer Aktivität und ist daher in seinem Nährstoffbedarf stark vom Wirtsorganismus abhängig (52). Rotwild, kleine Nager, Amphibien und Vögel stellen das Erregerreservoir. Als Vektor dient die Zecke. Andererseits verfügt das Bakterium über eine enorme Flexibilität in der Genexpression. Bei seinem ständigen Wirtswechsel ist *B. burgdorferi* in der Lage in kürzester Zeit abhängig von Temperatur, Nährstoffen und dem pH-Wert sein Expressionsschema umzustellen und an den Wirt anzupassen (14, 141).

### *Pathogenese und Krankheitsbild*

*Borrelia burgdorferi sensu lato* ist der Erreger der Lyme-Borreliose, einer auf der nördlichen Hemisphäre weit verbreiteten Zoonose, die in Mitteleuropa durch Zecken der Spezies *Ixodes ricinus* übertragen wird. Die Lyme-Borreliose ist eine Multisystem-Krankheit, die in mehreren Stadien abläuft und anderen Erkrankungen ähnelt. Während der Blutmahlzeit der

Zecke gelangen die Borrelien aus dem Mitteldarm über die Hämolymphe in die Speicheldrüse der Zecke und werden in den menschlichen Organismus injiziert. An der Einstichstelle beginnen die Bakterien sich zu vermehren, was nach 2-32 Tagen und in ca. 70-80 % der Fälle mit einer sich ausbreitenden Hautrötung, dem Erythema migrans, einhergeht (202, 204, 209). Begleitet wird diese lokale Infektion des ersten Krankheitsstadiums oft durch grippeähnliche Symptome. Bleibt die Infektion unbehandelt, gelangt der Erreger über den Blutkreislauf in unterschiedliche Organe und kann im zweiten Stadium Schmerzen in Muskeln, Knochen und Nerven, akute Meningitiden oder Facialisparesen (Neuroborreliosen) verursachen. Die Spirochäten binden über verschiedene Adhäsionsmoleküle, z.B. P66 und die „Decorin-binding proteins“ A und B (DbpA, DbpB) an Endothzellen oder Kollagen des Bindegewebes, um sich so innerhalb des Wirtes auszubreiten und zu ihren Zielorganen vorzudringen (22). Außerdem akquiriert *B. burgdorferi* über das Lipoprotein OspA humanes Plasminogen (PLG), das Vorläuferprotein der Protease Plasmin (55). Die Bindung des Plasmaproteins führt zu einer verstärkten Umwandlung in aktives Plasmin durch PLG-Aktivatoren des Wirtes, deren Sekretion durch OspA induziert wird (54). Durch Ausnutzen dieses Wirtssystems sind Borrelien in der Lage Komponenten der ECM zu degradieren und innerhalb des Wirts über Gewebsbarrieren hinweg zu migrieren. Borrelien können in immunprivilegierten Organen, z.B. in Gelenken, im Nervensystem oder der Haut, über mehrere Jahre persistieren und im dritten Stadium der Lyme-Borreliose zu chronischen Erkrankungen wie der Lyme-Arthritis, Enzephalomyelitiden, der Acrodermatitis chronica atrophicans oder zu Manifestationen in Auge oder Herz führen. Einzelne Krankheitsstadien können ausbleiben, und eine Spontanheilung ist in jedem Stadium möglich. Jedoch sprechen 10 % der Lyme-Arthritis Fälle in den USA nicht auf eine Antibiotikatherapie an (207). Dabei handelt es sich wahrscheinlich weniger um eine persistierende Infektion, da der Erreger in der Synovialflüssigkeit mittels PCR nicht nachweisbar ist (150, 172). Vielmehr ist diese therapieresistente Form der Lyme-Arthritis vermutlich eine Autoimmunerkrankung, da sie mit der Expression des HLA-DR4 Allels assoziiert ist (96, 205). Darüber hinaus sind T-Zelllinien dieser Patienten spezifisch für OspA (98, 121). Eine molekulare Mimikry zwischen dem T-Zellepitop von OspA (OspA<sub>165-173</sub>) und einem humanen homologen Peptid ist demzufolge wahrscheinlich die Ursache für die Autoimmunerkrankung. Das „human leukocyte function-associated antigen 1“ (hLFA-1) wurde als homologes Peptid identifiziert, reagiert aber nicht mit allen HLA Allelen, die typischerweise bei Patienten mit therapieresistenter Lyme-Arthritis vorkommen und wurde deshalb als relevantes Autoantigen wieder ausgeschlossen (59, 206). Diese Autoimmunerkrankung scheint deshalb eher multifaktoriell bedingt zu sein. Zum Beispiel



induziert OspA von *B. burgdorferi* die Differenzierung von T-Helferzellen, die IL-17 und TNF- $\alpha$  exprimieren (83). IL-17 ist ein proinflammatorisches Cytokin, das bei rheumatischer Arthritis vorkommt und ausschließlich durch mikrobielle Lipopeptide induziert wird (17, 83). Aus diesem Grund könnte IL-17 zusammen mit anderen proinflammatorischen Cytokinen, z.B. IL-6, an der Entstehung der therapieresistenten Lyme-Arthritis beteiligt sein (97).

Einige Symptome der Lyme-Borreliose wurden bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts mehrfach beschrieben (zusammengefasst in 203). Jedoch wurde die Erkrankung erst 1977 von Allen C. Steere näher untersucht und als Lyme-Arthritis bezeichnet, nachdem in Lyme im U.S. Bundesstaat Connecticut gehäuft Fälle von rheumatischer Arthritis bei Kindern auftraten (208). 1982 isolierte Willy Burgdorfer den Erreger der Lyme-Borreliose aus dem Mitteldarm von *Ixodes scapularis* (13). Damit wurde der anfängliche Verdacht, dass es sich um eine von Arthropoden übertragene Infektionskrankheit handelt, bestätigt. Die Genotypisierung unterschiedlicher Isolate ergaben, dass sich das ursprünglich als *B. burgdorferi* benannte Pathogen in mehrere Genospezies aufteilt. In den USA wird die Lyme-Borreliose ausschließlich von *B. burgdorferi sensu stricto* verursacht. In Europa sind hingegen drei humanpathogene Borrelia Spezies bekannt – *B. burgdorferi s.s.*, *B. afzelii*, *B. garinii*. Wobei die Mehrzahl der Erkrankungen in Europa durch *B. afzelii* und *B. garinii* hervorgerufen wird (204). Es wurden auch Fälle in Europa beschrieben, bei denen die Spezies *B. bissettii*, *B. lusitaniae*, *B. spielmani* und *B. valaisiana* mit der Lyme-Borreliose in Verbindung gebracht werden (23, 36, 178, 179, 212).

### *Immunevasion*

Trotz einer aktiven Immunantwort des Wirtes kann *B. burgdorferi* während des Ausbreitungsprozesses überleben. Der Erreger hat verschiedene Mechanismen entwickelt, der Abwehrreaktion zu entgehen. *B. burgdorferi* kann sowohl die Expression von Oberflächenproteinen verändern oder minimieren als auch direkt in das Immungeschehen eingreifen, indem das Bakterium die Immunantwort des Wirtes inhibiert. Das Lipoprotein VlsE ist ein Beispiel für Antigenvariation bei *B. burgdorferi* (232). Die Frequenz der Antigenrekombination ist in immunkompetenten Mäusen höher als in immundefizienten (233). Die Immunreaktion des Wirtes hat auch zur Folge, dass z.B. das Oberflächenprotein OspC im Mausmodell als Antwort auf die Bildung spezifischer Antikörper in seiner Expression runter reguliert wird. Bis dahin gebildete Antikörper werden somit unwirksam (122).

Sobald *B. burgdorferi* in den Wirtsorganismus eindringt, wird es mit dem Komplementsystem konfrontiert. *B. burgdorferi* aktiviert den alternativen und den klassischen Weg, kann aber dem Komplementangriff widerstehen (101). Jedoch unterscheiden sich einzelne Borrelienisolate in ihrer Serumresistenz gegenüber dem Komplementsystem (10) und werden danach klassifiziert. *B. burgdorferi* Isolate werden als intermediär resistent eingestuft, da die Serumresistenz eines Isolats variieren kann. *B. afzelii* Isolate gelten als Serum resistent und *B. garinii* Isolate sind Serum sensitiv und werden stärker mit Komplementproteinen beladen als Serum resistente Stämme (105, 109, 114). Die Serumresistenz korrespondiert mit der Fähigkeit der Borrelien die Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1 an ihre Oberfläche zu binden (108). Für *B. burgdorferi* wurden bis zu fünf Lipoproteine auf der Oberfläche identifiziert, die für die Bindung der beiden Regulatorproteine verantwortlich sind und entsprechend als „Complement regulator-acquiring surface proteins“ (CRASPs) bezeichnet werden (107, 108). Die Anzahl der exprimierten CRASPs unterscheidet sich je nach Isolat. Die CRASPs lassen sich in zwei Gruppen aufteilen. CRASP-1 und CRASP-2 gehören zur Gruppe I und binden Faktor H und FHL-1. Hingegen interagieren CRASP-3, CRASP-4 und CRASP-5 der Gruppe II ausschließlich mit Faktor H. CRASPs bilden eine heterogene Proteinfamilie und sind bis auf CRASP-3, CRASP-4 und CRASP-5, die zur Familie der „OspE/F related proteins“ (Erp) gehören, nicht miteinander verwandt (Tab. 3).

Tabelle 3: Mitglieder der CRASP Familie von *B. burgdorferi* (verändert nach 66)

	<b>Gen</b>	<b>Genlokalisierung</b>	<b>MW (kDa)</b>	<b>Ligand</b>
Gruppe I				
CRASP-1	<i>cspA</i>	lp54	25,9	Faktor H, FHL-1
CRASP-2	<i>cspZ</i>	lp28-3	23,2	Faktor H, FHL-1
Gruppe II				
CRASP-3	<i>erpP</i>	cp32-9	20,7	Faktor H
CRASP-4	<i>erpC</i>	cp32-2	18,5	Faktor H
CRASP-5	<i>erpA</i>	cp32-1	17,7	Faktor H

lp: „linear plasmid“, cp: „circular plasmid“, MW: „molecular weight“

Vergleichende Analysen der CRASP-Expressionsmuster haben gezeigt, dass alle Serum resistenten und intermediär resistenten Stämme CRASP-1 exprimieren, was auf eine bedeutende Rolle für die Komplementresistenz schließen lässt (161, Peter Kraiczy persönliche Mitteilung). Diese Hypothese wird durch die Beobachtungen gestützt, dass CRASP-1 „Knock-out“ Mutanten und Borrelienstämmen, denen das lineare Plasmid 54 (lp54) fehlt, welches das CRASP-1 kodierende Gen *cspA* trägt, Serum sensitiv sind (11). Seit 2005 ist die

dreidimensionale Struktur von CRASP-1 bekannt (26). Das Protein weist eine helikale Lollipop-Struktur auf. Zwei Moleküle bilden über die C-terminalen Helices ein Homodimer aus (Abb. 6). Das CRASP-1-Dimer formt eine hydrophobe Tasche, in der Aminosäuren lokalisiert sind, die für die Bindung von Faktor H oder FHL-1 essentiell sind (25, 26). Faktor H und FHL-1 binden über die SCRs 5-7 und SCRs 19-20 an Gruppe I CRASPs (CRASP-1 und CRASP-2). Die Binderegion für die Gruppe II CRASPs ist im C-Terminus von Faktor H den SCRs 19-20 lokalisiert (104, 107, 244). Faktor H und FHL-1 besitzen Kofaktoraktivität und vermitteln die enzymatische Spaltung von C3b durch die Protease Faktor I, wenn die Wirtsproteine an CRASPs gebunden sind (66, 103, 104). C3b wurde auch inaktiviert, nachdem Borrelienzellen entweder mit humanem Serum oder FHL-1 inkubiert wurden (108). Demzufolge sind Serum resistente *B. burgdorferi* Stämme in der Lage Faktor H/FHL-1 aus dem Serum zu rekrutieren und die Komplementaktivierung direkt auf der Oberfläche zu kontrollieren. Damit nutzen die Bakterien einen verbreiteten Mechanismus der Komplementevasion. Zusätzlich exprimiert *B. burgdorferi* ein CD59 ähnliches Protein, das an das Komplementprotein C9 bindet und die Bildung des MAC inhibiert (162). Mit diesen Immunevasionsstrategien sind die Spirochäten vor der Komplement vermittelten Phagozytose und Lyse geschützt und können im Wirt überleben und sich ausbreiten.

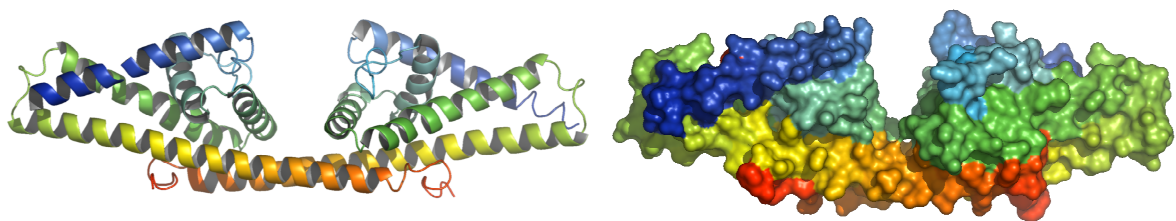


Abbildung 6: Dreidimensionale Struktur des CRASP-1 Homodimers von *B. burgdorferi* (26).

### 3.2 *Staphylococcus aureus*

#### *Biologie*

Das grampositive, kugelförmige Bakterium *Staphylococcus aureus* gehört zur Familie der Micrococcaceae. Dem Namen nach ist *S. aureus* unter dem Mikroskop häufig in Traubenform oder paarweise angeordnet. Staphylokokken sind katalasepositiv, fakultativ anaerob und können bei Mensch und Tier schwere Infektionen hervorrufen. *S. aureus* unterscheidet sich von anderen Staphylokokkenspezies durch eine goldene Pigmentierung der Kolonien, die durch Karotinoide verursacht wird, und die Anwesenheit der Enzyme Koagulase und

Desoxyribonuklease. Das Genom besteht aus einem 2,8-Mb großen zirkulären Chromosom, Prophagen, Plasmiden und Transposons. Gene, die Virulenz und Antibiotikaresistenz vermitteln, liegen sowohl auf dem Chromosom als auch auf extrachromosomalen Elementen, über die diese Genen zwischen Bakterien ausgetauscht werden (124).

### *Pathogenese und Krankheitsbild*

*S. aureus* ist ein opportunistisches Pathogen, das für eine große Zahl von nosokomialen Infektionen verantwortlich ist. In den vergangenen Jahren haben vor allem MRSA-Stämme an Bedeutung gewonnen, die durch den weit verbreiteten Antibiotikaeinsatz entstanden sind und nunmehr eine erfolgreiche Therapie erschweren. Bei 20 % der Bevölkerung lebt das Bakterium dauerhaft als Kommensale auf der Haut und den Schleimhäuten des Oropharynx (163). Abhängig vom Immunstatus kann das Bakterium jedoch Hautinfektionen in Form von Pyodermien oder lebensbedrohliche invasive Infektionen, z.B. Osteomyelitis, Pneumonie, septische Arthritis und Endokarditis, verursachen. Zusätzlich produzieren einige Stämme Toxine, die zu den Toxikonosen „Staphylococcal scalded skin syndrome“ (SSSS), Toxisches Schock-Syndrom und Lebensmittelvergiftungen führen.

*S. aureus* gehört zur Standortflora und besiedelt Schleimhäute durch Adhäsion an Oligosaccharidketten der Muzine („Schleimstoffe“), die durch Oberflächenproteine vermittelt wird (195). Um eine Infektion hervorzurufen wirken meist disponierende Faktoren begünstigend. So spielen neben Fremdmaterialien, wie Kathetern oder Plastikimplantaten, immunsuppressive Faktoren oder Vorschädigungen der Haut eine wichtige Rolle. Vor allem Fremdmaterialien fördern das Eindringen von *S. aureus* in den Organismus. Diese werden schnell von Fibrinogen, Fibronektin und Kollagen umhüllt und verbessern die Adhärenz des Erregers über sog. „Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules“ (MSCRAMM), die an Proteine der ECM binden. Die Expression von Adhäsinen ist nicht nur für die Anlagerung an Gewebe entscheidend, sondern verhilft *S. aureus* zur Ausbildung eines Schutzmantels aus wirtseigenen Proteinen, um sich damit vor dem Immunsystem zu tarnen. Besonders bei invasiven Infektionen sind Endothelzellen von Bedeutung. *S. aureus* adhärirt an Endothelzellen und wird daraufhin von diesen phagozytiert (60). Das intrazelluläre Milieu fördert die Bildung von „small-colony variants“ (221). Auf diese Weise ist der Erreger vor dem Immunsystem und Antibiotika geschützt und persistierende oder rezidivierende Infektionen werden begünstigt (173). *S. aureus* sekretiert ein breites Spektrum an zytolytischen Toxinen, wie dem  $\alpha$ -Toxin, und Enzymen, z.B. Hyaluronidasen, Lipasen,

Desoxyribonukleasen, Kollagenasen und andere Proteasen. Diese Faktoren ermöglichen es dem Erreger Wirtsgewebe zu zerstören, um Nährstoffe für sich zugänglich zu machen sowie um sich innerhalb des Wirts über den Blutkreislauf auszubreiten oder in angrenzendes Gewebe vorzudringen. Die Expression von Virulenzfaktoren wird über ein Set von regulatorischen Genen koordiniert, die als „Accessory gene regulator“ (*agr*) bezeichnet werden. Ist eine bestimmte Zelldichte erreicht, wird die Expression von extrazellulären Proteinen induziert. Gleichzeitig wird die Bildung von Oberflächenproteinen, die zur Anlagerung an Wirtsgewebe von Bedeutung sind, supprimiert (164).

*S. aureus* bildet bei lokalen Infektionen mit Hilfe des Fibrinogenrezeptors „Clumping factor A“ (ClfA) und der Koagulase eine Fibrinkapsel aus und grenzt sich so von der Umgebung ab. Einwandernde Granulozyten lagern sich um den Infektionsherd. Aufgrund von Nährstoffmangel breitet sich diese Kapsel zunehmend aus und es entsteht ein Abszess. Die Abszedierung ist eine typische Wirtsantwort auf eine lokale *S. aureus* Infektion und äußert sich auf der Haut als Karbunkel oder beim Verschmelzen mehrerer Karbunkel als Furunkel.

Einige *S. aureus* Stämme produzieren Exotoxine, wie das „Toxic shock syndrom toxin“-1 (TSST-1), die Lebensmittelintoxikationen verursachenden Enterotoxine A-E oder die beiden Exfoliatintoxine A und B. TSST-1 und Enterotoxine sind Superantigene, die direkt an die invariante Domäne des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC, „major histocompatibility complex“) der Klasse II binden und diesen mit dem T-Zellrezeptor verbinden. Folglich kommt es zu einer unspezifischen Aktivierung und Proliferation von bis zu 20 % der ruhenden T-Zellen und zu einer massiven Freisetzung von Zytokinen, das zu hohem Fieber, Schock, verstärkter Permeabilität der Gefäße und Multiorganversagen führt (124). Hingegen bewirken die Exfoliatintoxine eine nicht-entzündungsassoziierte blasenförmige Abhebung der Haut durch proteolytische Spaltung des Stratum granulosum vom Stratum spinosum. Diese Erkrankung kommt vor allem bei Kleinkindern vor und wird als „Staphylococcal scaled skin syndrom“ oder Lyell-Syndrom bezeichnet.

### *Immunevasion*

Um im menschlichen Organismus zu überleben, hat *S. aureus* mehrere Mechanismen entwickelt, vor allem die angeborene Immunantwort des Menschen zu umgehen. Bisher wurden zahlreiche Faktoren identifiziert, mit denen der Erreger in der Lage ist die Wirtsabwehr auf unterschiedlichen Ebenen zu torpedieren. Dabei spielen

Komplementevasionsstrategien eine zentrale Rolle. *S. aureus* exprimiert eine Reihe von Immunevasionsproteinen, die an der Oberfläche gebunden sind oder sekretiert werden. Die Proteine blockieren die Migration von neutrophilen Granulozyten oder interferieren direkt mit der Opsonophagozytose durch Immunzellen (Abb. 7).

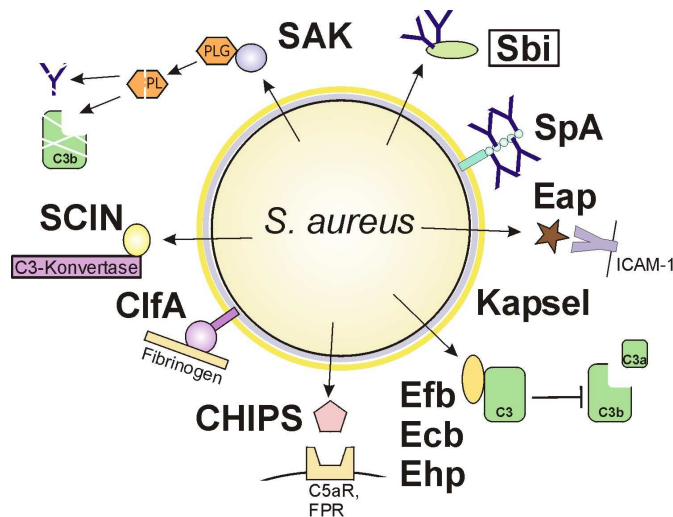


Abbildung 7: Mechanismen, mit denen *S. aureus* der Opsonophagozytose entgeht. Die Funktion der Moleküle ist im Text beschrieben. Sbi: „Staphylococcal binder of immunoglobulins“, SpA: Protein A, Eap: „Extracellular adherence protein“, Efb: „Extracellular fibrinogen-binding protein“, Ecb: „Extracellular complement-binding protein“, Ehp: „Efb homology protein“, CHIPS: „Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*“, ClfA: „Clumping factor A“, SCIN: „Staphylococcal complement inhibitor“, SAK: Staphylokinase, PLG: Plasminogen, PL: Plasmin (verändert nach 51).

Dabei sind auch einige kürzlich identifizierter Komplementinhibitoren von entscheidender Bedeutung. *S. aureus* sekretiert das 14 kDa Protein „Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*“ (CHIPS), das spezifisch an die beiden verwandten Rezeptoren auf Neutrophilen, den C5a Rezeptor und den Rezeptor für fomylierte Peptide (FPR), bindet. CHIPS blockiert die Bindung der natürlichen Liganden und die nachgeschaltete Signalstransduktionskaskade. So verhindert *S. aureus* die Aktivierung und Rekrutierung von Neutrophilen, die durch das Komplementsystem vermittelt wird (32, 169). Die Chemotaxis von Neutrophilen wird auch durch das „Extracellular adherence protein“ (Eap) inhibiert. Eap blockiert durch die direkte Interaktion mit dem „Intercellular Adherence Molecule“-1 (ICAM-1) auf Endothelzellen die Adhäsion von Neutrophilen an die Blutgefäßwand und verhindert die Diapedese und Migration zum Infektionsherd (19). *S. aureus* sekretiert zytolytische Toxine mit einer starken Spezifität für Leukozyten, sog. Leukotoxine (51). Von Neutrophilen phagozytierte Bakterien können in den Phagolysosomen überleben, indem sie zum einen mit

den Enzymen Staphylokinase und Aureolysin antimikrobielle Defensine neutralisieren und zum anderen mit Hilfe von zwei Superoxiddismutasen, der Katalase und Karotinoidpigmenten reaktive Sauerstoffspezies abbauen (186).

Fünfundsiebzig Prozent aller humanen *S. aureus* Infektionen werden von Staphylokokken verursacht, die eine Polysaccharidkapsel des Serotyps 5 oder 8 produzieren (124). Die Kapsel lässt zwar die Bindung von Komplementfaktoren an die Zellwand zu, macht diese aber für die entsprechenden Rezeptoren auf Neutrophilen unzugänglich und vermittelt somit Resistenz gegenüber Phagozytose (51). „Clumping factor A“ bindet Fibrinogen und verhindert durch den sich bildenden Fibrinogenmantel die Ablagerung von Opsoninen auf der Erregeroberfläche. Damit ist *S. aureus* vor der Phagozytose durch Makrophagen geschützt (74). Das auf der Oberfläche exprimierte Protein A (SpA) bindet den Fc Teil von IgG (50). Demzufolge werden die Immunglobuline in umgekehrter Orientierung an die Zelloberfläche gebunden und können so weder vom Fc Rezeptor auf Neutrophilen noch von C1q erkannt werden. Das Protein Sbi wurde als zweites IgG bindendes Protein in *S. aureus* identifiziert (235). Zusätzlich interagiert Sbi mit  $\beta_2$ -Glykoprotein I, das auch als Apolipoprotein H bekannt ist (234). Die Protease Staphylokinase wandelt humanes Plasminogen, das über unterschiedliche Rezeptoren an die Bakterienoberfläche gebunden ist, in seine aktive Form Plasmin um. Diese Serinprotease wiederum spaltet die beiden Opsonine IgG und C3b (187). *S. aureus* kann somit auf unterschiedlichen Wegen Immunglobuline inaktivieren und die Aktivierung des Komplementsystems über den klassischen Weg hemmen.

In Abb. 8 sind die Komplement inhibitorischen Proteine von *S. aureus* mit den jeweiligen Angriffspunkten in der Komplementkaskade dargestellt. *S. aureus* exprimiert dabei mehrere Proteine, die auf der Ebene von C3 inhibierend auf die Komplementaktivierung wirken. Das sekretierte 10-kDa Protein „Staphylococcal complement inhibitor“ (SCIN) blockiert alle drei Komplementaktivierungswege. SCIN interagiert mit an Oberflächen gebundenen C3-Konvertasen und stabilisiert zum einen die C3bBb und C4bC2a Komplexe, so dass die Aktivität der Konvertasen blockiert wird. Zum anderen verhindert diese Interaktion die Bildung neuer Konvertasen (185). Das SCIN Gen (*scn*) ist zusammen mit den Genen der sekretierten Proteine CHIPS (*chp*), Staphylokinase (*sak*) und des Superantigens Enterotoxin A (*sea*) auf der Pathogenitätsinsel SaPI5 lokalisiert, die als erstes „Immune Evasion Cluster“ (IEC) bei *S. aureus* beschrieben wurde (32, 185).

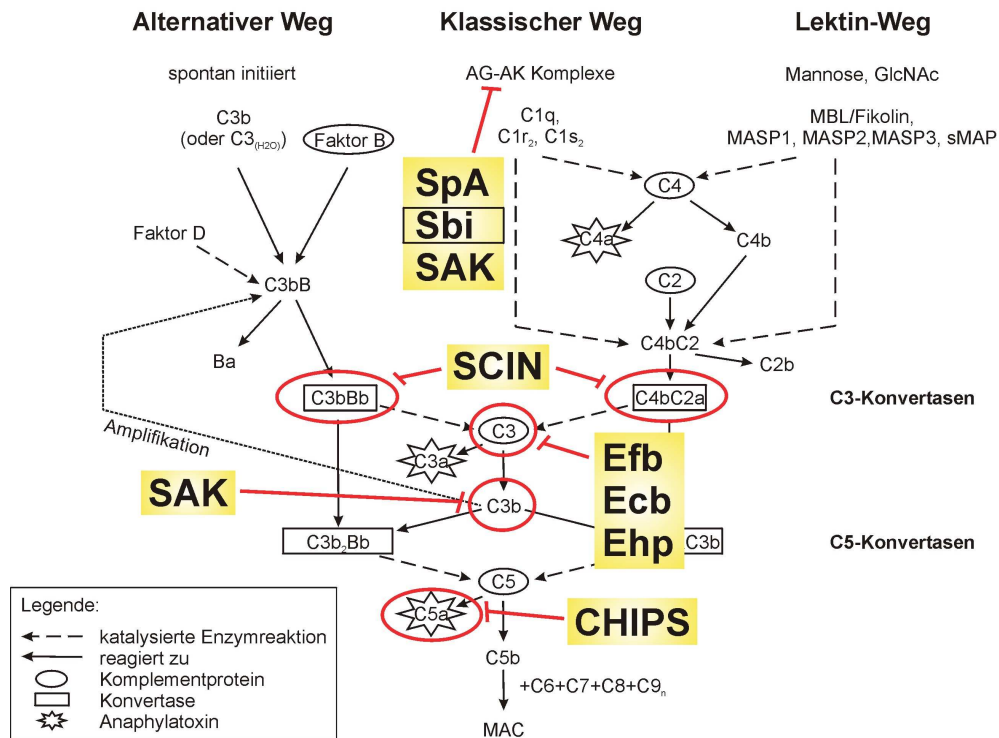


Abbildung 8: Komplementinhibitoren von *S. aureus* und ihre Angriffspunkte in der Komplementkaskade. SpA: Protein A, Sbi: „staphylococcal binder of immunoglobulins“, SAK: Staphylokinase, SCIN: „Staphylococcal complement inhibitor“, Efb: „Extracellular fibrinogen-binding protein“, Ecb: „Extracellular complement-binding protein“, Ehp: „Efb homology protein“, CHIPS: „Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*“

Das „Extracellular fibrinogen-binding protein“ (Efb), ursprünglich als Fibrinogen bindendes Protein beschrieben, bindet zusätzlich an C3. Efb inhibiert den alternativen und den klassischen Weg der Komplementaktivierung und hemmt die Opsonophagozytose (119, 120). Dabei blockiert Efb die Aktivierung von C3 zu C3b, indem es an die C3d Domäne im C3 Molekül bindet und Konformationsänderungen herbeiführt, die eine Spaltung zu C3a und C3b verhindern (62). *S. aureus* exprimiert das „Efb homology protein“ (Ehp), das besonders im C-terminalen C3 bindenden Teil eine hohe Homologie zu Efb aufweist. Im Unterschied zu Efb verfügt Ehp über zwei C3d Bindestellen und inhibiert die Spaltung von C3 über den alternativen Weg in einem stärkeren Maße als Efb (61). Kürzlich wurde ein zweites „Immune Evasion Cluster“ (IEC-2) beschrieben, das die SCIN homologen Proteine SCIN-B und SCIN-C sowie Efb und ein weiteres Efb verwandtes Protein „Extracellular complement-binding protein“ (Ecb) kodiert und vermutlich durch horizontalen Gentransfer entstanden ist. Die homologen Proteine wurden ebenfalls als Konvertaseinhibitoren identifiziert und charakterisiert (93). Obwohl bisher keine Komplementregulator bindenden Proteine für *S. aureus* bekannt sind, wurde eine Faktor I vermittelte Spaltung von gebundenem C3b zu iC3b



unabhängig von Faktor H beschrieben, die zu einer verminderten Phagozytoseaktivität von Neutrophilen führt (27, 28). Auf einer weiteren Pathogenitätsinsel ist das Gen für das Protein „Staphylococcal Superantigen-like“-7 (SSL-7) lokalisiert, welches C5 bindet und die durch das Komplementsystem vermittelte Hämolyse und das Abtöten von *E. coli* inhibiert. Unabhängig davon bindet SSL-7 an IgA und verhindert die Erkennung über den Fc $\alpha$ RI (116).

#### 4 Fragestellung

Humanpathogene Krankheitserreger haben zahlreiche Strategien entwickelt, die Aktivierung der Komplementkaskade zu unterbinden, um den Angriff dieses potenten Effektorsystems zu überleben und eine Infektion etablieren zu können. Ein bei vielen Pathogenen weit verbreiteter Mechanismus ist die Rekrutierung der wichtigsten Komplementregulatoren des alternativen Weges, Faktor H und FHL-1, an ihre Oberfläche. Als Inhibitoren der Komplementaktivierung sind die gebundenen Regulatorproteine funktional aktiv und schützen den Erreger vor Komplement vermittelter Phagozytose und Zellyse. Das Protein FHR-1 weist im C-Terminus eine starke Homologie zu Faktor H auf. Diese strukturelle Verwandtschaft lässt ähnliche Funktionen für FHR-1 bei der Immunevasion von Pathogenen vermuten.

Ziel dieser Arbeit war es die Bindung von FHR-1 an die Faktor H bindenden Oberflächenproteine CRASP von *B. burgdorferi* zu untersuchen und zu charakterisieren. Vergleichende Bindungsstudien sollten Aufschluss über die Bindeeigenschaften von FHR-1, Faktor H und FHL-1 gegenüber den CRASPs geben. Darüber hinaus sollte die Funktion von FHR-1 bei der Bindung an CRASPs analysiert werden. Außerdem befasst sich die Arbeit mit der Fragestellung, ob die Rekrutierung der Komplementregulatoren der Faktor H Proteinfamilie ein allgemeines Prinzip der Immunevasion von humanpathogenen Erregern ist. Dies sollte am Beispiel von *S. aureus* überprüft werden, da das Bakterium bei der Streuung innerhalb des Wirtes eine ausgeprägte bakteriämische Phase durchläuft und somit dem Komplementsystem ausgesetzt ist. Dabei sollte die Bindung von Faktor H Proteinen aus humanem Serum an *S. aureus* untersucht werden, der bakterielle Ligand identifiziert und der Mechanismus der Interaktion charakterisiert werden. Letztendlich soll die Arbeit dazu beitragen, die Interaktionsmechanismen zwischen Wirt und Pathogen weiter aufzuklären, die es dem Pathogen ermöglicht der Immunantwort des Wirtes zu entkommen und eine Infektion zu etablieren. Diese Ergebnisse sollen dann als Grundlage für die Entwicklung neuer therapeutische Wirkstoffe und Vaccine dienen.

## Übersicht zu den Manuskripten

Die vorliegende Dissertation basiert auf folgenden Manuskripten.

- 1 Haupt K, Kraiczky P, Wallich R, Brade V, Skerka C, Zipfel PF.**  
**Binding of Human Factor H-Related Protein 1 to Serum-Resistant *Borrelia burgdorferi* is Mediated by Borrelial Complement Regulator-Acquiring Surface Proteins.**  
J Inf Dis 2007; 196:124-133

### Inhalt des Manuskripts:

*B. burgdorferi*, der Erreger der Lyme-Borreliose, bindet FHR-1 zusätzlich zu Faktor H und FHL-1. Die FHR-1 Bindung wird über die drei Oberflächenproteine CRASP-3, CRASP-4 und CRASP-5, aber nicht über CRASP-1 und CRASP-2 vermittelt. Die drei Faktor H Proteine zeigen unterschiedliche Interaktionsprofile gegenüber den fünf CRASPs. FHR-1 konkurriert mit Faktor H um die CRASP-Bindung und moduliert dabei die Komplement regulatorische Aktivität von Faktor H, was auf eine entscheidende Relevanz für FHR-1 bei der Immunevasion von *B. burgdorferi* hinweist.

### Umfang und Inhalt des Eigenanteils:

Katrin Haupt hat folgende Experimente konzipiert, geplant, durchgeführt, ausgewertet und interpretiert: Expression und Aufreinigung der rekombinanten Proteine FHR-1 und FHL-1, Absorptionsversuche mit *B. burgdorferi* LW2, Immunfluoreszenzversuche mit *B. burgdorferi* LW2, Proteinbindungsexperimente, ELISA und Kofaktorassay. Die „Surface Plasmon Resonance“ Experimente wurden von ihr konzipiert und interpretiert. Die Ergebnisse des Ligandenblot mit Zelllysaten unterschiedlicher Borrelienstämmen hat Katrin Haupt interpretiert. Ebenfalls hat sie das Manuskript geschrieben.

- 2 **Haupt K**, Kraiczky P, Wallich R, Brade V, Skerka C, Zipfel PF.  
**FHR-1, an additional human plasma protein, binds to complement regulator-acquiring surface proteins of *Borrelia burgdorferi*.**  
J Int Med Microbiol (die Annahme des Manuskripts wurde am 09.11.2007 bestätigt, im Druck)

Inhalt des Manuskripts:

FHR-1 bindet an *B. burgdorferi* über die Oberflächenproteine CRASP-3, CRASP-4 und CRASP-5 und unterscheidet sich damit von den humanen Interaktionspartnern Faktor H und FHL-1. Vergleichende Analysen zeigen unterschiedliche Bindeprofile von FHR-1 und Faktor H gegenüber den drei CRASPs, d.h. seitens des Pathogens bindet CRASP-3 stärker Faktor H, CRASP-4 zeigt eine Präferenz für FHR-1 und CRASP-5 bindet beide Komplementproteine mit gleicher Intensität. Die Expression mehrerer CRASPs erlaubt es dem Pathogen, verschiedene Regulatoren der humanen Immunantwort zu binden und so im Wirt zu überleben.

Umfang und Inhalt des Eigenanteils:

Katrin Haupt hat folgende Experimente konzipiert, geplant, durchgeführt, ausgewertet und interpretiert: Expression und Aufreinigung der rekombinanten Proteine FHR-1 und FHL-1, ELISA und „Slot blot“ Versuche. Ebenfalls hat sie das Manuskript geschrieben.

- 3 Kraiczky P, Schreiber J, Skerka C, **Haupt K**, Brade V, Wallich R, Zipfel PF.  
**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.**  
J Int Med Microbiol (die Annahme des Manuskripts wurde am 09.11.2007 bestätigt, im Druck)

Inhalt des Manuskripts:

*B. burgdorferi* bindet die beiden Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1 über das Oberflächenprotein CRASP-2. Innerhalb von drei der vier Faktor H Binderegionen in CRASP-2 wurden fünf geladene und hydrophobe Aminosäuren

identifiziert, die für die Faktor H/FHL-1 Bindung essentiell sind. Die Aufklärung der Interaktion zwischen Komplementregulatoren des Wirtes und Virulenzfaktoren des Erregers ist für die Entwicklung therapeutischer Wirkstoffe unerlässlich.

Umfang und Inhalt des Eigenanteils:

Katrin Haupt hat rekombinantes FHL-1 exprimiert und aufgereinigt und für die Experimente bereitgestellt. Die ELISA Versuche wurden von Katrin Haupt konzipiert.

- 4 **Haupt K**, van den Elsen J, Burman J, Hälbich S, Reuter M, Richter J, Skerka C, Zipfel PF.

**The *Staphylococcus aureus* protein Sbi acts as a complement inhibitor and forms a ternary complex with host complement Factor H and C3b.**

(in Überarbeitung für PloS Pathogens bis zum 04.04.2008)

Inhalt des Manuskripts:

*S. aureus* rekrutiert Faktor H und FHR-1 aus humanem Serum an seine Oberfläche. Die Faktor H Bindung wird über das bakterielle Protein Sbi vermittelt, indem es einen ternären Komplex mit Faktor H und C3b oder C3d eingeht. Sbi agiert als wirksamer Komplementinhibitor und hemmt die Komplement vermittelte Hämolyse über den alternativen Weg. Sbi ist ein multifunktionales Protein, mit dem *S. aureus* in der Lage ist der Immunantwort des Wirtes auf mehreren Wegen zu entgehen.

