

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene

Prof. Dr. med. Aepfelbacher

Rolle spezifischer Proteine bei der Phagosomreifung bei der intrazellulären Prozessierung von *Borrelia burgdorferi* in primären humanen Makrophagen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Yousef Barsoom
aus Rüsselsheim

Hamburg 2023

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 09.01.2024**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Samuel Huber

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Stefan Linder

1	Einleitung	5
1.1	<i>Borrelia burgdorferi</i>	5
1.1.1	Verbreitung in der Welt	6
1.1.2	Lyme Borreliose	6
1.1.3	Intrazelluläre Verarbeitung von Borrelien in Makrophagen	7
1.2	Makrophagen	8
1.3	Untersuchte Proteine	9
1.3.1	Swiprosin 1	9
1.3.2	SKAP 2	10
1.3.3	Myosin 1f	12
1.4	Fragestellung und Ziel der Arbeit	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Material	15
2.1.1	Geräte	15
2.1.2	Computerprogramme	15
2.1.3	Chemikalien, Reagenzien und Medienlösungen	16
2.1.4	Verbrauchsmaterialien	17
2.1.5	Borrelienstämme	17
2.1.6	Antikörper	17
2.1.7	Proteinkonstrukte	18
2.1.8	siRNA	18
2.2	Methoden	18
2.2.1	Experimente mit Makrophagen	18
2.2.1.1	Monozytenisolierung und Makrophagenanzucht	18
2.2.1.2	Ablösen der Makrophagen und Aussäen und Kultivierung auf Deckplättchen	19
2.2.1.3	Elektroporation mittels Neon Elektroporationssystem (Invitrogen)	19
2.2.1.4	Knockdown Experimente	20
2.2.2	Experimente mit Borrelien	20
2.2.3	Herstellung eines Western Blots	21
2.2.3.1	Gelherstellung für die Proteinauftrennung	21
2.2.3.2	Zelllysate Herstellung	22
2.2.3.3	Proteinkonzentrationsbestimmung mithilfe der Methode nach Bradford	22
2.2.3.4	Proteinübertragung auf die Membran	22
2.2.3.5	Färbung und Entwicklung des Western Blots	22
2.2.4	Immunfluoreszenzfärbung	23
2.2.5	Mikroskopie	23

3	Ergebnisse	24
3.1	SWS1 ist an Podosomen, Filopodien und Pseudopodien lokalisiert.....	24
3.2	SKAP2 und Myo1f lassen sich an Podosomen nachweisen.....	26
3.3	SWS1 lokalisiert an Aufnahmestrukturen von Borrelien und an Phagosomen.....	26
3.4	SKAP2 und Myo1f sind nicht an Borrelien-haltigen Phagosomen angereichert	30
3.5	SWS1 beeinflusst die phagosomale Kompaktierung von Borrelien.....	33
3.6	SKAP2 und Myo1f haben einen geringen Effekt auf die Kompaktierung	34
3.7	SWS1 ko-lokalisiert weder mit SNX3 noch mit RAB5a in primären, humanen Makrophagen.....	35
4	Diskussion	36
4.1	SWS1 und Myo1f - neue Kandidaten für die Podosomenstruktur in Makrophagen?.....	36
4.2	Swiprosin 1 – Ein neuer Kandidat für die Aufnahme von Borrelien und Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts in den Makrophagen?	37
4.3	Steigert SWS1 Knockdown das intrazelluläre Überleben der Borrelien?	38
4.4	Ausblick	38
5	Zusammenfassung	40
6	Abkürzungsverzeichnis	41
7	Literaturverzeichnis	42
8	Danksagung	49
9	Lebenslauf	50
10	Eidesstattliche Erklärung	51

1 Einleitung

1.1 *Borrelia burgdorferi*

Borrelia burgdorferi (*Bb*) gehört wie *Treponema pallidum*, dem Erreger der Syphilis, zur Gattung der Spirochäten. Der spirale bzw. korkenzieherartig aussehende Erreger wurde von W. Burgdorfer als Auslöser der Lyme Borreliose identifiziert und anschließend nach seinem Entdecker benannt. (Burgdorfer et al., 1982) Unterschieden wird zwischen *Bb sensu lato* und *Bb sensu stricto*. Zu *B. burgdorferi sensu lato* („im weiteren Sinn“) zählen die Arten *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. spielmanii*, *B. bavariensis*, welche den Menschen infizieren können. (Rudenko et al., 2011) Borrelienstämme, die nicht die Lyme-Erkrankung auslösen, werden nicht zum *sensu lato* Stamm gezählt. Dazu zählt zum Beispiel *Borrelia recurrentis*. Dieser Erreger verursacht das Krankheitsbild des Rückfallfiebers. (Cutler, 2010)

Der in dieser Arbeit genutzte Borrelienstamm ist *Bb sensu stricto* (Wild-type *Borrelia burgdorferi* B31 ATCC 35210). Weiterhin wurde sein GFP exprimierender Stamm GCB726 für einige Experimente genutzt.

