

Schriften aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie des  
Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

Band 1

**Peter Kraiczy**

**Natürliche Komplementresistenz und  
humorale Immunabwehr bei *Borrelia burgdorferi*,  
dem Erreger der Lyme-Borreliose**

Shaker Verlag  
Aachen 2004

### **Bibliografische Information der Deutschen Bibliothek**

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

Priv.-Doz. Dr. phil. nat. Peter Kraiczky  
Institut für Medizinische Mikrobiologie  
Universitätsklinikum Frankfurt/Main  
Paul-Ehrlich-Str. 40  
D-60596 Frankfurt/Main  
[Kraiczky@em.uni-frankfurt.de](mailto:Kraiczky@em.uni-frankfurt.de)

Copyright Shaker Verlag 2004

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 3-8322-3346-6  
ISSN 1614-7758

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen  
Telefon: 02407/95 96 - 0 • Telefax: 02407/95 96 - 9  
Internet: [www.shaker.de](http://www.shaker.de) • eMail: [info@shaker.de](mailto:info@shaker.de)

*Meiner Frau und meinen Kindern*



## Vorwort

Die als Lyme-Borreliose bezeichnete Multisystemerkrankung beim Menschen stellt mit ca. 60.000 Neuinfektionen pro Jahr in Deutschland neben der Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) die am häufigsten durch Zecken übertragene Infektionskrankheit dar. Trotz der Entdeckung des Erregers durch Willy Burgdorfer im Jahre 1981 und der zunehmenden naturwissenschaftlichen Erkenntnisse über die komplexe Beziehung zwischen Erreger (*Borrelia burgdorferi*), Vektor (*Ixodes ricinus*, gemeinhin als „Holzbock“ bekannt) und dem menschlichen Wirt, bleiben nach wie vor eine Vielzahl von Fragen unbeantwortet.

Das vorliegende Buch ist eine modifizierte Fassung der Habilitationsschrift des Verfassers und setzt sich im Wesentlichen mit der Frage auseinander, warum *Borrelia burgdorferi*, dem Erreger der Lyme-Borreliose in der Lage ist, trotz einer effizienten Immunabwehr, erfolgreich im menschlichen Körper zu überleben. In diesem Zusammenhang scheint die natürliche Resistenz gegenüber der angeborenen Immunabwehr, insbesondere des Komplementsystems eine wichtige Rolle beim Überleben des Erregers im menschlichen Organismus zu spielen. Die aus dieser Studie erzielten Erkenntnisse zeigen, dass Borrelien verschiedene Strategien entwickelt haben, um sich effektiv dem menschlichen Immunsystems zu entziehen und damit einer Abtötung zu entgehen.

An dieser Stelle möchte ich meine Wertschätzung und Dankbarkeit gegenüber meinen Freunden, Kollegen und Mitarbeitern des Institutes ausdrücken, die durch ihre vielseitige Unterstützung zum Gelingen dieser Studie beigetragen haben. Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem akademischen Lehrer Herrn Prof. Dr. med. Volker Brade, dem Direktor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, für die stets gewährte Unterstützung, seine wertvollen Anmerkungen und die zahlreichen konstruktiven Diskussionen.

Nicht zuletzt gilt mein aufrichtiger Dank meiner lieben Frau und meinen Kindern, die mich durch ihr großes Verständnis und ihre Ermutigungen in vielfältiger Weise unterstützt haben.

Frankfurt am Main, im Oktober 2004

*Peter Kraiczy*



---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Charakteristika von <i>Borrelia burgdorferi</i>	1
1.1.1 Taxonomische Einteilung und genetische Diversität von <i>Borrelia burgdorferi</i>	1
1.1.2 Morphologie der Borrelien	3
1.1.3 Physiologie der Borrelien	4
1.1.4 Molekularbiologische Aspekte	5
1.1.5 Diversität und Immunogenität der Oberflächenproteine von <i>Borrelia burgdorferi</i>	7
1.2 Die Multisystemerkrankung Lyme-Borreliose	8
1.2.1 Geschichtliches und Epidemiologie	8
1.2.2 Klinik der Lyme-Borreliose	10
1.2.3 Diagnostik der Lyme-Borreliose	14
1.2.4 Therapie der Lyme-Borreliose	16
1.3 Wissensstand über die Interaktion zwischen Wirt und Borrelien	17
1.4 Die Komplementresistenz von Borrelien als möglicher Pathogenitätsfaktor	20
1.5 Funktion des Komplementsystems	22
1.5.1 Aktivierungswege	22
1.5.2 Regulation der Komplementkaskade	25
1.6 Die Faktor H-Proteinfamilie	27
1.7 Zielsetzung	31
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>33</b>
2.1 Material	33
2.1.1 Stämme	33
2.1.1.1 Borrelienstämme	33
2.1.1.2 Andere Bakterienstämme	33
2.1.2 Basisvektoren	33
2.1.3 Plasmidkonstrukte	35
2.1.4 Oligonukleotide	35
2.1.5 Antikörper	36
2.1.6 Rekombinante Proteine	37
2.1.7 Normales Humanserum	38
2.1.8 Kollektiv der Patientensera	38
2.1.9 Kulturmedien	39