Umfang und Inhalt des Eigenanteils:

Katrin Haupt hat folgende Experimente konzipiert, geplant, durchgeführt, ausgewertet und interpretiert: Kultivierung des *S. aureus* Stammes H591, Adsorptionsversuche mit *S. aureus* H591, ELISA, Proteinbindungsexperimente (CEWA), Inhibition der Proteinbindung mit Antikörpern und Kofaktorassay. Die „Surface Plasmon Resonance“ Experimente sowie die Hämolyseassays wurden von ihr konzipiert und interpretiert. Ebenfalls hat sie die Publikation geschrieben.

## Manuskripte

- 1 **Haupt K, Kraiczky P, Wallich R, Brade V, Skerka C, Zipfel PF. Binding of Human Factor H-Related Protein 1 to Serum-Resistant *Borrelia burgdorferi* is Mediated by Borrelial Complement Regulator-Acquiring Surface Proteins. J Inf Dis 2007; 196:124-33**

## MAJOR ARTICLE

## Binding of Human Factor H-Related Protein 1 to Serum-Resistant *Borrelia burgdorferi* Is Mediated by Borrelial Complement Regulator-Acquiring Surface Proteins

Katrin Haupt,<sup>1,a</sup> Peter Kraiczky,<sup>4,a</sup> Reinhard Wallich,<sup>3</sup> Volker Brade,<sup>4</sup> Christine Skerka,<sup>1</sup> and Peter F. Zipfel<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Infection Biology, Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology, and <sup>2</sup>Friedrich Schiller University, Jena, <sup>3</sup>Institute of Immunology, University of Heidelberg, Heidelberg, and <sup>4</sup>Institute of Medical Microbiology, University Hospital of Frankfurt, Frankfurt, Germany

**Background.** Isolates of *Borrelia burgdorferi*, the causative agent of Lyme disease, express up to 5 distinct complement regulator-acquiring surface proteins (CRASP-1, -2, -3, -4, and -5).

**Methods.** By use of ligand affinity blotting, enzyme-linked immunosorbent assay, surface plasmon resonance, and functional complement assays, we have identified factor H-related protein 1 (FHR-1) as a novel protein that binds to the bacterium via CRASP-3, -4, and -5.

**Results.** When incubated in serum, serum-resistant *Borrelia burgdorferi* strain LW2 bind FHR-1, an additional member of the human factor H protein family, and, similarly, 2 mouse FHR proteins bind to the surface. Recombinant FHR-1 binds to 3 borrelial surface proteins (CRASP-3, -4, and -5) but not to CRASP-1 and -2. A comparative analysis of the individual CRASPs revealed common as well as distinct binding profiles for the 3 human regulators. FHR-1 binds to 3 CRASPs, and factor H binds to all 5 CRASPs. In addition, factor H-like protein 1 interacts with CRASP-1 and -2 but with no other borrelial proteins.

**Conclusions.** Thus, by expressing multiple surface proteins with different binding properties, the pathogen can attach a unique combination of host complement regulators to its surface. For the pathogen, this type of surface decoration and specific acquisition of different host plasma proteins allows fine-tuning of the host immune attack.

Lyme borreliosis, the most commonly reported vectorborne infectious disease in Eurasia and the United States, is caused by bacteria of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex, which includes *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, and *B. afzelii* [1, 2]. Spirochetes cause local skin rash (erythema migrans), and untreated Lyme disease can result in chronic, multisystemic disorders that primarily affect the joints, the central nervous sys-

tem, and the skin, thereby causing Lyme arthritis, neuroborreliosis, or acrodermatitis chronica atrophicans [1]. Upon infection, complement, which represents the first line of innate immune defense, is activated. One central strategy of *B. burgdorferi* to avoid a destructive complement attack is the binding of host fluid-phase complement regulators, such as factor H and/or factor H-like protein 1 (FHL-1) to their surface [3, 4]. Acquisition of these host proteins allows innate immune control and inhibition of the complement cascade at the level of C3 directly on the surface of the pathogen [4].

Factor H and FHL-1, the main human fluid-phase regulators of the alternative pathway of complement, are structurally related and are both encoded by the factor H gene, which is located on chromosome band 1q32 [5]. In their secreted forms, the 2 plasma proteins are exclusively composed of individual protein domains

Received 3 August 2006; accepted 21 December 2006; electronically published 23 May 2007.

Potential conflicts of interest: none reported.

Financial support: Deutsche Forschungsgemeinschaft.

<sup>a</sup> K.H. and P.K. contributed equally to the study.

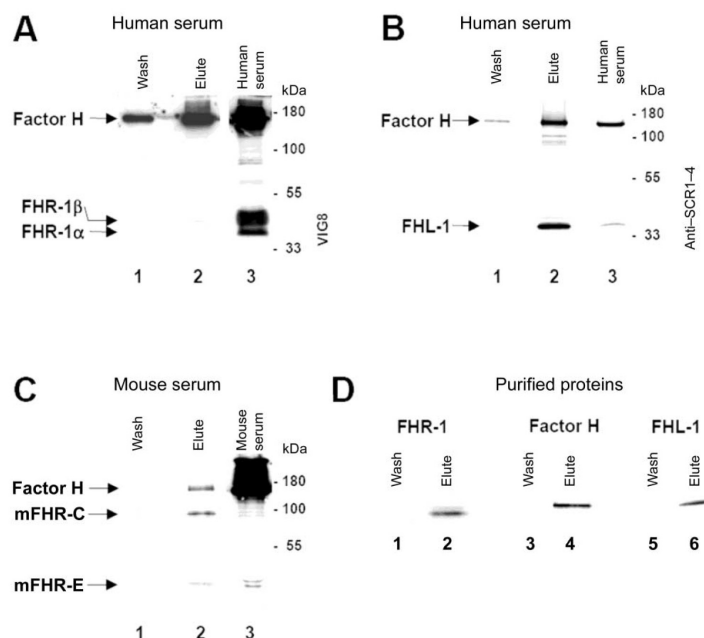
Reprints or correspondence: Prof. Peter F. Zipfel, Dept. of Infection Biology, Leibniz Institute for Natural Products Research and Infection Biology, Beutenbergstr 11a, D- 07743 Jena, Germany (peter.zipfel@pmail.hki-jena.de).

The Journal of Infectious Diseases 2007;196:124-33

© 2007 by the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved.

0022-1899/2007/19601-0019\$15.00

DOI: 10.1086/518509

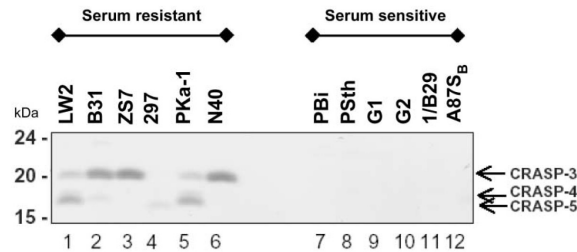


**Figure 1.** Absorption of host immune regulators from human and mouse serum. *Borrelia burgdorferi* strain LW2 bacteria were incubated in human (A and B) or mouse (C) serum or with purified proteins (D). After extensive washing, bound proteins were eluted, separated by SDS-PAGE, and identified by Western blotting using specific antibody or antiserum. Panel A shows that monoclonal antibody VIG8 reacted with the C-terminus of factor H and with factor H-related protein 1 (FHR-1). Panel B shows that anti-SCR1-4 reacted with the N-terminus of factor H and identifies factor H and factor H-like protein 1 (FHL-1). In panel C, factor H antiserum that reacts with mouse factor H and with the 2 FHR proteins present in mouse serum was used. In panel D, *Borrelia* cells were incubated with either recombinant human FHR-1, purified human factor H, or recombinant human FHL-1. Bound proteins were identified in the elute fraction with specific antiserum. The mobility of the marker proteins is indicated.

termed “short consensus repeats” (SCRs). The 42-kDa FHL-1 protein consists of 7 SCRs, and the 150-kDa factor H protein includes 20 SCRs [6]. The SCRs of FHL-1 are identical to the N-terminal domain of factor H; however, the protein has a unique C-terminal extension of 4 aa [7]. Factor H and FHL-1 are members of the factor H protein family, which in humans includes 6 additional factor H-related proteins (FHR-1, -2, -3, -4A, -4B, and -5) [8]. The FHR proteins represent plasma proteins that are structurally and antigenically related to each other and to factor H and that are transcribed from separate genes. The human FHR-1 protein is composed of 5 SCR domains and exists in 2 forms. The 37-kDa FHR-1 $\alpha$  has 1 and the 43-kDa FHR-1 $\beta$  has 2 carbohydrate side chains attached [9]. The 3 most C-terminal SCRs of FHR-1 (SCR3, -4, and -5) display a high homology to SCR18, -19, and -20 of factor H, suggesting similar and conserved function(s). The C-terminal SCRs of both FHR-1 and factor H bind to heparin and

C3b, which is indicative of a regulatory role in complement activation [10, 11]. The precise function(s) of the FHR proteins is currently under investigation. FHR genes are conserved in evolution and have been identified in humans, chimpanzees, rats, mice, and the bony fish barred sand bass [12, 13].

Serum-resistant *B. afzelii* as well as moderately serum-resistant *B. burgdorferi* strains express surface proteins that bind the human complement regulators factor H and/or FHL-1 [14]. These borrelial lipoproteins are termed “complement regulator-acquiring surface proteins” (CRASPs). CRASPs have been divided into 2 groups: proteins that bind both factor H and FHL-1 (CRASP-1 and -2 of *B. afzelii* and *B. burgdorferi*) and proteins that exclusively bind factor H (CRASP-4 and -5 of *B. afzelii* and CRASP-3, -4, and -5 of *B. burgdorferi*) [3]. The 5 CRASPs of *B. burgdorferi* form a functionally related but structurally heterologous group of proteins. The factor H- and FHL-1-binding CRASP-1 belongs to the paralogous family gbb54



**Figure 2.** Binding of factor H-related protein 1 (FHR-1) to serum-resistant, but not serum-sensitive, *Borrelia burgdorferi* strains. Cell lysate prepared from serum-resistant (LW2, B31, ZS7, 297, PKa-1, and N40; lanes 1–6) and serum-sensitive (PBi, PStH, G1, G2, 1/B29, and A87S<sub>B</sub>; lanes 7–12) strains was separated by SDS-PAGE, transferred to a membrane, and probed with FHR-1. The mobility of the various complement regulator-acquiring surface proteins (CRASPs) and that of the size markers is indicated.

[15], and CRASP-2, which lacks amino acid homology to any other CRASP, is encoded by a single gene located on lp28–3 [16]. CRASP-3, -4, and -5 are members of the polymorphic Erp (OspE/F-related proteins) family of *B. burgdorferi* strain B31 [17], with CRASP-3 corresponding to ErpP, CRASP-4 to ErpC, and CRASP-5 to ErpA [18, 19]. Serum resistance of *Borrelia* strains correlates with CRASP expression, suggesting that factor H and FHL-1 attach to the microbial surface and regulate complement activation [3, 20].

In the present study, we have identified FHR-1 as an additional human plasma protein that binds to serum-resistant, but not to serum-sensitive, *B. burgdorferi*. *B. burgdorferi* binds to FHR-1 via CRASP-3, -4, and -5. Each of these borrelial surface proteins also binds factor H. The different recognition and binding patterns of the individual CRASPs are relevant for immune evasion.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains and culture conditions.** Serum-resistant *B. burgdorferi* strains (LW2 [skin isolate, Germany], B31, ZS7, 297, PKa-1, and N40) as well as serum-sensitive strains (PBi, PStH, G1, G2, 1/B29, and A87S<sub>B</sub>) were grown at 33°C for 5–6 days up to a cell density of  $1 \times 10^7$  cells/mL in modified Barbour-Stoener-Kelly medium, as described elsewhere [14].

**Expression of recombinant FHR-1 and FHL-1.** Recombinant FHR-1 and FHL-1 were expressed in insect cells infected with recombinant baculovirus [7, 11]. Briefly, adherent *Spodoptera frugiperda* cells (Sf9) grown at 28°C in monolayer cultures were infected with recombinant virus at an MOI of 5.

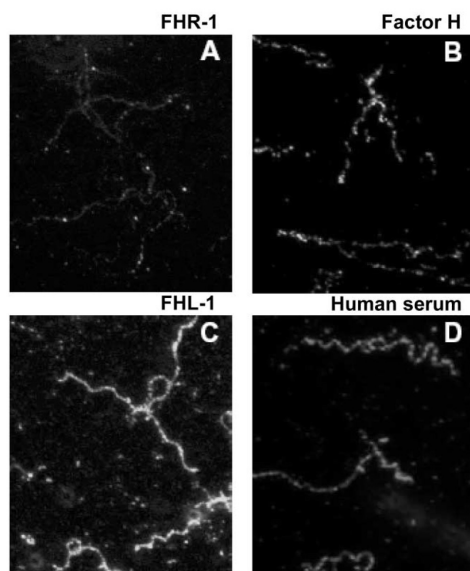
**Construction of expression plasmids and purification of CRASPs.** Construction and expression of plasmids harboring the *cspA*, *cspZ*, and *erpP* genes encoding for CRASP-1, -2, and -3 was done as described elsewhere [15, 17]. CRASP-4 was amplified using primers ErpC42 (forward; 5'-GCTTTGATAA-GTGGATCCAAAATCATACTTTATATG-3') and ErpC3nc

(reverse; 5'-GCTTTTTGATTCATAAATTGTTCTCGAGTAT-ACTTCTAAC-3') of strain B31-MI [21]. The amplified DNA fragment was digested with restriction enzymes *Bam*HI and *Xho*I, resulting in a gene lacking the hydrophobic leader-encoding sequences and ligated in frame into the pGEX-6P-1 vector, which includes a glutathione-S-transferase (GST) tag. Similarly, the gene for CRASP-5 was amplified using primers OspE37 (forward; 5'-GTTTTTATACTCCCGGGTCTTGCA-AAATTCAT-3') and ErpA3nc (reverse; 5'-GTTTTTTTATTCATATACGGGCCCTCTATATTCTAAC-3') and were digested with *Sma*I. The gene lacking the hydrophobic leader sequence was ligated into expression vector pGEX-6P-1. All 5 CRASPs were expressed as GST-fusion proteins in *Escherichia coli* JM109 and were purified on glutathione-Sepharose, as described elsewhere [17].

**Absorption experiments.** Absorption experiments were performed as described elsewhere [14]. Briefly, *B. burgdorferi* cells ( $5 \times 10^8$  cells) were grown to mid-log phase, harvested by centrifugation (5000 g for 30 min at 4°C), and resuspended in veronal buffered saline (supplemented with 1 mmol/L Mg<sup>2+</sup>, 0.15 mmol/L Ca<sup>2+</sup>, and 0.1% gelatine [pH 7.4]). *B. burgdorferi* strain LW2 was incubated either in normal human serum (NHS), 750  $\mu$ L of mouse serum, or PBS supplemented with purified FHR-1 (2.5  $\mu$ g), factor H (2.5  $\mu$ g; Calbiochem), or FHL-1 (2.5  $\mu$ g).

**Immunofluorescence assay.** *B. burgdorferi* strain LW2, which expresses all 5 CRASPs, was grown to mid-log phase, harvested, washed, and resuspended in 300  $\mu$ L of PBS. Spirochetes ( $2 \times 10^9$ ) were incubated with 5  $\mu$ g of purified FHR-1, factor H, or FHL-1 for 1 h at room temperature. After 4 washes with PBS containing 0.2% BSA (PBSA), cells were collected and resuspended in PBSA. After incubation with polyclonal anti-serum specific for the N-terminus of factor H and FHL-1 or monoclonal antibodies (MAbs) specific for the C-terminus of FHR-1 and factor H (VIG8 and C18), cells were washed. Ali-





**Figure 3.** Binding of human complement regulators to intact *Borrelia burgdorferi* cells. *B. burgdorferi* strain LW2 bacteria were incubated with purified factor H-related protein 1 (FHR-1; **A**), factor H (**B**), or factor H-like protein 1 (FHL-1; **C**) or in human serum (**D**). Bound proteins were detected by immunofluorescence after staining with either specific monoclonal antibodies or polyclonal antiserum. Bacteria incubated with human serum (**D**) were treated with monoclonal antibody VIG8, which is specific for the common C-terminus of FHR-1 and factor H and, consequently, identifies both proteins.

quots of 10  $\mu$ L were spotted on microscopic slides and allowed to dry overnight. After fixation with acetone, samples were dried at room temperature and incubated in a humidified chamber with secondary Alexa 555- and Alexa 488-labeled antibodies. Slides were then washed with PBSA and mounted on ProLong Gold antifade reagent (Molecular Probes) before being sealed. Slides were visualized by confocal microscopy using an LSM microscope (Carl Zeiss).

**Protein-binding assays.** Recombinant CRASPs (5  $\mu$ g/mL each) or cell extract prepared from cells expressing an unrelated protein were immobilized on wells of a microtiter plate (MaxiSorb; Nunc) overnight at 4°C. After 3 washing steps with PBS containing 0.05% Tween 20, unspecific binding sites were blocked with 0.2% gelatin in PBS for 6 h at 4°C. The immobilized proteins were incubated with NHS (diluted 1:10) overnight at 4°C. After being washed 3 times in PBS, protein complexes were removed from the well using SDS buffer (60 mmol/L Tris [pH 6.8], 2% SDS, and 25% glycerin). This mixture was subjected to SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using

polyclonal rabbit anti-factor H SCR1-4 antiserum [7] or MAb VIG8 [22].

**SDS-PAGE and Western blot analysis.** Wash and elute fractions (obtained from the adsorption experiments) or samples obtained from the cofactor assays were separated by SDS-PAGE, and factor H SCR1-4 antiserum or MAb VIG8 or C3b antiserum was used for Western blotting.

**ELISA.** Recombinant CRASPs (5  $\mu$ g/mL each) were immobilized on wells of a microtiter plate overnight at 4°C. Unspecific binding sites were blocked with 0.2% gelatin in PBS for 6 h at 4°C. FHR-1, factor H (Calbiochem), or FHL-1 was added to the wells and left overnight at 4°C. After addition of factor H SCR1-4 antiserum or MAb VIG8 for 2 h at room temperature, protein complexes were identified using secondary horseradish peroxidase-coupled antiserum. The reaction was developed with 1,2-phenylenediamine dihydrochloride (Dako-Cytomation), and absorbency was measured at 490 nm.

**Ligand-affinity blotting.** Cell extract was prepared from serum-resistant and serum-sensitive *Borrelia* strains and was analyzed by ligand-affinity blotting, as described elsewhere [16].

**Surface plasmon resonance.** Protein-protein interactions were analyzed using surface plasmon resonance with a Biacore 3000 instrument (Biacore AB), as described elsewhere [23].

**Cofactor assay.** Cofactor activity of factor H bound to CRASPs was analyzed by measuring factor I-mediated conversion of C3b to inactive C3b (iC3b) [24].

## RESULTS

### Binding of FHR proteins derived from human and mouse serum to *B. burgdorferi*.

*B. burgdorferi* strain LW2 was incubated either in human or mouse serum, and bound proteins were eluted, separated by SDS-PAGE, and analyzed by Western blotting. MAb specific for the common C-terminus of FHR-1 and factor H identified FHR-1 $\alpha$ , FHR-1 $\beta$ , and factor H in the elute fraction (figure 1A, lane 2). An antiserum reacting with SCR1-4 identified factor H and FHL-1 (figure 1B, lane 2). Because mice represent a common reservoir for *B. burgdorferi*, mouse serum was used. This approach identified mouse factor H (150 kDa) and 2 murine (m) FHR-proteins, mFHR-C (100 kDa) and mFHR-E (40 kDa), in the elute fraction (figure 1C, lane 2). The results obtained with human serum were confirmed using purified FHR-1, factor H, and FHL-1. All 3 human proteins were detected in the elute fraction (figure 1D, lanes 2, 4, and 6). These experiments demonstrate binding of FHR proteins from human and mouse sources to borrelial cells.

### Correlation between binding of human FHR-1 and serum resistance.

To analyze whether FHR-1 binding correlates with serum resistance, serum-resistant and serum-sensitive isolates were used. FHR-1 bound to all lysates prepared from serum-resistant strains (LW2, B31, ZS7, 297, PKa-1, and N40) but not from serum-sensitive strains (PBi, PStH, G1, G2, 1/B29, and

A87S<sub>B</sub>) (figure 2). The serum-resistant strains express several FHR-1 binding proteins, and on the basis of mobility, it can be concluded that binding occurs via CRASP-3, -4, and -5.

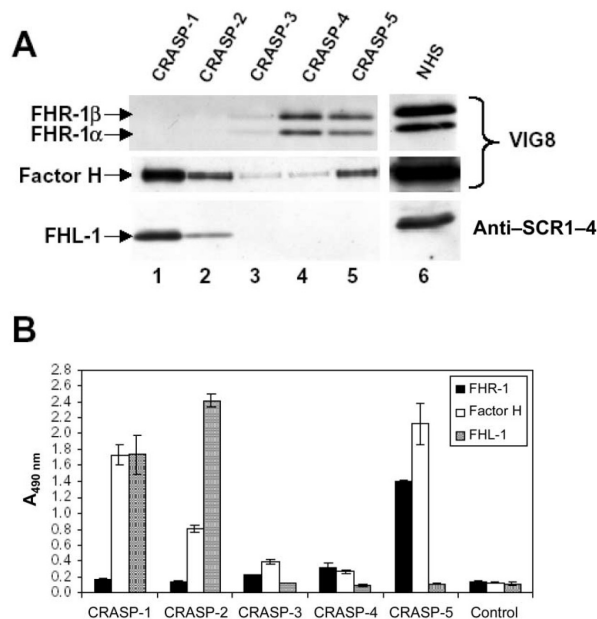
**Binding of human FHR-1 to intact *B. burgdorferi*.** Immunofluorescence microscopy was used to visualize the distribution on the surface. FHR-1 binding to intact *B. burgdorferi* strain LW2, which expresses all 5 CRASPs, showed a patchy pattern, indicating a clustering of the borrelial FHR-1 binding surface proteins (figure 3A). Bound factor H and FHL-1 showed a more homogenous distribution over the entire bacterial surface (figure 3B and 3C). When *B. burgdorferi* was incubated with human serum, the staining pattern suggested that the proteins bind simultaneously to the borrelial surface (figure 3D).

**Binding of human serum proteins FHR-1, factor H, and FHL-1 to CRASPs.** To identify which CRASP binds FHR-1, a combined ELISA and Western blot assay was used, one that allows the identification of the bound host regulators according to their mobility and reactivity. This assay showed weak binding of FHR-1 $\alpha$  and FHR-1 $\beta$  to CRASP-3 and strong binding to CRASP-4 and -5 (figure 4A, top). Factor H bound strongly to

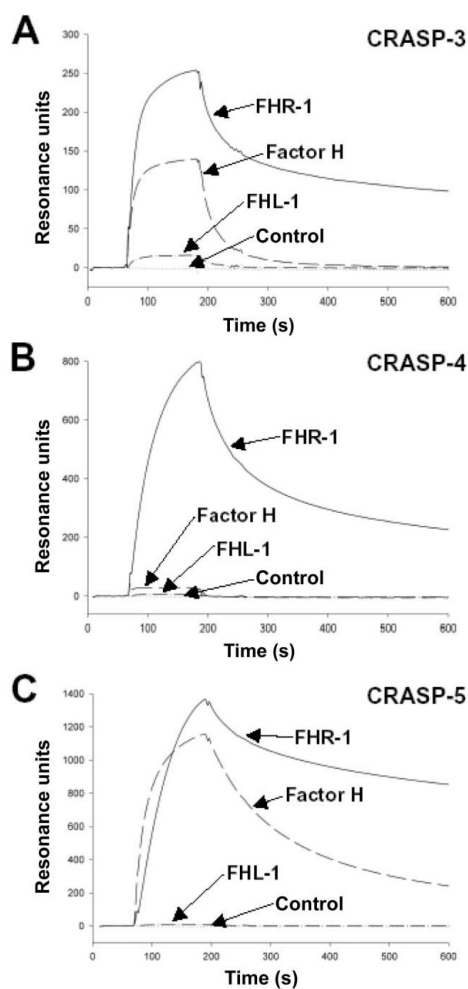
CRASP-1, -2, and -5 and weakly to CRASP-3 and -4 (figure 4A, middle). In addition, FHL-1 did bind to CRASP-1 and -2 (figure 4A, bottom) but to no other CRASP. Thus, FHR-1, factor H, and FHL-1 bind to several CRASPs and show differential preference for individual CRASPs.

Binding was further assayed by ELISA to quantify and compare the intensity of binding. Purified FHR-1 bound weakly to CRASP-3 and -4 and strongly to CRASP-5. Factor H showed prominent binding to CRASP-1, -2, and -5. FHL-1 bound to CRASP-1 and -2 but no other CRASP (figure 4B).

**Surface plasmon resonance.** Having identified FHR-1 as a ligand for CRASP-3, -4, and -5, the binding profiles of FHR-1 and factor H were compared using surface plasmon resonance. FHR-1 bound to CRASP-3, as indicated by the strong association and dissociation profile (figure 5A). FHR-1 binding to CRASP-3 was more pronounced than factor H binding. When equimolar amounts of FHR-1 were used, CRASP-3 interaction was almost twice as strong as factor H interaction. Factor H dissociation was more rapid, and FHL-1 did not bind to CRASP-3. FHR-1 showed strong binding to CRASP-4 (figure



**Figure 4.** Binding of human immune regulators to individual complement regulator-acquiring surface proteins (CRASPs). In panel A, individual CRASPs were immobilized on a microtiter plate and incubated with normal human serum (NHS). After extensive washing, bound proteins were eluted from the wells, separated by SDS-PAGE, and assayed by Western blotting. The various bound proteins (indicated on the left) were identified because of their mobility and reactivity with the indicated antibody or antiserum. In panel B, individual CRASPs were immobilized on the wells of a microtiter plate and incubated with purified host immune regulators factor H-related protein 1 (FHR-1), factor H, or factor H-like protein 1 (FHL-1), and binding was assayed by ELISA.



**Figure 5.** Surface plasmon resonance analyses. Individual complement regulator-acquiring surface proteins (CRASPs) were immobilized, and purified host immune regulators factor H-related protein 1 (FHR-1), factor H, and factor H-like protein 1 (FHL-1) were applied in fluid phase. *A*, CRASP-3. FHR-1 bound with strong intensity to CRASP-3, as indicated by the prominent association profile and the slow dissociation profile. Factor H binding was of lower intensity, and FHL-1 binding was low or absent. *B*, CRASP-4. FHR-1 interacted strongly with immobilized CRASP-4, as indicated by the prominent association profile and the slow dissociation profile. Factor H binding was rather low, and FHL-1 binding was absent. *C*, CRASP-5. FHR-1 bound strongly to immobilized CRASP-5, as indicated by the very prominent association profile and the slow dissociation profile. Factor H binding was of similar intensity, and FHL-1 binding was again low or absent.

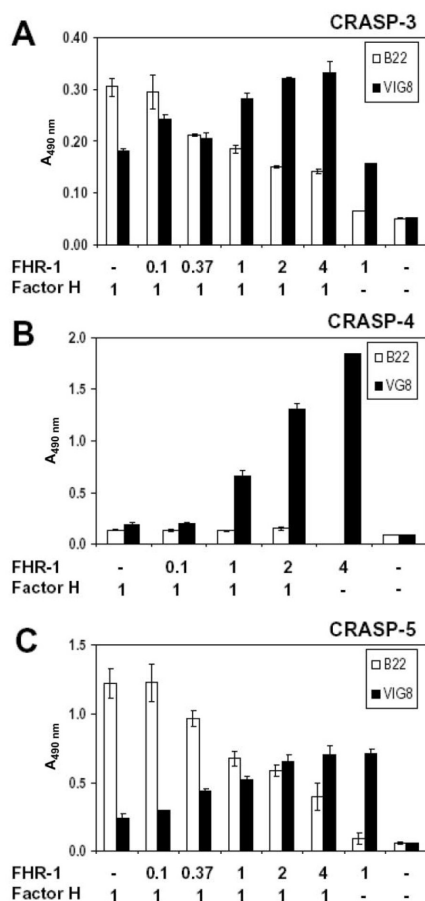
5B). With surface plasmon resonance, binding of neither factor H nor FHL-1 to CRASP-4 was detectable. FHR-1 bound strongly to CRASP-5, as demonstrated by the strong association and the stability of the complex after removal of the ligand (figure 5C). Also, factor H bound to CRASP-5, and dissociation of the factor H:CRASP-5 complex was faster than that of FHR-1:CRASP-5 complex. FHL-1 did not bind to CRASP-5. These assays revealed that FHR-1 binds to 3 CRASPs and that the binding is stronger relative to that of factor H.

The affinity for the strongest associating partners—that is, FHR-1 binding to CRASP-5—was analyzed on a kinetic level. On immobilization of CRASP-5 and using FHR-1 from 0 to 15 nmol, the interaction followed a 1:1 model and reached a dissociation constant of  $3 \times 10^{-9}$  mol/L, with an association rate of  $3.8 \times 10^5$  1/ms and a dissociation rate of  $1 \times 10^{-3}$  1/s.

When CRASP-3 and -4 were immobilized at the same concentration, the interaction was not sufficient to determine kinetic values. Therefore, the interaction between FHR-1 and each of the 3 CRASPs was compared at higher levels, allowing a relative comparison of the association and dissociation rates. FHR-1 showed the strongest association with CRASP-5, and the association with both CRASP-4 and -3 was  $<3.8 \times 10^5$  1/ms. Similarly, the interaction between FHR-1 and CRASP-3 was the most stable, with a dissociation rate  $<1 \times 10^{-3}$  1/s.

**Competition between FHR-1 and factor H for CRASP binding.** The binding preferences of FHR-1 and factor H to CRASP-3, -4, and -5 were compared. When increasing amounts of FHR-1 and a constant concentration of factor H was used, simultaneous binding of both proteins was detected. Binding of factor H was detected with the factor H-specific MAb B22, and binding of both FHR-1 and factor H was detected with MAb VIG8. For CRASP-3, an increase in the concentration of FHR-1 resulted in decreased reactivity of the factor H-specific MAb and in increased reactivity of MAb VIG8, which reacts with both proteins (figure 6A). This pattern shows that CRASP-3 binds both proteins simultaneously. When a ratio reflecting the physiological condition was used (FHR-1:factor H ratio of 0.37:1), FHR-1 and factor H binding was comparable. Again, FHR-1 bound to CRASP-4, but factor H binding was weak (figure 6B; note the different scales of the Y-axes). Both FHR-1 and factor H also bound to CRASP-5 under the physiological setting. Increasing FHR-1 concentrations influenced factor H binding; thus, FHR-1 and factor H seem to share the same binding site(s) (figure 6C).

**Cofactor activity of factor H bound to CRASPs.** Factor H displays cofactor activity when bound to CRASP-1, -2, or 3 [15, 16]. To link binding with regulation, the cofactor activities of factor H bound to various CRASPs were compared. Prominent cofactor activity, demonstrated by the appearance of  $\alpha'68$ ,  $\alpha'46$ , and  $\alpha'43$ , was observed for factor H bound to CRASP-1 and -5 (figure 7A, lanes 1 and 5). These cleavage products



**Figure 6.** Binding competition. The indicated complement regulator-acquiring surface proteins (CRASPs) were immobilized on microtiter plates, and the binding of factor H-related protein 1 (FHR-1) and factor H was analyzed by ELISA. Binding of factor H was determined in the absence of FHR-1. On addition of increasing amounts of FHR-1 (molar ratios are shown), binding was visualized with antibody specific for factor H (monoclonal antibody [MAb] B22) or with MAb VIG8, which reacts with the C-terminus of both FHR-1 and factor H. *A*, CRASP-3. FHR-1 competed with factor H for binding, as indicated by the reduction of factor H-specific MAb B22 reactivity when FHR-1 was added. In addition, the reactivity of MAb VIG8 was increased. The FHR-1:factor H ratio of 0.37:1 reflects the physiological condition. *B*, CRASP-4. Factor H binding was not affected by the addition of FHR-1. The reactivity of MAb B22 remained constant, and that of MAb VIG8 increased. *C*, CRASP-5. Factor H bound strongly to CRASP-5, as indicated by the high absorbency. However, when FHR-1 was added, factor H binding decreased, as indicated by the reduction of factor H-specific MAb B22 reactivity, and MAb VIG8 increased. Note the different scales of the Y-axes.

appeared at lower levels when factor H was bound to CRASP-2 (*lane 2*) and -3 (*lane 3*). Thus, factor H-mediated regulatory activity does directly correlate with the binding intensity of CRASPs.

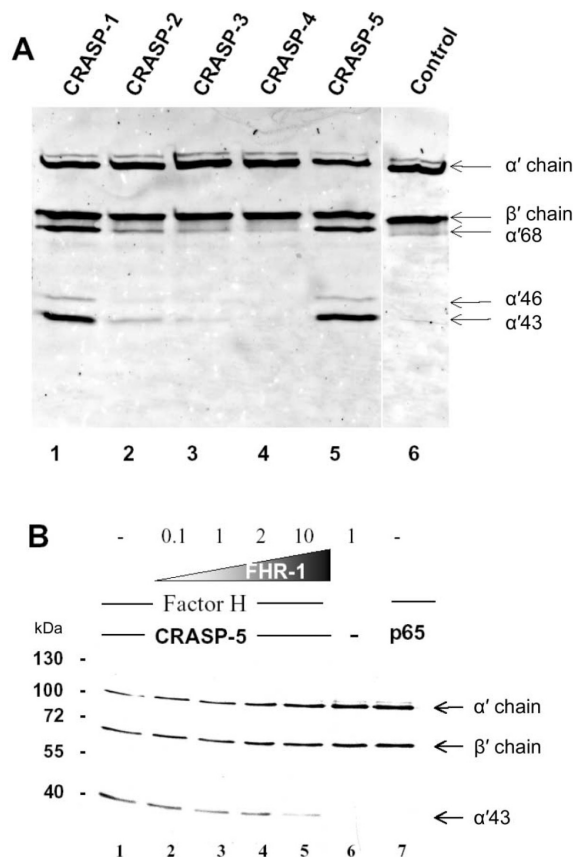
CRASP-5 binds the host complement regulator factor H, but it also binds FHR-1, which lacks complement regulatory activities. Previously, a cofactor enhancing activity was demonstrated for FHR-1 [25]. Thus, we analyzed how FHR-1 modulates the cofactor activity of CRASP-5-bound factor H. Factor H was bound in the presence of increasing amounts of FHR-1, and cofactor activity was analyzed. FHR-1, which competes with factor H for binding, decreased cofactor activity in a dose-dependent manner. Reduced cofactor activity resulting in less C3b cleavage was indicated by the intensity of the  $\alpha$ 43 band (figure 7*B*). Quantitative analyses of the degradation product iC3b showed that, at equal molar FHR-1:factor H ratios, degradation was reduced by 21%, and, at a 2:1 ratio, complement inhibition was reduced by 50% (data not shown). Thus, FHR-1 inhibits the regulatory functions of CRASP-5-bound factor H.

## DISCUSSION

*Borrelia* species express different CRASPs, and CRASP surface expression is associated with serum resistance. Here, we have shown that FHR-1, an additional human plasma protein, binds to the surface of intact serum-resistant, but not serum-sensitive, *B. burgdorferi* strains. Recombinant FHR-1 binds to CRASP-3 (ErpP), -4 (ErpC), and -5 (ErpA). Thus, each CRASP binds at least 2 members of the factor H family: CRASP-3, -4, and -5 bind FHR-1 and factor H, and CRASP-1 and -2 bind factor H and FHL-1. This preference suggests that, on infection, *B. burgdorferi* acquire simultaneously 3 proteins of the factor H family and that this type of surface decoration facilitates immune escape of the pathogen and survival in the immunocompetent host.

Human FHR-1 and, similarly, mFHR-C and mFHR-E bind to borrelial strain LW2 (figure 1*C*) [5]. The 100-kDa mFHR-C, the 40-kDa mFHR-E, and mouse factor H bind to intact *B. burgdorferi* (figure 1*C*). Binding of mouse factor H to CRASP-orthologous Erp and OspE proteins has been shown recently [4]. Binding of human and mouse FHR proteins, which seem to be enriched on the borrelial surface (figure 1*C*), suggests a role for human FHRs and mFHRs in immune evasion. Currently, the biological functions of the FHRs are unknown [26, 27]. FHR-1 has a plasma concentration of  $\sim 50 \mu\text{g/mL}$ , is a constituent of lipoprotein particles, and binds heparin and the central complement components C3b and C3d [9, 11, 22, 28–30].

Serum-resistant *Borrelia* strains express different numbers and combinations of CRASPs. Each CRASP binds at least 2 factor H family proteins and has a preference for 1 host regulator. CRASP-1 preferentially binds factor H, CRASP-2 preferentially binds FHL-1, CRASP-3 and -4 show a preference for



**Figure 7.** Complement regulatory activity of complement regulator–acquiring surface protein (CRASP)–bound factor H. Panel A shows that attached factor H retains cofactor activity and that this activity correlates with binding intensity. The indicated CRASPs or an unrelated control protein (p65) were immobilized on microtiter plates. Factor H, C3b, and factor I were added, and, after incubation for 15 min at 37°C, the mixture was separated by SDS-PAGE; C3b degradation fragments were then analyzed by Western blotting. The mobility of the  $\alpha'$  chain and the  $\beta$  chain of C3 and the cleavage products of the  $\alpha'$  chain— $\alpha'68$ ,  $\alpha'46$ , and  $\alpha'43$ —are indicated. Panel B shows that factor H–related protein 1 (FHR-1) influences the cofactor activity of factor H bound to CRASP-5 in a dose-dependent manner (molar ratios are shown).