Bei *Bb* handelt es sich um eine unregelmäßig gewundene Spirochäte, welche 10 - 40 μM lang und 0,2 - 0,3 μM breit werden kann (Aberer and Duray, 1991). Der spiralförmige Körper von *Bb* kommt dadurch zustande, dass im periplasmatischen Raum, dem Raum zwischen äußerer und innerer Membran, sogenannte Endoflagellen liegen. Diese Flagellen dienen der Spirochäte der Fortbewegung und besonders ist hierbei, dass diese zum Zellskelett der Borrelie gehören (Dombrowski et al., 2009). Der Erreger erreicht eine Geschwindigkeit von bis zu 4 $\mu\text{M}/\text{s}$ im Gewebe (Moriarty et al., 2008). Dabei bewegt sich *Bb* rotierend um die eigene Längsachse fort.

Borrelien werden über Zecken der Spezies (*Ixodes ricinus*) auf den Menschen übertragen. Zecken nehmen ihre Blutmahlzeit an Rehen, Nagetieren und Vögeln zu sich. Durch die Blutmahlzeit gelangen die Borrelien in ihren Wirt. Dann vermehren sich die Borrelien in den Organismen, vor allem in Mäusen, wobei diese nicht erkranken. Wenn eine Zecke erneut eine Blutmahlzeit von infizierten Tieren zu sich nimmt, dann infiziert sich die Zecke mit den Borrelien. Befällt sie dann den Menschen, kann es zu einer Übertragung der Borrelien kommen, wobei der Mensch als unbeabsichtigter Wirt zu betrachten ist (Lane and Loye, 1991, Lane et al., 1991, Mather et al., 1989).

Bb ist sehr anpassungsfähig. Der Erreger muss zunächst in Zecken überleben und dann in Säugetieren, wobei sich pH-Wert und Temperatur in den Organismen unterscheiden. Ein Teil dieser Anpassungsfähigkeit liegt in der Fähigkeit bestimmte Lipoproteine zu exprimieren. Das outer surface protein A (OspA) wird im Zeckendarm exprimiert, wohingegen das outer surface protein C (Osp C) während der frühen Infektionsphase in Säugetieren hergestellt wird. Dabei hat Osp A vor allem die Funktion die Adhäsion am Darm der Zecke zu ermöglichen, Osp C spielt hingegen eine wesentliche Rolle bei der Infektion der Säugetiere (Pal et al., 2000, Schwan and Piesman, 2000, Tilly et al., 2006).

Dieser Zyklus von *Bb* könnte darin begründet sein, dass dem Bakterium Gene für die Synthese von Nukleotiden, Aminosäuren, Fettsäuren und Enzymkofaktoren fehlen (Fraser et al., 1997).

Bb B31 hat ein lineares Chromosom mit 910 725 Basenpaaren und enthält zudem 17 lineare und zirkuläre Plasmide. Die Anzahl der Plasmide kann bei anderen Borrelienstämmen variieren. Das Borrelienchromosom enthält 853 Gene, die Proteine für die unterschiedlichsten Aufgaben des Bakteriums kodieren. Auf Plasmiden sind Oberflächenproteine kodiert, die wichtig für die Zelladhäsion und Invasivität des Bakteriums sind. Obwohl *Bb* zu den gramnegativen Bakterien gehört, fehlt das typische Lipopolysaccharid (LPS) und die Lipoteichonsäure (LTA). *Bb* zeigt zudem keine ausgeprägten Virulenzfaktoren und bildet auch kein Sekret aus (Fraser et al., 1997, Kenedy et al., 2012).