2.1.9.1 Modifiziertes BSK-Medium zur Borrelienzucht (Barbour-Stoener-Kelly-Medium)	39
2.1.9.2 Kultivierungsmedium zur Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	40
2.2 Methoden	41
2.2.1 Kultivierung von Borrelienzellen	41
2.2.2 Immunologische Nachweisverfahren	41
2.2.2.1 Bestimmung der Gesamtkomplementaktivität (CH50)	41
2.2.2.2 Detektion von deponierten Komplementkomponenten auf der Oberfläche von Borrelienzellen nach Inkubation mit NHS oder Patientenserum	42
2.2.2.3 Analyse des Komplementaktivierungsweges mittels Detektion von deponierten Komplementkomponenten auf der Zelloberfläche von Borrelienzellen	44
2.2.2.4 Detektion von gebundenen Komplementregulatoren auf der Zelloberfläche von Borrelienzellen	44
2.2.2.5 Identifizierung von Borrelien-spezifischen Proteinen mittels direkter und indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie	45
2.2.2.6 Detektion von deponierten terminalen Komplementkomplexen mittels Immunelektronenmikroskopie	45
2.2.2.7 Funktioneller Assay zur Messung der Kofaktoraktivität von FHL-1/Reconnectin und Faktor H	46
2.2.2.8 Detektion von Borrelien-spezifischen Antikörpern aus Sera von Patienten mit Lyme-Borreliose mittels Immunoblot	47
2.2.3 Proteinbiochemische Nachweisverfahren	48
2.2.3.1 Herstellung von Ganzzellhomogenaten von Borrelien	48
2.2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen	48
2.2.3.3 Tris/Tricin SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) von Proteinen	48
2.2.3.4 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen (Westernblot)	49
2.2.3.5 Aufreinigung von rekombinanten Proteinen mittels Affinitätschromatographie	49
2.2.3.6 Isolierung von äußeren Membranfraktionen des <i>B. afzelii</i> -Isolates FEM1	50
2.2.2.7 Biotinylierung von Antikörpern	50
2.2.4 Molekularbiologische Nachweisverfahren	51
2.2.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	51
2.2.4.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Borrelienzellen	51
2.2.4.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen	52
2.2.4.4 Elektrophoretische Auftrennung von RNA in Formaldehyd-Agarosegelen	52
2.2.4.5 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus- (RFLP-) und Plasmidprofil- Analyse mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese	52
2.2.4.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)	53

2.2.4.7 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	54
2.2.4.8 RFLP-Analyse von 5S-23S "intergenic spacer"-Amplifikaten	54
2.2.4.9 Sequenzierung von PCR-Amplifikaten und Plasmid-DNA	55
2.2.4.10 Restriktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen	55
2.2.4.11 Auffüllen von 5´-Überhängen („fill in“-Reaktion)	55
2.2.4.12 Dephosphorylierung von restringierter Vektor-DNA	55
2.2.4.13 Ligation von DNA	56
2.2.4.14 Transformation von <i>Escherichia coli</i>	56
2.2.5 Spezielle Testverfahren	56
2.2.5.1 Kultivierung von Borrelien auf Festnährböden	56
2.2.5.2 Bakterizidie-Assay	57
2.2.5.3 Serumadsorptionsexperimente	58
2.2.5.4 Ligandenaffinitätsblots	59
2.2.5.5 Generierung von Borrelienvarianten	59
2.2.5.6 Testung von Sera auf Antibiotika mit <i>Bacillus subtilis</i>	60
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>61</b>
3.1 Typisierung von <i>Borrelia burgdorferi</i> s. l.-Isolaten	61
3.1.1 Molekularbiologische Genotypisierung von Borrelienisolaten mittels RFLP und 5S-23S-rDNA-Analyse	61
3.1.2 Analyse des Proteinprofils von Borrelienisolaten in der SDS-PAGE	63
3.2 Untersuchungen zur natürlichen Komplementresistenz von <i>B. burgdorferi</i> s.l. in normalem Humanserum (NHS)	65
3.2.1 Analyse der Komplementresistenz von Borrelienisolaten im Bakterizide-Assay	65
3.2.2 Analyse der Ablagerung von Komplementfaktor C3 und C6 und des Komplementkomplexes TCC auf der Zelloberfläche von Borrelienisolaten	68
3.2.3 Immunelektronenmikroskopische Untersuchungen zur Lokalisation von abgelagerten TCC bei Komplement-resistenten und Komplement-sensiblen Borrelienisolaten	70
3.2.4 Untersuchungen zum Aktivierungsweg von Komplement bei <i>B. burgdorferi</i> s.s., <i>B. garinii</i> und <i>B. afzelii</i>	73
3.3 Untersuchungen zum Mechanismus der natürlichen Komplementresistenz von <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.	74
3.3.1 Absorptionsexperimente zum Nachweis von gebundenem FHL-1/Reconnectin und Faktor H	75
3.3.2 Nachweis der Kofaktoraktivität von Membran-gebundenem FHL-1/Reconnectin und Faktor H	77