FHR-1, and CRASP-5 binds FHR-1 and factor H at similar levels. These preferences correlate with the inhibitory potential: prominent cofactor activity is observed for factor H attached to CRASP-1 and CRASP-5 (figure 7). FHR-1 lacks cofactor activity (data not shown) but competes with factor H for binding to 3 CRASPs and thereby inhibits the complement regulatory activity of factor H. When FHR-1 is present in 2-fold molar excess to factor H, complement inactivation is reduced by 50%. Thus, local expression and distribution of the 2 regulators does clearly affect complement inactivation. It has been

reported previously that, in fluid phase, FHR-1 enhances cofactor activity of factor H [25]. Although both regulators bind to CRASP-5, CRASP-5–bound FHR-1 lacks complement enhancing activity but shows an inhibitory role. Because FHR-1 negatively affects the complement inhibitory activity of factor H, *Borrelia* species, which express multiple factor H–binding proteins, may have an advantage on contact with plasma. Thus, because FHR-1 modulates the complement regulatory activity, surface decoration with various host regulatory proteins influences C3b inactivation and immune evasion.

An increasing number of human pathogens are being identified that express surface molecules that bind host complement regulators of the factor H protein family (i.e., factor H, FHL-1, and FHR-1). In addition to *B. burgdorferi* and *B. garinii*, gram-positive *Streptococcus pyogenes* and *S. agalacticae* bind factor H via the bacterial surface proteins streptococcal M, Fba, and  $\beta$  protein [31, 32], and *S. pneumoniae* does so via the PspC and Hic surface proteins [33, 34]. In the gram-negative bacteria *Neisseria gonorrhoeae* and *B. hermsii*, the Por1A and Fhba protein have been identified [35, 36]. It was recently shown that *Treponema denticula* bind FHL-1 [37]. For several proteins, the factor H and/or FHL-1 binding sides have been mapped either to the C-terminus (e.g.,  $\beta$  protein; CRASP-1, -3, and -5; and the OspE paralogs p21, ErpA, and ErpC) or the N-terminus (e.g., M5, M6, Fba, PspC, and Hic) [27].

In summary, we have identified human FHR-1 as well as mFHR-C and mFHR-E as additional host plasma proteins that bind to the surface of borrelia. Binding of human FHR-1 is mediated by 3 CRASPs (CRASP-3 [ErpP], -4 [ErpC], and -5 [ErpA]). FHR-1 seems to be relevant for immune evasion of the pathogen, given that FHR-1 competes with factor H for binding and thus modulates the regulatory activity of factor H in complement control. Apparently by decorating its surface with distinct host proteins, the pathogen can modulate and fine-tune its immune escape during infection and in different hosts.

#### Acknowledgments

We thank Steffi Hälbich and Christa Hanssen-Huebner, for skillful and expert technical assistance.

#### References

1. Steere AC. Lyme disease. *N Engl J Med* **1989**;321:586–96.
2. Wang G, van Dam AP, Schwartz I, Dankert J. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* **1999**;12:633–53.
3. Kraiczky P, Skerka C, Kirschfink M, Brade V, Zipfel PF. Immune evasion of *Borrelia burgdorferi* by acquisition of human complement regulators FHL-1/reconectin and factor H. *Eur J Immunol* **2001**;31:1674–84.
4. Alitalo A, Meri T, Ramo L, et al. Complement evasion by *Borrelia burgdorferi*: serum-resistant strains promote C3b inactivation. *Infect Immun* **2001**;69:3685–91.
5. Diaz-Guillen MA, Rodriguez de Cordoba S, Heine-Suner D. A radiation hybrid map of complement factor H and factor H-related genes. *Immunogenetics* **1999**;49:549–52.
6. Zipfel PF, Skerka C. Complement factor H and related proteins: an expanding family of complement-regulatory proteins? *Immunol Today* **1994**;15:121–6.
7. Kuhn S, Skerka C, Zipfel PF. Mapping of the complement regulatory domains in the human factor H-like protein 1 and in factor H1. *J Immunol* **1995**;155:5663–70.
8. Jozsi M, Richter H, Loschmann I, et al. FHR-4A: a new factor H-related protein is encoded by the human FHR-4 gene. *Eur J Hum Genet* **2005**;13:321–9.
9. Skerka C, Horstmann RD, Zipfel PF. Molecular cloning of a human serum protein structurally related to complement factor H. *J Biol Chem* **1991**;266:12015–20.
10. Hellwege J, Jokiranta TS, Koistinen V, Vaarala O, Meri S, Zipfel PF. Functional properties of complement factor H-related proteins FHR-3 and FHR-4: binding to the C3d region of C3b and differential regulation by heparin. *FEBS Lett* **1999**;462:345–52.
11. Majno S. Funktionelle charakterisierung des faktor H-verwandten proteins (FHR-1) im komplementsystem. Jena, Germany: Friedrich-Schiller-University, **2003**.
12. Zipfel PF, Kemper C, Dahmen A, Gigli I. Cloning and recombinant expression of a barred sand bass (*Paralabrax nebulifer*) cDNA: the encoded protein displays structural homology and immunological crossreactivity to human complement/cofactor related plasma proteins. *Dev Comp Immunol* **1996**;20:407–16.
13. Ren G, Doshi M, Hack BK, Alexander JJ, Quigg RJ. Isolation and characterization of a novel rat factor H-related protein that is up-regulated in glomeruli under complement attack. *J Biol Chem* **2002**;277:48351–8.
14. Kraiczky P, Skerka C, Brade V, Zipfel PF. Further characterization of complement regulator-acquiring surface proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* **2001**;69:7800–9.
15. Kraiczky P, Hellwege J, Skerka C, et al. Complement resistance of *Borrelia burgdorferi* correlates with the expression of BbCRASP-1, a novel linear plasmid-encoded surface protein that interacts with human factor H and FHL-1 and is unrelated to Erp proteins. *J Biol Chem* **2004**;279:2421–9.
16. Hartmann K, Corvey C, Skerka C, et al. 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* **2006**;61:1220–36.
17. Kraiczky P, Hellwege J, Skerka C, et al. 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* **2003**;33:697–707.
18. Lam TT, Nguyen TP, Montgomery RR, Kantor FS, Fikrig E, Flavell RA. Outer surface proteins E and F of *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease. *Infect Immun* **1994**;62:290–8.
19. Stevenson B, Tilly K, Rosa PA. A family of genes located on four separate 32-kilobase circular plasmids in *Borrelia burgdorferi* B31. *J Bacteriol* **1996**;178:3508–16.
20. Brooks CS, Vuppala SR, Jett AM, Alitalo A, Meri S, Akins DR. Complement regulator-acquiring surface protein 1 imparts resistance to human serum in *Borrelia burgdorferi*. *J Immunol* **2005**;175:3299–308.
21. Fraser CM, Casjens S, Huang WM, et al. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* **1997**;390:580–6.
22. Proding WM, Hellwege J, Spruth M, Dierich MP, Zipfel PF. The C-terminus of factor H: monoclonal antibodies inhibit heparin binding and identify epitopes common to factor H and factor H-related proteins. *Biochem J* **1998**;331:41–7.
23. Wieland GD, Nehmann N, Muller D, et al. Early growth response proteins EGR-4 and EGR-3 interact with immune inflammatory mediators NF-kappaB p50 and p65. *J Cell Sci* **2005**;118:3203–12.
24. Meri T, Blom AM, Hartmann A, et al. The hyphal and yeast forms of *Candida albicans* bind the complement regulator C4b-binding protein (C4BP). *Infect Immun* **2004**;72:6633–41.
25. Hellwege J, Jokiranta TS, Koistinen V, et al. Functional properties of complement factor H-related proteins FHR-3 and FHR-4: binding to the C3d region of C3b and differential regulation by heparin. *FEBS Lett* **1999**;462:345–52.
26. Vik DP, Munoz-Canoves P, Kozono H, Martin LG, Tack BF, Chaplin DD. Identification and sequence analysis of four complement factor H-related transcripts in mouse liver. *J Biol Chem* **1990**;265:3193–201.
27. Zipfel PF, Skerka C, Hellwege J, et al. Factor H family proteins: on complement, microbes and human diseases. *Biochem Soc Trans* **2002**;30:971–8.
28. Zipfel PF, Jokiranta TS, Hellwege J, Koistinen V, Meri S. The factor H protein family. *Immunopharmacology* **1999**;42:53–60.

29. Park CT, Wright SD. Fibrinogen is a component of a novel lipoprotein particle: factor H-related protein (FHRP)-associated lipoprotein particle (FALP). *Blood* **2000**;95:198–204.
30. Park CT, Wright SD. Plasma lipopolysaccharide-binding protein is found associated with a particle containing apolipoprotein A-I, phospholipid, and factor H-related proteins. *J Biol Chem* **1996**;271:18054–60.
31. Areschoug T, Stalhammar-Carlemalm M, Karlsson I, Lindahl G. Streptococcal beta protein has separate binding sites for human factor H and IgA-Fc. *J Biol Chem* **2002**;277:12642–8.
32. Pandiripally V, Gregory E, Cue D. Acquisition of regulators of complement activation by *Streptococcus pyogenes* serotype M1. *Infect Immun* **2002**;70:6206–14.
33. Dave S, Brooks-Walter A, Pangburn MK, McDaniel LS. PspC, a pneumococcal surface protein, binds human factor H. *Infect Immun* **2001**;69:3435–7.
34. Janulczyk R, Iannelli F, Sjöholm AG, Pozzi G, Björck L. Hic, a novel surface protein of *Streptococcus pneumoniae* that interferes with complement function. *J Biol Chem* **2000**;275:37257–63.
35. Ram S, McQuillen DP, Gulati S, Elkins C, Pangburn MK, Rice PA. 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* **1998**;188:671–80.
36. Hovis KM, McDowell JV, Griffin L, Marconi RT. Identification and characterization of a linear-plasmid-encoded factor H-binding protein (FhbA) of the relapsing fever spirochete *Borrelia hermsii*. *J Bacteriol* **2004**;186:2612–8.
37. McDowell JV, Lankford J, Stamm L, Sadlon T, Gordon DL, Marconi RT. Demonstration of factor H-like protein 1 binding to *Treponema denticola*, a pathogen associated with periodontal disease in humans. *Infect Immun* **2005**;73:7126–32.

- 2 **Haupt K, Kraiczy P, Wallich R, Brade V, Skerka C, Zipfel PF. FHR-1, an additional human plasma protein, binds to complement regulator-acquiring surface proteins of *Borrelia burgdorferi*.** (zur Publikation angenommen bei International Journal of Medical Microbiology)

XML:ver:5.0.1 5 jena	IJMM : 50314	Prod.Type:FTP pp.1-6(col.fig.:NIL)	ED:MamathaG. PAGN:NMN SCAN:
-------------------------	--------------	---------------------------------------	--------------------------------

## ARTICLE IN PRESS

Available online at www.sciencedirect.com



ELSEVIER

International Journal of Medical Microbiology ■■■■■ ■■■■■ ■■■■■

IJMM

www.elsevier.de/ijmm

1  
3  
5  
7  
9 **FHR-1, an additional human plasma protein, binds to complement regulator-acquiring surface proteins of *Borrelia burgdorferi***

11 Katrin Haupt<sup>a</sup>, Peter Kraiczy<sup>b</sup>, Reinhard Wallich<sup>c</sup>, Volker Brade<sup>b</sup>, Christine Skerka<sup>a</sup>,  
13 Peter F. Zipfel<sup>a,d,\*</sup>

15 <sup>a</sup>Department of Infection Biology, Leibniz Institute for Natural Products Research and Infection Biology – Hans-Knöll-Institute,  
17 Beutenbergstr. 11a, D-07743 Jena, Germany

17 <sup>b</sup>Institute of Medical Microbiology, University Hospital of Frankfurt/Main, Germany

19 <sup>c</sup>Institute of Immunology, University of Heidelberg, Germany

19 <sup>d</sup>Biological-Pharmaceutical Faculty, Friedrich-Schiller-University, Jena, Germany

21 Accepted 9 November 2007

23  
25 **Abstract**

27 The *Borrelia burgdorferi* strain LW2, a causative agent of Lyme disease, expresses up to five distinct complement  
29 regulator-acquiring surface proteins (CRASPs) that bind the human immune regulators factor H and/or FHL-1. In the  
31 present study, we identify FHR-1, a member of the human factor H protein family, as an additional ligand for  
33 CRASP-3, CRASP-4, and CRASP-5 but not for CRASP-1 and CRASP-2. A comparative analysis of the binding  
35 characteristics revealed unique and distinct binding profiles of the three host immune regulators to CRASPs. FHR-1  
37 binds to CRASP-3, CRASP-4, and CRASP-5; factor H binds to all five CRASPs, and FHL-1 binds preferentially to  
39 CRASP-1 and CRASP-2. On the pathogen site, CRASP-3 interacts predominantly with factor H; CRASP-4 shows a  
41 preference for FHR-1, and CRASP-5 binds strongly and with equal intensity FHR-1 and factor H. Thus, expression of  
43 several CRASPs with distinct binding properties for host proteins allows the pathogen to attach various functionally  
45 distinct host proteins to its surface.

45 © 2008 Published by Elsevier GmbH.

47 **Keywords:** *Borrelia burgdorferi*; Complement regulator-acquiring surface proteins; CRASP; Factor H; FHR-1

49  
51 **Introduction**

53 *Borrelia burgdorferi* sensu lato causes Lyme disease  
55 (Lyme borreliosis), a severe emerging multi-systemic  
infection, which is transmitted by ticks of the genus  
*Ixodes* (Steere et al., 2004). The *B. burgdorferi* complex

57 is subdivided into multiple species, e.g. *B. burgdorferi*  
59 sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii*, and *B. spielmanii*  
61 (Wang et al., 1999; Richter et al., 2004), which are all  
63 pathogens to humans. Lyme borreliosis occurs in stages  
65 and mimics other diseases. Following transmission  
67 through tick bite, a local skin rash (erythema migrans)  
69 can appear. If untreated, the spirochete can establish a  
71 chronic infection that affects joints, the nervous system,  
heart, skin, or other organs (Steere et al., 2004). To  
disseminate throughout the body and to cause persistent  
infections, the spirochete has developed various me-

\*Corresponding author at: Department of Infection Biology,  
Leibniz Institute for Natural Products Research and Infection Biology  
– Hans-Knöll-Institute, Beutenbergstr. 11a, D-07743 Jena, Germany.  
Tel.: +49 3641 65 69 00; fax: +49 3641 65 69 02.

E-mail address: peter.zipfel@hki-jena.de (P.F. Zipfel).

1438-4221/\$ - see front matter © 2008 Published by Elsevier GmbH.  
doi:10.1016/j.ijmm.2007.11.010

Please cite this article as: Haupt, K., et al., FHR-1, an additional human plasma protein, binds to complement regulator-acquiring surface proteins of *Borrelia*... Int. J. Med. Microbiol. (2008), doi:10.1016/j.ijmm.2007.11.010



1 mechanisms to inhibit the host immune response. *B.*  
 2 *burgdorferi* binds the human complement regulators  
 3 factor H and its splicing variant factor H-like protein 1  
 4 (FHL-1) onto its surface (Kraiczky et al., 2001b). The  
 5 bound host regulators are functionally active and inhibit  
 6 complement-mediated killing (Alitalo et al., 2001;  
 7 Brooks et al., 2005). The two immune regulators of  
 8 the alternative pathway of the complement system  
 9 factor H and FHL-1 consist of homologous globular  
 10 domains named short consensus repeats (SCR) (Zipfel  
 11 and Skerka, 1994). These human plasma proteins inhibit  
 12 the complement cascade at the level of C3b. They act as  
 13 cofactors for factor I-mediated degradation of C3b and  
 14 accelerate the decay of the C3 convertase of the  
 15 alternative pathway by competing with factor B for  
 16 C3b-binding (Pangburn et al., 1977; Kühn et al., 1995;  
 17 Kühn and Zipfel, 1996). Binding of factor H and FHL-1  
 18 to the cell surface of *B. burgdorferi* is mediated by  
 19 complement regulator-acquiring surface proteins  
 20 (CRASPs) (Kraiczky et al., 2001a). *B. burgdorferi*  
 21 expresses five CRASPs, i.e. CRASP-1, CRASP-2,  
 22 CRASP-3, CRASP-4, and CRASP-5, which are distinct  
 23 from each other. Both CRASP-1 and CRASP-2 (group  
 24 I) interact with factor H and FHL-1 via SCRs 5–7 and  
 25 the C-terminus of factor H (SCRs 19 and 20). In  
 26 contrast, CRASP-3, CRASP-4 and CRASP-5 (group II)  
 27 are members of the polymorphic Erp (OspE/F-related  
 28 proteins) family (Kraiczky et al., 2003) that bind  
 29 exclusively factor H via SCRs 19 and 20 (Kraiczky  
 30 et al., 2001a). Expression of CRASPs enhances survival of  
 31 *B. burgdorferi* in human serum due to factor H and/or  
 32 FHL-1 binding to the surface of the spirochetes (Brooks  
 33 et al., 2005).

34 The factor H protein family includes factor H, FHL-  
 35 1, and further six factor H related proteins (i.e. FHR1,  
 36 FHR-2, FHR-3, FHR-4A, FHR-4B, and FHR-5),  
 37 which are encoded by separate genes and are structural-  
 38 ly and antigenically related to factor H (Estaller et al.,  
 39 1991; Skerka et al., 1991; Zipfel et al., 1999; Józsi et al.,  
 40 2005). FHR-1 consists of five SCR domains. The three  
 41 C-terminal SCRs of factor H, i.e. the SCRs 18–20, and  
 42 of FHR-1, i.e. the SCRs 3–5, show high homology,  
 43 differing only in two amino acid residues, thus suggest-  
 44 ing similar and conserved function(s) (Zipfel et al.,  
 45 2002). In the present study, we analyzed if FHR-1 binds  
 46 to CRASPs of *B. burgdorferi*.

## 47 Materials and methods

### 48 Expression of recombinant FHR-1 and FHL-1

49 Recombinant FHR-1 and FHL-1 were expressed in  
 50 insect cells infected with recombinant baculovirus  
 51 (Kühn et al., 1995; Majno, 2003). Briefly, adherent

52 *Spodoptera frugiperda* cells (Sf9) grown at 28 °C in  
 53 monolayer cultures were infected with recombinant  
 54 virus using a multiplicity of infection of five.

### 55 Construction of expression plasmids and purification 56 of CRASP proteins

57 Construction and expression of plasmids harboring  
 58 the *espA*, *espZ*, and the *erpP* genes encoding for  
 59 CRASP-1, CRASP-2, and CRASP-3, has been de-  
 60 scribed (Kraiczky et al., 2003, 2004). CRASP-4 and  
 61 CRASP-5 were expressed as reported (Haupt et al.,  
 62 2007). All five CRASPs were expressed as GST-fusion  
 63 proteins in *Escherichia coli* JM 109 and purified on  
 64 glutathione-Sepharose as described (Kraiczky et al.,  
 65 2003).

### 66 ELISA

67 Recombinant CRASP proteins (0.25 µg each), cell  
 68 extract prepared from cells expressing an unrelated  
 69 protein (p65) or BSA, were immobilized onto wells of a  
 70 microtiter plate overnight at 4 °C. Unspecific binding  
 71 sites were blocked with 0.2% gelatin in PBS for 6 h at  
 72 4 °C. Human serum (diluted 1:100), FHR-1 or factor H  
 73 (Calbiochem, Darmstadt, Germany) were added to the  
 74 wells and left overnight at 4 °C. After addition of SCR  
 75 1–4 antiserum (Kühn et al., 1995) or mAb VIG8  
 76 (Proding et al., 1998) for 2 h at room temperature,  
 77 protein complexes were identified using secondary HRP-  
 78 coupled antisera. The reaction was developed with 1,2-  
 79 phenylenediamine dihydrochloride (OPD) (DakoCyto-  
 80 mation, Glostrup, Denmark), and the absorbency was  
 81 measured at 490 nm.

### 82 Affinity blot interaction assay by micro-sample 83 filtration (slot blot)

84 Recombinant CRASP-1, CRASP-2, CRASP-3,  
 85 CRASP-4, and CRASP-5 (0.5 µg each) or cell extract  
 86 prepared from cells expressing an unrelated protein  
 87 (p65) were transferred onto a nitrocellulose membrane  
 88 using the micro-sample device Bio-Dot<sup>®</sup> SF (BioRad,  
 89 München, Germany). The membranes were blocked in  
 90 PBS supplemented with 2.5% BSA and 1/10 Rotiblock<sup>®</sup>  
 91 (Roth, Karlsruhe, Germany) for 30 min at room  
 92 temperature and incubated in FHR-1, factor H, and  
 93 FHL-1 (10 nM each) overnight at 4 °C. After three  
 94 washing steps in PBS supplemented with 0.05% Tween-  
 95 20, the membranes were probed with the mAb VIG8 or  
 96 anti SCR 1–4, followed by a secondary HRP-coupled  
 97 antiserum, and the bound proteins were detected by  
 98 ECL.

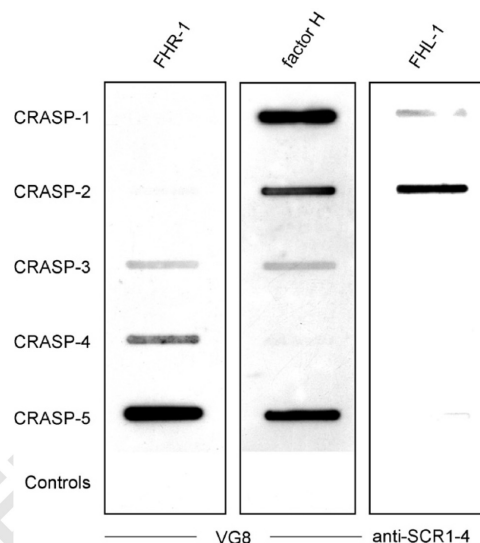
**Results and discussion**

In order to compare the binding characteristics of the five CRASPs to various factor H family proteins, ELISA experiments were performed. The individual CRASPs were immobilized onto the surface of a microtiter plate, incubated with human serum and the bound immune regulators were detected using specific polyclonal antiserum SCR 1-4 that interacts with the first four N-terminal SCRs and consequently detects factor H and FHL-1. In addition, mAb VIG8 was used, which binds to the conserved C-termini of factor H and FHR-1. This approach showed that all five CRASPs bind members of the factor H family, however, with different intensities (Fig. 1). The reactivity of anti SCR 1-4 indicated strong binding of factor H and FHL-1 to CRASP-1 and CRASP-2. Monoclonal antibody VIG8 showed binding of factor H to all CRASPs and displayed most prominent binding to CRASP-4 and CRASP-5. The different binding profiles of the two antibodies suggest binding of an additional factor H-related protein to CRASP-3 and CRASP-4.

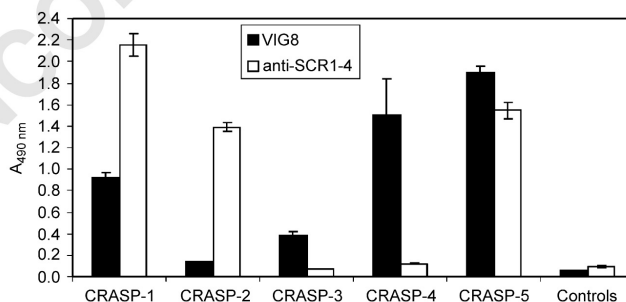
To identify which factor H family protein binds to the individual CRASP, slot blot experiments were performed. The individual CRASPs were immobilized on a nitrocellulose membrane and binding of purified FHR-1, factor H, and FHL-1 was analyzed. FHR-1 bound to CRASP-3, CRASP-4, and CRASP-5. Factor H bound to all CRASPs but weakly to CRASP-4. FHL-1 bound to CRASP-1 and CRASP-2 but to no other CRASPs (Fig. 2).

To evaluate the binding characteristics of FHR-1 and factor H to the three borrelial proteins CRASP-3, CRASP-4, and CRASP-5, dose-depending binding was assayed. Again, individual CRASPs were immobilized to the surface of a microtiter plate and incubated with increasing concentrations of FHR-1 or factor H. Used at equal molar amounts, FHR-1 binding to CRASP-3 was lower than factor H binding (Fig. 3, upper panel).

In contrast, FHR-1 bound with higher intensity to CRASP-4 than factor H (Fig. 3, middle panel). FHR-1 and factor H bound CRASP-5 with almost equal intensities, and binding was rather prominent (Fig. 3, lower panel). In summary, FHR-1 and factor H bound to each of the three CRASPs, i.e. CRASP-3, CRASP-4, and CRASP-5, in a dose-dependent manner.

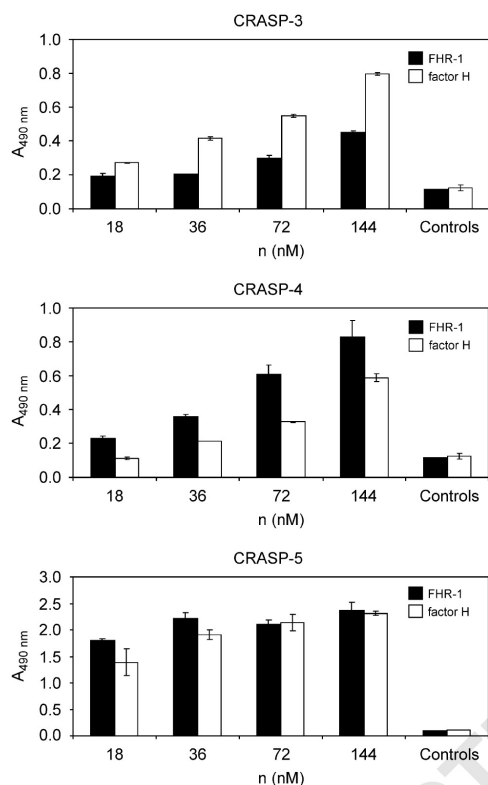


**Fig. 2.** Binding of FHR-1, factor H, and FHL-1 to individual CRASPs (slot blot). The five CRASPs were applied to a nitrocellulose matrix by vacuum and incubated with the purified proteins FHR-1, factor H, and FHL-1. The bound proteins were detected with the indicated antibodies after extensive washing.



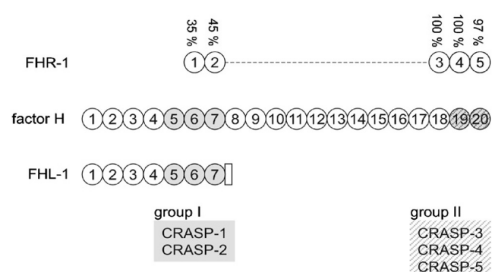
**Fig. 1.** Binding of factor H proteins from human serum to individual CRASPs. CRASP-1, CRASP-2, CRASP-3, CRASP-4, and CRASP-5 (0.25 µg) were immobilized onto a microtiter plate and incubated with human serum. After extensive washing, the bound proteins were assayed by ELISA using the indicated antibodies.

Please cite this article as: Haupt, K., et al., FHR-1, an additional human plasma protein, binds to complement regulator-acquiring surface proteins of *Borrelia*... Int. J. Med. Microbiol. (2008), doi:10.1016/j.ijmm.2007.11.010



**Fig. 3.** Dose-dependent binding of FHR-1 and factor H to CRASP-3, CRASP-4, and CRASP-5. The three CRASPs were immobilized onto a microtiter plate and incubated with FHR-1 or factor H at equimolar amounts at increasing concentrations. Binding was assayed by ELISA using the mAb VIG8.

To prevent serum-mediated killing, *B. burgdorferi* expresses five CRASPs that bind the complement regulators factor H and FHL-1. Here we demonstrate that FHR-1, an additional human plasma protein of the factor H protein family, binds to three CRASPs, i.e. CRASP-3, CRASP-4, and CRASP-5. Each of these group II CRASPs showed a different binding preference for FHR-1. FHR-1 binds CRASP-5 with the strongest intensity. Comparing the binding characteristics of FHR-1 and factor H at equimolar levels showed that FHR-1 is the prominent ligand for CRASP-4. Both host plasma proteins bind CRASP-5 with the same intensity. Based on the similarity of the binding preferences, we speculate that FHR-1 binds to CRASP-3, CRASP-4, and CRASP-5 via the C-terminus. CRASP-1 and CRASP-2, which bind factor H in two domains, did



**Fig. 4.** Linear structures of FHR-1, factor H, and FHL-1 and positions of binding domains for CRASPs of *B. burgdorferi*. Proteins of the factor H family are composed of a different number of short consensus repeats (SCRs). FHR-1, which is encoded by a unique gene located within the factor H gene cluster, consists of five SCRs, which are aligned according to their sequence similarity with the SCRs of factor H. The level of sequence identity on the amino acid level between the SCRs of FHR-1 and factor H is indicated. Factor H consists of 20 SCRs. FHL-1 is derived from the factor H gene by alternative splicing and is identical in sequence with the seven N-terminal SCRs of factor H plus a C-terminal extension of four amino acids. Group I CRASPs – CRASP-1 and CRASP-2 – bind factor H and FHL-1 in SCRs 5–7 and at the C-terminal SCRs 19 and 20 of factor H, indicated in grey. In contrast, group II CRASPs – CRASP-3, CRASP-4, and CRASP-5 – interact with factor H exclusively at SCRs 19 and 20, indicated in diagonal stripes.

not bind FHR-1. This lack of binding is explained by the weak sequence similarities between SCR 1 and 2 of FHR-1 and SCR 6 and 7 of factor H with 36% and 45%, respectively (Zipfel et al., 2002). Furthermore, FHR-1 lacks a SCR domain equivalent for SCR 5 of factor H, and SCR 5 is likely involved in CRASP binding. The high sequence homology between the C-termini of FHR-1 and factor H argues for a CRASP binding region in SCR 3–5 of FHR-1. Currently, the biological functions of FHR-1 are unknown. FHR-1 has a plasma concentration of approximately 100 µg/ml, is a constituent of lipoprotein particles, and binds heparin and the central complement components C3b and C3d (Skerka et al., 1991; Park and Wright, 1996, 2000; Proding et al., 1998; Zipfel et al., 1999; Majno, 2003).

Comparing the binding profiles of the three host plasma proteins, FHR-1, factor H, and FHL-1 for the borrelian CRASPs, we conclude that FHR-1 binds to group II CRASPs, i.e. CRASP-3, CRASP-4, and CRASP-5. Factor H binds to all five CRASPs, and FHL-1 interacts exclusively with CRASPs of group I, i.e. CRASP-1 and CRASP-2 (Table 1).

Thus, at least two members of the factor H family bind to the same single CRASP. Group I CRASPs – CRASP-1 and CRASP-2 – bind factor H and FHL-1,

Please cite this article as: Haupt, K., et al., FHR-1, an additional human plasma protein, binds to complement regulator-acquiring surface proteins of *Borrelia*... Int. J. Med. Microbiol. (2008), doi:10.1016/j.ijmm.2007.11.010

**Table 1.** Binding preferences of the individual borrelial CRASPs for the host immune regulators FHR-1, factor H, and FHL-1

	FHR-1	Factor H	FHL-1
Group I			
CRASP-1	–	+	+
CRASP-2	–	+	+
Group II			
CRASP-3	+	+	–
CRASP-4	+	+	–
CRASP-5	+	+	–

group II CRASPs – CRASP-3, CRASP-4, and CRASP-5 – bind FHR-1 and factor H. This preference suggests that upon infection borrelia simultaneously acquire three proteins of the factor H family, and this type of surface decoration facilitates immune escape of the pathogen and survival in the immunocompetent host.

### Conflict of interest note

The authors declare that they have no commercial or other association that might pose a conflict of interest.

### References

- Alitalo, A., Meri, T., Rämö, L., Jokiranta, T.S., Heikkilä, T., Seppälä, I.J., Oksi, J., Viljanen, M., Meri, S., 2001. Complement evasion by *Borrelia burgdorferi*: serum-resistant strains promote C3b inactivation. *Infect. Immun.* 69, 3685–3691.
- Brooks, C., Vuppala, S.R., Jett, A.M., Alitalo, A., Meri, S., Akins, D.R., 2005. Complement regulator-acquiring surface protein 1 imparts resistance to human serum in *Borrelia burgdorferi*. *J. Immunol.* 175, 3299–3308.
- Estaller, C., Koistinen, V., Schwaeble, W., Dierich, M.P., Weiss, E.H., 1991. Cloning of the 1.4-kb mRNA species of human complement factor H reveals a novel member of the short consensus repeat family related to the carboxy terminal of the classical 150-kDa molecule. *J. Immunol.* 146, 3190–3196.
- Haupt, K., Kraiczky, P., Wallich, R., Brade, V., Skerka, C., Zipfel, P.F., 2007. Binding of human FHR-1 to serum-resistant *Borrelia burgdorferi* is mediated by borrelial complement regulator-acquiring surface proteins. *J. Infect. Dis.* 196, 124–133.
- Józsi, M., Richter, H., Löschmann, I., Skerka, C., Buck, F., Beisiegel, U., Erdei, A., Zipfel, P.F., 2005. FHR-4A: a new factor H-related protein is encoded by the human FHR-4 gene. *Eur. J. Hum. Genet.* 13, 321–329.
- Kraiczky, P., Skerka, C., Brade, V., Zipfel, P.F., 2001a. Further characterization of complement regulator-acquiring surface proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 69, 7800–7809.
- Kraiczky, P., Skerka, C., Kirschfink, M., Brade, V., Zipfel, P.F., 2001b. Immune evasion of *Borrelia burgdorferi* by acquisition of human complement regulators FHL-1/reconectin and Factor H. *Eur. J. Immunol.* 31, 1674–1684.
- Kraiczky, P., Hellwage, J., Skerka, C., Kirschfink, M., Brade, V., Zipfel, P.F., 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.
- Kraiczky, P., Hellwage, J., Skerka, C., Becker, H., Kirschfink, M., Simon, M.M., Brade, V., Zipfel, P.F., Wallich, R., 2004. 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.
- Kühn, S., Zipfel, P.F., 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.
- Kühn, S., Skerka, C., Zipfel, P.F., 1995. Mapping of the complement regulatory domains in the human factor H-like protein 1 and in factor H<sup>1</sup>. *J. Immunol.* 155, 5663–5670.
- Majno, S., 2003. Funktionelle Charakterisierung des Faktor H-verwandten Proteins (FHR-1) im Komplementsystem. Doctoral Thesis, Friedrich-Schiller-University, Jena, Germany.
- Pangburn, M.K., Schreiber, R.D., Müller-Eberhard, H.J., 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.
- Park, C.T., Wright, S.D., 1996. Plasma lipopolysaccharide-binding protein is found associated with a particle containing apolipoprotein A-I, phospholipid, and factor H-related proteins. *J. Biol. Chem.* 271, 18054–18060.
- Park, C.T., Wright, S.D., 2000. Fibrinogen is a component of a novel lipoprotein particle: factor H-related protein (FHRP)-associated lipoprotein particle (FALP). *Blood* 95, 198–204.
- Prodinger, W.M., Hellwage, J., Spruth, M., Dierich, M.P., Zipfel, P.F., 1998. The C-terminus of factor H: monoclonal antibodies inhibit heparin binding and identify epitopes common to factor H and factor H-related proteins. *Biochem. J.* 331, 41–47.
- Richter, D., Schlee, D.B., Allgower, R., Matuschka, F.R., 2004. Relationships of a novel Lyme disease spirochete, *Borrelia spielmani* sp. nov., with its hosts in Central Europe. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6414–6419.
- Skerka, C., Horstmann, R.D., Zipfel, P.F., 1991. Molecular cloning of a human serum protein structurally related to complement factor H. *J. Biol. Chem.* 266, 12015–12020.
- Steere, A.C., Coburn, J., Glickstein, L., 2004. The emergence of Lyme disease. *J. Clin. Invest.* 113, 1093–1101.
- 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.

Please cite this article as: Haupt, K., et al., FHR-1, an additional human plasma protein, binds to complement regulator-acquiring surface proteins of *Borrelia...* *Int. J. Med. Microbiol.* (2008), doi:10.1016/j.ijmm.2007.11.010

IJMM : 50314

ARTICLE IN PRESS

6 K. Haupt et al. / International Journal of Medical Microbiology ■ (■■■■) ■■■-■■■

1	Zipfel, P.F., Skerka, C., 1994. Complement factor H and related proteins: an expanding family of complement-regulatory proteins? Immunol. Today 15, 121–126.	9
3		
5	Zipfel, P.F., Jokiranta, T.S., Hellwage, J., Koistinen, V., Meri, S., 1999. The factor H protein family. Immunopharmacology 42, 53–60.	11
7		13

UNCORRECTED PROOF

Please cite this article as: Haupt, K., et al., FHR-1, an additional human plasma protein, binds to complement regulator-acquiring surface proteins of *Borrelia*... Int. J. Med. Microbiol. (2008), doi:10.1016/j.ijmm.2007.11.010

- 3 Kraiczky P, Schreiber J, Skerka C, **Haupt K**, Brade V, Wallich R, Zipfel PF. **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.** (zur Publikation angenommen bei International Journal of Medical Microbiology)

XML:ver:5.0.1 5 jena	IJMM : 50323	Prod.Type:FTP pp.1-4(col.fig.:NIL)	ED:PraveenNC PAGN:NMN SCAN:
-------------------------	--------------	---------------------------------------	--------------------------------

## ARTICLE IN PRESS

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

ELSEVIER

IJMM

International Journal of Medical Microbiology ■ (■■■■) ■■■-■■■

[www.elsevier.de/ijmm](http://www.elsevier.de/ijmm)

## SHORT COMMUNICATION

7 **Assessment of the regions within complement regulator-acquiring surface**  
 9 **protein (CRASP)-2 of *Borrelia burgdorferi* required for interaction with**  
 11 **host immune regulators FHL-1 and factor H**

13 Peter Kraiczky<sup>a,\*</sup>, Johanna Schreiber<sup>a,1</sup>, Christine Skerka<sup>b</sup>, Katrin Haupt<sup>b</sup>,  
 15 Volker Brade<sup>a</sup>, Reinhard Wallich<sup>c</sup>, Peter F. Zipfel<sup>b,d</sup>

17 <sup>a</sup>Institute of Medical Microbiology and Infection Control, University Hospital of Frankfurt, Paul-Ehrlich-Straße 40, D-60596 Frankfurt, Germany

19 <sup>b</sup>Department of Infection Biology, Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology, Jena, Germany

19 <sup>c</sup>Institute of Immunology, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany

21 <sup>d</sup>Friedrich Schiller University, Jena, Germany

23 Accepted 27 December 2007

## Abstract

29 The ability of *Borrelia burgdorferi* sensu lato to survive and persist in a variety of vertebrate hosts is a multifactorial process. Several potential mechanisms of immune evasion have been identified. We have shown that some *Borrelia* species can bind host-derived fluid-phase immune regulators FHL-1 and factor H to their surface via complement regulator-acquiring surface proteins (CRASPs). Factor H and FHL-1 serve as cofactors for factor I, a serine protease that cleaves C3b directly on the cell surface and thereby confers resistance of spirochetes to complement-mediated lysis. Among the CRASP molecules produced by *B. burgdorferi*, BbCRASP-2 represents a novel FHL-1 and factor H binding protein that is distinct from other borrelial CRASP molecules and is predominantly expressed by serum-resistant *Borrelia* strains. The goal of this study was to identify BbCRASP-2 determinants required for FHL-1 and factor H binding. A high number of recombinant BbCRASP-2 mutants were generated by in vitro mutagenesis and tested for factor H and FHL-1 binding employing ligand affinity blotting and ELISA. Up to 8 amino acid substitutions in the proposed binding regions 2 and 3 of BbCRASP-2 resulted in reduced or complete loss of FHL-1 and/or factor H binding ability. This finding suggests that the factor H/FHL-1 binding site is discontinuous and long distance interaction is involved in binding of both immune regulators. Furthermore, putative coiled-coil structural elements as recently discussed to be important in the interaction of BbCRASP-1 with factor H seem to play a subordinate role for binding of BbCRASP-2 to FHL-1 and factor H. The elucidation of host-pathogen interactions will help to develop novel therapeutic strategies against Lyme disease/borreliosis.