1.1.1 Verbreitung in der Welt

Die Zeckenart *Ixodes ricinus* ist selbst mit 10-20% mit Borrelien infiziert, wobei die Infektionsrate bei adulten Zecken in lokalen Gebieten über 50% betragen kann. (Rauter and Hartung, 2005) Bei dem Vorhandensein von Borrelien in Zecken spielt auch deren Stadium eine wichtige Rolle. Im Schnitt sind adulte Zecken zu 19,7% befallen, wohingegen die Nymphen mit 9,3% und die Larven nur zu 1,2% infiziert sind. Aus diesen Daten lässt sich schlussfolgern, dass die Zecken die Borrelien im Laufe ihres Lebens bei Blutmahlzeiten, vor allem aus Nagetieren und Vögeln, erwerben. (Fingerle et al., 1994)

Bb sensu stricto findet sich vor allem in Europa und Nordamerika. Die Stämme *B. afzelii* und *B. garinii* kommen sowohl in Europa und auch Asien vor (Baranton et al., 1992).

Die Inzidenz für die Lyme Borreliose in Europa schwankt von Nord nach Süd. So gibt es in Ländern in Zentraleuropa wie in Slowenien eine Inzidenz von 206/100 000 (Fälle / Einwohner) und in Österreich 135/100 000 im Jahr 2005. Hingegen ist die Inzidenz in südlichen europäischen Ländern viel geringer, wie in Portugal und Italien, wo weniger als 1 Fall pro 100 000 Einwohner beschrieben ist (Smith et al., 2006)- In Deutschland wurde für die Region Würzburg nach Analyse einer prospektiven Studie eine Inzidenz von 111 / 100 000 errechnet. Hochrechnungen der Inzidenzen für Deutschland ergeben 60 000 – 100 000 Fälle pro Jahr (Huppertz et al., 1999, Poggensee et al., 2008).

1.1.2 Lyme Borreliose

Bei der Lyme Borreliose handelt es sich um die häufigste durch Vektoren (Zecken) übertragene Infektionskrankheit. Es gibt jährlich in den USA mehr als 300 000 Fälle und in Europa mehr als 100 000 (Johnson et al., 2014, Lindgren et al., 2006).

Es handelt sich um eine systemische Erkrankung, die multifaktoriell Gelenke, Haut, Herz, Augen, Nervensystem und das muskuloskeletale System betreffen kann. Auslöser sind gram-negative Bakterien der Art *Borrelia burgdorferi sensu lato*. (Burgdorfer et al., 1982, Gupta and Tripathy, 2020, Borgermans et al., 2014) Benannt wurde die Erkrankung nach dem Ort Lyme in Connecticut in den USA. Dort traten seit 1972 gehäuft eine Oligoarthritis bzw. Arthritis der großen Gelenke, vor allem des Kniegelenkes, auf. Die Gelenke waren dabei meist schmerzhaft angeschwollen. (Steere et al., 1977) Ursache für diese Erkrankung waren die Borrelien. (Burgdorfer et al., 1982)

Die Lyme Borreliose verläuft in drei Stadien, die durch typische Symptome gekennzeichnet sind. Bei den drei Stadien handelt es sich um die frühe lokalisierte, die frühe ausgedehnte und die späte persistierende Infektion. Bei 60% der Infizierten tritt im frühen Stadium ein *Erythema chronicum migrans* (ECM) auf, welches sich um die Einstichstelle des Zeckenbisses ausbildet. Es handelt sich um ein Ringerythem, das nach zentral hin abgeblasst ist. Die Rötung des ECMs kommt durch die reaktive Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen aus beispielsweise Makrophagen oder dendritischen Zellen auf die sich ausbreitenden Bakterien zustande. Dadurch, dass ein ECM nur in 60% der Fälle auftritt, kann eine Infektion mit *Borrelia burgdorferi* (Bb) zunächst unbemerkt bleiben. Somit kann es sein, dass eine Therapie zu spät begonnen wird, wodurch sich eine Infektion manifestieren kann. Neben der Manifestation als ECM kann sich die Borrelieninfektion auch als Lymphadenitis cutis benigna (Lcb), auch Borrelienlymphozytom genannt, auf der Haut zeigen. Diese tritt erst Wochen bis Monate nach der Infektion auf und es handelt sich dabei um eine gutartige Vermehrung von lymphoretikulärem Gewebe der Haut. Meist sieht man bei der Lcb eine rötliche, knotige Schwellung. Im ersten Stadium treten neben dem ECM und/oder der Lcb zusätzlich oft grippeähnliche Symptome auf, dazu gehören Muskelschmerzen, Fieber, allgemeines Schwächegefühl und Kopfschmerzen. (Steere et al., 1983, Albrecht et al., 1991, Buechner et al., 1995, Neubert, 1984)