3.3.3 Lokalisation von Membran-gebundenem FHL-1/Reconnectin und Faktor H auf der Borrelienoberfläche	78
3.3.4 Identifikation der mit der Borrelienoberfläche interagierenden Bindungsdomänen von FHL-1/Reconnectin	79
3.4 Charakterisierung von FHL-1/Reconnectin- und Faktor H-bindenden Borrelienproteinen (Complement Regulator-Acquiring Surface Proteins, CRASPs)	81
3.4.1 Lokalisation der mit den CRASPs interagierenden Domänen von FHL-1/Reconnectin und Faktor H	88
3.4.2 Analysen zur Membranständigkeit von CRASPs	90
3.4.3 Bindungsstudien mit rekombinanten CRASPs	91
3.4.4 Bindungsstudien mit rekombinanten OspE-Proteinen	92
3.4.5 Analyse der Aminosäuresequenzen von Faktor H-bindenden Proteinen der Erp-Familie	94
3.4.6 Temperatureinfluss auf die Genexpression von CRASPs	97
3.5 Wirkung von Sera von Lyme-Borreliose Patienten auf Komplement-resistente und Komplement-intermediäre Borrelienisolat	99
3.5.1 Bakterizidie-Assays mit Sera von Patienten aller Stadien der Lyme-Borreliose	99
3.5.2 Analyse der Komplementablagerung nach Inkubation von Borrelienisolaten mit Patientensera	103
3.5.3 Identifikation von bakteriziden Antikörpern und korrespondierenden Antigenen	104
3.5.4 Bakterizidie-Assay mit anti-OspC Antikörpern aus Sera von Patienten mit Stadium I-Lyme-Borreliose	106
<b>4. Diskussion</b>	<b>111</b>
4.1 Grundlegende Aspekte zur experimentellen Handhabung von Borrelien	112
4.2 Natürliche Komplementresistenz von <i>Borrelia burgdorferi</i> -Isolaten gegenüber NHS	113
4.2.1 Phänotypische Charakterisierung der Serumempfindlichkeit von <i>Borrelia burgdorferi</i>	113
4.2.2 Testmethoden zur Ermittlung der Komplementresistenz bei <i>Borrelia burgdorferi</i>	114
4.2.3 Einfluss exogener Faktoren auf die Komplementresistenz von Borrelien	117
4.3 Initiale Komplementaktivierung durch <i>Borrelia burgdorferi</i>	117
4.4 Bedeutung der "regulativen" Komplementresistenz bei <i>Borrelia burgdorferi</i>	119
4.4.1 Inhibierung der Komplementaktivierung durch membrangebundenes FHL-1/Reconnectin und Faktor H	119
4.4.2 Lokalisation der Bindungsdomänen von FHL-1/Reconnectin und Faktor H	122
4.4.3 „Complement regulator-acquiring surface proteins“ (CRASPs) - eine Proteinfamilie mit differenzierten Bindungseigenschaften gegenüber FHL-1/Reconnectin und Faktor H	125
4.4.4 Hinweise auf das Faktor H-bindende Sequenzmotiv bei CRASPs	128

4.4.5 Einfluss von exogenen Faktoren auf die Genregulation der CRASPs	129
4.4.6 Modell der molekularen Mechanismen der „regulativen“ Komplementresistenz bei <i>Borrelia burgdorferi</i>	130
4.5 Bedeutung der „strukturellen“ Komplementresistenz bei <i>Borrelia burgdorferi</i>	132
4.6 Bakterizide Antikörper und deren Antigen-spezifität	133
4.6.1 Einfluss von borrelienspezifischen Antikörpern auf die komplementabhängige Wachstumshemmung (Bakterizidie) verschiedener <i>Borrelia burgdorferi</i> -Isolate	133
4.6.2 Charakterisierung bakterizider Antikörper in Immunsera von Lyme-Borreliose Patienten	136
4.7 Zukünftige Fragestellungen	139
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>141</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>143</b>
<b>7. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>187</b>
<b>8. Anhang</b>	<b>189</b>