45 © 2008 Published by Elsevier GmbH.

47 **Keywords:** *Borrelia burgdorferi*; Lyme disease; Immune evasion; CRASP; Complement

## Introduction

59 The ability of *Borrelia burgdorferi* sensu lato to  
 61 encounter and persistently infect diverse vertebrate

51 \*Corresponding author. Tel.: +49 69 6301 7165; fax:  
 +49 69 6301 5767.

53 E-mail address: [Kraiczky@em.uni-frankfurt.de](mailto:Kraiczky@em.uni-frankfurt.de) (P. Kraiczky).

1 This work forms part of the M.D. thesis by J. Schreiber.

55 1438-4221/\$ - see front matter © 2008 Published by Elsevier GmbH.  
 doi:10.1016/j.ijmm.2007.12.008

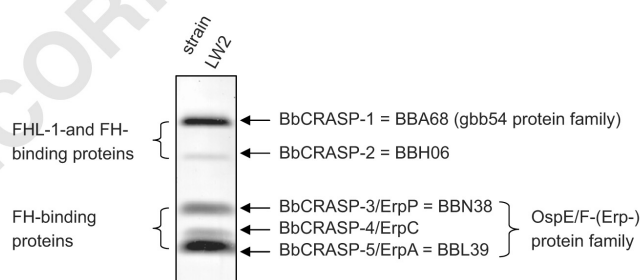
Please cite this article as: Kraiczky, P., et al., Assessment of the regions within complement regulator-acquiring surface protein (CRASP)-2 of *Borrelia burgdorferi* required for interaction with.... Int. J. Med. Microbiol. (2008), doi:10.1016/j.ijmm.2007.12.008

1 hosts frequently requires complex environmental sensing  
 2 mechanisms involving coordinated expression of  
 3 proteins essential to overcome host defense, in particular  
 4 the innate and adaptive immune responses. It has  
 5 recently been shown that *B. burgdorferi* sensu stricto  
 6 (s.s.) resists complement-mediated killing by hijacking  
 7 host-derived fluid-phase immune regulators FHL-1 and  
 8 factor H from human serum (Kraiczky et al., 2001;  
 9 Alitalo et al., 2001). Factor H and FHL-1, the main  
 10 immune regulators of the alternative pathway of  
 11 complement activation, act as cofactors for factor I, a  
 12 serine protease that inactivates C3b directly on the cell  
 13 surface and thereby confers resistance of spirochetes to  
 14 complement-mediated lysis (Zipfel and Skerka, 1999).  
 15 Binding of factor H and FHL-1 to *B. burgdorferi* s.s.  
 16 mainly depend on the expression of distinct complement  
 17 regulator-acquiring surface proteins or CRASPs (Kraiczky  
 18 et al., 2001). *B. burgdorferi* s.s. strain LW2 expresses  
 19 all 5 CRASP proteins, termed BbCRASP-1 to  
 20 BbCRASP-5 of which BbCRASP-1 and BbCRASP-2  
 21 bind both immune regulators (factor H and FHL-1) and  
 22 BbCRASP-3 to -5 interact solely with factor H (Fig. 1).  
 23 BbCRASP-1 detected in all *B. burgdorferi* s.s. isolates  
 24 is the dominant factor H/FHL-1 binding protein and  
 25 belongs to the gbb54 paralogous gene family (Kraiczky  
 26 et al., 2001, 2004). The factor H-binding CRASP proteins  
 27 BbCRASP-3 to -5 has been identified as members of the  
 28 polymorphic Erp (OspE/F-related protein) family  
 29 (Kraiczky et al., 2003). BbCRASP-2 represents a novel  
 30 FHL-1 and factor H-binding protein that is distinct  
 31 from every other borrelial CRASP protein (Hartmann  
 32 et al., 2006). The aim of the present study was to identify  
 33 the amino acid residues within BbCRASP-2 directly  
 34 involved in binding of FHL-1 and factor H.

## Materials and methods

To introduce single amino acid substitutions into  
 BbCRASP-2 a site-directed mutagenesis approach was  
 conducted as described by the QuikChange™ protocol  
 (Stratagene). Briefly, PCR reactions were carried out for  
 18 cycles (95 °C for 30 s, 55 °C for 30 s and 68 °C for  
 13 min) using 50 ng expression vector pCSPZ (Hartmann  
 et al., 2006), 125 ng of each mutagenic primer, and  
 2.5 U *Pfu* polymerase (Stratagene) in a final volume of  
 50 µl. Before transformation of *Escherichia coli*, the  
 PCR reaction was treated with 10 U DpnI to eliminate  
 the remaining vector DNA. Expression of the mutated  
 GST-BbCRASP-2 fusion proteins and affinity purification  
 on Glutathione-Sepharose columns were performed  
 as recommended by the manufacturer (GE Healthcare).  
 Factor H and FHL-1 binding to the mutated fusion  
 proteins were then analyzed by employing ELISA.

Purified GST-BbCRASP-2 fusion protein, mutated  
 GST-BbCRASP-2 proteins, and GST (2.5 ng/µl each)  
 were immobilized using Nunc Immobilizer™ glutathione  
 microtiter plates (Nunc, Wiesbaden, Germany)  
 overnight at 4 °C. Unspecific binding sites were blocked  
 with 0.2% gelatin in PBS for 6 h at 4 °C. Factor H  
 (Calbiochem, Darmstadt, Germany) or purified FHL-1  
 (5 µg/ml each) was added to the wells and left overnight  
 at 4 °C. After addition of polyclonal anti-factor H  
 antibodies for 2 h at room temperature, protein  
 complexes were identified using a secondary peroxidase-  
 conjugated anti-goat IgG antibody. The reaction was  
 developed with 1,2-phenylenediamine dihydrochloride  
 (Sigma-Aldrich), and the absorbance was measured at  
 490 nm.



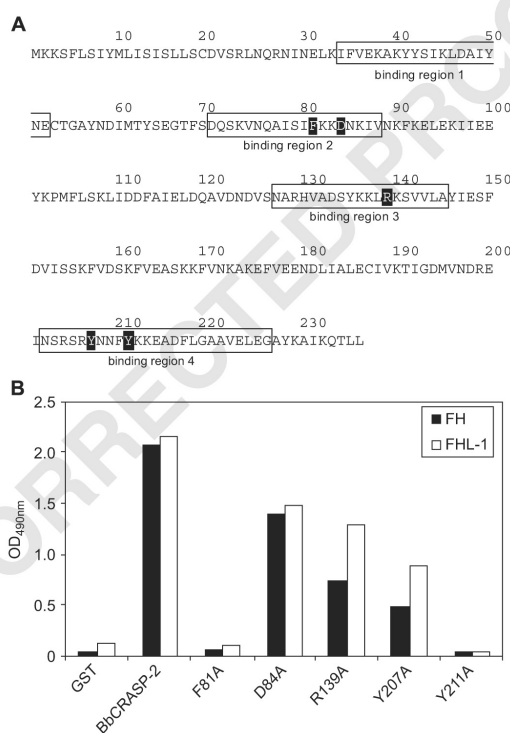
**Fig. 1.** Demonstration of the FHL-1 and factor H-binding capability of *Borrelia burgdorferi* s.s. LW2. Binding of immune regulators FHL-1 and factor H to *B. burgdorferi* was analyzed by ligand affinity blot analyses. Cell lysate (15 µg) was subjected to 10% Tris/Tricine SDS-PAGE and blotted to nitrocellulose membranes. The membranes were then incubated with NHS for detection of factor H and FHL-1 binding by using a polyclonal anti-factor H antibody (Calbiochem). The description of the gbb54 and gbb162 paralogous protein family was used according to the nomenclature for type strain B31 (Fraser et al., 1997; Casjens et al., 2000).

Please cite this article as: Kraiczky, P., et al., Assessment of the regions within complement regulator-acquiring surface protein (CRASP)-2 of *Borrelia burgdorferi* required for interaction with.... Int. J. Med. Microbiol. (2008), doi:10.1016/j.ijmm.2007.12.008

**Results and discussion**

In the present study, we used a site-directed mutagenesis approach to identify and localize distinct amino acid residues critical for interaction of BbCRASP-2 with human immune regulators FHL-1 and factor H. In an initial attempt, we introduced 33 single amino acid substitutions within three different regions encompassing amino acid positions 70–88, 127–145, and 202–226 all of which are proposed to be involved in binding of immune regulators (Hartmann et al., 2006). Each amino acid residue selected was replaced by alanine to minimize folding problems and to reduce side effects. Five amino acid substitutions (F81A, D84A, R139A, Y207A, and Y211A) could be identified to either significantly reduced or completely abolished binding

of FHL-1 and/or factor H (Fig. 2). These data support the conclusion that the factor H/FHL-1 binding site in BbCRASP-2 is discontinuous and long distance interaction are involved in binding of both immune regulators. Furthermore, demonstration that substitutions of charged (D84A and R139A) and hydrophobic (F81A, Y207A, and Y211A) amino acid residues have an impact on interaction suggest that long-range electrostatic forces and ion pairings as well as hydrophobic interaction are involved in binding of factor H/FHL-1 to BbCRASP-2. The elucidation of the host-pathogen interaction could help to develop new therapeutic agents for the prevention of Lyme disease.



**Fig. 2.** Binding of immune regulators to BbCRASP-2 mutants. (A) Amino acid sequence of BbCRASP-2. The postulated factor H/FHL-1 binding regions 1–4 (Hartmann et al., 2006) are indicated by boxing and substitutions introduced into BbCRASP-2 that reduce or completely abolish binding of host immune regulators are indicated by white fonts with black background. (B) Recombinant GST–BbCRASP-2 fusion protein, mutants F81A, D84A, R139A, Y207A, and Y211A as well as purified GST protein (2.5 ng/μl) were immobilized onto a microtiter plate and incubated with purified factor H or FHL-1. Binding of factor H or FHL-1 was assayed by employing an ELISA together with polyclonal anti-factor H antibodies. Three independent experiments were conducted, each with very similar results. For clarity, only data from a representative experiment is shown.

Please cite this article as: Kraiczy, P., et al., Assessment of the regions within complement regulator-acquiring surface protein (CRASP)-2 of *Borrelia burgdorferi* required for interaction with.... Int. J. Med. Microbiol. (2008), doi:10.1016/j.ijmm.2007.12.008



1 **Acknowledgements**

3 We thank Christa Hanssen-Hübner and Jane Herrlich  
4 for skillful and expert technical assistance. This work  
5 was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft  
6 DFG, Project Kr3383/1-1.

9 **References**

- 11 Alitalo, A., Meri, T., Rämö, L., Jokiranta, T.S., Heikkilä, T.,  
12 Seppälä, I.J., Oksi, J., Viljanen, M., Meri, S., 2001.  
13 Complement evasion by *Borrelia burgdorferi*: serum-resis-  
14 tant strains promote C3b inactivation. *Infect. Immun.* 69,  
15 3685–3691.
- 16 Casjens, S., Palmer, N., van Vugt, R., Huang, W.M.,  
17 Stevenson, B., Rosa, P.A., Lathigra, R., Stutton, G.,  
18 Peterson, J., Dodson, R.J., Haft, D., Hickey, E., Gwinn,  
19 M., White, O., Fraser, C.M., 2000. A bacterial genome in  
20 flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal  
21 DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease  
22 spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Mol. Microbiol.* 35,  
23 490–516.
- 24 Fraser, C.M., Casjens, S., Huang, W.M., Sutton, G.G.,  
25 Clayton, R., Lathigra, R., White, O., Ketchum, K.A.,  
26 Dodson, R., Hickey, E.K., Gwinn, M., Dougherty, B.,  
27 Tomb, J.-F., Fleischmann, R.D., Richardson, D., Peterson,  
J., Kerlavage, A.R., Quackenbush, J., Salzberg, S., Hanson,  
M., van Vugt, R., Palmer, N., Adams, M.D., Gocayne, J.,  
Weidman, J., Utterback, T., Watthey, L., McDonald, L.,  
29 Artiach, P., Bowman, Ch., Garland, S., Fujii, C., Cotton,  
M.D., Horst, K., Roberst, K., Hatch, B., Smith, H.O.,  
30 Venter, J.C., 1997. Genomic sequence of a Lyme disease  
31 spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 390, 580–586.
- 32 Hartmann, K., Corvey, C., Skerka, C., Kirschfink, M., Karas,  
33 M., Brade, V., Miller, J.C., Stevenson, B., Wallich, R.,  
34 Zipfel, P.F., Kraiczy, P., 2006. Functional characterization  
35 of BbCRASP-2, a distinct outer membrane protein of  
36 *Borrelia burgdorferi* that binds host complement regulators  
37 factor H and FHL-1. *Mol. Microbiol.* 61, 1220–1236.
- 38 Kraiczy, P., Skerka, C., Brade, V., Zipfel, P.F., 2001. Further  
39 characterization of complement regulator-acquiring surface  
40 proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 69,  
41 7800–7809.
- 42 Kraiczy, P., Hellwage, J., Skerka, C., Kirschfink, M., Brade,  
43 V., Zipfel, P.F., Wallich, R., 2003. Immune evasion of  
44 *Borrelia burgdorferi*: mapping of a complement inhibitor  
45 factor H-binding site of BbCRASP-3, a novel member of  
46 the Erp protein family. *Eur. J. Immunol.* 33, 697–707.
- 47 Kraiczy, P., Hellwage, J., Skerka, C., Becker, H., Kirschfink,  
48 M., Simon, M.M., Brade, V., Zipfel, P.F., Wallich, R.,  
49 2004. Characterization of BbCRASP-1, the dominant  
50 factor H and FHL-1 binding protein of *Borrelia burgdor-*  
51 *feri*. *J. Biol. Chem.* 279, 2421–2429.
- 52 Zipfel, P.F., Skerka, C., 1999. FHL-1/reconnectin: a human  
53 complement and immune regulator with cell-adhesive  
54 function. *Immunol. Today* 20, 135–140.

- 4 **Haupt K, van den Elsen J, Burman J, Hälbich S, Reuter M, Richter J, Skerka C, Zipfel PF. The *Staphylococcus aureus* protein Sbi acts as a complement inhibitor and forms a ternary complex with host complement Factor H and C3b.** (in Überarbeitung für PLoS Pathogens)

Eingereicht bei PLoS Pathogens

## The *Staphylococcus aureus* protein Sbi acts as a complement inhibitor and forms a ternary complex with host complement Factor H and C3b

Katrin Haupt\*, Jean van den Elsen†, Julia Burman†, Steffi Hälbich\*, Michael Reuter\*, Julia Richter\*, Christine Skerka\*, Peter F. Zipfel\*¶<sup>2</sup>

\* Department of Infection Biology, Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology, Jena, Germany

† Department of Biology and Biochemistry, University of Bath, Claverton Down, Bath, United Kingdom

¶ Friedrich Schiller University, Jena

The Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus*, similar to other pathogens binds human complement regulators Factor H and FHR-1 from human serum. Here we identify the excreted protein Sbi as a ligand that interacts with Factor H by a – to our knowledge – new type of interaction. Factor H binds to Sbi in combination with C3b or C3d, and forms ternary Sbi:C3:Factor H complexes. Apparently the isoform of C3 further influences the stability of the complex; surface plasmon resonance studies revealed a higher stability of C3d complexed to Sbi, as compared to C3b or C3. As part of this ternary complex Factor H is functionally active and displays complement regulatory activity. Sbi, which recruits C3b and Factor H, acts as a potent complement inhibitor, which inhibits alternative pathway-mediated lysis of rabbit erythrocytes by human serum and other sera. Thus Sbi is a multifunctional bacterial protein, which binds host complement components Factor H and C3 as well as IgG and  $\beta_2$ -glycoprotein I and interferes with both innate and adaptive immune recognition.

### Introduction

In order to establish an infection pathogens have developed multiple mechanisms to avoid immune recognition and to escape host immune attack. A microbe that has crossed a physiological barrier, like the skin or mucous membranes of the host, is directly recognized and attacked by the complement system [1,2]. Complement, which mediates a powerful innate immune defense of vertebrate hosts, is activated immediately, within seconds upon entry of a foreign invader. Activation of the complement system occurs through three pathways, the alternative, the classical, or the lectin pathway. The activated system cleaves the central complement protein C3 into the fragments C3a and C3b,

and deposits C3b onto the surface of a microbe, which normally results in opsonization and elimination of the microbe by phagocytosis. In addition the activated complement system forms the membrane attack complex (MAC), which kills the microbe by complement-mediated lysis. The cleavage products C3a and C5a serve as potent anaphylatoxins, which attract immune effector cells to the site of infection. Non-pathogenic microbes are effectively killed and eliminated by the complement system [3].

In order to restrict complement activation to the surface of an invading microbe host cells are protected from complement attack by membrane bound and soluble regulators. Factor H is the major fluid-phase complement regulator that controls alternative pathway activation at the level of C3. The 150-kDa Factor H protein is exclusively composed of 20 structural repetitive protein domains, termed short consensus repeats (SCR) [4]. Factor H is a member of a protein family, that includes the Factor H like protein 1 (FHL-1), derived from a splicing variant of the Factor H gene, and five Factor H related proteins (FHRs) that are encoded on separate genes [5]. Factor H controls complement activation by acting as a cofactor for the serine protease Factor I, which cleaves surface-bound C3b into iC3b. In addition, by competing with Factor B for C3b binding Factor H accelerates the decay of the alternative pathway C3 convertase. Thus, Factor H blocks C3b deposition and amplification of the complement cascade on the cell surface [5,6].

In order to survive and to establish an infection, pathogens need to inhibit the host complement attack and apparently utilize diverse escape mechanisms. Several pathogens acquire host fluid-phase complement regulators, like Factor H, FHL-1, FHR-1 and C4bp from host plasma and body fluids. Bound to the surface of a pathogen, host regulators retain complement regulatory functions, and inhibit complement activation. Therefore, acquisition of the host regulators masks the pathogenic surface, which results in survival of the pathogen [7,8].

This common strategy of complement evasion has been identified for multiple pathogens, including Gram-positive and Gram-negative bacteria, human pathogenic fungi, parasites and viruses [1]. For many pathogens the corresponding surface proteins were identified and

Running title: A novel type of Factor H acquisition by *S. aureus*

Key words: human, complement, bacterial infections, antigens

Abbreviation

CEWA: Combined ELISA and Western blot Assay, Sbi:

*Staphylococcus aureus* binder of IgG

characterized, e.g. the M protein and Fba of *Streptococcus pyogenes*, CRASP-1 to CRASP-5 of *Borrelia burgdorferi*, Por1A of *Neisseria gonorrhoeae*, Tuf of *Pseudomonas aeruginosa*, PspC of *Streptococcus pneumoniae* and Gpml from *Candida albicans* [9,10,11,12,13,14,15,16]. Several of these pathogenic surface proteins bind additional host plasma proteins and display multiple functions. The M protein of *Streptococcus pyogenes* binds the complement regulators Factor H, FHL-1 and C4bp as well as other plasma proteins, i.e. plasminogen, fibronectin, thrombin, fibrinogen, IgA, IgG and kininogen [1,17,18,19]. The C. *albicans* surface protein Gpml binds Factor H, FHL-1 and plasminogen [16]. In addition, CRASP-1 of *Borrelia hermsii* and Tuf of *P. aeruginosa*, bind Factor H, FHR-1 and plasminogen [14,20]. These pathogenic surface proteins display multiple functions and interfere with the complement regulation and coagulation. Thus, multiple or potentially all pathogens acquire soluble host factors and utilize these proteins for immune evasion [1].

*S. aureus* is a major human pathogen responsible for hospital- and community-acquired infection. The Gram-positive bacterium permanently colonizes the human skin and mucous membranes of ca. 20 % of the population [21]. Once the pathogen has crossed host immune barriers *S. aureus* can cause superficial skin infection, toxin-mediated diseases or serious invasive infections depending on the interaction of the pathogen's virulence factors and the defense mechanisms of the host [22]. The pathogen utilizes complex strategies to survive and disseminate within the host and expresses several virulence factors to block both innate and adaptive immune response [23].

*S. aureus* utilizes several proteins to control and evade the host complement attack. The cell wall-anchored protein A (SpA) binds the Fc region of IgG [24]. *S. aureus* expresses the protease staphylokinase, that cleaves human plasminogen into active plasmin, which in turn cleaves IgG. In both cases recognition of the pathogen by C1q, the initial component of the classical complement activation pathway, is inhibited [25,26]. Sbi is an additional staphylococcal IgG-binding protein that similar to SpA interacts with the Fc part of IgG [27]. Furthermore, Sbi binds  $\beta_2$ -glycoprotein I, which is also termed apolipoprotein H [28]. Recently, additional effector molecules of *S. aureus* are identified, that directly interfere with complement activation at the level of C3. The extracellular fibrinogen-binding protein (Efb), the Efb homologous protein (Ehp), and the extracellular complement-binding protein (Ecb), bind C3 and C3d, prevent further activation of C3b and consequently block the activity of C3b-containing convertases [29,30,31,32,33]. The staphylococcal complement inhibitor (SCIN) acts on surface-bound C3 convertases, C3bBb and C4b2a, by stabilizing these complexes, thereby reducing the enzymatic activity [34,35].

Here we show binding of Factor H and FHR-1 to the surface of intact *S. aureus* and in addition identify the excreted staphylococcal Sbi protein as a Factor H binding protein. Native Factor H from human serum binds to Sbi, and this binding is mediated by a second serum factor, which was identified as C3. Factor H binding is increased in the presence of C3b or C3d suggesting formation of a ternary complex. This complex blocks activation of the alternative complement pathway. The Factor H binding site of Sbi was located to domains III and IV and thus is distinct from the IgG binding sites which are contained in the N-terminal domains I and II [28]. Here, we demonstrate a novel mechanism for Factor H binding by

Sbi. Sbi forms a ternary complex with Factor H and C3b or C3d and the Sbi bound regulators interfere with complement activation.

## Materials and Methods

### Bacterial strain and culture condition.

*S. aureus* strain H591 (MSSA clinical isolate, UK) was grown at 37°C in tryptic soy broth (TSB, Sigma).

### Adsorption experiments.

Overnight cultures of *S. aureus* were diluted to OD<sub>600</sub>=0.2 in TSB and incubated for about 1.5 h at 37°C to OD<sub>600</sub>=1.0 (approximately 1.2 x 10<sup>9</sup> cfu). Cells (2 x 10<sup>9</sup> cfu) were harvested by centrifugation (6000 g, 8 min at room temperature), resuspended in veronal buffered saline (GVB<sup>2+</sup>, Sigma) supplemented with 10 mM EDTA and incubated with either normal human serum (NHS, diluted 1:10) or Factor H (5 µg, Aventis Behring) for 1 h at 37°C with agitation. Subsequently, the cells were washed four times with EDTA-GVB<sup>2+</sup> and bound proteins were eluted with SDS buffer (60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2 % SDS, 25 % glycerine) for 5 min at 98°C. Wash and elute fractions were separated by SDS-PAGE, transferred to a membrane and analyzed by Western blotting using a polyclonal goat Factor H antiserum (Merck).

### Cloning, expression and purification of recombinant Sbi constructs.

Recombinant fragments of the N-terminal region of Sbi (adjacent to the poly-proline region) were engineered, expressed and purified as described previously by [Burman et al. submitted]. The following Sbi constructs were used in this study: Sbi-E (amino acids 28-266) containing IgG-binding domains I and II and C3 interacting domains III and IV; Sbi-I (amino acids 42-94); Sbi-III-IV (amino acids 150-266) and Sbi-IV (amino acids 197-266).

### Expression of Factor H deletion mutants.

The Factor H deletion mutants SCRs 1-7, SCRs 8-11, SCRs 11-15, SCRs 15-18 and SCRs 19-20 were expressed in insect cells infected with recombinant baculovirus as described earlier [39]. Briefly, *Spodoptera frugiperda* cells (Sf9) were grown at 28°C in monolayer cultures in protein-free expression medium for insect cells (BioWhittaker). Adherent Sf9 cells were infected with recombinant virus using a multiplicity of infection of five. The culture supernatant was harvested after 9 days and recombinant Factor H constructs were purified by affinity chromatography using Ni-NTA-Agarose (Qiagen).

### Antibody binding to Sbi-fragments.

The complete extra cellular region, Sbi-E, and the extra cellular deletion mutants Sbi-I, Sbi-III/IV, Sbi-IV, BSA (0.1 µg each) and Factor H (0.05 µg) were immobilized onto a microtiter plate for 2 h at room temperature. Unspecific binding sites were blocked with 0.2 % gelatine in DPBS (Lonza) over night at 4°C. After extensive washing with PBSI (3.3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·xH<sub>2</sub>O, 6.7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 145 mM NaCl, pH 7.2) supplemented with 0.05 % Tween 20 a polyclonal rabbit SCR1-4 antiserum and the two mAbs B22 and C18 (all specific for Factor H) were added for 2 h at room temperature. Protein-antibody complexes were detected using secondary horseradish peroxidase (HRP)-coupled antiserum. All antibodies and antisera were used at 1:1000 dilutions. The reaction was developed with 1,2-phenylenediamine dihydrochloride (OPD, Dako) and the absorbency was measured at 490 nm.

### Protein binding assay - CEWA.

A combined ELISA and Western blot approach (CEWA) was used to assay Factor H binding to Sbi-E and the deletion constructs Sbi-I, Sbi-III/IV and Sbi-IV [36]. The proteins (0.5 µg) were immobilized onto a microtiter plate over night at 4°C. After blocking with 0.2 % gelatine in DPBS (Lonza) for 6 h at 4°C, NHS (diluted 1:10), Factor H (0.25 µg), a combination of Factor H (0.25 µg) and C3b (0.5 µg, Merck), or Factor H (0.25 µg) and C3d (0.13 µg, Merck) were added and incubated over night at 4°C. After extensive washing protein complexes were removed with SDS buffer, separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using the mAb C18, which is specific for SCR 20 of Factor H. As positive controls the borrelial Factor H binding protein CRASP-1, and also the Factor H/FHR1 binding protein CRASP-5 (kindly provided by Dr. Peter Kraiczky (University of Frankfurt a. M.) and by Prof. Dr. Reinhard Wallich (University of Heidelberg)) and as negative control BSA were used.

### Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

The Sbi deletion fragments Sbi-III/IV, Sbi-IV or CRASP-1 and BSA (0.1 µg) were immobilized onto a microtiter plate over night at 4°C. After blocking with 0.2 % gelatine in DPBS (Lonza) for 6 h at 4°C, Factor H (0.125 µg), a combination of Factor H (0.125 µg) and C3b (0.25 µg) or C3d (0.065 µg), the Factor H deletion mutants SCRs 1-7, SCRs 8-11, SCRs 11-15, SCRs 15-18 and SCRs 19-20 used at equimolar amounts to Factor H in combination with C3b (0.25 µg) were added. Bound Factor H or Factor H deletion mutants were detected with polyclonal Factor H antiserum (1:4000, Merck) and an appropriate secondary horseradish peroxidase-coupled antiserum (1:4000, Dako). The reaction was developed with 1,2-phenylenediamine dihydrochloride (OPD, Dako) and the absorbency was measured at 490 nm.

### Inhibition of protein binding with an antiserum.

Sbi-E and the extra cellular deletion mutants Sbi-I, Sbi-III/IV, Sbi-IV or CRASP-1, and BSA (0.5 µg) were immobilized and unspecific binding sites were blocked as described. Factor H (0.25 µg), polyclonal Factor H

antiserum (diluted 1:100) and C3b (0.5  $\mu$ g) were preincubated for 2 h at 4°C. Subsequently the mixture was added to the immobilized proteins and incubated over night at 4°C. After extensive washing protein complexes were removed from the well with SDS buffer, separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting with the polyclonal rabbit SCR1-4 antiserum.

#### Complement cofactor assay.

For determining the regulatory activity of Sbi-bound Factor H, the regulator (0.15  $\mu$ g) together with C3b (0.3  $\mu$ g) or C3b (0.3  $\mu$ g) alone were added to immobilized Sbi-E, Sbi-I, Sbi-III/IV, Sbi-IV, CRASP-1, or BSA (0.5  $\mu$ g) incubated over night at 4°C. After extensive washing Factor I (0.8  $\mu$ g) was added and the mixture was incubated for 30 min at 37°C. C3b conversion to inactive C3b (iC3b) was detected after separating the protein solution by SDS-PAGE with Western blot analysis using a polyclonal goat C3 antiserum (Merck).

#### SDS-PAGE and Western blot analysis.

Samples were separated by SDS-PAGE using 10 % and 12 % gels. After the transfer of the proteins onto nitrocellulose membranes by semi-dry blotting [40], the membranes were blocked with 5 % (w/v) dried milk in PBSI for 30 min at room temperature and incubated with the indicated primary antibodies over night at 4°C. Antibodies were diluted in 2.5 % (w/v) dried milk in PBSI. The proteins were detected by ECL using appropriate secondary antisera that was coupled with horseradish peroxidase.

#### Surface plasmon resonance studies.

Protein-protein interactions were analyzed by the surface plasmon resonance technique using a Biacore 3000 instrument (Biacore AB) as described [41]. Briefly, the staphylococcal proteins Sbi-E, Sbi-I, Sbi-III/IV or human C3d were coupled to the surface of the flow cells of the sensor chip via a standard amine-coupling procedure (carboxylated dextran chip CM5, Biacore AB) until about 2000 resonance units were reached. A control cell was prepared under identical conditions that lacked a protein. Sbi-E, Factor H, C3, C3b or C3d were diluted in DPBS (Lonza), adjusted to equal molarities and injected with a flow rate of 5  $\mu$ l/min at 25°C. Alternatively, Ni<sup>2+</sup> and Sbi-E was loaded to a NTA-chip, and C3d followed by Factor H were injected at equimolar amounts. Each interaction was analyzed at least three times.

#### Hemolytic assays.

In order to analyze the complement regulatory effect of Sbi, hemolytic assays were performed using rabbit erythrocytes (rE, Rockland). Following preincubation of NHS with Sbi-E or Sbi-III/IV for 30 min at 37°C,  $5 \times 10^6$  rE were added (150  $\mu$ l total volume) and further incubated for 30 min at 37°C. After centrifugation (2 min, 5000 rpm) the absorbency of the supernatant was measured at 414 nm. NHS, Sbi-E and Sbi-III/IV were used at the indicated concentrations. Samples were diluted in HEPES buffer (20 mM HEPES, 144 mM NaCl, 7 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM EGTA, 1 % BSA, pH 7.4). The effect of Sbi on different animal sera (Innovative Research) was assayed using 30 % animal serum and 2  $\mu$ g Sbi-E.

In order to analyze and distinguish between the alternative and the classical/lectin pathway complement activation was pursued in different buffers. Alternative pathway activity was measured in EGTA-HEPES buffer. Activation of all three pathways was assayed in Ca<sup>2+</sup>-HEPES buffer (20 mM HEPES, 144 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4). The effect of the classical and the lectin pathway was assayed in Factor B deficient serum (Complement Technology Inc.) and the Ca<sup>2+</sup>-HEPES buffer. All three approaches (AP, AP+CP/LP and CP/LP) were analyzed in the presence of none, 0.3  $\mu$ g and 1.0  $\mu$ g Sbi-E.

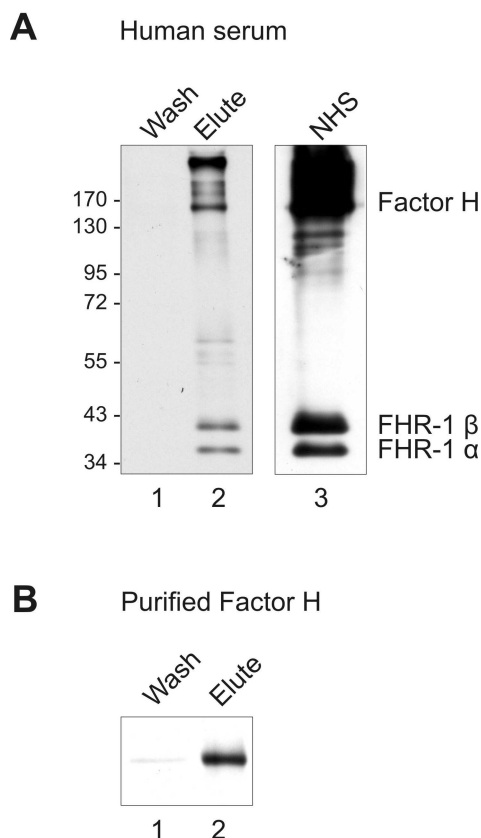
## Results

### Factor H binds to the surface of *S. aureus*.

In order to analyze binding of host complement regulators to *S. aureus*, strain H591 was incubated in human serum. After extensive washing bound proteins were eluted, separated by SDS-PAGE, transferred to a membrane and analyzed by Western blotting. This approach identified three bands of 150, 43 and 37 kDa, which represent Factor H, FHR-1 $\beta$  and FHR-1 $\alpha$ , respectively (Figure 1A, lane 2). These proteins were absent in the final wash fraction, thus suggesting specificity of binding (Figure 1A, lane 1 and lane 2). The same proteins were also identified in human serum (Figure 1A, lane 3). When bacteria were incubated with purified Factor H binding of the purified protein was also detected in the elute fraction (Figure 1B, lane 2).

### Factor H binds to excreted protein Sbi.

In order to characterize the bacterial ligand mediating this interaction we hypothesized that the staphylococcal Sbi protein might represent the binding protein. The N-



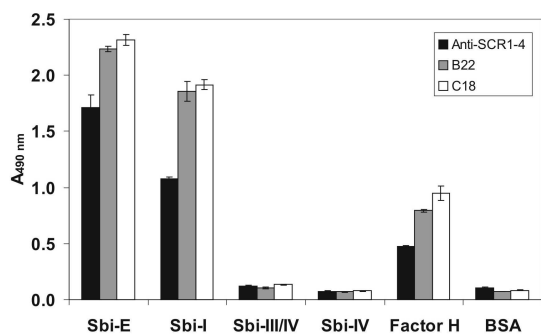
**Figure 1: Adsorption of Factor H and FHR-1 to intact *S. aureus*.** Cells of *S. aureus* strain H591 were incubated in human serum (A) or with purified Factor H (B). After extensive washing, bound proteins were eluted, separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using polyclonal Factor H antiserum. (A) In the elute fraction (lane 2) polyclonal Factor H antiserum reacted with three bands of 150, 43 and 37 kDa representing Factor H, FHR-1 $\beta$  and FHR-1 $\alpha$ , respectively. The same proteins were also identified in human serum (lane 3). (B) Purified Factor H bound to the bacteria and was detected in the elute fraction (lane 2). The mobility of the marker proteins is indicated. NHS, normal human serum.

terminal region of Sbi (i.e. Sbi-E) is composed of four domains and includes the IgG binding domains I and II [28, Burman et al. submitted<sup>1</sup>]. IgG binding of Sbi-E and Sbi-I was confirmed for one polyclonal antiserum and two mAbs, which are directed to Factor H (Figure 2, columns 1 and 2). The Constructs Sbi-III/IV and Sbi-IV did not bind these antibodies. Antibody binding was rather strong and exceeded the reactivity for the specific ligand Factor H (Figure 2, compare columns 5 and 1).

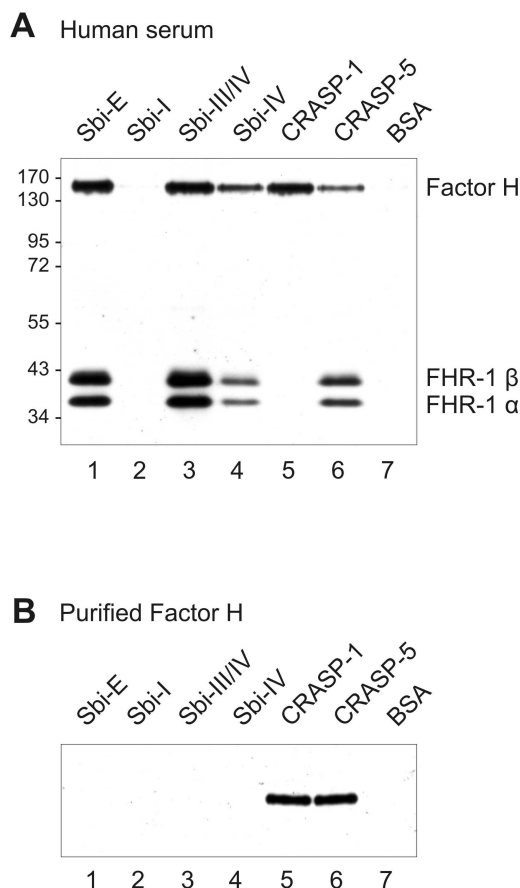
### Factor H binding and localization of the Factor H binding domains in Sbi.

As Sbi is an IgG binding protein, interaction with additional ligands cannot be studied by standard ELISA. Consequently we used the previously described combined ELISA and Western blot approach (CEWA) to study binding of human serum proteins to Sbi [36]. CEWA, which allows the identification of Sbi bound serum proteins by size and by reactivity with specific antisera, revealed that Factor H as well as both FHR-1 $\alpha$  and

<sup>1</sup>Burman JD, Leung E, Atkins KL, O'Seaghda MN, Lango L, Bernadó P, Bagby S, Svergun DI, Foster TJ, Isenman DE, van den Elsen JMH. Interaction of Human Complement with Sbi, a Staphylococcal Immunoglobulin-binding Protein: Indications of a Novel Mechanism of Complement Evasion by *Staphylococcus aureus*. submitted



**Figure 2: Antibody binding of Sbi constructs.** Recombinant constructs Sbi-E, Sbi-I, Sbi-III/IV and Sbi-IV were immobilized and binding of a polyclonal Factor H antiserum (anti-SCR 1-4) and the two mABs B22 and C18 specific for Factor H was assayed by ELISA. Binding is mediated by the immunoglobulin binding regions which are positioned in the N-terminal domains I and II.