Haben sich die Borrelien über die Blutgefäße ausgebreitet, so befindet sich der Patient im zweiten Stadium der Erkrankung. Es können Wundläsionen wie z.B. multiple Erythema migrans, Muskel- und Gelenkschmerzen, Augenbindegewebsentzündungen, kardiale und neurologische Symptome wie akute Neuroborreliose oder Meningopolyneuritis auftreten. (Steere et al., 2004) Im letzten Stadium der Lyme Borreliose kommt es zu einem Anschwellen der Gelenke (Lyme Arthritis), vor allem große Gelenke wie das Kniegelenk sind betroffen. Eine Spätmanifestation der Lyme Borreliose, die ebenfalls auf der Haut nach Monaten bis Jahren nach der Infektion auftreten kann, ist die Acrodermatitis chronica atrophicans. Es handelt sich hierbei um eine bläuliche Verfärbung der Haut mit einer ödematösen Schwellung. (Buechner et al., 1995)

Die gängige Therapie der Lyme Borreliose stellt das Antibiotikum Doxycyclin dar. Dabei ist eine frühe Therapie nach Infektion am besten, um langfristige Manifestationen zu verhindern. Ein späteres Stadium ist mit einer schwierigeren Therapie verbunden. (Zajkowska et al., 2012) Kommt es zur Erregerpersistenz nach Antibiotikatherapie, so ist ein weiterer Antibiotikaversuch mit einer anderen Substanzklasse indiziert. Bis jetzt konnte keine erworbene Resistenz für eine der empfohlenen Antibiotika festgestellt werden. (Cerar et al., 2010, Hunfeld et al., 2005)

1.1.3 Intrazelluläre Verarbeitung von Borrelien in Makrophagen

Makrophagen als spezialisierte Phagozyten können pro Zelle mehrere Borrelien aufnehmen und eliminieren. (Gordon, 2016) Borrelien werden über verschiedene Wege von Makrophagen erkannt und aufgenommen. Hierzu zählen FcγR, Komplementrezeptor 3 und TLR 2. (Benach et al., 1984, Cervantes et al., 2011, Hawley et al., 2012)

Die Aufnahme von Borrelien in Makrophagen findet im Wesentlichen durch zwei Strukturen statt. Zum einen gibt es das Filopodium, dieses kann man mit einem ausgestreckten Finger vergleichen. Das Filopodium hat die Aufgabe, die sehr beweglichen Borrelien festzuhalten. Es handelt sich um eine aktinreiche Struktur, die ebenfalls Formine wie FMNL1, mDia1 und Daam1 enthält. Die Formine spielen bei der Ausbildung des Filopodiums durch Nukleation und Elongation der Aktin-Filamente, sowie auch bei deren Stabilisierung innerhalb des Filopodiums eine wichtige Rolle. (Hoffmann et al., 2014, Naj et al., 2013)

Eine weitere wichtige Aufnahmestruktur stellen die coiling-Pseudopoden dar. Hierbei handelt es sich um aktinreiche Protrusionen, die sich um den Borrelienkörper winden, sobald dieser in der Nähe des Makrophagen ist. Dieser Prozess findet bei 50-70% der Borrelienaufnahme statt. (Rittig et al., 1992)

Borrelien werden bei der Aufnahme in Immunzellen in einem sogenannten Phagosom, eingeschlossen, welches aus der sie umgebenden Zellmembran besteht. Unterschieden werden dabei das frühe und das späte Phagosom als auch das Phagolysosom in dem dann ein Verdau von Proteinen, Lipiden und Kohlenhydraten möglich ist. Durch Fusionen mit Endosomen und Lysosomen, die eine Ansäuerung des Kompartiments bewirken und Enzyme zum Verdau mitbringen, entsteht im Makrophagen das sogenannte borrelienhaltige Phagolysosom. (Fairn and Grinstein, 2012) Das Borrelienphagosom ist positiv für Rab22a. Außerdem spielt Rab5a eine wichtige Rolle bei der Phagolysosomreifung. Hierbei kommt es an bestimmten Stellen im borrelienhaltigen Phagosom zu Membranabschnürungen, woraufhin die langgestreckten Borrelien zu kugelförmigen Strukturen verdichtet werden. (Naj and Linder, 2015)

Borrelien-haltige Phagosomen im Makrophagen wurden im Rahmen dieser Arbeit in die kugelförmige kompaktierte Variante wie in Abbildung 1 und in die noch nicht komplett verdichtete aber zum Fixationszeitpunkt beginnende Verdichtung unterschieden (intermediäre Form). Eine weitere Form stellt die lang gebliebene Spirochäte dar, die noch nicht prozessiert wurde. Zwischen den drei Formen

langgestreckt, intermediär und kompaktiert, also kugelförmig verdichtet wurde in der Auswertung unterschieden.