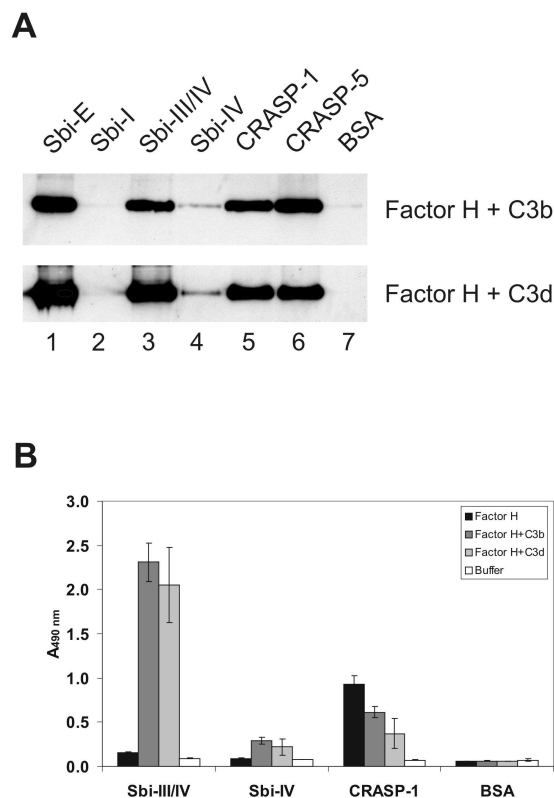
**Figure 3: Binding of Factor H and FHR-1 to Sbi.** (A) CEWA was used to analyze interaction of host complement regulators with the IgG binding Sbi protein. Sbi-E, Sbi-I, Sbi-III/IV and Sbi-IV were immobilized onto the surface of a microtiter plate and human serum was applied. After extensive washing bound proteins were eluted, separated by SDS-PAGE and identified by Western blotting based on their mobility and their reactivity with mAB C18 that is specific for the C-terminal SCR domain of Factor H and FHR-1. The borrelial Factor H binding CRASP-1, the Factor H/FHR-1 binding CRASP-5 and BSA were used as controls. The mobility of the marker proteins is indicated. (B) Purified Factor H was used in the same assay.

FHR-1 $\beta$  bind to Sbi-E comprising the domains I-IV (Figure 3A, lane 1). Both Factor H and FHR-1 $\alpha$ /FHR-1 $\beta$  bound to the deletion constructs Sbi-III/IV and with lower intensity to Sbi-IV (Figure 3A, lanes 3 and 4). The IgG binding domain Sbi-I did not bind the host complement regulators (Figure 3A, lane 2). As described previously Factor H bound to borrelial CRASP-1 and CRASP-5 and FHR-1 $\alpha$ /FHR-1 $\beta$  to CRASP-5 (Figure 3A, lanes 5 and 6)[36].

Having demonstrated binding of Factor H, FHR-1 $\alpha$  and FHR-1 $\beta$  from human serum to Sbi via domains III and IV, we wanted to confirm this interaction with purified proteins. However purified Factor H did not bind to Sbi, but did bind to CRASP-1 and CRASP-5 (Figure 3B). These results suggest that binding of Factor H to Sbi is mediated by an additional serum factor.

**Identification of a serum factor that mediates Factor H:Sbi interaction.**

In order to identify the additional serum factor that mediates binding of the complement regulator, we hypothesized that the central complement component C3, which binds to the staphylococcal inhibitors Efb, Ehp and Ecb [29,30,32] might be such a mediator. Consequently binding of purified Factor H in the presence of the complement proteins C3b and C3d was analyzed by CEWA.



**Figure 4: Binding of Factor H to Sbi fragments in the presence of C3b or C3d.** (A) Sbi-E, Sbi-I, Sbi-III/IV and Sbi-IV, CRASP-1 and CRASP-5 of *Borrelia burgdorferi* and BSA were immobilized and incubated with Factor H together with C3b or C3d. After washing bound proteins were eluted from the wells, separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using the mAB C18. In the presence of C3b or C3d Factor H bound to Sbi-E, Sbi-III/IV, Sbi-IV, CRASP-1 and to CRASP-5. (B) Sbi-III/IV, Sbi-IV, CRASP-1 and BSA were immobilized and binding of Factor H alone, Factor H and C3b, or Factor H and C3d was assayed by ELISA using polyclonal Factor H antiserum. Again in the presence of C3b or C3d Factor H bound to Sbi-III/IV, to Sbi-IV weakly and to CRASP-1. Factor H alone did not bind to CRASP-1.

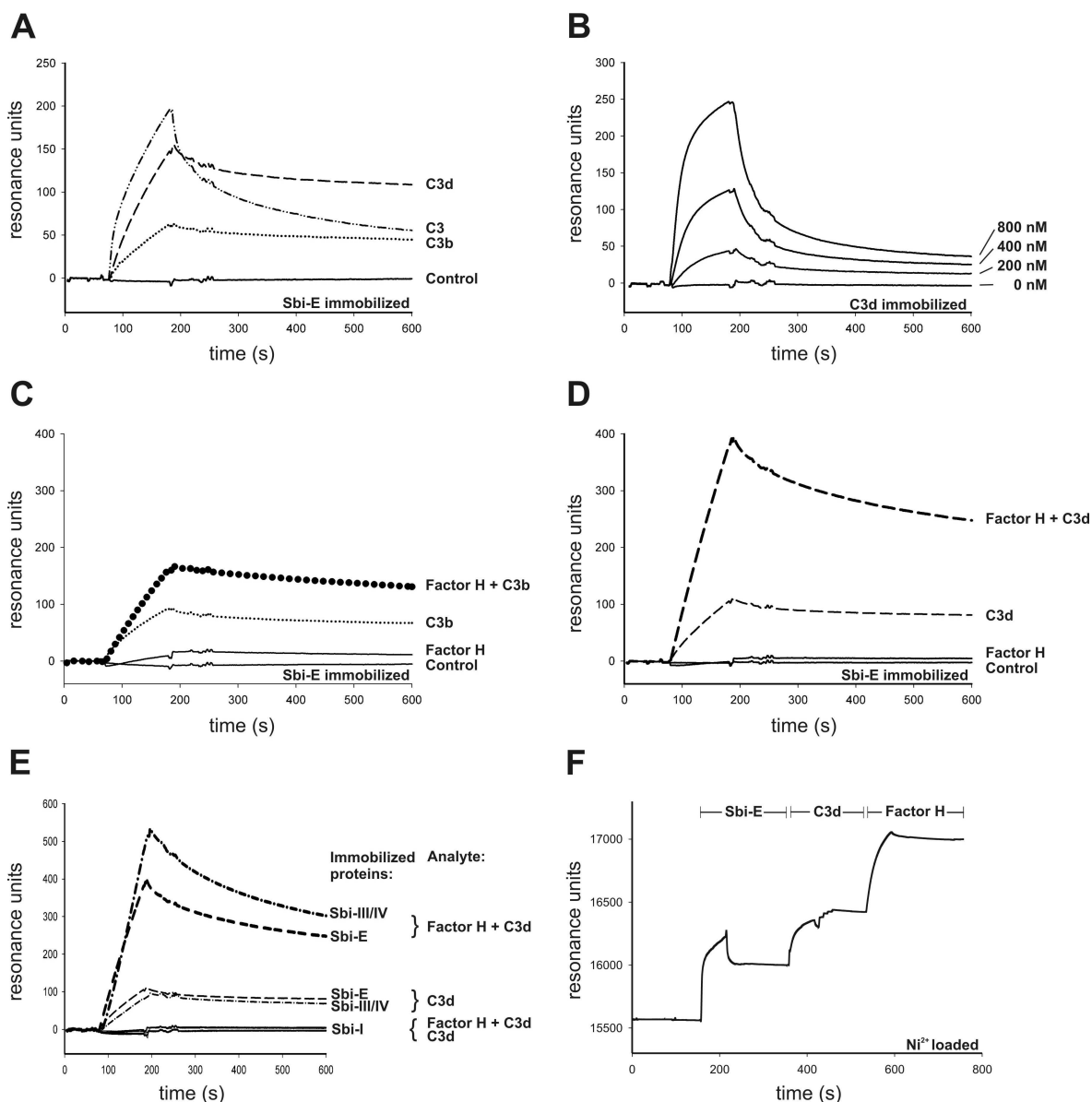
When coincubated with either C3b or C3d Factor H bound to Sbi-E, Sbi-III/IV and Sbi-IV, but not to Sbi-I (Figure 4A). This effect suggests that Sbi forms a ternary complex with Factor H and C3.

Factor H binds to domains III and IV of Sbi, but not to the IgG binding domain I. The interaction to the non-IgG binding domains was confirmed by standard ELISA. Purified Factor H bound to Sbi-III/IV in the presence of purified C3b or C3d (Figure 4B, columns 1). Binding of Factor H together with C3b or C3d to Sbi-IV was rather low. Apparently Factor H bound with stronger intensity to Sbi-III/IV as compared to the Factor H binding to borrelial CRASP-1 (Figure 4B, compare columns 1 and 3). This result reveals a novel mechanism of capturing

host immune regulators, as Sbi binds Factor H in combination with a second host ligand, namely C3.

**Characterization of the Sbi:C3:Factor H ternary complex.**

Having identified staphylococcal Sbi as a protein that binds the host complement components Factor H together with C3b or C3d, we analyzed C3 binding and ternary complex formation in more detail. First binding of the various forms of C3 was analyzed to immobilized Sbi-E in real time using surface plasmon resonance. C3 showed a strong association and a relative fast dissociation (Figure 5A: C3).



**Figure 5: Analyzing Sbi:C3 interaction by surface plasmon resonance.** (A) Sbi-E was immobilized and C3, C3b and C3d were applied in fluid phase. C3 showed strong association and after removal of the analyte a relative fast dissociation (dash-dotted line). C3b showed a slower association profile as compared to unprocessed C3, however the complex was rather stable (dotted line). In addition C3d showed a prominent association profile and the complex was rather stable (dashed line). (B) Dose-dependent interaction of Sbi-E to immobilized C3d. (C) Effect of C3b on Factor H-Sbi interaction. Sbi-E was immobilized and binding of the single components Factor H or C3b, or of a combination of the two proteins Factor H and C3b was analyzed. (D) Effect of C3d on Factor H-Sbi interaction. Sbi-E was immobilized and binding of the single components Factor H or C3d, or of a combination of the two proteins Factor H and C3d was analyzed. As identical concentrations were used the binding profiles can be directly compared and thus demonstrate stronger interaction of the complex in the presence of C3d as compared to C3b. (E) The various fragments Sbi-E, Sbi-I and Sbi-III/IV were coupled to the surface of a sensor chip and binding of proteins Factor H alone or C3d alone or in combination was analyzed. C3d bound to Sbi-E and Sbi-III/IV with comparable intensities, but did not bind to Sbi-I. The Factor H:C3d complex showed stronger binding to Sbi-E and Sbi-III/IV, but did not bind to Sbi-I. (F) Subsequent association of Sbi-E, C3d and Factor H to an NTA-chip forming a stable Sbi-E:C3d:Factor H complex.

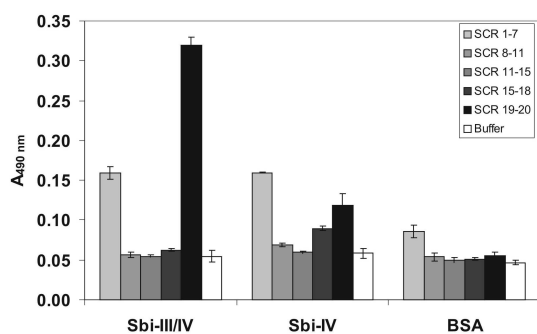
In addition C3d, the degradation product of C3, showed a more pronounced association and also a slow rate of dissociation (Figure 5A: C3d). This slow dissociation profile of both C3d and C3b suggests a high stability of the Sbi:C3b and Sbi:C3d complexes.

Based on the strong association of C3d to Sbi-E, this interaction was analyzed in more detail. Sbi-E showed a dose-dependent binding to immobilized C3d when used at a range of 200, 400 and 800 nM (Figure 5B). The same dose-dependent binding was observed in a reverse setting with immobilized Sbi-E (data not shown). These results demonstrate that C3, C3b and C3d bind directly to the staphylococcal Sbi.

In order to further analyze the interaction and complex formation Sbi-E representing domains I-IV was immobilized and complex formation was followed in real time. In this setting Factor H bound rather weakly to immobilized Sbi-E, while the C3b binding was stronger (Figure 5C). A strong increase was observed in the presence of both Factor H and C3b confirming the formation of a ternary complex (Figure 5C). Formation of the ternary complex was also analyzed with Factor H and C3d (Figure 5D). Binding of C3d was almost comparable to that of C3b (compare Figure 5D and Figure 5C) however the ternary Sbi:C3d:Factor H complex was stronger.

Binding and ternary complex formation was analyzed to immobilized Sbi-constructs, i.e. Sbi-E, Sbi-I and Sbi-III/IV, to localize the C3 binding domains in Sbi. C3d did not bind to the IgG binding domain Sbi-I, but to Sbi-E and also to the construct Sbi-III/IV (Figure 5E). C3d interaction to Sbi-E and Sbi-III/IV was comparable, thus confirming the role of domains III and IV for the contact. Based on the strong interaction of the Sbi:C3d:Factor H complex to Sbi-E and to Sbi-III/IV (Figure 5E) it is concluded that the C3/Factor H interaction region of Sbi is located exclusively in Sbi domains III and IV.

To characterize the formation of Sbi:C3d:Factor H complex Sbi-E was coupled to an NTA-chip and complex formation was followed upon sequential addition of C3d and Factor H (Figure 5F). Immobilization of Sbi-E was observed and upon addition of C3d formation of the Sbi:C3d complex was followed in real time (Figure 5F, middle part). Upon addition of Factor H, an association was detected by the increase in the surface plasmon resonance signal.



**Figure 6: Localization of the Sbi binding regions within Factor H.** Sbi-III/IV and Sbi-IV were immobilized to the surface of a microtiter plate and the indicated Factor H deletion constructs and C3b were added. Binding was assayed by ELISA using polyclonal Factor H antiserum. SCRs 1-7 bound weakly and SCRs 19-20 bound with strong intensity to Sbi-III/IV. Binding of SCRs 1-7 to Sbi-III/IV and Sbi-IV was comparable however binding of SCRs 19-20 to Sbi-IV was reduced. The additional Factor H deletion mutants did not bind to Sbi.

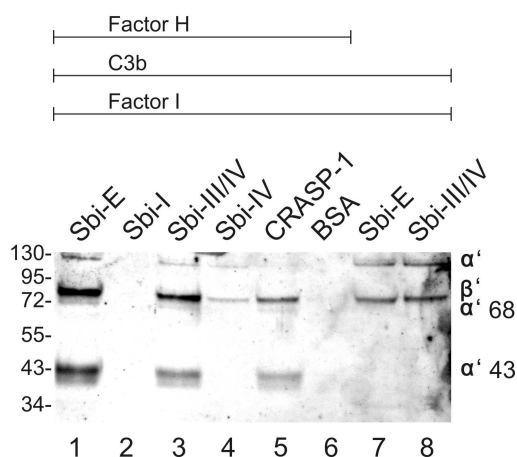
These results demonstrate that Factor H binds directly to the Sbi:C3d complex and that Factor H does not compete with C3b for Sbi-E binding (Figure 5F, last part). The observed mass increase at the surface of the sensor chip during association of Factor H to the Sbi:C3d complex was higher than that of Factor H to immobilized C3d (data not shown).

### Localization of the Sbi binding domains within Factor H.

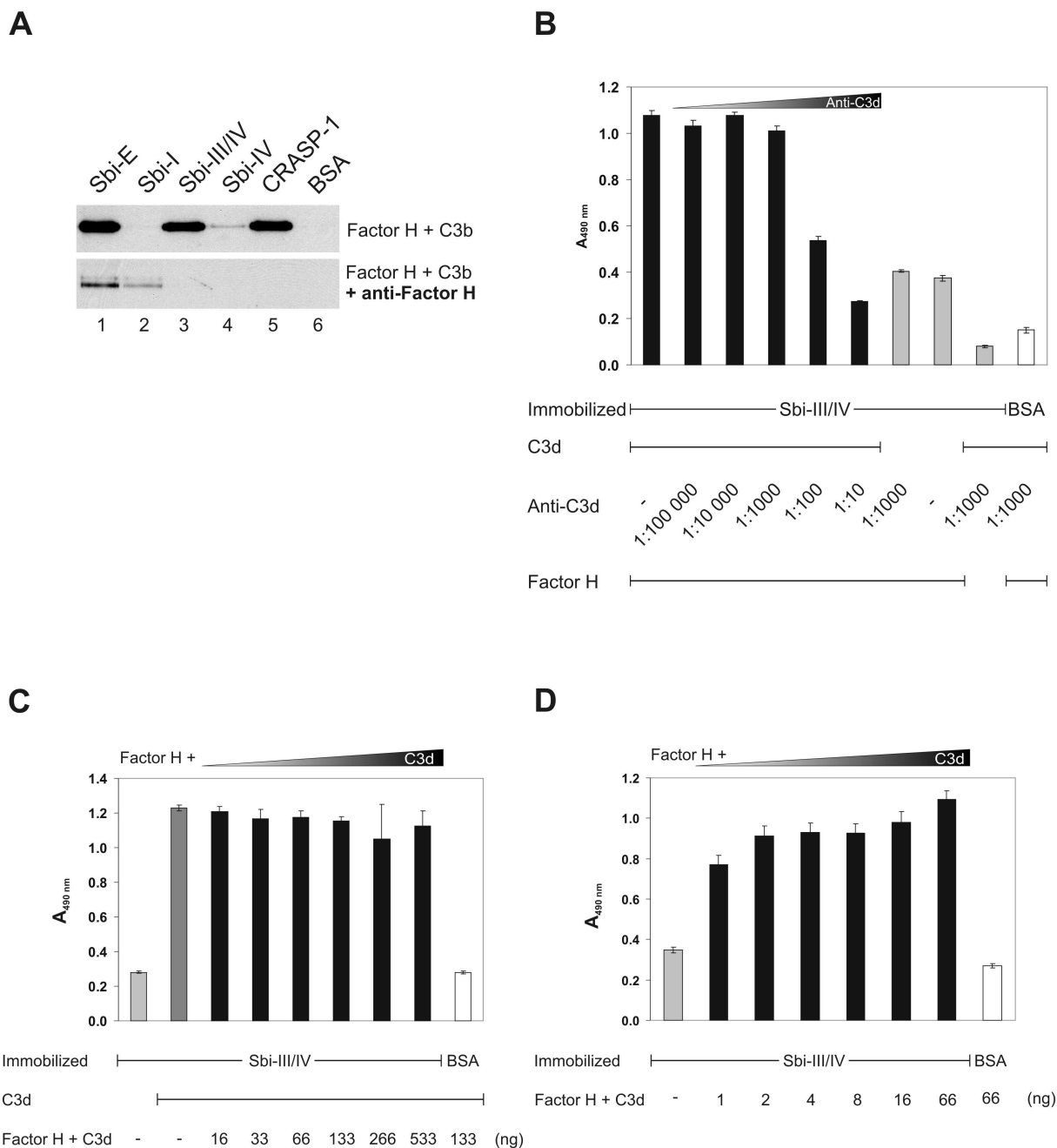
To further characterize this novel type of Factor H acquisition with C3, we decided to identify the Factor H domains that are involved in this interaction. Factor H deletion constructs were used in an ELISA experiment. In the presence of C3b Factor H SCRs 1-7 bound and stronger binding of SCRs 19-20 to immobilized Sbi-III/IV was observed (Figure 6, column 1). Two Sbi binding regions within the Factor H protein were localized, one with relative weak Sbi binding, located within the N-terminal SCRs 1-7 and a second stronger binding site was localized within the C-terminal recognition region of Factor H, within SCRs 19-20.

### Factor H fixed in the Sbi:C3b ternary complex displays cofactor activity.

Factor H bound to pathogenic ligands maintains complement regulatory activity which relates to complement evasion [1]. It was therefore of importance to assay if Factor H fixed in this novel ternary complex is also functionally active and has complement regulatory activity. Factor H and C3b were incubated simultaneously with immobilized Sbi-E or the deletion fragments Sbi-I, Sbi-III/IV and Sbi-IV. Subsequently, Factor I was added and the mixture was incubated further. Following this treatment the proteins were eluted, separated by SDS-PAGE and after transfer to a membrane the C3b degradation products were identified by Western blotting.



**Figure 7: Factor H retains cofactor activity within the Sbi:C3b:Factor H complex.** Sbi-E, Sbi-I, Sbi-III/IV and Sbi-IV, and the borreliac CRASP-1 were immobilized to the surface of a microtiter plate. Factor H and C3b were added and following extensive washing Factor I was applied. After 30 min incubation the mixture was harvested and separated by SDS-PAGE. C3b degradation was analyzed by Western blotting using a polyclonal C3 antiserum. The mobility of the  $\alpha'$  and  $\beta'$  chain of C3b and the cleavage products  $\alpha'68$  and  $\alpha'43$  are indicated. Factor H mediated cofactor activity is detected when the complex is coupled to Sbi-E and Sbi-III/IV (lanes 1 and 3). The borreliac CRASP-1 protein and BSA were used as controls (lane 5 and 6). In the absence of Factor H C3b remains intact (lanes 7 and 8).



**Figure 8: Characterization of the ternary Sbi:Factor H:C3 complex.** (A) Polyclonal Factor H antiserum blocks the formation of the Sbi:C3b:Factor H complex. Sbi-E, Sbi-I, Sbi-III/IV and Sbi-IV were immobilized onto the surface of a microtiter plate and Factor H and C3b (upper panel) or Factor H, C3b preincubated with polyclonal Factor H antiserum (lower panel) were added. After extensive washing the bound proteins were eluted, separated by SDS-PAGE and Factor H was identified by Western blotting using polyclonal SCR 1-4 antiserum. Polyclonal Factor H antiserum inhibited formation of the ternary complex. CRASP-1 of *B. burgdorferi* and BSA were used as controls. (B, C, D) The formation of the ternary Sbi-III/IV:C3d:Factor H complex was studied with ELISA experiments using polyclonal Factor H antiserum for detection of Factor H binding. (B) Sbi-III/IV and BSA were immobilized, incubated with C3d and increasing dilutions of C3d antiserum was added. After washing Factor H was added and binding was assayed. (C) Saturating concentrations of C3d (0.2 µg) were added to immobilized Sbi-III/IV and BSA. Simultaneously Factor H was preincubated with increasing amounts of C3d and the protein mixture was added to the immobilized Sbi-III/IV:C3d complexes. Subsequently, Factor H binding was measured. (D) Again Sbi-III/IV and BSA were immobilized and Factor H and increasing amounts of C3d were added measuring the minimal amount of C3d required to gain an increase in Factor H binding to Sbi-III/IV.

Factor H bound to Sbi-E in the presence of C3b displayed cofactor activity as indicated by the disappearance of the  $\alpha'$  band and the appearance of the  $\alpha'68$ - and  $\alpha'43$  bands (Figure 7, lane 1). The same degradation profile of C3b was observed when Factor H was bound to Sbi-III/IV (Figure 7, lane 3) or to borrelial CRASP-1 (Figure 7, lane 5). In the absence of Factor H no degradation of C3b was observed (Figure 7, lanes 7 and 8). These results show

that Factor H attached to Sbi in a ternary complex maintains complement regulatory activity.

**Characterization of the binding mechanism within the ternary complex.**

Ternary Sbi:C3b:Factor H and Sbi:C3d:Factor H complexes represent a novel mechanism for Factor H attachment. Factor H has a C3b/C3d binding region within the C-terminal recognition region, which also



forms the major contact with Sbi. Therefore we asked whether the ternary complex is based on a sandwich type interaction, by which Sbi binds first intact C3, C3b or C3d and then Factor H. Alternatively a tripartite complex may be formed, in which Factor H directly contacts Sbi and C3. Inhibition experiments were performed to test this hypothesis and to characterize this interaction in more detail. First Factor H and C3b were incubated in the presence of Factor H antiserum and Factor H binding to immobilized Sbi was studied. Preincubation of Factor H with the specific antiserum decreased binding to Sbi-E and blocked binding to the fragments Sbi-III/IV and Sbi-IV (Figure 8A, lower panel). The weak binding of antiserum treated Factor H to intact Sbi-E and to Sbi-I is explained by Factor H binding to Sbi via IgG.

Secondly, Sbi-III/IV was immobilized, C3d was added and Sbi-III/IV bound C3d was blocked with increasing amounts of specific C3d antiserum. Subsequently, the binding of Factor H was analyzed. Factor H binding was not impaired with antisera titres up to 1:1000 but was reduced and not completely blocked at the highest titres (1:100 and 1:10) (Figure 8B). This result shows direct binding of Factor H to Sbi and indicates that the presence of C3d Sbi enhances formation of the ternary complex.

Similarly, Sbi-III/IV was immobilized and a saturating amount of C3d was bound. In order to block C3d binding sites on the Factor H protein, Factor H was preincubated with increasing concentrations of C3d prior to binding. The preincubated Factor H:C3d complexes were added to the immobilized Sbi:C3d complexes and after incubation Factor H binding was analyzed. Again ternary Sbi:C3d:Factor H complexes were detected and complex formation was independent of the amount of C3b used for preincubation (Figure 8C). This result is in agreement with a direct Factor H:Sbi contact.

Next binding of Factor H with increasing amounts of C3d to immobilized Sbi-III/IV was studied. Already at a low amount of C3d (1ng) resulting in a molar Factor H:C3d ratio of 25:1, Factor H:Sbi interaction was enhanced (Figure 8D). In summary the inhibition and blocking experiments reveal that Factor H binds directly to Sbi and that binding is assisted by C3d.

#### **Sbi is a complement inhibitor.**

Staphylococcal Sbi forms a ternary complex with host complement proteins Factor H and C3. Consequently the complement inhibitory activity of Sbi was assayed in a standard hemolysis assay, using human serum and rabbit erythrocytes. In this assay Sbi-E and also Sbi-III/IV inhibited complement-mediated lysis of rabbit erythrocytes in a dose-dependent manner. Complete inhibition was observed at a concentration of 600 ng of either Sbi-E or Sbi-III/IV (Figure 9A). In contrast, Sbi-I had no effect (data not shown) indicating that C3b and Factor H binding is relevant for complement inhibitory activity. These results demonstrate that Sbi acts as a potent complement inhibitor. Hemolysis of rabbit erythrocytes in human serum was dose-dependent over a range from 5 to 15 % and Sbi blocked hemolysis efficiently at all serum concentrations (Figure 9B).

To analyze the species range of Sbi-E the inhibitory effect of Sbi-E was tested in different animal sera. Complement mediated inhibition was observed in human, mouse and guinea pig sera, and no effect was detected in dog, goat and sheep sera (Figure 9C). Thus Sbi acts in human serum but also displays a broader species range.

Sbi is a potent complement inhibitor. Therefore we investigated the inhibitory effect of Sbi-E in all three

complement pathways. Sbi-E clearly inhibited alternative pathway activity (Figure 9D, column 2 and 3). When all pathways were activated hemolysis was reduced in a dose-dependent manner, indicating that the alternative pathway, which was blocked by Sbi-E, is involved and that the classical and lectin pathway are unaffected (Figure 9D, columns 7 and 8). This effect was confirmed upon analyzing the impact on the classical and the lectin pathway. Sbi-E did not inhibit hemolysis of rabbit erythrocytes when complement was activated via the classical and the lectin pathway (Figure 9D, columns 12 and 13). These results demonstrate that Sbi-E efficiently inhibits the alternative, but not or not as efficiently the classical and the lectin pathway.

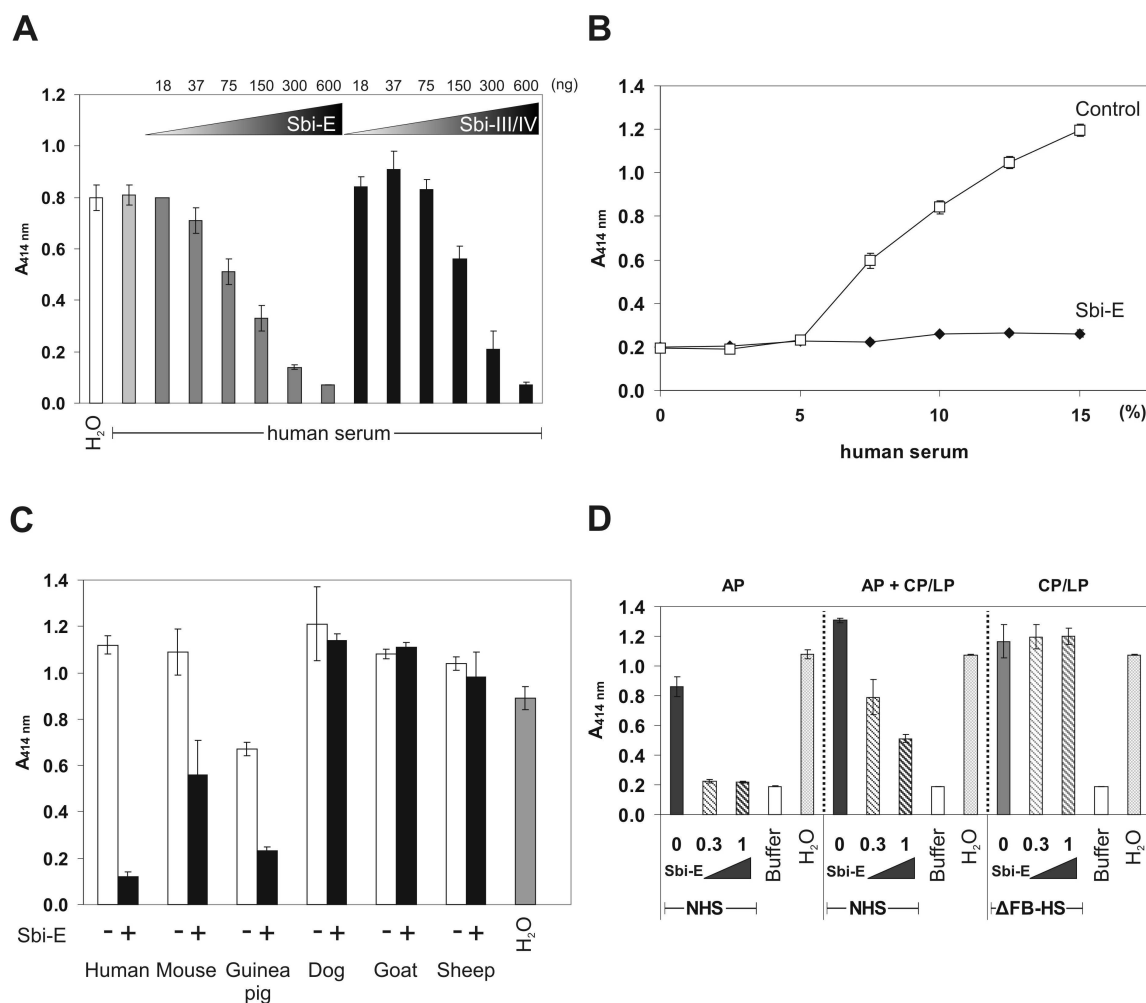
#### **Discussion**

The Gram-positive bacterium *S. aureus*, similar to other human pathogens binds the complement regulators Factor H and FHR-1 from human serum. We identify the staphylococcal Sbi protein as one ligand for the two host complement regulators. Apparently Sbi binds Factor H by a new mechanism, as this human regulator binds to Sbi together with C3, which likely results in formation of a ternary Sbi:C3:Factor H complex. Arranged in this ternary complex Factor H is functionally active and displays complement regulatory activity. Thus Sbi is a potent complement inhibitor, and inhibits the hemolytic activity of human and rodent serum on rabbit erythrocytes via the alternative pathway. Thus the multifunctional bacterial Sbi protein interferes with both innate and adaptive immune recognition, by acquisition of multiple host proteins in form of the complement components Factor H, C3 as well as IgG and  $\beta_2$ -glycoprotein I.

Purified Factor H bound to intact bacteria, but dependent on the assay showed weak or even no binding to Sbi (compare Figure 1 and Figure 3B). This difference in binding suggests that *S. aureus* expresses an additional Factor H binding surface protein. The identification of this protein is subject of further studies. The staphylococcal Sbi protein was identified as a ligand for Factor H. However Factor H binding is strong in the presence of an additional complement protein C3 to the purified Sbi protein and forms a ternary complex (Figure 4 and Figure 5).

Factor H has two contact regions for Sbi, which are located within SCRs 1-7 and SCRs 19-20 (Figure 6). Very similar contact domains were identified for other microbial Factor H binding proteins, e.g. CRASP-1 and CRASP-2 of *B. burgdorferi*, Tuf of *P. aeruginosa* and Gpm1 of *C. albicans* [12,14,16,37]. Inhibition experiments showed that polyclonal Factor H antiserum blocks Factor H binding to Sbi, however a mAb directed against the C-terminus of Factor H did not affect binding (Figure 8A and data not shown). These results suggest that the C-terminus alone is not sufficient for binding and that additional regions of Factor H are involved. However, in the proposed ternary complex the regulatory region of Factor H (i.e. SCRs 1-4) is freely accessible as demonstrated by the Factor I mediated cleavage of C3b (Figure 7).

The staphylococcal Sbi protein is composed of four globular N-terminal domains connected to a tyrosine-rich C-terminal domain via a prolin-rich region [38]. A recombinant fragment with domains I-IV (Sbi-E), as well as constructs Sbi-III/IV and Sbi-IV, but not Sbi-I bound Factor H in combination with C3b or C3d (Figure 4), thus localizing the Factor H binding region to Sbi domains III



**Figure 9: Sbi is a complement inhibitor.** (A) Alternative pathway-mediated hemolysis of rabbit erythrocytes was assayed in the presence of increasing amounts of Sbi-E (columns 3-8) or Sbi-III/IV (columns 9-14). Hemolysis of rabbit erythrocytes with ddH<sub>2</sub>O is shown in column 1; hemolysis in human serum in the absence (open squares) or the presence of Sbi-E (filled rhombi). (B) Hemolysis of rabbit erythrocytes following incubation in increasing concentrations of complement active human serum in the absence (open squares) or the presence of Sbi-E (filled rhombi). (C) Lysis of rabbit erythrocytes in serum (30 %) derived from the indicated species; i.e. human, mouse, guinea pig, dog, goat and sheep. (D) Comparing the effect of Sbi on alternative pathway (AP)-, alternative, classical and lectin pathway (AP + CP/LP)-, as well as classical and lectin pathway (CP/LP)-mediated hemolysis of human serum on rabbit erythrocytes. Background lysis was subtracted for (A) and (C). NHS, normal human serum, ΔFB-HS, Factor B depleted human serum.

and IV. As the Factor H/C3b binding sites in domain III and IV and the IgG binding sites in domain I and II are separated, the Sbi protein may simultaneously bind several host proteins.

The binding properties of Sbi are unique as – to our knowledge – Sbi is the only bacterial protein that binds Factor H in combination with an additional complement component, i.e. the processed fragments of C3, C3b and C3d. It will be of interest to demonstrate whether other pathogenic proteins or virulence factors form such ternary complexes.

The three proteins Sbi, C3 and Factor H form a ternary complex, in which Sbi interacts directly with C3b or C3d. Factor H binds to the Sbi:C3b complex by forming an additional contact likely with both C3 and Sbi. The Sbi:C3 interaction appears rather complex, as intact C3 and the two processed forms C3b and C3d display different binding profiles resulting in different stabilities (Figure 5A). C3d complexed to Sbi showed the highest binding intensity, and C3b or C3 a lower interaction. In addition the rate constants of C3d and Sbi-III/IV when assayed by surface plasmon resonance did not fit a 1:1 model of interaction, but rather fit a bivalent

analyte model (data not shown and Figure 1A and 1B). In addition it was shown that Sbi also binds to the C3a fragment [Burman et al. submitted<sup>1</sup>]. The proposed bivalent analyte interaction together with the different binding profiles for the three C3 forms suggest that C3 undergoes a conformational change upon binding to Sbi and exposes additional binding epitopes, which affect Sbi interaction, or that these C3b/C3d binding region(s) is/are differently accessible to the bacterial Sbi protein.

During complement activation C3 is cleaved, the C3 cleavage products bind to Sbi, increase Factor H binding and enhance the stability of the ternary complex. Such a feed back regulation may increase the amount of inhibitory host regulators like Factor H at the site of infection and result in protection of the pathogen from complement attack.

This inhibition of the alternative pathway by Sbi indicates that Factor H bound to Sbi affects the C3 convertase. Within the ternary complex Factor H displays complement regulatory activity (Figure 7), which seems to be responsible for inhibition of hemolytic activity. This explains why Sbi domains III and IV display an inhibitory effect, but not domain I (Figure 9A and data

not shown). Compared to the other staphylococcal complement regulators Efb and Ecb, Sbi does not interfere with C5 convertase activity of the classical pathway and did not affect hemolysis mediated by the classical pathway (Figure 9D) [29]. Thus Sbi forms a ternary complex with the two human complement proteins Factor H and C3, revealing a novel mechanism for complement inhibition.

The inhibitory activity of Sbi is not restricted to human complement as the protein also blocks complement in other species i.e. mouse and guinea pig. Demonstrating that Sbi is a staphylococcal virulence factor with a broader species range as compared to the human specific inhibitor SCIN, which acts specifically in the human system [29,34].

Sbi is a potent complement inhibitor, which interferes with the hemolytic activity of human serum. In hemolytic assays with rabbit erythrocytes Sbi used at 2 µg/ml (= 0.3 µg) exclusively blocked the alternative pathway whereas the classical and the lectin pathways were unaffected (Figure 9D). However when used at higher concentrations of 1000 µg/ml in an ELISA approach the Sbi-III/IV fragment blocks all three activation pathways of human complement but the Sbi-IV fragment is a specific inhibitor for the alternative pathway [Burman et al. submitted<sup>1</sup>]. This activity differs from that of SCIN and its homologues SCIN-B and SCIN-C, which affects all three complement pathways [29,34].

The staphylococcal Sbi protein is a multifunctional protein which binds the complement effectors Factor H, FHR-1 and C3 and also the processed forms C3b and C3d, as well as IgG and β<sub>2</sub>-glycoprotein I. Thus Sbi mediates innate and adaptive immune escape (i) by acquiring host complement inhibitors, which correlates with the activation state of complement, (ii) by inhibiting complement activation at the level of alternative pathway C3 convertase, (iii) by binding and inactivation of IgG to avoid recognition by phagocytes, and (iv) most likely by blocking C3dg binding to complement receptor 2 (CR2) [Burman et al. submitted<sup>1</sup>].

## Acknowledgements

We thank Peter Kraiczy, University of Frankfurt a. M., and Reinhard Wallich, University of Heidelberg, for supplying CRASP-1 and CRASP-5 of *B. burgdorferi*. Dr Edward Feil, University of Bath, is gratefully acknowledged for providing *S. aureus* strain H591. This work was supported by the Netzwerk Grundlagenforschung of the Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology.

## References

- Zipfel PF, Würzner R, Skerka C (2007) Complement evasion of pathogens: common strategies are shared by diverse organisms. *Mol Immunol* 44: 3850-3857.
- Lambris JD, Ricklin D, Geisbrecht B.V. Complement Evasion by Human Pathogens. *Natur Review Microbiology*. In press.
- Walport MJ (2001) Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 344: 1058-1066.
- Rodriguez de Cordoba S, Esparza-Gordillo J, Goicoechea de Jorge E, Lopez-Trascasa M, Sanchez-Corral P (2004) The human complement factor H: functional roles, genetic variations and disease associations. *Mol Immunol* 41: 355-367.
- Zipfel PF, Jokiranta TS, Hellwege J, Koistinen V, Meri S (1999) The factor H protein family. *Immunopharmacology* 42: 53-60.
- Whaley K, Ruddy S (1976) Modulation of the alternative complement pathways by beta 1 H globulin. *J Exp Med* 144: 1147-1163.
- Rooijackers SH, van Strijp JA (2007) Bacterial complement evasion. *Mol Immunol* 44: 23-32.
- Kraiczy P, Würzner R (2006) Complement escape of human pathogenic bacteria by acquisition of complement regulators. *Mol Immunol* 43: 31-44.
- Horstmann RD, Sievertsen HJ, Knobloch J, Fischetti VA (1988) Antiphagocytic activity of streptococcal M protein: selective binding of complement control protein factor H. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 1657-1661.
- Pandiripally V, Gregory E, Cue D (2002) Acquisition of regulators of complement activation by *Streptococcus pyogenes* serotype M1. *Infect Immun* 70: 6206-6214.
- Wei L, Pandiripally V, Gregory E, Clymer M, Cue D (2005) Impact of the SpeB protease on binding of the complement regulatory proteins factor H and factor H-like protein 1 by *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun* 73: 2040-2050.
- Kraiczy P, Skerka C, Brade V, Zipfel PF (2001) Further characterization of complement regulator-acquiring surface proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 69: 7800-7809.
- Ram S, McQuillen DP, Gulati S, Elkins C, Pangburn MK, et al. (1998) 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.
- Kunert A, Losse J, Gruszyn C, Hühn M, Kaendler K, et al. (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.
- Dave S, Brooks-Walter A, Pangburn MK, McDaniel LS (2001) PspC, a pneumococcal surface protein, binds human factor H. *Infect Immun* 69: 3435-3437.
- Poltermann S, Kunert A, von der Heide M, Eck R, Hartmann A, et al. (2007) Gpm1p is a factor H, FHL-1 and plasminogen-binding surface protein of *Candida albicans*. *J Biol Chem*.
- Retnoningrum DS, Podbielski A, Cleary PP (1993) Type M12 protein from *Streptococcus pyogenes* is a receptor for IgG3. *J Immunol* 150: 2332-2340.
- Ringdahl U, Sjöbrink U (2000) Analysis of plasminogen-binding M proteins of *Streptococcus pyogenes*. *Methods* 21: 143-150.
- Cue D, Lam H, Cleary PP (2001) Genetic dissection of the *Streptococcus pyogenes* M1 protein: regions involved in fibronectin binding and intracellular invasion. *Microb Pathog* 31: 231-242.
- Rossmann E, Kraiczy P, Herzberger P, Skerka C, Kirschfink M, et al. (2007) Dual binding specificity of a *Borrelia hermsii*-associated complement regulator-acquiring surface protein for factor H and plasminogen discloses a putative virulence factor of relapsing fever spirochetes. *J Immunol* 178: 7292-7301.
- Peacock SJ, de Silva I, Lowy FD (2001) What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*? *Trends Microbiol* 9: 605-610.
- Lowy FD (1998) *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 339: 520-532.
- Foster TJ (2005) Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol* 3: 948-958.
- Forsgren A, Sjöquist J (1966) "Protein A" from *S. aureus*. I. Pseudo-immune reaction with human gamma-globulin. *J Immunol* 97: 822-827.
- Salys AA, Whitt D. (2002) *Bacterial Pathogenesis: A molecular approach*. Washington D.C.: ASM Press.
- Rooijackers SH, van Wamel WJ, Ruyken M, van Kessel KP, van Strijp JA (2005) Anti-opsonic properties of staphylokinase. *Microbes Infect* 7: 476-484.
- Zhang L, Jacobsson K, Vasi J, Lindberg M, Frykberg L (1998) A second IgG-binding protein in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* 144 ( Pt 4): 985-991.
- Zhang L, Jacobsson K, Strom K, Lindberg M, Frykberg L (1999) *Staphylococcus aureus* expresses a cell surface

- protein that binds both IgG and beta2-glycoprotein I. *Microbiology* 145 ( Pt 1): 177-183.
29. Jongerijs I, Kohl J, Pandey MK, Ruyken M, van Kessel KP, et al. (2007) Staphylococcal complement evasion by various convertase-blocking molecules. *J Exp Med* 204: 2461-2471.
  30. Lee LY, Hook M, Haviland D, Wetsel RA, Yonter EO, et al. (2004) Inhibition of complement activation by a secreted *Staphylococcus aureus* protein. *J Infect Dis* 190: 571-579.
  31. Lee LY, Liang X, Hook M, Brown EL (2004) Identification and characterization of the C3 binding domain of the *Staphylococcus aureus* extracellular fibrinogen-binding protein (Efb). *J Biol Chem* 279: 50710-50716.
  32. Hammel M, Sfyroera G, Pырpassopoulos S, Ricklin D, Ramyar KX, et al. (2007) Characterization of Ehp: A secreted complement inhibitory protein from *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*.
  33. Hammel M, Sfyroera G, Ricklin D, Magotti P, Lambris JD, et al. (2007) A structural basis for complement inhibition by *Staphylococcus aureus*. *Nat Immunol* 8: 430-437.
  34. Rooijackers SH, Ruyken M, Roos A, Daha MR, Presanis JS, et al. (2005) Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases. *Nat Immunol* 6: 920-927.
  35. Rooijackers SH, van Kessel KP, van Strijp JA (2005) Staphylococcal innate immune evasion. *Trends Microbiol* 13: 596-601.
  36. Haupt K, Kraiczky P, Wallich R, Brade V, Skerka C, et al. (2007) Binding of human factor H-related protein 1 to serum-resistant *Borrelia burgdorferi* is mediated by borrelial complement regulator-acquiring surface proteins. *J Infect Dis* 196: 124-133.
  37. Kraiczky P, Skerka C, Kirschfink M, Brade V, Zipfel PF (2001) Immune evasion of *Borrelia burgdorferi* by acquisition of human complement regulators FHL-1/reconectin and Factor H. *Eur J Immunol* 31: 1674-1684.
  38. Atkins KL, Burman JD, Chamberlain ES, Cooper JE, Poutrel B, et al. (2007) *S. aureus* IgG-binding proteins SpA and Sbi: Host specificity and mechanisms of immune complex formation. *Mol Immunol*. In press.
  39. Kühn S, Skerka C, Zipfel PF (1995) Mapping of the complement regulatory domains in the human factor H-like protein 1 and in factor H1. *J Immunol* 155: 5663-5670.
  40. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (2001) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
  41. Jokiranta TS, Hellwage J, Koistinen V, Zipfel PF, Meri S (2000) Each of the three binding sites on complement factor H interacts with a distinct site on C3b. *J Biol Chem* 275: 27657-27662.

## Diskussion

### **Interaktion von FHR-1, Faktor H und FHL-1 mit CRASPs von *B. burgdorferi***

Jeder Mikroorganismus wird vom menschlichen Immunsystem erkannt und angegriffen. Deshalb haben humanpathogene Krankheitserreger Strategien entwickelt, mit denen sie der effizienten Immunantwort des Wirtes entkommen. *B. burgdorferi*, der Erreger der Lyme-Borreliose, entgeht der angeborenen Immunabwehr, indem das Bakterium Komplementregulatoren des Wirtes, wie Faktor H und FHL-1, an seine Oberfläche bindet. Diese Interaktion wird über „Complement regulator-acquiring surface proteins“ (CRASPs) vermittelt und verleiht dem Erreger sog. Serumresistenz, d.h. *B. burgdorferi* ist durch die Akquirierung der funktional aktiven Regulatoren des Wirtes vor der durch das Komplement vermittelten Phagozytose und Lyse geschützt und kann so in humanem Serum überleben. In dieser Arbeit wird erstmalig mit Hilfe von Adsorptionsversuchen und Immunfluoreszenzexperimenten die Bindung von humanem FHR-1, einem weiteren Mitglied der Faktor H Proteinfamilie, an die Oberfläche von *B. burgdorferi* gezeigt. FHR1 spielt offensichtlich eine wichtige Rolle für die Immunevasion, da auch andere pathogene Erreger, wie die verwandten Spirochäten *B. hermsii* und *L. interrogans*, aber auch *P. aeruginosa* und Streptokokken der Gruppe A, FHR-1 spezifisch binden (16, 113, 189, 220). Ebenfalls wird in dieser Arbeit gezeigt, dass zwei FHR-Proteine der Maus, mFHR-C und mFHR-E, an die Oberfläche von intakten Borrelien binden. Zudem wurde die Bindung von Faktor H der Maus an das Oberflächenprotein OspE beschrieben (1). Diese Bindung zeigt, dass *B. burgdorferi* auch in anderen Wirten, wie zum Beispiel den Nagern, das Prinzip der Rekrutierung von Komplementregulatoren der Faktor H Proteinfamilie als Immunevasionsstrategie nutzt.

FHR-1 bindet an *B. burgdorferi* über die bakteriellen Proteine CRASP-3, CRASP-4 und CRASP-5. Dabei handelt es sich um CRASPs der Gruppe II, die bisher ausschließlich für die Bindung an Faktor H bekannt waren (107). Faktor H bindet an CRASPs der Gruppe II über die C-terminalen SCRs 19 und 20 (107). Der C-Terminus von FHR-1 weist eine starke Sequenzübereinstimmung zu dem von Faktor H auf (42). Diese Homologie lässt vermuten, dass FHR1 mit den C-terminalen SCRs 4 und 5 an die drei Borrelienproteine bindet. Für die Bindung von Faktor H an CRASPs der Gruppe I, d.h. CRASP-1 und CRASP-2, sind neben den SCRs 19 und 20 vor allem die SCRs 5-7 entscheidend (103, 107). FHR-1 bindet nicht an

CRASPs der Gruppe I, da einerseits die Sequenzhomologie zwischen den SCRs 1 und 2 von FHR-1 und den SCRs 6 und 7 von Faktor H mit entsprechend 36 % und 45 % zu gering ist und andererseits ein dem SCR 5 von Faktor H entsprechendes SCR in FHR-1 fehlt (Abb. 9, (240)).

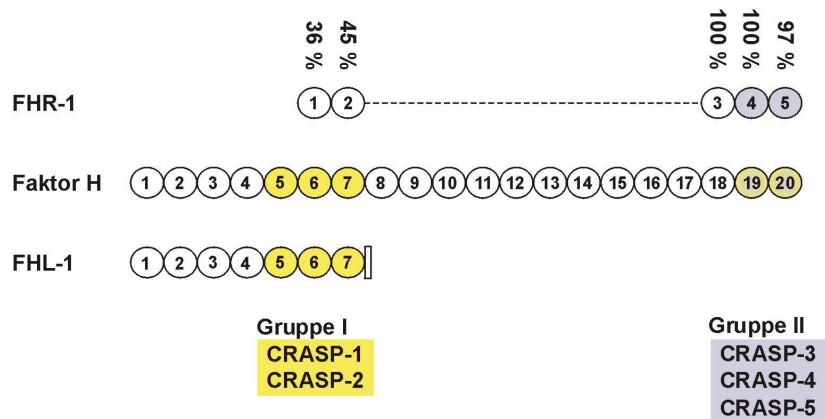


Abbildung 9: Lineare Strukturen von FHR-1, Faktor H und FHL-1 mit Binderegionen der CRASPs von *B. burgdorferi*. CRASPs der Gruppe I binden SCRs 5-7 und SCRs 19 und 20 in Faktor H und SCRs 5-7 in FHL-1 (gelb unterlegt). CRASPs der Gruppe II binden SCRs 4 und 5 in FHR-1 und SCRs 19 und 20 in Faktor H (blau unterlegt) (verändert nach 68 = Manuskript 2).

Vergleichende Analysen der Bindung von FHR-1, Faktor H und FHL-1 haben gezeigt, dass aus der Perspektive des Pathogens jedes der fünf CRASPs zwei Proteine der Faktor H Familie bindet. Die CRASPs der Gruppe I, CRASP-1 und CRASP-2, binden Faktor H und FHL-1. Hingegen binden die CRASPs der Gruppe II, CRASP-3, CRASP-4 und CRASP-5, FHR-1 und Faktor H (Tab. 4). Außerdem bindet jedes CRASP bevorzugt an eines der drei Faktor H Proteine. CRASP-1 interagiert am stärksten mit Faktor H und CRASP-2 mit FHL-1. CRASP-3 bindet stärker an FHR-1. Für CRASP-4 ist FHR-1 der bedeutendere Interaktionspartner. CRASP-5 bindet FHR-1 und Faktor H mit gleicher Intensität. Die Ergebnisse beruhen auf ELISA Experimenten und „Surface Plasmon Resonance“ Studien. Die unterschiedliche Bindungsstärke spiegelt sich auch in der Aktivität des gebundenen Faktor H wider, die mit Komplementkofaktorassays untersucht wurde. So hat Faktor H gebunden an CRASP-1 oder CRASP-5 das größte komplementinhibitorische Potential bei der Spaltung von C3b durch die Serinprotease Faktor I. Jeder *B. burgdorferi* Stamm exprimiert ein bestimmtes Set an unterschiedlichen CRASPs, die verschiedene Bindeeigenschaften aufweisen. Das ermöglicht dem Erreger je nach Lokalisation im Wirtsorganismus oder Infektionsphase eine Kombination von Regulatorproteinen an seine Oberfläche zu rekrutieren.

Tabelle 4: Interaktionsprofile der Komplementproteine FHR-1, Faktor H und FHL-1 für die einzelnen CRASPs. Die Anzahl der „+“ kennzeichnet die Bindungsstärke.

	<b>FHR-1</b>	<b>Faktor H</b>	<b>FHL-1</b>
Gruppe I			
CRASP-1	-	+++	+
CRASP-2	-	+	++
Gruppe II			
CRASP-3	+	+	-
CRASP-4	++	+	-
CRASP-5	+++	+++	-

Kompetitionsexperimente zeigen, dass FHR-1 mit Faktor H um die Bindung an CRASP-3 und an CRASP-5 konkurriert und Faktor H verdrängt. Dieses Ergebnis bestätigt, dass FHR-1 und Faktor H über die gleiche Binderegion, d.h. über die C-terminalen SCRs, an die CRASPs der Gruppe II binden. FHR-1 hat keine Kofaktoraktivität per se. Konkurrieren die beiden Faktor H Proteine um die Bindung an CRASP-5, wird Faktor H durch FHR-1 verdrängt und die Komplement inhibierende Aktivität auf der Oberfläche nimmt ab. Obwohl für FHRs beschrieben wurde, dass sie in Gegenwart von Faktor H die Kofaktoraktivität steigern (71), hat FHR-1 gebunden an CRASP-5 so eine indirekte hemmende Wirkung. FHR-1 bindende CRASPs der Gruppe II können die Oponisierung von *B. burgdorferi* negativ beeinflussen. Aus diesem Grund haben Borrliebstämme einen Vorteil, die mehrere unterschiedliche CRASPs exprimieren, um in humanem Plasma oder Geweben mit höherer FHR-1 Konzentration als im Plasma zu überleben. Vor allem *B. burgdorferi* Stämme, die CRASP-1 in ihrem Repertoire an Lipoproteinen haben, sind Serum resistent oder intermediär resistent (161, Peter Kraiczky persönliche Mitteilung).

CRASPs bilden die Schnittstelle bei der Interaktion zwischen Wirt und Pathogen und sind damit sowohl optimale Targets für die Entwicklung therapeutischer Wirkstoffe als auch wichtige Impfstoffkandidaten. Deshalb ist die Aufklärung der Interaktionsmechanismen zwischen CRASPs und den Wirtsregulatoren Faktor H und FHL-1 von entscheidender Bedeutung. Hier wurden für CRASP-2 fünf Aminosäuren identifiziert (81Phe, 84Asp, 129Arg, 207Tyr und 211Tyr), die für die Bindung an Faktor H und FHL-1 essentiell sind. Diese Aminosäuren liegen in drei von insgesamt vier Faktor H/FHL-1 Binderegionen, die mittels Peptidspot Analyse als Bindestellen lokalisiert wurden (66, Abb. 10). Für CRASP-1

wurden drei Domänen inklusive der C-Terminus des Proteins als potentielle Bindestellen für Faktor H und FHL-1 identifiziert (103). CRASP-1 von *B. burgdorferi* ist das erste Faktor H bindende bakterielle Protein, für das die Kristallstruktur vorliegt und nun Aufschluss über die Faktor H Interaktion mit dem mikrobiellen Protein gibt (26). Die dreidimensionale Struktur von CRASP-1 zeigt, dass der C-Terminus für die Homodimerisierung von CRASP-1 verantwortlich ist und somit indirekt für die Faktor H Bindung notwendig. Der Verlust des C-Terminus zerstört die Dimerstruktur, die eine wichtige Voraussetzung für die Bindung von Faktor H/FHL-1 ist (25). Aminosäuren im mittleren Teil des Proteins sind für die direkte Bindung von Faktor H und FHL-1 entscheidend. Diese Aminosäuren liegen in einer hydrophoben Tasche, die das Dimer formt und eine Bindestelle für die Komplementregulatoren darstellt (Peter Kraiczy persönliche Mitteilung).

```

M K K S F L S I Y M   L I S I S L L S C D   V S R L N Q R N I N   30
E L K I F V E K A K   Y Y S I K L D A I Y   N E C T G A Y N D I   60
                        Region 1
M T Y S E G T F S D   Q S K V N Q A I S I   F K K D N K I V N K   90
                        Region 2
F K E L E K I I E E   Y K P M F L S K L I   D D F A I E L D Q A   120
V D N D V S   N A R H   V A D S Y K K L R K   S V V L A Y I E S F   150
                        Region 3
D V I S S K F V D S   K F V E A S K K F V   N K A K E F V E E N   180
D L I A L E C I V K   T I G D M V N D R E   I N S R S R Y N N F   210
V K K E A D F L G A   A V E L E G A Y K A   I K Q T L L           236
                        Region 4

```

Abbildung 10: Aminosäuresequenz von CRASP-2 des *B. burgdorferi* Stammes B31. Faktor H/FHL-1 Binderegionen sind gelb unterlegt. Die fünf Aminosäuren 81Phe, 84Asp, 129Arg, 207Tyr und 211Tyr (grün) sind für die Faktor H und FHL-1 Bindung essentiell (verändert nach 106 = Manuskript 3).

Die fünf für die Bindung der Regulatorproteine bedeutenden Aminosäuren wurden durch gerichtete Mutagenese im CRASP-2 Gen identifiziert und sind in drei Faktor H/FHL-1 Binderegionen von CRASP-2 lokalisiert. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Bindung an Faktor H/FHL-1 diskontinuierlich ist und linear weit entfernte Interaktionspunkte involviert sind, was darauf schließen lässt, dass ähnlich wie bei CRASP-1 die dreidimensionale Struktur Einfluss auf die Bindung hat. Die identifizierten Aminosäuren sind geladen (84Asp, 129Arg) oder hydrophob (81Phe, 207Tyr, 211Tyr) und zeigen, dass sowohl ionische als auch hydrophobe Wechselwirkungen bei der Interaktion zwischen den Faktor H Proteinen und CRASP-2 eine Rolle spielen. Die dreidimensionale Struktur von CRASP-2 und die Analyse



von Kokkristallen mit Faktor H-Fragmenten oder FHL-1 werden über die Faktor H/FHL-1 Bindung umfassend Aufschluss geben.

### **Faktor H bildet einen ternären Komplex mit dem Komplementinhibitor Sbi von *S. aureus* und dem Komplementprotein C3**

*S. aureus* verursacht als opportunistischer Krankheitserreger nicht nur oberflächliche Hautinfektionen sondern auch tief-invasive und systemische Infektionen, die meist mit einer bakteriellen Streuung über den Blutkreislauf einhergehen. Während der bakteriämischen Phase wird der Erreger von der humoralen Abwehr des angeborenen Immunsystems, dem Komplementsystem, angegriffen. Um sich dennoch erfolgreich auszubreiten, nutzt *S. aureus* zahlreiche Immunevasionsmechanismen, mit denen sich das Bakterium vor dem potenten Effektorsystem des Wirtes schützt. Erstmals wird in dieser Arbeit gezeigt, dass das Bakterium die Komplementproteine Faktor H und FHR-1 aus humanem Serum an seine Oberfläche bindet und somit Faktor H neben einer Vielzahl von inhibitorischen Proteinen nutzt, um die Komplementaktivierung auf der Zelloberfläche zu kontrollieren (186). Mit *S. aureus* wurde ein weiterer Erreger identifiziert, der sowohl Faktor H als auch FHR-1 an seine Oberfläche bindet. Die Bindung der Komplementkomponenten wurde ähnlich wie bei *B. burgdorferi* in Adsorptionsversuche mit humanem Serum und mit aufgereinigten Proteinen an intakten *S. aureus* Zellen nachgewiesen.

Das Staphylokokkenprotein Sbi ist ein multifunktionales Protein. Sbi wurde als erstes Faktor H und FHR-1 bindendes Protein von *S. aureus* identifiziert und bindet das Komplementprotein C3 sowie dessen Spaltprodukte C3b und C3d. Darüber hinaus interagiert Sbi mit IgG und dem  $\beta_2$ -Glykoprotein I (234, 235). Damit ist Sbi als wichtiges Immunevasionsprotein von *S. aureus* in der Lage sowohl die angeborene als auch die adaptive Immunantwort des Wirtes zu beeinflussen. Indem Sbi die Komplementproteine Faktor H und C3/C3d bindet, inhibiert das Protein die weitere Aktivierung des Komplementsystems über den alternativen Weg. Zusätzlich bindet Sbi Immunglobuline in umgekehrter Orientierung und verhindert damit die Opsonophagozytose von *S. aureus*. Gebunden an C3dg verhindert Sbi außerdem die Erkennung durch B-Zellen und follikuläre dendritische Zellen über CR2 (Jean van den Elsen persönliche Mitteilung). Komplement bindende Proteine mit multiplen Funktionen wurden auch in *B. hermsii* (CRASP-1), in *P. aeruginosa* (Tuf) und in der

humanpathogenen Hefe *C. albicans* (Gpm1) identifiziert (113, 168, 189). Diese drei Proteine binden sowohl Faktor H als auch Plasminogen, das Vorläuferprotein der Wirtsprotease Plasmin. Demnach können Pathogene mit ein und dem selben Protein auf mehrere Umwelteinflüsse im menschlichen Organismus, sei es die Aktivierung des Komplementsystems und andere Abwehrmechanismen oder das Gerinnungssystem, reagieren, um sich innerhalb des Wirtes erfolgreich zu etablieren und durch Auflösen von Gewebestrukturen zu disseminieren.

Sbi wurde als Ligand für Faktor H und FHR-1 identifiziert. Dieses bakterielle Protein ist für die Bindung an das Plasmaprotein  $\beta_2$ -Glykoprotein I bekannt, das aus fünf SCRs besteht (176). Basierend auf der strukturellen Ähnlichkeit zwischen den Komplementregulatoren der Faktor H Proteinfamilie und dem  $\beta_2$ -Glykoprotein I wurde die Bindung von Faktor H und FHR-1 an Sbi als potentieller Interaktionspartner untersucht. Faktor H aus humanem Serum bindet an Sbi, nicht aber aufgereinigtes Faktor H, was vermuten lässt, dass ein oder mehrere weitere Serumfaktoren an der Bindung beteiligt sind. Diese Serumfaktoren wurden als C3b oder C3d identifiziert. Faktor H bindet an Sbi über einen neuen Mechanismus, bei dem Faktor H zusammen mit dem zentralen Komplementfaktor C3b oder dessen Spaltprodukt C3d an Sbi bindet und so einen ternären Komplex aus Sbi, C3b/C3d und Faktor H formt.

*S. aureus* exprimiert mehrere Faktor H bindende Proteine, da aufgereinigtes Faktor H allein an die Oberfläche von *S. aureus* bindet, aber nur sehr schwach bis gar nicht an Sbi. Diese Ergebnisse lassen auf die Existenz zusätzlicher Liganden für Faktor H schließen, die in weiterführenden Studien untersucht werden sollen. In der Regel besitzen Pathogene mehrere Faktor H bindende Proteine, was zeigt, dass die Akquirierung von Faktor H für die Komplementresistenz pathogener Mikroorganismen von entscheidender Bedeutung ist (Tab. 5). Zum Beispiel zeigt die Deletion des Faktor H bindenden Proteins Gpm1 von *C. albicans* eine geringe Reduktion in der Faktor H Bindung an den Erreger, was auf das Vorhandensein weiterer Faktor H Liganden auf der Oberfläche von *C. albicans* hinweist (168).

Tabelle 5: Pathogene, die mehrere Faktor H bindende Proteine exprimieren.

Pathogen	Faktor H Liganden	Referenz
<i>B. afzelii</i>	CRASP-1, CRASP-2, CRASP-3, CRASP-4, CRASP-5	107
<i>B. burgdorferi</i>	CRASP-1, CRASP-2, CRASP-3, CRASP-4, CRASP-5, OspE, p21	1, 73, 107
<i>B. hermsii</i>	FhbA, CRASP-1	78, 189
<i>L. interrogans</i>	LenA (LfhA), LenB	210, 220
<i>S. pneumoniae</i>	PspC, Hic	30, 85
<i>S. pyogenes</i>	M-Protein, Fba, Scl1	16, 77, 152

Sbi kann gleichzeitig mehrere Wirtsproteine binden, da die beiden Binderegionen für Faktor H und IgG räumlich voneinander getrennt liegen. Das Staphylokokken Protein besteht aus vier N-terminalen globulären Domänen, die über eine Prolin reiche Region mit einer Tyrosin reichen C-terminalen Domäne verbunden ist (Abb. 11). Die Faktor H Binderegion ist in der dritten und vierten globulären Domäne von Sbi (Sbi-III, Sbi-IV) lokalisiert. Sbi bindet Immunglobuline über die erste und zweite globuläre Domäne (Sbi-I, Sbi-II) (235, Jean van den Elsen persönliche Mitteilung). Die Tatsache, dass Sbi ein IgG bindendes Protein ist, macht die Durchführung von ELISA Experimenten mit Sbi-Fragmenten, die die globulären Domänen I und II enthalten, unmöglich. Hier kam eine Methode zum Einsatz, die im Rahmen dieser Doktorarbeit entwickelt wurde und bereits für die Bindungsstudien von Faktor H Proteinen an CRASPs von *B. burgdorferi* aus humanem Serum etabliert wurde und als „combined ELISA Western blot assay“ (CEWA) bezeichnet wird. CEWA ermöglicht es die gebundenen Liganden sowohl nach ihrer Reaktivität mit dem spezifischen Antikörper als auch hinsichtlich ihrer Größe zu detektieren.

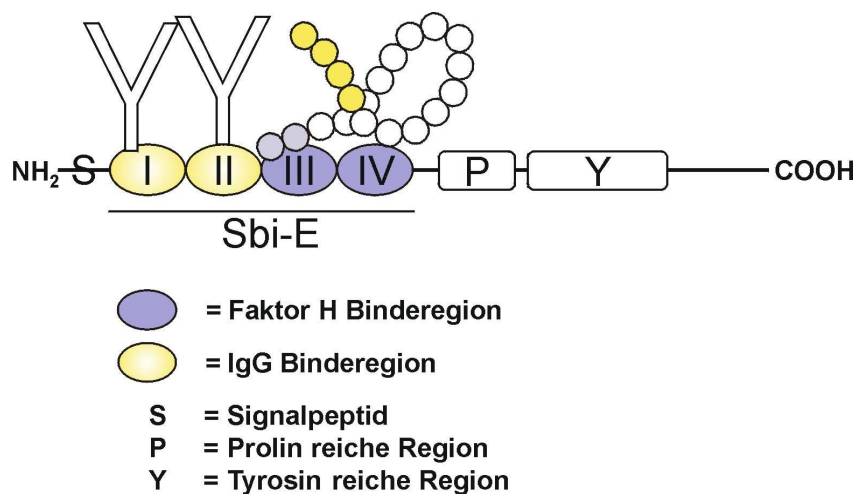


Abbildung 11: Struktur von Sbi mit den Binderegionen für Faktor H und IgG.

Innerhalb des Faktor H Proteins wurden zwei Sbi Binderegionen lokalisiert, die sich in den N-terminalen SCRs 1-7 und in den C-terminalen SCRs 19 und 20 befinden. Da innerhalb des ternären Komplexes aus Sbi, C3b und Faktor H, der Komplementregulator Faktor H funktional aktiv ist, ist die regulatorische Domäne (SCRs 1-4) frei zugänglich und nicht in die Bindung involviert. Das gleiche Interaktionsprinzip seitens des Faktor H Moleküls wurde für die Faktor H bindenden Proteine CRASP-1 und CRASP-2 von *B. burgdorferi*, Tuf von *P. aeruginosa* und Gpm1 von *C. albicans* identifiziert (103, 107, 113, 168). Diese pathogenen Oberflächenproteine interagieren ebenfalls mit Faktor H über die SCRs 5-7 und die SCRs 19-20.

Faktor H bindet an Sbi über einen neuen Mechanismus. Beide Proteine bilden in Gegenwart von C3b oder C3d einen ternären Komplex aus. Sbi ist das einzig bisher bekannte bakterielle Protein, das Faktor H zusammen mit einem weiteren Komplementprotein, den Spaltprodukten von C3, C3b oder C3d, bindet. Detaillierte Analysen des Sbi:C3b/C3d:Faktor H Komplexes zeigen, dass Sbi direkt mit den C3 Spaltprodukten interagiert und Faktor H vermutlich mit beiden Proteinen, Sbi und C3b/C3d, eine Bindung eingeht. Um den tatsächlichen Aufbau dieses ternären Komplexes aufklären zu können, bedarf es der Analyse von Kokristallen mit Sbi, C3d und dem kleineren, weniger flexiblen FHR-1 anstelle von Faktor H, da FHR-1 ebenfalls an Sbi bindet. Außerdem soll untersucht werden, ob andere C3 bindende Proteine von *S. aureus*, wie z.B. Efb, Faktor H binden und in ähnlicher Weise einen ternären Komplex bilden.

Durch die Ausbildung des ternären Komplexes wird vermehrt Faktor H zum Infektionsherd rekrutiert und schützt *S. aureus* vor der Opsonierung mit C3b. Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse der „Surface Plasmon Resonanz“ Studien gestützt, die zeigen, dass bereits die Interaktion zwischen Sbi und den C3 Molekülen sehr komplex ist. C3 und die untersuchten Derivate von C3, C3b und C3d, unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Bindungsstärke an Sbi. C3d bindet mit der höchsten Intensität an Sbi-E, die vier globulären Domänen von Sbi. C3b formt einen stabilen aber schwächeren Komplex mit Sbi-E. Die Bindung zwischen C3 und Sbi-E ist eher instabil. Diese Resultate lassen vermuten, dass in den C3 Spaltprodukten C3b und C3d Epitope für Sbi besser zugänglich sind als im intakten Molekül, welches aus sterischen Gründen die Bindung eher behindert oder eine Konformationsänderung während der Interaktion mit Sbi sich ungünstig auf den Komplex auswirkt. Zusätzlich ist die Bindung von Faktor H an den Sbi-E:C3d Komplex stärker als an den Sbi-E:C3b Komplex. Diese

unterschiedlichen Interaktionsprofile haben somit Einfluss auf die Komplementaktivierung. Im Zuge der C3 Aktivierung binden die Spaltprodukte von C3 an Sbi, rekrutieren Faktor H und erhöhen die Stabilität des ternären Komplexes. Auf diese Weise wird durch komplementaktives Faktor H vermehrt C3 inaktiviert. Infolge würde eine positive Rückkopplungsreaktion entstehen, die Faktor H verstärkt an Sbi binden lässt.

Darüber hinaus ist Sbi innerhalb des ternären Komplexes mit Faktor H ein potenter Komplementinhibitor und hemmt die Aktivierung der Komplementkaskade über den alternativen Weg. Hämolyseexperimente mit Kaninchenerythrozyten zeigen, dass die Faktor H bindenden Sbi-Fragmente die Lyse der Zellen in Gegenwart von humanem Serum inhibieren. Sbi blockiert die Hämolyse im alternativen Weg nicht aber im klassischen und Lektin-Weg. Diese spezifische Inhibition zeigt, dass Faktor H als Regulator des alternativen Weges gebunden an Sbi die Aktivität der C3-Konvertase, C3bBb, auf der Oberfläche der Erythrozyten hemmt. Verglichen mit SCIN, einem Komplementinhibitor von *S. aureus*, der Einfluss auf alle drei Komplementaktivierungswege hat, inhibiert Sbi ausschließlich den alternativen Weg (185). Sbi blockiert die Komplementaktivierung auch im Serum von Mäusen und Meerschweinchen und ist nicht wie SCIN humanspezifisch. Sbi hat keinen Einfluss auf die C5-Konvertase des klassischen Weges im Gegensatz zu Efb und Ecb (93). Demzufolge hemmt das Staphylokokkenprotein Sbi, das mit den Komplementproteinen Faktor H und C3b/C3d einen ternären Komplex eingeht, die Komplementkaskade über einen neuen bisher noch unbekanntem Mechanismus. Indem Sbi die Komplementregulatoren abhängig vom Status der Komplementaktivierung zusammen mit den C3 Derivaten C3b oder C3d bindet, inhibiert Sbi die weitere Aktivierung der Komplementkaskade über den alternativen Weg.

### **Bedeutung der Bindung von FHR-1 an Pathogene**

In der vorliegenden Arbeit wird für *B. burgdorferi* erstmalig die Bindung von FHR-1 an die Oberfläche von Pathogenen beschrieben. FHR-1 bindet ebenfalls an das untersuchte humanpathogene Bakterium *S. aureus*. Für beide Erreger wurden die FHR-1 Liganden identifiziert – CRASP-3, CRASP-4, CRASP-5 von *B. burgdorferi* und Sbi von *S. aureus*. Mittlerweile ist bekannt, dass die FHR-1 Bindung an spezifische Oberflächenproteine von

Pathogenen ein allgemein verbreiteter Mechanismus ist, der für die Krankheitserreger von immunologischer Relevanz ist (245).

Die FHR-1 Bindung an die bakteriellen Oberflächenproteine CRASP-3, CRASP-4 und CRASP-5 von *B. burgdorferi* und Tuf von *P. aeruginosa* wird über den C-Terminus des Wirtsproteins vermittelt (67, 68, 113). FHR-1 weist in den C-terminalen SCRs 3-5 eine starke Sequenzhomologie zum C-Terminus von Faktor H, den SCRs 18-20, auf (42). Über diese Region bindet Faktor H an Zellen und reguliert so die Komplementaktivierung auf Oberflächen. Für FHR-1 wurde somit gezeigt, dass sich die strukturelle Homologie zu Faktor H in ähnlichen Eigenschaften widerspiegelt und FHR-1 über die gleiche Domäne an Zellen bindet wie Faktor H.

FHR-1 konkurriert mit Faktor H um die Bindung an bakterielle Oberflächenproteine und ist in der Lage Faktor H zu verdrängen. Beide Wirtsproteine binden an CRASPs der Gruppe II von *B. burgdorferi* und konkurrieren um die Bindung. Wird Faktor H durch FHR-1 verdrängt, hat dies negative Folgen für den Erreger, da FHR-1 keine Komplement regulatorische Funktion besitzt wie Faktor H. Dabei könnte es sich um einen Schutzmechanismus des Wirtes handeln als Antwort auf die Strategie des Pathogens durch Rekrutierung von Regulatorproteinen dem Komplementangriff zu entgehen. Jedoch verfügt *B. burgdorferi* je nach Stamm über ein unterschiedlich großes Arsenal an CRASPs, die es dem Erreger ermöglichen bestimmte Kombinationen an Faktor H Proteinen zu akquirieren, z.B. Faktor H und FHL-1 an CRASPs der Gruppe I, und die Bindung von FHR-1 zu kompensieren.

Die verdrängende Eigenschaft von FHR-1 ist die erste Funktion, die für das Faktor H Protein im Zusammenhang mit Immunevasion bisher beschrieben wurde. Da Pathogene gezielt FHR-1 an ihre Oberfläche binden, hat diese Bindung auch positive Effekte für den Erreger. Somit kann die Bindung von FHR-1 vielfältige Funktionen haben. FHR-1 liegt im Plasma mit Lipoproteinpartikeln (FALPs) assoziiert vor und ist innerhalb der FALPs an Fibrinogen gebunden (158, 159). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass *S. aureus* FHR-1 an seine Oberfläche bindet. Diese FHR-1 Bindung könnte somit die Rekrutierung von weiterem Fibrinogen fördern und den Schutz vor Phagozytose erhöhen. Ähnlich wie mit dem ternären Komplex aus Sbi, C3b/C3d und Faktor H gezeigt, könnte sich in diesen Fall ebenfalls ein Multiproteinkomplex ausbilden. Dieser Fragestellung sollte in weiterführenden Studien nachgegangen werden. Des Weiteren kann FHR-1 gebunden an Komplement bindende

Oberflächenproteine anderer Erreger als Platzhalter für Faktor H fungiert. Das molekulare Verhältnis von Faktor H zu FHR-1 im Plasma beträgt ca. 3:1, d.h. Faktor H liegt im Überschuss vor. Insofern kann Faktor H dann FHR-1 von der Bindung verdrängen und seine Funktion als Komplementinhibitor auf der Erregeroberfläche ausüben.