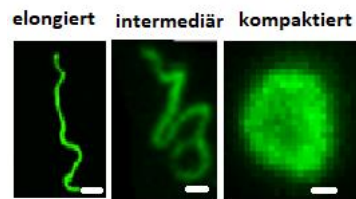


Abb. 1: Borrelienzustände Man erkennt die drei Borrelienzustände, in die im Rahmen dieser Arbeit unterteilt wurden. Es handelt sich um GFP-exprimierende Borrelien bei dieser Grafik. Maßstab 1µM

Bei Rab22a und Rab5a handelt es sich um Proteine aus der RabGTPasen-Familie (Ras-related proteins in brain), welche kleine GTPasen darstellen und Effektorproteine haben. RabGTPasen sind im GTP gebundenen Zustand aktiv und im GDP-gebundenen Zustand inaktiv. Sie vermitteln über eine Interaktion mit anderen Proteinen zum Beispiel Funktionen wie Fusionen und Membranabschnürungen. (Hutagalung and Novick, 2011)

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das Sorting nexin 3 (SNX3) mit Rab5a positiven Vesikeln an das Borrelien-Phagosom rekrutiert wird. Dies ist der Prozess durch den Rab5a an das Phagosom rekrutiert wird. Hierbei bindet das SNX3 mithilfe seiner PX-Domäne (Phox-Domäne) an PI(3)P der phagosomalen Membran. Über seinen C-Terminus rekrutiert das SNX3 dann weiterhin einen zweiten Effektor, das Galectin-9 an das Phagosom. Bei Galectin-9 handelt es sich um ein Lektin welches am Protein- und Membranrecycling beteiligt ist. (Klose et al., 2019) Für Galectin-9 wurde bereits festgestellt, dass es bei Infektionen hochreguliert wird und somit eine wichtige Rolle bei der Prozessierung spielen könnte. (Pelletier et al., 2003)

Haben Reifungsprozesse mithilfe von Rab22a, Rab5a, SNX3 und Galectin-9 stattgefunden, so kann man das gereifte Phagolysosom durch den Marker Lamp1 nachweisen. Im Phagolysosom wird Bb dann endgültig im Makrophagen verdaut und eliminiert. Zudem werden verdaute Borrelienproteine oder deren Bruchstücke mithilfe der MHC Klasse II auf der Oberfläche der Makrophagen präsentiert, da diese zu den antigenpräsentierenden Zellen gehören.

1.2 Makrophagen

Makrophagen gehören zum angeborenen Immunsystem und haben eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des adaptiven Immunsystems. Sie präsentieren hierzu phagozytierte Bestandteile über Ihre MHC-II-Moleküle. Im Blut zirkulieren Monozyten, welche die Vorläufer der Makrophagen darstellen. Die Monozyten werden im Knochenmark gebildet von wo sie aus in das Blutssystem übergehen. (Parihar et al., 2010)

Bei Makrophagen handelt es sich um spezialisierte Phagozyten, die durch verschiedene Mechanismen eine Vielzahl an Aufgaben erfüllen können. Zu den Mechanismen gehören zum Beispiel die pattern recognition Rezeptoren, Hormon- und Zytokinrezeptoren und Lysosomen, die einen Verdau von Mikroorganismen oder Proteinen ermöglichen. Eine wichtige Aufgabe der Makrophagen ist u.a. die Elimination von Mikroorganismen, wozu auch Bb gehört. Es wird auch eine Beteiligung von Makrophagen an Wundheilungsprozessen beschrieben. (Elhelu, 1983) Weiterhin können Makrophagen die Extrazellulärmatrix umbauen, abgestorbene Zellen und Zellreste als auch allgemein den Detritus entfernen. Kommt es zur Gewebsverletzung, Inflammation oder Infektion so werden Monozyten an den Ort mittels Chemokinen rekrutiert, wo sie sich zu Makrophagen differenzieren.

Differenzierte Makrophagen können selbst ebenfalls durch eine chemotaktische Anziehung zum Ort der Entzündung wandern. (Varol et al., 2015, Ginhoux and Jung, 2014, Geissmann et al., 2010) Damit eine Zellmigration stattfinden kann, wird die Aktinpolymerisation benötigt, um die jeweilige Membran nach vorne zu bewegen. So kann sich die Zelle durch Umstrukturierung ihres Aktinzytoskeletts fortbewegen. (Smith et al., 2003)

Makrophagen kommen im Körper an den unterschiedlichsten Stellen vor und haben spezialisierte Aufgaben. Sie werden auch als Kupfferzellen, Mikroglia und Langerhanszellen je nach Ort im Körper bezeichnet.