### **Schlussfolgerung**

Pathogene Mikroorganismen exprimieren Proteine auf ihrer Oberfläche, die Regulatoren des Komplementsystems binden und tarnen sich somit vor dem Immunsystem des Wirtes. Die Bindung von Faktor H und FHL-1 an gesunde körpereigene Zellen verhindert normalerweise die Komplementaktivierung auf Nicht-Aktivatoroberflächen. Damit wird die Bildung und gleichzeitig auch die Bindung des Opsonins C3b gehemmt und die nachfolgende Bildung des MAC findet nicht statt. Krankheitserreger nutzen dieses Prinzip zu ihrem eigenen Vorteil und verhindern auf diese Weise die Opsonierung mit C3b, was einen wichtigen Virulenzmechanismus darstellt, um im menschlichen Organismus der Wirtsantwort in Form des Komplementsystems zu entgehen und zu überleben.

Vermutlich alle Pathogene, die mit dem Komplementsystem konfrontiert werden, so auch *B. burgdorferi* und *S. aureus*, akquirieren die Regulatorproteine der Flüssigphase des alternativen Wegs. Hier ist ein allgemeines Prinzip der Immunevasion erkennbar, das von zahlreichen Krankheitserregern auf gleiche Art und Weise, aber unter Verwendung unterschiedlicher Werkzeuge genutzt wird. Zum einen wird in dieser Arbeit die Interaktion zwischen Wirt und Pathogen weiter aufgeklärt und zum anderen mit Sbi ein neues bakterielles Komplement bindendes und Komplement inhibierendes Protein identifiziert. Die umfassende Aufklärung der Immunevasionsstrategien und der Interaktionsmechanismen zwischen Wirt und Pathogen sowie die Identifizierung wichtiger Targets bilden die Grundlage für die Entwicklung neuer therapeutischer Wirkstoffe und Vaccine.

## Literaturverzeichnis

1. Alitalo, A., T. Meri, T. Chen, H. Lankinen, Z. Z. Cheng, T. S. Jokiranta, I. J. Seppala, P. Lahdenne, P. S. Hefty, D. R. Akins, and S. Meri. 2004. Lysine-dependent multipoint binding of the *Borrelia burgdorferi* virulence factor outer surface protein E to the C terminus of factor H. *J Immunol* 172:6195-201.
2. Asakawa, R., H. Komatsuzawa, T. Kawai, S. Yamada, R. B. Goncalves, S. Izumi, T. Fujiwara, Y. Nakano, N. Suzuki, Y. Uchida, K. Ouhara, H. Shiba, M. A. Taubman, H. Kurihara, and M. Sugai. 2003. Outer membrane protein 100, a versatile virulence factor of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Mol Microbiol* 50:1125-39.
3. Barbour, A. G., and S. F. Hayes. 1986. Biology of *Borrelia* species. *Microbiol Rev* 50:381-400.
4. Barlow, P. N., M. Baron, D. G. Norman, A. J. Day, A. C. Willis, R. B. Sim, and I. D. Campbell. 1991. Secondary structure of a complement control protein module by two-dimensional <sup>1</sup>H NMR. *Biochemistry* 30:997-1004.
5. Barlow, P. N., D. G. Norman, A. Steinkasserer, T. J. Horne, J. Pearce, P. C. Driscoll, R. B. Sim, and I. D. Campbell. 1992. Solution structure of the fifth repeat of factor H: a second example of the complement control protein module. *Biochemistry* 31:3626-34.
6. Blackmore, T. K., V. A. Fischetti, T. A. Sadlon, H. M. Ward, and D. L. Gordon. 1998. M protein of the group A *Streptococcus* binds to the seventh short consensus repeat of human complement factor H. *Infect Immun* 66:1427-31.
7. Blackmore, T. K., J. Hellwage, T. A. Sadlon, N. Higgs, P. F. Zipfel, H. M. Ward, and D. L. Gordon. 1998. Identification of the second heparin-binding domain in human complement factor H. *J Immunol* 160:3342-8.
8. Blackmore, T. K., T. A. Sadlon, H. M. Ward, D. M. Lublin, and D. L. Gordon. 1996. Identification of a heparin binding domain in the seventh short consensus repeat of complement factor H. *J Immunol* 157:5422-7.
9. Bordet, J. B. V. 1901. Sur l'existence de substances sensibilisatrices dans la plupart des serum antimicrobiens. *Ann Inst Pasteur* 15:289.
10. Brade, V., I. Kleber, and G. Acker. 1992. Differences of two *Borrelia burgdorferi* strains in complement activation and serum resistance. *Immunobiology* 185:453-65.
11. Brooks, C. S., S. R. Vuppala, A. M. Jett, A. Alitalo, S. Meri, and D. R. Akins. 2005. Complement Regulator-Acquiring Surface Protein 1 Imparts Resistance to Human Serum in *Borrelia burgdorferi*. *J Immunol* 175:3299-308.
12. Buchner, H. 1889. Über die nähere Natur der bakterientötenden Substanz in Blutserum. *Zentralbl Bakteriol* 6:561-65.
13. Burgdorfer, W., A. G. Barbour, S. F. Hayes, J. L. Benach, E. Grunwaldt, and J. P. Davis. 1982. Lyme disease-a tick-borne spirochetosis? *Science* 216:1317-9.
14. Bykowski, T., M. E. Woodman, A. E. Cooley, C. A. Brissette, V. Brade, R. Wallich, P. Kraiczy, and B. Stevenson. 2007. Coordinated expression of *Borrelia burgdorferi* complement regulator-acquiring surface proteins during the Lyme disease spirochete's mammal-tick infection cycle. *Infect Immun* 75:4227-36.



15. Casjens, S., N. Palmer, R. van Vugt, W. M. Huang, B. Stevenson, P. Rosa, R. Lathigra, G. Sutton, J. Peterson, R. J. Dodson, D. Haft, E. Hickey, M. Gwinn, O. White, and C. M. Fraser. 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.
16. Caswell, C. C., R. Han, K. M. Hovis, P. Ciborowski, D. R. Keene, R. T. Marconi, and S. Lukomski. 2008. The Scl1 protein of M6-type group A *Streptococcus* binds the human complement regulatory protein, factor H, and inhibits the alternative pathway of complement. *Mol Microbiol* 67:584-96.
17. Chabaud, M., J. M. Durand, N. Buchs, F. Fossiez, G. Page, L. Frappart, and P. Miossec. 1999. Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 42:963-70.
18. Chaplin, H., Jr. 2005. Review: the burgeoning history of the complement system 1888-2005. *Immunohematol* 21:85-93.
19. Chavakis, T., M. Hussain, S. M. Kanse, G. Peters, R. G. Bretzel, J. I. Flock, M. Herrmann, and K. T. Preissner. 2002. *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nat Med* 8:687-93.
20. China, B., M. P. Sory, B. T. N'Guyen, M. De Bruyere, and G. R. Cornelis. 1993. Role of the YadA protein in prevention of opsonization of *Yersinia enterocolitica* by C3b molecules. *Infect Immun* 61:3129-36.
21. Chung, K. M., M. K. Liszewski, G. Nybakken, A. E. Davis, R. R. Townsend, D. H. Fremont, J. P. Atkinson, and M. S. Diamond. 2006. West Nile virus nonstructural protein NS1 inhibits complement activation by binding the regulatory protein factor H. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:19111-6.
22. Coburn, J., J. R. Fischer, and J. M. Leong. 2005. Solving a sticky problem: new genetic approaches to host cell adhesion by the Lyme disease spirochete. *Mol Microbiol* 57:1182-95.
23. Collares-Pereira, M., S. Couceiro, I. Franca, K. Kurtenbach, S. M. Schafer, L. Vitorino, L. Goncalves, S. Baptista, M. L. Vieira, and C. Cunha. 2004. First isolation of *Borrelia lusitaniae* from a human patient. *J Clin Microbiol* 42:1316-8.
24. Cooper, N. R. 1975. Enzymatic activity of the second component of complement. *Biochemistry* 14:4245-51.
25. Cordes, F. S., P. Kraiczy, P. Roversi, M. M. Simon, V. Brade, O. Jahraus, R. Wallis, L. Goodstadt, C. P. Ponting, C. Skerka, P. F. Zipfel, R. Wallich, and S. M. Lea. 2006. Structure-function mapping of BbCRASP-1, the key complement factor H and FHL-1 binding protein of *Borrelia burgdorferi*. *Int J Med Microbiol* 296 Suppl 40:177-84.
26. Cordes, F. S., P. Roversi, P. Kraiczy, M. M. Simon, V. Brade, O. Jahraus, R. Wallis, C. Skerka, P. F. Zipfel, R. Wallich, and S. M. Lea. 2005. A novel fold for the factor H-binding protein BbCRASP-1 of *Borrelia burgdorferi*. *Nat Struct Mol Biol* 12:276-7.
27. Cunnion, K. M., E. S. Buescher, and P. S. Hair. 2005. Serum complement factor I decreases *Staphylococcus aureus* phagocytosis. *J Lab Clin Med* 146:279-86.
28. Cunnion, K. M., P. S. Hair, and E. S. Buescher. 2004. Cleavage of complement C3b to iC3b on the surface of *Staphylococcus aureus* is mediated by serum complement factor I. *Infect Immun* 72:2858-63.
29. Dahl, M. R., S. Thiel, M. Matsushita, T. Fujita, A. C. Willis, T. Christensen, T. Vorup-Jensen, and J. C. Jensenius. 2001. MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway. *Immunity* 15:127-35.
30. Dave, S., A. Brooks-Walter, M. K. Pangburn, and L. S. McDaniel. 2001. PspC, a pneumococcal surface protein, binds human factor H. *Infect Immun* 69:3435-7.

31. Davies, A., D. L. Simmons, G. Hale, R. A. Harrison, H. Tighe, P. J. Lachmann, and H. Waldmann. 1989. CD59, an LY-6-like protein expressed in human lymphoid cells, regulates the action of the complement membrane attack complex on homologous cells. *J Exp Med* 170:637-54.
32. de Haas, C. J., K. E. Veldkamp, A. Peschel, F. Weerkamp, W. J. Van Wamel, E. C. Heezius, M. J. Poppelier, K. P. Van Kessel, and J. A. van Strijp. 2004. Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*, a bacterial antiinflammatory agent. *J Exp Med* 199:687-95.
33. DiScipio, R. G. 1992. Ultrastructures and interactions of complement factors H and I. *J Immunol* 149:2592-9.
34. DiScipio, R. G., P. J. Daffern, M. A. Jagels, D. H. Broide, and P. Sriramarao. 1999. A comparison of C3a and C5a-mediated stable adhesion of rolling eosinophils in postcapillary venules and transendothelial migration in vitro and in vivo. *J Immunol* 162:1127-36.
35. DiScipio, R. G., P. J. Daffern, I. U. Schraufstatter, and P. Sriramarao. 1998. Human polymorphonuclear leukocytes adhere to complement factor H through an interaction that involves alphaMbeta2 (CD11b/CD18). *J Immunol* 160:4057-66.
36. Diza, E., A. Papa, E. Vezyri, S. Tsounis, I. Milonas, and A. Antoniadis. 2004. *Borrelia valaisiana* in cerebrospinal fluid. *Emerg Infect Dis* 10:1692-3.
37. Dodds, A. W., and M. Matsushita. 2007. The phylogeny of the complement system and the origins of the classical pathway. *Immunobiology* 212:233-43.
38. Dodds, A. W., X. D. Ren, A. C. Willis, and S. K. Law. 1996. The reaction mechanism of the internal thioester in the human complement component C4. *Nature* 379:177-9.
39. Dodds, A. W., R. B. Sim, R. R. Porter, and M. A. Kerr. 1978. Activation of the first component of human complement (C1) by antibody-antigen aggregates. *Biochem J* 175:383-90.
40. Edwards, A. O., R. Ritter, 3rd, K. J. Abel, A. Manning, C. Panhuysen, and L. A. Farrer. 2005. Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science* 308:421-4.
41. Edwards, M. S., D. L. Kasper, H. J. Jennings, C. J. Baker, and A. Nicholson-Weller. 1982. Capsular sialic acid prevents activation of the alternative complement pathway by type III, group B streptococci. *J Immunol* 128:1278-83.
42. Estaller, C., V. Koistinen, W. Schwaeble, M. P. Dierich, and E. H. Weiss. 1991. Cloning of the 1.4-kb mRNA species of human complement factor H reveals a novel member of the short consensus repeat family related to the carboxy terminal of the classical 150-kDa molecule. *J Immunol* 146:3190-6.
43. Estaller, C., W. Schwaeble, M. Dierich, and E. H. Weiss. 1991. Human complement factor H: two factor H proteins are derived from alternatively spliced transcripts. *Eur J Immunol* 21:799-802.
44. Fearon, D. T. 1978. Regulation by membrane sialic acid of beta1H-dependent decay-dissociation of amplification C3 convertase of the alternative complement pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:1971-5.
45. Fearon, D. T. 1979. Regulation of the amplification C3 convertase of human complement by an inhibitory protein isolated from human erythrocyte membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:5867-71.
46. Fearon, D. T., and K. F. Austen. 1975. Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. *J Exp Med* 142:856-63.
47. Fedarko, N. S., B. Fohr, P. G. Robey, M. F. Young, and L. W. Fisher. 2000. Factor H binding to bone sialoprotein and osteopontin enables tumor cell evasion of complement-mediated attack. *J Biol Chem* 275:16666-72.
48. Fernandez, H. N., P. M. Henson, A. Otani, and T. E. Hugli. 1978. Chemotactic response to human C3a and C5a anaphylatoxins. I. Evaluation of C3a and C5a leukotaxis in vitro and under stimulated in vivo conditions. *J Immunol* 120:109-15.

49. Fingerroth, J. D., J. J. Weis, T. F. Tedder, J. L. Strominger, P. A. Biro, and D. T. Fearon. 1984. Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:4510-4.
50. Forsgren, A., and J. Sjöquist. 1966. "Protein A" from *S. aureus*. I. Pseudo-immune reaction with human gamma-globulin. *J Immunol* 97:822-7.
51. Foster, T. J. 2005. Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol* 3:948-58.
52. Fraser, C. M., S. Casjens, W. M. Huang, G. G. Sutton, R. Clayton, R. Lathigra, O. White, K. A. Ketchum, R. Dodson, E. K. Hickey, M. Gwinn, B. Dougherty, J. F. Tomb, R. D. Fleischmann, D. Richardson, J. Peterson, A. R. Kerlavage, J. Quackenbush, S. Salzberg, M. Hanson, R. van Vugt, N. Palmer, M. D. Adams, J. Gocayne, J. Weidman, T. Utterback, L. Wathley, L. McDonald, P. Artiach, C. Bowman, S. Garland, C. Fuji, M. D. Cotton, K. Horst, K. Roberts, B. Hatch, H. O. Smith, and J. C. Venter. 1997. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 390:580-6.
53. Friese, M. A., J. Hellwage, T. S. Jokiranta, S. Meri, H. H. Peter, H. Eibel, and P. F. Zipfel. 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* 36:809-18.
54. Fuchs, H., M. M. Simon, R. Wallich, M. Bechtel, and M. D. Kramer. 1996. *Borrelia burgdorferi* induces secretion of pro-urokinase-type plasminogen activator by human monocytes. *Infect Immun* 64:4307-12.
55. Fuchs, H., R. Wallich, M. M. Simon, and M. D. Kramer. 1994. The outer surface protein A of the spirochete *Borrelia burgdorferi* is a plasmin(ogen) receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12594-8.
56. Fujita, T., I. Gigli, and V. Nussenzweig. 1978. Human C4-binding protein. II. Role in proteolysis of C4b by C3b-inactivator. *J Exp Med* 148:1044-51.
57. Goldstein, S. F., K. F. Buttle, and N. W. Charon. 1996. Structural analysis of the Leptospiraceae and *Borrelia burgdorferi* by high-voltage electron microscopy. *J Bacteriol* 178:6539-45.
58. Gordon, D. L., R. M. Kaufman, T. K. Blackmore, J. Kwong, and D. M. Lublin. 1995. Identification of complement regulatory domains in human factor H. *J Immunol* 155:348-56.
59. Gross, D. M., T. Forsthuber, M. Tary-Lehmann, C. Etling, K. Ito, Z. A. Nagy, J. A. Field, A. C. Steere, and B. T. Huber. 1998. Identification of LFA-1 as a candidate autoantigen in treatment-resistant Lyme arthritis. *Science* 281:703-6.
60. Hamill, R. J., J. M. Vann, and R. A. Proctor. 1986. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by cultured bovine aortic endothelial cells: model for postadherence events in endovascular infections. *Infect Immun* 54:833-6.
61. Hammel, M., G. Sfyroera, S. Pyrpasopoulos, D. Ricklin, K. X. Ramyar, M. Pop, Z. Jin, J. D. Lambris, and B. V. Geisbrecht. 2007. Characterization of Ehp: A secreted complement inhibitory protein from *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*.
62. Hammel, M., G. Sfyroera, D. Ricklin, P. Magotti, J. D. Lambris, and B. V. Geisbrecht. 2007. A structural basis for complement inhibition by *Staphylococcus aureus*. *Nat Immunol* 8:430-7.
63. Hammerschmidt, S., V. Agarwal, A. Kunert, S. Haelbich, C. Skerka, and P. F. Zipfel. 2007. The host immune regulator factor H interacts via two contact sites with the PspC protein of *Streptococcus pneumoniae* and mediates adhesion to host epithelial cells. *J Immunol* 178:5848-58.
64. Harrison, R. A. 1983. Human C1 inhibitor: improved isolation and preliminary structural characterization. *Biochemistry* 22:5001-7.
65. Harrison, R. A., and P. J. Lachmann. 1980. The physiological breakdown of the third component of human complement. *Mol Immunol* 17:9-20.

66. Hartmann, K., C. Corvey, C. Skerka, M. Kirschfink, M. Karas, V. Brade, J. C. Miller, B. Stevenson, R. Wallich, P. F. Zipfel, and P. Kraiczy. 2006. Functional characterization of BbCRASP-2, a distinct outer membrane protein of *Borrelia burgdorferi* that binds host complement regulators factor H and FHL-1. *Mol Microbiol* 61:1220-36.
67. Haupt, K., P. Kraiczy, R. Wallich, V. Brade, C. Skerka, and P. F. Zipfel. 2007. Binding of human factor H-related protein 1 to serum-resistant *Borrelia burgdorferi* is mediated by borrelial complement regulator-acquiring surface proteins. *J Infect Dis* 196:124-33.
68. Haupt, K., P. Kraiczy, R. Wallich, V. Brade, C. Skerka, and P. F. Zipfel. 2008. FHR-1, an additional human plasma protein, binds to complement regulator-acquiring surface proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Int J Med Microbiol*, doi:10.1016/j.ijmm.2007.11.010.
69. Hawlisch, H., and J. Kohl. 2006. Complement and Toll-like receptors: Key regulators of adaptive immune responses. *Mol Immunol* 43:13-21.
70. Hellwege, J., F. Eberle, T. Babuke, H. Seeberger, H. Richter, A. Kunert, A. Hartl, P. F. Zipfel, T. S. Jokiranta, and M. Jozsi. 2006. Two factor H-related proteins from the mouse: expression analysis and functional characterization. *Immunogenetics* 58:883-93.
71. Hellwege, J., T. S. Jokiranta, V. Koistinen, O. Vaarala, S. Meri, and P. F. Zipfel. 1999. Functional properties of complement factor H-related proteins FHR-3 and FHR-4: binding to the C3d region of C3b and differential regulation by heparin. *FEBS Lett* 462:345-52.
72. Hellwege, J., S. Kühn, and P. F. Zipfel. 1997. The human complement regulatory factor-H-like protein 1, which represents a truncated form of factor H, displays cell-attachment activity. *Biochem J* 326 ( Pt 2):321-7.
73. Hellwege, J., T. Meri, T. Heikkila, A. Alitalo, J. Panelius, P. Lahdenne, I. J. Seppala, and S. Meri. 2001. The complement regulator factor H binds to the surface protein OspE of *Borrelia burgdorferi*. *J Biol Chem* 276:8427-35.
74. Higgins, J., A. Loughman, K. P. van Kessel, J. A. van Strijp, and T. J. Foster. 2006. Clumping factor A of *Staphylococcus aureus* inhibits phagocytosis by human polymorphonuclear leucocytes. *FEMS Microbiol Lett* 258:290-6.
75. Hill, S. A., S. G. Morrison, and J. Swanson. 1990. The role of direct oligonucleotide repeats in gonococcal pilin gene variation. *Mol Microbiol* 4:1341-52.
76. Hong, Y. Q., and B. Ghebrehiwet. 1992. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase and alkaline protease on serum complement and isolated components C1q and C3. *Clin Immunol Immunopathol* 62:133-8.
77. Horstmann, R. D., H. J. Sievertsen, J. Knobloch, and V. A. Fischetti. 1988. Antiphagocytic activity of streptococcal M protein: selective binding of complement control protein factor H. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:1657-61.
78. Hovis, K. M., M. E. Schriefer, S. Bahlani, and R. T. Marconi. 2006. Immunological and molecular analyses of the *Borrelia hermsii* factor H and factor H-like protein 1 binding protein, FhbA: demonstration of its utility as a diagnostic marker and epidemiological tool for tick-borne relapsing fever. *Infect Immun* 74:4519-29.
79. Huber-Lang, M., J. V. Sarma, F. S. Zetoune, D. Rittirsch, T. A. Neff, S. R. McGuire, J. D. Lambris, R. L. Warner, M. A. Flierl, L. M. Hoesel, F. Gebhard, J. G. Younger, S. M. Drouin, R. A. Wetsel, and P. A. Ward. 2006. Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat Med* 12:682-7.
80. Iida, K., and V. Nussenzweig. 1983. Functional properties of membrane-associated complement receptor CR1. *J Immunol* 130:1876-80.
81. Inal, J. M. 2005. Complement C2 receptor inhibitor trispanning: from man to schistosome. *Springer Semin Immunopathol* 27:320-31.

82. Inal, J. M., and R. B. Sim. 2000. A Schistosoma protein, Sh-TOR, is a novel inhibitor of complement which binds human C2. FEBS Lett 470:131-4.
83. Infante-Duarte, C., H. F. Horton, M. C. Byrne, and T. Kamradt. 2000. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. J Immunol 165:6107-15.
84. Isenman, D. E., and N. R. Cooper. 1981. The structure and function of the third component of human complement-I. The nature and extent of conformational changes accompanying C3 activation. Mol Immunol 18:331-9.
85. Janulczyk, R., F. Iannelli, A. G. Sjöholm, G. Pozzi, and L. Björck. 2000. Hic, a novel surface protein of *Streptococcus pneumoniae* that interferes with complement function. J Biol Chem 275:37257-63.
86. Jarva, H., J. Hellwage, T. S. Jokiranta, M. J. Lehtinen, P. F. Zipfel, and S. Meri. 2004. The group B streptococcal beta and pneumococcal Hic proteins are structurally related immune evasion molecules that bind the complement inhibitor factor H in an analogous fashion. J Immunol 172:3111-8.
87. Jarva, H., R. Janulczyk, J. Hellwage, P. F. Zipfel, L. Björck, and S. Meri. 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 168:1886-94.
88. Jarva, H., T. S. Jokiranta, J. Hellwage, P. F. Zipfel, and S. Meri. 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 163:3957-62.
89. Joiner, K., E. Brown, C. Hammer, K. Warren, and M. Frank. 1983. Studies on the mechanism of bacterial resistance to complement-mediated killing. III. C5b-9 deposits stably on rough and type 7 *S. pneumoniae* without causing bacterial killing. J Immunol 130:845-9.
90. Jokiranta, T. S., Z. Z. Cheng, H. Seeberger, M. Jozsi, S. Heinen, M. Noris, G. Remuzzi, R. Ormsby, D. L. Gordon, S. Meri, J. Hellwage, and P. F. Zipfel. 2005. Binding of complement factor H to endothelial cells is mediated by the carboxy-terminal glycosaminoglycan binding site. Am J Pathol 167:1173-81.
91. Jokiranta, T. S., J. Hellwage, V. Koistinen, P. F. Zipfel, and S. Meri. 2000. Each of the three binding sites on complement factor H interacts with a distinct site on C3b. J Biol Chem 275:27657-62.
92. Jokiranta, T. S., A. Solomon, M. K. Pangburn, P. F. Zipfel, and S. Meri. 1999. Nephritogenic lambda light chain dimer: a unique human miniautoantibody against complement factor H. J Immunol 163:4590-6.
93. Jongerius, I., J. Kohl, M. K. Pandey, M. Ruyken, K. P. van Kessel, J. A. van Strijp, and S. H. Rooijackers. 2007. Staphylococcal complement evasion by various convertase-blocking molecules. J Exp Med 204:2461-71.
94. Jozsi, M., C. Licht, S. Strobel, S. L. Zipfel, H. Richter, S. Heinen, P. F. Zipfel, and C. Skerka. 2008. Factor H autoantibodies in atypical hemolytic uremic syndrome correlate with CFHR1/CFHR3 deficiency. Blood 111:1512-4.
95. Jozsi, M., H. Richter, I. Loschmann, C. Skerka, F. Buck, U. Beisiegel, A. Erdei, and P. F. Zipfel. 2005. FHR-4A: a new factor H-related protein is encoded by the human FHR-4 gene. Eur J Hum Genet 13:321-9.
96. Kalish, R. A., J. M. Leong, and A. C. Steere. 1993. Association of treatment-resistant chronic Lyme arthritis with HLA-DR4 and antibody reactivity to OspA and OspB of *Borrelia burgdorferi*. Infect Immun 61:2774-9.
97. Kamradt, T. 2002. Lyme disease and current aspects of immunization. Arthritis Res 4:20-9.
98. Kamradt, T., B. Lengl-Janssen, A. F. Strauss, G. Bansal, and A. C. Steere. 1996. Dominant recognition of a *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A peptide by T helper cells in patients with treatment-resistant Lyme arthritis. Infect Immun 64:1284-9.

99. Kinoshita, T., Y. Takata, H. Kozono, J. Takeda, K. S. Hong, and K. Inoue. 1988. C5 convertase of the alternative complement pathway: covalent linkage between two C3b molecules within the trimolecular complex enzyme. *J Immunol* 141:3895-901.
100. Klein, R. J., C. Zeiss, E. Y. Chew, J. Y. Tsai, R. S. Sackler, C. Haynes, A. K. Henning, J. P. SanGiovanni, S. M. Mane, S. T. Mayne, M. B. Bracken, F. L. Ferris, J. Ott, C. Barnstable, and J. Hoh. 2005. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science* 308:385-9.
101. Kochi, S. K., and R. C. Johnson. 1988. Role of immunoglobulin G in killing of *Borrelia burgdorferi* by the classical complement pathway. *Infect Immun* 56:314-21.
102. Kotarsky, H., J. Hellwage, E. Johnsson, C. Skerka, H. G. Svensson, G. Lindahl, U. Sjobring, and P. F. Zipfel. 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* 160:3349-54.
103. Kraiczy, P., J. Hellwage, C. Skerka, H. Becker, M. Kirschfink, M. M. Simon, V. Brade, P. F. Zipfel, and R. Wallich. 2004. 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* 279:2421-9.
104. Kraiczy, P., J. Hellwage, C. Skerka, M. Kirschfink, V. Brade, P. F. Zipfel, and R. Wallich. 2003. Immune evasion of *Borrelia burgdorferi*: mapping of a complement-inhibitor factor H-binding site of BbCRASP-3, a novel member of the Erp protein family. *Eur J Immunol* 33:697-707.
105. Kraiczy, P., K. P. Hunfeld, S. Breitner-Ruddock, R. Würzner, G. Acker, and V. Brade. 2000. Comparison of two laboratory methods for the determination of serum resistance in *Borrelia burgdorferi* isolates. *Immunobiology* 201:406-19.
106. Kraiczy, P., Schreiber, J., Skerka, C., Haupt, K., Brade, V., Wallich, R., Zipfel, P.F. . 2008. Assessment of the regions within complement regulator-acquiring protein (CRASP)-2 of *Borrelia burgdorferi* required for interaction with host immune regulators FHL-1 and factor H. *Int J Med Microbiol* doi:10.1016/j.ijmm.2007.12.008.
107. Kraiczy, P., C. Skerka, V. Brade, and P. F. Zipfel. 2001. Further characterization of complement regulator-acquiring surface proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 69:7800-9.
108. Kraiczy, P., C. Skerka, M. Kirschfink, V. Brade, and P. F. Zipfel. 2001. Immune evasion of *Borrelia burgdorferi* by acquisition of human complement regulators FHL-1/reconnectin and Factor H. *Eur J Immunol* 31:1674-84.
109. Kraiczy, P., C. Skerka, M. Kirschfink, P. F. Zipfel, and V. Brade. 2001. Mechanism of complement resistance of pathogenic *Borrelia burgdorferi* isolates. *Int Immunopharmacol* 1:393-401.
110. Kresken, M., Hafner, D., Schmitz, F.J., Wichelhaus, T.A. 2004. PEG-Resistenzstudie 2004. [http://www.p-e-g.org/ag\\_resistenz/main.htm](http://www.p-e-g.org/ag_resistenz/main.htm).
111. Kühn, S., C. Skerka, and P. F. Zipfel. 1995. Mapping of the complement regulatory domains in the human factor H-like protein 1 and in factor H1. *J Immunol* 155:5663-70.
112. Kühn, S., and P. F. Zipfel. 1996. Mapping of the domains required for decay acceleration activity of the human factor H-like protein 1 and factor H. *Eur J Immunol* 26:2383-7.
113. Kunert, A., J. Losse, C. Gruszin, M. Huhn, K. Kaendler, S. Mikkat, D. Volke, R. Hoffmann, T. S. Jokiranta, H. Seeberger, U. Moellmann, J. Hellwage, and P. F. Zipfel. 2007. Immune evasion of the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*: elongation factor Tuf is a factor H and plasminogen binding protein. *J Immunol* 179:2979-88.
114. Kurtenbach, K., H. S. Sewell, N. H. Ogden, S. E. Randolph, and P. A. Nuttall. 1998. Serum complement sensitivity as a key factor in Lyme disease ecology. *Infect Immun* 66:1248-51.
115. Lambris, J. D., D. Ricklin, and B. V. Geisbrecht. 2008. Complement evasion by human pathogens. *Nat Rev Microbiol* 6:132-42.

116. Langley, R., B. Wines, N. Willoughby, I. Basu, T. Proft, and J. D. Fraser. 2005. The staphylococcal superantigen-like protein 7 binds IgA and complement C5 and inhibits IgA-Fc alpha RI binding and serum killing of bacteria. *J Immunol* 174:2926-33.
117. Law, S. K., and R. P. Levine. 1977. Interaction between the third complement protein and cell surface macromolecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:2701-5.
118. Le, Y., S. H. Lee, O. L. Kon, and J. Lu. 1998. Human L-ficolin: plasma levels, sugar specificity, and assignment of its lectin activity to the fibrinogen-like (FBG) domain. *FEBS Lett* 425:367-70.
119. Lee, L. Y., M. Hook, D. Haviland, R. A. Wetsel, E. O. Yonter, P. Syribeys, J. Vernachio, and E. L. Brown. 2004. Inhibition of complement activation by a secreted *Staphylococcus aureus* protein. *J Infect Dis* 190:571-9.
120. Lee, L. Y., X. Liang, M. Hook, and E. L. Brown. 2004. Identification and characterization of the C3 binding domain of the *Staphylococcus aureus* extracellular fibrinogen-binding protein (Efb). *J Biol Chem* 279:50710-6.
121. Lengl-Janssen, B., A. F. Strauss, A. C. Steere, and T. Kamradt. 1994. The T helper cell response in Lyme arthritis: differential recognition of *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A in patients with treatment-resistant or treatment-responsive Lyme arthritis. *J Exp Med* 180:2069-78.
122. Liang, F. T., M. B. Jacobs, L. C. Bowers, and M. T. Philipp. 2002. An immune evasion mechanism for spirochetal persistence in Lyme borreliosis. *J Exp Med* 195:415-22.
123. Loos, M., A. B. Laurell, A. G. Sjöholm, U. Martensson, and A. I. Berkel. 1980. Immunochemical and functional analysis of a complete C1q deficiency in man: evidence that C1r and C1s are in the native form, and that they reassociate with purified C1q to form macromolecular C1. *J Immunol* 124:59-63.
124. Lowy, F. D. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 339:520-32.
125. Madico, G., J. Ngampasutadol, S. Gulati, U. Vogel, P. A. Rice, and S. Ram. 2007. Factor H binding and function in sialylated pathogenic Neisseriae is influenced by gonococcal, but not meningococcal, porin. *J Immunol* 178:4489-97.
126. Majno, S. 2003. Funktionelle Charakterisierung des Faktor H-verwandten Proteins (FHR-1) im Komplementsystem. Doctoral Thesis. Friedrich-Schiller-University, Jena.
127. Malhotra, R., J. Lu, U. Holmskov, and R. B. Sim. 1994. Collectins, collectin receptors and the lectin pathway of complement activation. *Clin Exp Immunol* 97 Suppl 2:4-9.
128. Malhotra, R., M. Ward, R. B. Sim, and M. I. Bird. 1999. Identification of human complement Factor H as a ligand for L-selectin. *Biochem J* 341 ( Pt 1):61-9.
129. Manuelian, T., J. Hellwage, S. Meri, J. Caprioli, M. Noris, S. Heinen, M. Jozsi, H. P. Neumann, G. Remuzzi, and P. F. Zipfel. 2003. Mutations in factor H reduce binding affinity to C3b and heparin and surface attachment to endothelial cells in hemolytic uremic syndrome. *J Clin Invest* 111:1181-90.
130. Matsumoto, M., K. Nagaki, H. Kitamura, S. Kuramitsu, S. Nagasawa, and T. Seya. 1989. Probing the C4-binding site on C1s with monoclonal antibodies. Evidence for a C4/C4b-binding site on the gamma-domain. *J Immunol* 142:2743-50.
131. Matsushita, M., Y. Endo, and T. Fujita. 2000. Cutting edge: complement-activating complex of ficolin and mannose-binding lectin-associated serine protease. *J Immunol* 164:2281-4.
132. Matsushita, M., and T. Fujita. 1992. Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. *J Exp Med* 176:1497-502.
133. Matsushita, M., S. Thiel, J. C. Jensenius, I. Terai, and T. Fujita. 2000. Proteolytic activities of two types of mannose-binding lectin-associated serine protease. *J Immunol* 165:2637-42.

134. McDowell, J. V., J. Frederick, L. Stamm, and R. T. Marconi. 2007. Identification of the gene encoding the FhbB protein of *Treponema denticola*, a highly unique factor H-like protein 1 binding protein. *Infect Immun* 75:1050-4.
135. McKenzie, R., G. J. Kotwal, B. Moss, C. H. Hammer, and M. M. Frank. 1992. Regulation of complement activity by vaccinia virus complement-control protein. *J Infect Dis* 166:1245-50.
136. McRae, J. L., P. J. Cowan, D. A. Power, K. I. Mitchelhill, B. E. Kemp, B. P. Morgan, and B. F. Murphy. 2001. Human factor H-related protein 5 (FHR-5). A new complement-associated protein. *J Biol Chem* 276:6747-54.
137. McRae, J. L., T. G. Duthy, K. M. Griggs, R. J. Ormsby, P. J. Cowan, B. A. Cromer, W. J. McKinstry, M. W. Parker, B. F. Murphy, and D. L. Gordon. 2005. Human factor H-related protein 5 has cofactor activity, inhibits C3 convertase activity, binds heparin and C-reactive protein, and associates with lipoprotein. *J Immunol* 174:6250-6.
138. Medicus, R. G., O. Gotze, and H. J. Müller-Eberhard. 1976. Alternative pathway of complement: recruitment of precursor properdin by the labile C3/C5 convertase and the potentiation of the pathway. *J Exp Med* 144:1076-93.
139. Medof, M. E., T. Kinoshita, and V. Nussenzweig. 1984. Inhibition of complement activation on the surface of cells after incorporation of decay-accelerating factor (DAF) into their membranes. *J Exp Med* 160:1558-78.
140. Meri, S., and M. K. Pangburn. 1990. Discrimination between activators and nonactivators of the alternative pathway of complement: regulation via a sialic acid/polyanion binding site on factor H. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:3982-6.
141. Miller, J. C., K. von Lackum, K. Babb, J. D. McAlister, and B. Stevenson. 2003. Temporal analysis of *Borrelia burgdorferi* Erp protein expression throughout the mammal-tick infectious cycle. *Infect Immun* 71:6943-52.
142. Misasi, R., H. P. Huemer, W. Schwaeble, E. Solder, C. Larcher, and M. P. Dierich. 1989. Human complement factor H: an additional gene product of 43 kDa isolated from human plasma shows cofactor activity for the cleavage of the third component of complement. *Eur J Immunol* 19:1765-8.
143. Müller-Eberhard, H. J. 1988. Molecular organization and function of the complement system. *Annu Rev Biochem* 57:321-47.
144. Müller-Eberhard, H. J., and O. Gotze. 1972. C3 proactivator convertase and its mode of action. *J Exp Med* 135:1003-8.
145. Müller-Eberhard, H. J., M. J. Polley, and M. A. Calcott. 1967. Formation and functional significance of a molecular complex derived from the second and the fourth component of human complement. *J Exp Med* 125:359-80.
146. Murphy, B. F., J. R. Saunders, M. K. O'Bryan, L. Kirszbaum, I. D. Walker, and A. J. d'Apice. 1989. SP-40,40 is an inhibitor of C5b-6-initiated haemolysis. *Int Immunol* 1:551-4.
147. Nagasawa, S., and R. M. Stroud. 1977. Cleavage of C2 by C1s into the antigenically distinct fragments C2a and C2b: demonstration of binding of C2b to C4b. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:2998-3001.
148. Nicholson-Weller, A., J. P. March, S. I. Rosenfeld, and K. F. Austen. 1983. Affected erythrocytes of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria are deficient in the complement regulatory protein, decay accelerating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:5066-70.
149. Nilsson, U. R., and H. J. Mueller-Eberhard. 1965. Isolation of Beta If-Globulin from Human Serum and Its Characterization as the Fifth Component of Complement. *J Exp Med* 122:277-98.
150. Nocton, J. J., F. Dressler, B. J. Rutledge, P. N. Rys, D. H. Persing, and A. C. Steere. 1994. Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by polymerase chain reaction in synovial fluid from patients with Lyme arthritis. *N Engl J Med* 330:229-34.



151. Ohta, M., M. Okada, I. Yamashina, and T. Kawasaki. 1990. The mechanism of carbohydrate-mediated complement activation by the serum mannan-binding protein. *J Biol Chem* 265:1980-4.
152. Pandiripally, V., E. Gregory, and D. Cue. 2002. Acquisition of regulators of complement activation by *Streptococcus pyogenes* serotype M1. *Infect Immun* 70:6206-14.
153. Pandiripally, V., L. Wei, C. Skerka, P. F. Zipfel, and D. Cue. 2003. Recruitment of complement factor H-like protein 1 promotes intracellular invasion by group A streptococci. *Infect Immun* 71:7119-28.
154. Pangburn, M. K., M. A. Atkinson, and S. Meri. 1991. Localization of the heparin-binding site on complement factor H. *J Biol Chem* 266:16847-53.
155. Pangburn, M. K., and H. J. Müller-Eberhard. 1984. The alternative pathway of complement. *Springer Semin Immunopathol* 7:163-92.
156. Pangburn, M. K., R. D. Schreiber, and H. J. Müller-Eberhard. 1981. Formation of the initial C3 convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3. *J Exp Med* 154:856-67.
157. Pangburn, M. K., R. D. Schreiber, and H. J. Müller-Eberhard. 1977. Human complement C3b inactivator: isolation, characterization, and demonstration of an absolute requirement for the serum protein beta1H for cleavage of C3b and C4b in solution. *J Exp Med* 146:257-70.
158. Park, C. T., and S. D. Wright. 2000. Fibrinogen is a component of a novel lipoprotein particle: factor H-related protein (FHRP)-associated lipoprotein particle (FALP). *Blood* 95:198-204.
159. Park, C. T., and S. D. Wright. 1996. Plasma lipopolysaccharide-binding protein is found associated with a particle containing apolipoprotein A-I, phospholipid, and factor H-related proteins. *J Biol Chem* 271:18054-60.
160. Park, J. M., F. R. Greten, Z. W. Li, and M. Karin. 2002. Macrophage apoptosis by anthrax lethal factor through p38 MAP kinase inhibition. *Science* 297:2048-51.
161. Patarakul, K., M. F. Cole, and C. A. Hughes. 1999. Complement resistance in *Borrelia burgdorferi* strain 297: outer membrane proteins prevent MAC formation at lysis susceptible sites. *Microb Pathog* 27:25-41.
162. Pausa, M., V. Pellis, M. Cinco, P. G. Giulianini, G. Presani, S. Perticarari, R. Murgia, and F. Tedesco. 2003. Serum-resistant strains of *Borrelia burgdorferi* evade complement-mediated killing by expressing a CD59-like complement inhibitory molecule. *J Immunol* 170:3214-22.
163. Peacock, S. J., I. de Silva, and F. D. Lowy. 2001. What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*? *Trends Microbiol* 9:605-10.
164. Peng, H. L., R. P. Novick, B. Kreiswirth, J. Kornblum, and P. Schlievert. 1988. Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 170:4365-72.
165. Pickering, M. C., H. T. Cook, J. Warren, A. E. Bygrave, J. Moss, M. J. Walport, and M. Botto. 2002. Uncontrolled C3 activation causes membranoproliferative glomerulonephritis in mice deficient in complement factor H. *Nat Genet* 31:424-8.
166. Pillemer, L., L. Blum, I. H. Lepow, O. A. Ross, E. W. Todd, and A. C. Wardlaw. 1954. The properdin system and immunity. I. Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena. *Science* 120:279-85.
167. Podack, E. R., and H. J. Müller-Eberhard. 1979. Isolation of human S-protein, an inhibitor of the membrane attack complex of complement. *J Biol Chem* 254:9808-14.
168. Poltermann, S., A. Kunert, M. von der Heide, R. Eck, A. Hartmann, and P. F. Zipfel. 2007. Gpm1p is a factor H, FHL-1 and plasminogen-binding surface protein of *Candida albicans*. *J Biol Chem*.

169. Postma, B., M. J. Poppelier, J. C. van Galen, E. R. Prossnitz, J. A. van Strijp, C. J. de Haas, and K. P. van Kessel. 2004. Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* binds specifically to the C5a and formylated peptide receptor. *J Immunol* 172:6994-7001.
170. Preissner, K. T., E. R. Podack, and H. J. Muller-Eberhard. 1985. The membrane attack complex of complement: relation of C7 to the metastable membrane binding site of the intermediate complex C5b-7. *J Immunol* 135:445-51.
171. Pressner, K. T., E. R. Podack, and H. J. Muller-Eberhard. 1985. Self-association of the seventh component of human complement (C7): dimerization and polymerization. *J Immunol* 135:452-8.
172. Priem, S., G. R. Burmester, T. Kamradt, K. Wolbart, M. G. Rittig, and A. Krause. 1998. Detection of *Borrelia burgdorferi* by polymerase chain reaction in synovial membrane, but not in synovial fluid from patients with persisting Lyme arthritis after antibiotic therapy. *Ann Rheum Dis* 57:118-21.
173. Proctor, R. A., P. van Langevelde, M. Kristjansson, J. N. Maslow, and R. D. Arbeit. 1995. Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 20:95-102.
174. Ram, S., D. P. McQuillen, S. Gulati, C. Elkins, M. K. Pangburn, and P. A. Rice. 1998. 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* 188:671-80.
175. Ram, S., A. K. Sharma, S. D. Simpson, S. Gulati, D. P. McQuillen, M. K. Pangburn, and P. A. Rice. 1998. A novel sialic acid binding site on factor H mediates serum resistance of sialylated *Neisseria gonorrhoeae*. *J Exp Med* 187:743-52.
176. Reid, K. B., and A. J. Day. 1989. Structure-function relationships of the complement components. *Immunol Today* 10:177-80.
177. Ren, G., M. Doshi, B. K. Hack, J. J. Alexander, and R. J. Quigg. 2002. Isolation and characterization of a novel rat factor H-related protein that is up-regulated in glomeruli under complement attack. *J Biol Chem* 277:48351-8.
178. Richter, D., D. B. Schlee, R. Allgower, and F. R. Matuschka. 2004. Relationships of a novel Lyme disease spirochete, *Borrelia spielmani* sp. nov., with its hosts in Central Europe. *Appl Environ Microbiol* 70:6414-9.
179. Rijpkema, S. G., D. J. Tazelaar, M. J. Molkenboer, G. T. Noordhoek, G. Plantinga, L. M. Schouls, and J. F. Schellekens. 1997. Detection of *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* and group VS116 by PCR in skin biopsies of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans. *Clin Microbiol Infect* 3:109-116.
180. Rimoldi, M. T., A. J. Tenner, D. A. Bobak, and K. A. Joiner. 1989. Complement component C1q enhances invasion of human mononuclear phagocytes and fibroblasts by *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *J Clin Invest* 84:1982-9.
181. Ripoché, J., A. J. Day, T. J. Harris, and R. B. Sim. 1988. The complete amino acid sequence of human complement factor H. *Biochem J* 249:593-602.
182. RKI. 2007. Lyme-Borreliose: Zur Situation in den östlichen Bundesländern - Analyse der Meldedaten aus dem 5-Jahreszeitraum 2002-2006. *Epidemiologisches Bulletin* 38:351-8.
183. Rodriguez de Cordoba, S., M. A. Diaz-Guillen, and D. Heine-Suner. 1999. An integrated map of the human regulator of complement activation (RCA) gene cluster on 1q32. *Mol Immunol* 36:803-8.
184. Rollins, S. A., and P. J. Sims. 1990. The complement-inhibitory activity of CD59 resides in its capacity to block incorporation of C9 into membrane C5b-9. *J Immunol* 144:3478-83.
185. Rooijackers, S. H., M. Ruyken, A. Roos, M. R. Daha, J. S. Presanis, R. B. Sim, W. J. van Wamel, K. P. van Kessel, and J. A. van Strijp. 2005. Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases. *Nat Immunol* 6:920-7.

186. Rooijackers, S. H., K. P. van Kessel, and J. A. van Strijp. 2005. Staphylococcal innate immune evasion. *Trends Microbiol* 13:596-601.
187. Rooijackers, S. H., W. J. van Wamel, M. Ruyken, K. P. van Kessel, and J. A. van Strijp. 2005. Anti-opsionic properties of staphylokinase. *Microbes Infect* 7:476-84.
188. Rossi, V., S. Cseh, I. Bally, N. M. Thielens, J. C. Jensenius, and G. J. Arlaud. 2001. Substrate specificities of recombinant mannan-binding lectin-associated serine proteases-1 and -2. *J Biol Chem* 276:40880-7.
189. Rossmann, E., P. Kraiczy, P. Herzberger, C. Skerka, M. Kirschfink, M. M. Simon, P. F. Zipfel, and R. Wallich. 2007. Dual binding specificity of a *Borrelia hermsii*-associated complement regulator-acquiring surface protein for factor H and plasminogen discloses a putative virulence factor of relapsing fever spirochetes. *J Immunol* 178:7292-301.
190. Ruddy, S., and K. F. Austen. 1969. C3 inactivator of man. I. Hemolytic measurement by the inactivation of cell-bound C3. *J Immunol* 102:533-43.
191. Schlaf, G., T. Demberg, N. Beisel, H. L. Schieferdecker, and O. Gotze. 2001. Expression and regulation of complement factors H and I in rat and human cells: some critical notes. *Mol Immunol* 38:231-9.
192. Schmidtchen, A., E. Holst, H. Tapper, and L. Bjorck. 2003. Elastase-producing *Pseudomonas aeruginosa* degrade plasma proteins and extracellular products of human skin and fibroblasts, and inhibit fibroblast growth. *Microb Pathog* 34:47-55.
193. Seya, T., and J. P. Atkinson. 1989. Functional properties of membrane cofactor protein of complement. *Biochem J* 264:581-8.
194. Sharma, A. K., and M. K. Pangburn. 1996. Identification of three physically and functionally distinct binding sites for C3b in human complement factor H by deletion mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10996-1001.
195. Shuter, J., V. B. Hatcher, and F. D. Lowy. 1996. *Staphylococcus aureus* binding to human nasal mucin. *Infect Immun* 64:310-8.
196. Sim, R. B., G. J. Arlaud, and M. G. Colomb. 1979. C1 inhibitor-dependent dissociation of human complement component C1 bound to immune complexes. *Biochem J* 179:449-57.
197. Sim, R. B., T. M. Twose, D. S. Paterson, and E. Sim. 1981. The covalent-binding reaction of complement component C3. *Biochem J* 193:115-27.
198. Sing, A., D. Rost, N. Tvardovskaia, A. Roggenkamp, A. Wiedemann, C. J. Kirschning, M. Aepfelbacher, and J. Heesemann. 2002. Yersinia V-antigen exploits toll-like receptor 2 and CD14 for interleukin 10-mediated immunosuppression. *J Exp Med* 196:1017-24.
199. Skerka, C., J. Hellwege, W. Weber, A. Tilkorn, F. Buck, T. Marti, E. Kampen, U. Beisiegel, and P. F. Zipfel. 1997. The human factor H-related protein 4 (FHR-4). A novel short consensus repeat-containing protein is associated with human triglyceride-rich lipoproteins. *J Biol Chem* 272:5627-34.
200. Skerka, C., R. D. Horstmann, and P. F. Zipfel. 1991. Molecular cloning of a human serum protein structurally related to complement factor H. *J Biol Chem* 266:12015-20.
201. Skerka, C., N. Lauer, A. A. Weinberger, C. N. Keilhauer, J. Suhnel, R. Smith, U. Schlotzer-Schrehardt, L. Fritsche, S. Heinen, A. Hartmann, B. H. Weber, and P. F. Zipfel. 2007. Defective complement control of factor H (Y402H) and FHL-1 in age-related macular degeneration. *Mol Immunol* 44:3398-406.
202. Smith, R. P., R. T. Schoen, D. W. Rahn, V. K. Sikand, J. Nowakowski, D. L. Parenti, M. S. Holman, D. H. Persing, and A. C. Steere. 2002. Clinical characteristics and treatment outcome of early Lyme disease in patients with microbiologically confirmed erythema migrans. *Ann Intern Med* 136:421-8.

203. Steere, A. C. 1994. Lyme disease: a growing threat to urban populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:2378-83.
204. Steere, A. C., J. Coburn, and L. Glickstein. 2004. The emergence of Lyme disease. *J Clin Invest* 113:1093-101.
205. Steere, A. C., E. Dwyer, and R. Winchester. 1990. Association of chronic Lyme arthritis with HLA-DR4 and HLA-DR2 alleles. *N Engl J Med* 323:219-23.
206. Steere, A. C., B. Falk, E. E. Drouin, L. A. Baxter-Lowe, J. Hammer, and G. T. Nepom. 2003. Binding of outer surface protein A and human lymphocyte function-associated antigen 1 peptides to HLA-DR molecules associated with antibiotic treatment-resistant Lyme arthritis. *Arthritis Rheum* 48:534-40.
207. Steere, A. C., R. E. Levin, P. J. Molloy, R. A. Kalish, J. H. Abraham, 3rd, N. Y. Liu, and C. H. Schmid. 1994. Treatment of Lyme arthritis. *Arthritis Rheum* 37:878-88.
208. Steere, A. C., S. E. Malawista, D. R. Snyderman, R. E. Shope, W. A. Andiman, M. R. Ross, and F. M. Steele. 1977. Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three connecticut communities. *Arthritis Rheum* 20:7-17.
209. Steere, A. C., and V. K. Sikand. 2003. The presenting manifestations of Lyme disease and the outcomes of treatment. *N Engl J Med* 348:2472-4.
210. Stevenson, B., H. A. Choy, M. Pinne, M. L. Rotondi, M. C. Miller, E. Demoll, P. Kraiczy, A. E. Cooley, T. P. Creamer, M. A. Suchard, C. A. Brissette, A. Verma, and D. A. Haake. 2007. *Leptospira interrogans* Endostatin-Like Outer Membrane Proteins Bind Host Fibronectin, Laminin and Regulators of Complement. *PLoS ONE* 2:e1188.
211. Stoiber, H., R. Schneider, J. Janatova, and M. P. Dierich. 1995. Human complement proteins C3b, C4b, factor H and properdin react with specific sites in gp120 and gp41, the envelope proteins of HIV-1. *Immunobiology* 193:98-113.
212. Strle, F., R. N. Picken, Y. Cheng, J. Cimperman, V. Maraspin, S. Lotric-Furlan, E. Ruzic-Sabljić, and M. M. Picken. 1997. Clinical findings for patients with Lyme borreliosis caused by *Borrelia burgdorferi sensu lato* with genotypic and phenotypic similarities to strain 25015. *Clin Infect Dis* 25:273-80.
213. Sugita, Y., and Y. Masuho. 1995. CD59: its role in complement regulation and potential for therapeutic use. *Immunotechnology* 1:157-68.
214. Sugita, Y., Y. Nakano, and M. Tomita. 1988. Isolation from human erythrocytes of a new membrane protein which inhibits the formation of complement transmembrane channels. *J Biochem* 104:633-7.
215. Takahashi, M., Y. Endo, T. Fujita, and M. Matsushita. 1999. A truncated form of mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)-2 expressed by alternative polyadenylation is a component of the lectin complement pathway. *Int Immunol* 11:859-63.
216. Takahashi, M., S. Mori, S. Shigeta, and T. Fujita. 2007. Role of MBL-associated serine protease (MASP) on activation of the lectin complement pathway. *Adv Exp Med Biol* 598:93-104.
217. Takata, Y., T. Kinoshita, H. Kozono, J. Takeda, E. Tanaka, K. Hong, and K. Inoue. 1987. Covalent association of C3b with C4b within C5 convertase of the classical complement pathway. *J Exp Med* 165:1494-507.
218. Thiel, S., T. Vorup-Jensen, C. M. Stover, W. Schwaeble, S. B. Laursen, K. Poulsen, A. C. Willis, P. Eggleton, S. Hansen, U. Holmskov, K. B. Reid, and J. C. Jensenius. 1997. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature* 386:506-10.
219. Timmann, C., M. Leippe, and R. D. Horstmann. 1991. Two major serum components antigenically related to complement factor H are different glycosylation forms of a single protein with no factor H-like complement regulatory functions. *J Immunol* 146:1265-70.

220. Verma, A., J. Hellwage, S. Artiushin, P. F. Zipfel, P. Kraiczy, J. F. Timoney, and B. Stevenson. 2006. LfhA, a novel factor H-binding protein of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun* 74:2659-66.
221. Vesga, O., M. C. Groeschel, M. F. Otten, D. W. Brar, J. M. Vann, and R. A. Proctor. 1996. *Staphylococcus aureus* small colony variants are induced by the endothelial cell intracellular milieu. *J Infect Dis* 173:739-42.
222. Viboud, G. I., and J. B. Bliska. 2005. Yersinia outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* 59:69-89.
223. Vogt, W. 1986. Anaphylatoxins: possible roles in disease. *Complement* 3:177-88.
224. Vogt, W., G. Schmidt, B. Von Buttlar, and L. Dieminger. 1978. A new function of the activated third component of complement: binding to C5, an essential step for C5 activation. *Immunology* 34:29-40.
225. Wallich, R., J. Pattathu, V. Kitiratschky, C. Brenner, P. F. Zipfel, V. Brade, M. M. Simon, and P. Kraiczy. 2005. Identification and functional characterization of complement regulator-acquiring surface protein 1 of the Lyme disease spirochetes *Borrelia afzelii* and *Borrelia garinii*. *Infect Immun* 73:2351-9.
226. Walport, M. J. 2001. Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 344:1058-66.
227. Weiler, J. M., M. R. Daha, K. F. Austen, and D. T. Fearon. 1976. Control of the amplification convertase of complement by the plasma protein beta1H. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:3268-72.
228. Weineisen, M., U. Sjobring, M. Fallman, and T. Andersson. 2004. Streptococcal M5 protein prevents neutrophil phagocytosis by interfering with CD11b/CD18 receptor-mediated association and signaling. *J Immunol* 172:3798-807.
229. Whaley, K., and S. Ruddy. 1976. Modulation of C3b hemolytic activity by a plasma protein distinct from C3b inactivator. *Science* 193:1011-3.
230. Whaley, K., and S. Ruddy. 1976. Modulation of the alternative complement pathways by beta 1 H globulin. *J Exp Med* 144:1147-63.
231. Zarepari, S., K. E. Branham, M. Li, S. Shah, R. J. Klein, J. Ott, J. Hoh, G. R. Abecasis, and A. Swaroop. 2005. Strong association of the Y402H variant in complement factor H at 1q32 with susceptibility to age-related macular degeneration. *Am J Hum Genet* 77:149-53.
232. Zhang, J. R., J. M. Hardham, A. G. Barbour, and S. J. Norris. 1997. Antigenic variation in Lyme disease borreliae by promiscuous recombination of VMP-like sequence cassettes. *Cell* 89:275-85.
233. Zhang, J. R., and S. J. Norris. 1998. Kinetics and in vivo induction of genetic variation of vlsE in *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 66:3689-97.
234. Zhang, L., K. Jacobsson, K. Strom, M. Lindberg, and L. Frykberg. 1999. *Staphylococcus aureus* expresses a cell surface protein that binds both IgG and beta2-glycoprotein I. *Microbiology* 145 ( Pt 1):177-83.
235. Zhang, L., K. Jacobsson, J. Vasi, M. Lindberg, and L. Frykberg. 1998. A second IgG-binding protein in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* 144 ( Pt 4):985-91.
236. Ziccardi, R. J. 1983. The first component of human complement (C1): activation and control. *Springer Semin Immunopathol* 6:213-30.
237. Ziccardi, R. J., and N. R. Cooper. 1979. Active disassembly of the first complement component, C-1, by C-1 inactivator. *J Immunol* 123:788-92.
238. Zipfel, P. F., M. Edey, S. Heinen, M. Jozsi, H. Richter, J. Misselwitz, B. Hoppe, D. Routledge, L. Strain, A. E. Hughes, J. A. Goodship, C. Licht, T. H. Goodship, and C. Skerka. 2007. Deletion of complement factor H-related genes CFHR1 and CFHR3 is associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *PLoS Genet* 3:e41.

239. Zipfel, P. F., S. Heinen, M. Jozsi, and C. Skerka. 2006. Complement and diseases: defective alternative pathway control results in kidney and eye diseases. *Mol Immunol* 43:97-106.
240. Zipfel, P. F., T. S. Jokiranta, J. Hellwage, V. Koistinen, and S. Meri. 1999. The factor H protein family. *Immunopharmacology* 42:53-60.
241. Zipfel, P. F., C. Kemper, A. Dahmen, and I. Gigli. 1996. Cloning and recombinant expression of a barred sand bass (*Paralabrax nebulifer*) cDNA. The encoded protein displays structural homology and immunological crossreactivity to human complement/cofactor related plasma proteins. *Dev Comp Immunol* 20:407-16.
242. Zipfel, P. F., and C. Skerka. 1994. Complement factor H and related proteins: an expanding family of complement-regulatory proteins? *Immunol Today* 15:121-6.
243. Zipfel, P. F., and C. Skerka. 1999. FHL-1/reconectin: a human complement and immune regulator with cell-adhesive function. *Immunol Today* 20:135-40.
244. Zipfel, P. F., C. Skerka, J. Hellwage, S. T. Jokiranta, S. Meri, V. Brade, P. Kraiczky, M. Noris, and G. Remuzzi. 2002. Factor H family proteins: on complement, microbes and human diseases. *Biochem Soc Trans* 30:971-8.
245. Zipfel, P. F., R. Würzner, and C. Skerka. 2007. Complement evasion of pathogens: common strategies are shared by diverse organisms. *Mol Immunol* 44:3850-7.

## Vorträge und Poster

### Vorträge

**Bock, K.** 2005. The borrelial proteins CRASP-1 to CRASP-5 show different binding characteristics for soluble host complement regulators. Wittenberger Arbeitstreffen, Lutherstadt Wittenberg

**Bock, K.** 2006. The borrelial proteins CRASP-3, CRASP-4 and CRASP-5 bind the human Factor H related protein 1 (FHR-1). Jahrestagung der VAAM, Jena

### Posterpräsentationen

**Bock, K.,** Wallich, R., Kraiczy, P., Brade, V., Skerka, C., and Zipfel, P. F. 2005. Binding of the human FHR-1 protein to *Borrelia burgdorferi* is mediated by CRASPs. 10<sup>th</sup> Meeting on Complement in Human Disease, Heidelberg

**Haupt, K.,** Wallich, R., Kraiczy, P., Brade, V., Skerka, C., and Zipfel, P. F., 2006. Binding of the human Factor H-related protein (FHR-1) to *Borrelia burgdorferi* is mediated by complement regulator-acquiring surface proteins. XXI International Complement Workshop, Beijing, China

**Haupt, K.,** Wallich, R., Kraiczy, P., Brade, V., Skerka, C., and Zipfel, P. F. 2007. Complement regulator-acquiring surface proteins of *Borrelia burgdorferi* bind two additional plasma proteins, FHR-1 and plasminogen. IX International Jena Symposium on Tick-borne Diseases, Jena, Germany

**Haupt, K.,** Wallich, R., Kraiczy P., Brade V., Skerka C., and Zipfel P. F. 2007. CRASPs are multifunctional surface proteins of *Borrelia burgdorferi* that bind two additional plasma proteins, FHR-1 and plasminogen. 11<sup>th</sup> Meeting on Complement in Human Disease, Cardiff, Großbritannien

**Haupt, K.,** van den Elsen, J., and Zipfel, P. F. 2007. Sbi of *Staphylococcus aureus* reveals a novel mechanism for Factor H binding. 11<sup>th</sup> Meeting on Complement in Human Disease, Cardiff, Großbritannien. **Poster mit dem Posterpreis ausgezeichnet.**

## Eigenständigkeitserklärung

- Die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena ist mir bekannt.
- Die vorliegende Dissertation wurde von mir selbst angefertigt und alle benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen sind in dieser Arbeit angegeben.
- Alle Personen, die mich bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben, habe ich benannt.
- Die Hilfe eines Promotionsberaters habe ich nicht in Anspruch genommen.
- Dritte Personen haben weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.
- Diese Arbeit wurde bisher weder an einer anderen Hochschule als Dissertation noch als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht.

Jena, 06. Februar 2008

---

Katrin Haupt



**Katrin Haupt**

Lutherstr. 87  
07743 Jena  
Tel: 03641/ 29 85 43

## Lebenslauf

---

Diplom-Biologin

geboren am 25. Juli 1978 in Dresden,  
verheiratet, geb. Bock

### Schulbildung

September 1985 – Juli 1997

Grundschule und Geschwister-Scholl-Gymnasium Löbau  
Abschluss: Abitur (Note: 1,6)

### Auslandsaufenthalt

September 1997 – Juli 1998

Volunteer an der „Royal Masonic School“  
Rickmansworth, Großbritannien

### Studium

Oktober 1998 – September 2000

Grundstudium der Biologie an der Universität Bayreuth

Oktober 2000 – November 2004

Hauptstudium der Biologie  
an der Friedrich-Schiller-Universität Jena,  
Hauptfach: Mikrobiologie,  
Nebenfächer: Medizinische Mikrobiologie und Genetik  
Abschluss: Diplom-Biologin (Note: 1,1)

Januar – Juni 2002

Auslandsstudium an der Universität Umeå, Schweden

Dezember 2004 – dato

Promotionsstudium  
an der Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Dissertation am Leibniz Institut für Naturstoff-Forschung  
und Infektionsbiologie – Hans-Knöll-Institut,  
Abteilung Infektionsbiologie bei Prof. Dr. P. F. Zipfel  
Voraussichtlicher Abschluss: Dr. rer. nat.

Jena, 6. Februar 2008

---

Katrin Haupt

### Danksagung

Mein Dank gilt im Besonderen Prof. Dr. Peter F. Zipfel für die Bereitstellung des Themas, die engagierte Betreuung dieser Arbeit durch intensive fachliche Diskussionen und Ratschläge sowie seinen ermutigenden Optimismus.

Bei den Kooperationspartnern PD Dr. Peter Kraiczy in Frankfurt am Main, Prof. Dr. Reinhard Wallich in Heidelberg, Dr. Jean van den Elsen in Bath (Großbritannien) sowie ihren Mitarbeitern und Doktorandinnen bedanke ich mich für die fruchtbare Zusammenarbeit, den fachlichen Austausch und die Bereitstellung rekombinanter Proteine, Antikörper, Bakterienstämme und Plasmide.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Infektionsbiologie danke ich für die freundliche Atmosphäre und ständige Hilfsbereitschaft. Insbesondere möchte ich mich bei Ina Löschmann und Steffi Hälbich bedanken, die mich von Anfang an unterstützt und begleitet haben. Steffi Hälbich danke ich außerdem für die Erstellung wertvoller Daten an der Biacore. Sophia Poltermann und Anja Kunert gilt mein Dank für die fachlichen Diskussionen und Ratschläge, das perfekt funktionierende Labor 019 und die freundschaftliche Zusammenarbeit. Gerlinde Heckrodt danke ich vor allem für ihre Herzlichkeit und Fürsorge. Ich danke Michael Reuter für seine fachliche Unterstützung, guten Ideen und seinen Enthusiasmus. Außerdem möchte ich der gesamten Mittagsrunde für die angenehme Gesellschaft danken.

Nicht zuletzt danke ich meinem Mann, André Haupt, für seine Liebe und umfassende Unterstützung. Meinen Eltern möchte ich dafür danken, dass sie mir das Biologiestudium und damit auch diese Dissertation erst ermöglicht haben.

## Anhänge

- Autorenvereinbarungen

01-FEB-2008 12:14 Von: MED. MIKROBIOLOGIE +496963015767 An: 03641656902 S. 2/6  
28 Jan 08 14:31 RD127 \_\_\_\_\_ 03641656902 S. 1

---

Anhänge

---

Manuskript 1

**Haupt K, Kraiczy P, Wallich R, Brade V, Skerka C, Zipfel PF.** Binding of Human Factor H-Related Protein 1 to Serum-Resistant *Borrelia burgdorferi* is Mediated by Borrelial Complement Regulator-Acquiring Surface Proteins. J Inf Dis 2007; 196:124-133

---

**Katrin Haupt** hat folgende Experimente konzipiert, geplant, durchgeführt, ausgewertet und interpretiert: Expression und Aufreinigung der rekombinanten Proteine FHR-1 und FHL-1, Absorptionsversuche mit *B. burgdorferi* LW2, Immunfluoreszenzversuche mit *B. burgdorferi* LW2, Proteinbindungsexperimente, ELISA und Kofaktorassay. Die „Surface Plasmon Resonance“ Experimente wurden von ihr konzipiert und interpretiert. Die Ergebnisse des Ligandenblot mit Zelllysaten unterschiedlicher Borrelienstämme hat Katrin Haupt interpretiert. Ebenfalls hat sie das Manuskript verfasst.

Peter Kraiczy hat die Plasmide für die Expression von rekombinanten CRASP konstruiert, die Fusionsproteine exprimiert und die CRASPs nachfolgend aufgereinigt sowie den Ligandenblot mit Zelllysaten unterschiedlicher Borrelienstämme konzipiert, durchgeführt, ausgewertet und die Ergebnisse interpretiert. Die Absorptionsversuche und Immunfluoreszenzversuche mit *B. burgdorferi* LW2 wurden von Peter Kraiczy konzipiert, geplant und durchgeführt. Für die Experimente hat er die Kultivierung der Borrelienstämme übernommen. Peter Kraiczy war am Schreiben der Publikation beteiligt.

Reinhard Wallich stellte ebenfalls CRASPs zur Verfügung und war an der Interpretation der Ergebnisse beteiligt.

Volkcr Brade interpretierte und diskutierte die Ergebnisse zu den Versuchen mit Borrelien.

Christine Skerka konzipierte und analysierte Experimente und war am Schreiben des Manuskripts beteiligt.

Peter F. Zipfel war maßgeblich an der Konzeption der Experimente, an der Interpretation der Ergebnisse und am Schreiben der Publikation beteiligt.

# Anhänge

---

01-FEB-2008 12:14 Von: MED. MIKROBIOLOGIE +496963015767 An: 03641656902 S. 3/6  
20 Jan 08 14:31 R0127 03641656902 S. 2  
18/01/2008 13:04 +49-6221-565611 INFESTIONSIMMUNOLOGI S. 02

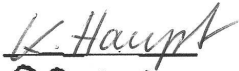
---

## Anhänge

---

### Unterschriften der Autoren:

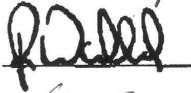
Katrin Haupt



Peter Kraiczy



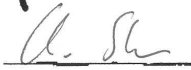
Reinhard Wallich



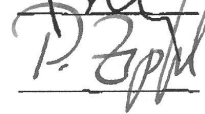
Volker Brade



Christine Skerka



Peter F. Zipfel



Jena, 14. Januar 2008

01-FEB-2008 12:14 Von: MED. MIKROBIOLOGIE +496963015767 An: 03641656902 S. 4/6  
28 Jan 08 14:31 R0127 03641656902 S. 3  
18/01/2008 13:04 +49-6221-565611 INFektionsIMMUNOLOGIE S. 03

Anhänge

Manuskript 2:

Haupt K, Kraiczy P, Wallich R, Brade V, Skerka C, Zipfel PF. FHR-1, an additional human plasma protein, binds to complement regulator-acquiring surface proteins of *Borrelia burgdorferi*. *J Int Med Microbiol* (im Druck)

Katrin Haupt hat folgende Experimente konzipiert, geplant, durchgeführt, ausgewertet und interpretiert: Expression und Aufreinigung der rekombinanten Proteine FHR-1 und FHL-1, ELISA und „Slot blot“ Versuche. Ebenfalls hat sie das Manuskript verfasst.

Peter Kraiczy hat die Plasmide für die Expression von rekombinanten CRASP konstruiert, die Fusionsproteine exprimiert und die CRASPs nachfolgend aufgereinigt und für die Experimente bereitgestellt. Peter Kraiczy war an der Interpretation der Ergebnisse beteiligt.



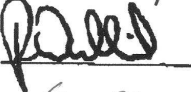


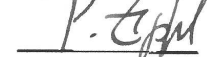
Reinhard Wallich stellte ebenfalls CRASPs zur Verfügung und interpretierte die Ergebnisse.

Volker Brade interpretierte und diskutierte die Ergebnisse zu den Versuchen mit Borrelien.

Christine Skerka konzipierte und analysierte Experimente und war am Schreiben des Manuskripts beteiligt.

Peter F. Zipfel war maßgeblich an der Konzeption der Experimente, an der Interpretation der Ergebnisse und am Schreiben der Publikation beteiligt.

Unterschriften der Autoren:

Katrin Haupt		Peter Kraiczy	
Reinhard Wallich		Volker Brade	
Christine Skerka		Peter F. Zipfel	

Jena, 14. Januar 2008

01-FEB-2008 12:14 Von: MED. MIKROBIOLOGIE +496963015767

An: 03641656902

S. 5/6

20 Jan 08 14:32

R0127

03641656902

S. 4

---

Anhänge

---

Manuskript 3:

Kraiczny P, Schreiber J, Skerka C, **Haupt K**, Brade V, Wallich R, Zipfel PF. 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. J Int Med Microbiol (im Druck)

---

**Katrin Haupt** hat rekombinantes FHL-1 exprimiert und aufgereinigt und für die Experimente bereitgestellt. Der ELISA Versuch wurde von Katrin Haupt konzipiert.

Peter Kraiczny war maßgeblich an der Konzeption aller Experimente und der Interpretation der Ergebnisse beteiligt. Die Publikation wurde hauptverantwortlich von ihm verfasst.

Johanna Schreiber hat folgende Experimente konzipiert, durchgeführt, ausgewertet und interpretiert: Mutagenese von CRASP-2, Expression und Aufreinigung der CRASP-2 Mutanten, Ligandenblot mit Zelllysate von *B. burgdorferi* LW2 und ELISA mit rekombinanten CRASP-2 Mutanten.

Christine Skerka konzipierte und analysierte Experimente und war am Schreiben des Manuskripts beteiligt.


Volker Brade interpretierte und diskutierte die Ergebnisse zu den Versuchen mit Borrelien.

Reinhard Wallich konzipierte Experimente, stellte rekombinante Proteine zur Verfügung und beteiligte sich bei der Auswertung der Ergebnisse und dem Schreiben des Manuskripts.

Peter F. Zipfel war an der Konzeption der Experimente, der Interpretation der Ergebnisse und dem Schreiben des Manuskripts beteiligt.

Unterschriften der Autoren:

Peter Kraiczny 

Johanna Schreiber 

# Anhänge

---

01-FEB-2008 12:14 Von: MED. MIKROBIOLOGIE +496963015767 An: 03641656902 S. 6/6  
20 Jan 08 15:45 A0127 03641656902 S. 1  
18/01/2008 13:04 +49-6221-565611 INFektionsIMMUNOLOGIE S. 05

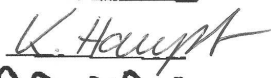
---

## Anhänge

Christine Skerka



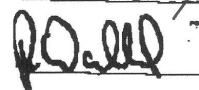
Katrin Haupt



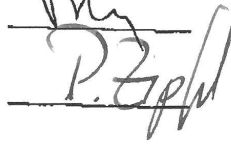
Volker Brade



Reinhard Wallich



Peter F. Zipfel



Jena, 14. Januar 2008



---

Anhänge

---

**Manuskript 4:**

**Haupt K, van den Elsen J, Burman J, Hälbich S, Reuter M, Richter J, Skerka C, Zipfel PF.** The *Staphylococcus aureus* protein Sbi acts as a complement inhibitor and forms a ternary complex with host complement Factor H and C3b. (eingereicht)

---

**Katrin Haupt** hat folgende Experimente konzipiert, geplant, durchgeführt, ausgewertet und interpretiert: Kultivierung des *S. aureus* Stammes H591, Adsorptionsversuche mit *S. aureus* H591, ELISA, Proteinbindungsexperimente (CEWA), Inhibition der Proteinbindung mit Antikörpern und Kofaktorassay. Die „Surface Plasmon Resonance“ Experimente sowie die Hämolyseassays wurden von ihr konzipiert und interpretiert. Ebenfalls hat sie die Publikation geschrieben.

Jean van den Elsen hat die Sbi-Fragmente kloniert, exprimiert und aufgereinigt und für die Experimente zur Verfügung gestellt. Er hat den *S. aureus* Stamm H591 bereitgestellt. Jean van den Elsen ist an der Konzeption der Experimente, der Interpretation der Ergebnisse und am Schreiben der Publikation beteiligt.

Julia Burman hat die Sbi-Fragmente kloniert, exprimiert und aufgereinigt.

Steffi Hälbich hat die „Surface Plasmon Resonance“ Experimente konzipiert, geplant, durchgeführt, ausgewertet und interpretiert.

Michael Reuter hat die Hämolyseassays konzipiert, geplant, durchgeführt, ausgewertet und interpretiert. Er war am Schreiben der Publikation beteiligt.

Julia Richter hat die Hämolyseassays konzipiert und durchgeführt und die Ergebnisse ausgewertet.

Christine Skerka konzipierte und analysierte Experimente und war am Schreiben der Publikation beteiligt.

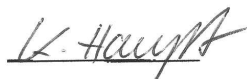
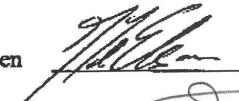
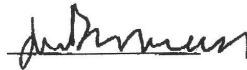
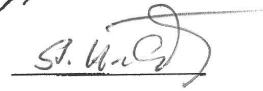



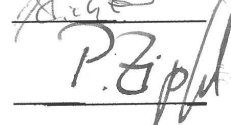
Peter F. Zipfel war maßgeblich an der Konzeption der Experimente, an der Interpretation der Ergebnisse und am Schreiben der Publikation beteiligt.

---

Anhänge

---

Unterschriften der Autoren:

Katrin Haupt		Jean van den Elsen	
Julia Burman		Steffi Hälbich	
Michael Reuter		Julia Richter	
Christine Skerka		Peter F. Zipfel	

Jena, 14. Januar 2008