Makrophagen können unterschiedliche Zustände annehmen. Sie werden in M1 und M2 unterteilt. Weiterhin existieren auch noch tumorassoziierte Makrophagen, sogenannte TAMs. Bei M1-Makrophagen handelt es sich um die proinflammatorische Makrophagenform, die nach Stimulation mit TLR-Liganden, M-CSF, TNF- α oder IFN- γ ausgeprägt wird. M1-Makrophagen gelten als tumorsuppressiv und wehren Mikroorganismen durch die Produktion reaktiver Metabolite ab. M2-Makrophagen, welche dem antiinflammatorischen Typ angehören, werden als tumorfördernd betrachtet. Sie differenzieren sich nach IL-4, IL-13, IL-1R Liganden, IL-10, Kortikosteroiden, TGF- β Stimulation aus (Quatromoni and Eruslanov, 2012). Tumorassoziierte Makrophagen können die Extrazellulärmatrix umbauen und dadurch Tunnel erschaffen, die es Tumorzellen vereinfachen zu metastasieren (Mantovani et al., 2004, Sica and Mantovani, 2012, Shand et al., 2014). Deshalb gehen Tumorassoziierte Makrophagen bei hoher Anzahl mit einer schlechteren Prognose für den Patienten einher (Dandekar et al., 2011). Dies gilt zum Beispiel für das Hodgkin Lymphom, Brustkrebs oder Ovarialkrebs.

Ein wichtiges Ausprägungsmerkmal der Makrophagen sind sogenannte Podosomen. Podosomen sind an der Zelladhäsion und am Umbau der Extrazellulären Matrix (EZM) beteiligt. Der Umbau der EZM kommt unter anderem durch die proteolytische Eigenschaft der Podosomen zustande (Linder et al., 2011). Podosomen bestehen aus einer F-Aktin-reichen Kernstruktur, die von einem Ring aus Zelladhäsionsmolekülen umschlossen werden. Über Integrine sind sie mit der EZM verbunden. Makrophagen bilden die proteolytisch aktiven Podosomen aus und sind dadurch an der Zellinvasion beteiligt (Wiesner et al., 2014).

1.3 Untersuchte Proteine

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Aktin-assoziierte Proteine auf ihren Einfluss auf die Aufnahme von Borrelien durch Makrophagen bzw. auf die Ausbildung eines Borrelien-haltigen Phagosoms untersucht. Hierzu gehören Swiprosin-1 (SWS 1), das Src kinase-associated phosphoprotein 2 (SKAP 2) und das Myosin 1f (Myo 1f).

1.3.1 Swiprosin 1

SWS 1, welches auch als EFHD-2 in der Literatur bekannt ist, wird in Verbindung mit Immunzellen (Vuadens et al., 2004), myokardialer Umstrukturierung (Gircz et al., 2020) und neurologischen Erkrankungen (Borger et al., 2014, Kogias et al., 2019) in Verbindung gebracht. SWS1 wurde bereits in CD8⁺ Lymphozyten (Vuadens et al., 2004), B-Zellen (Mielenz et al., 2005), Neuronen (Vega et al., 2008), Mastzellen und Melanomzellen (Kwon et al., 2013a, Ramesh et al., 2009) nachgewiesen.

Eine der Hauptaufgabe von SWS 1 besteht darin F-Aktin zu bündeln. Insgesamt besitzt ein SWS 1 Monomer drei Aktin Bindungsstellen. Um seine Aufgabe erfüllen zu können, spielt die Struktur des SWS 1 eine wichtige Rolle. Das Protein besteht aus einem ungeordneten N-Terminus, einer

prolinreichen Region, zwei EF-Händen, einer ligand mimic helix region und einer coiled-coil Region am C-Terminus. Die Anwesenheit von Ca^{2+} ist zudem notwendig, damit SWS 1 Aktin bündeln kann. Wenn Ca^{2+} vorliegt, dann dimerisieren zwei SWS 1 Monomere miteinander über deren coiled-coil Struktur (Kwon et al., 2013a). Somit ist die coiled-coil region des SWS 1 wichtig für dessen Dimerisierung und damit dessen Aktin Bündlungsfähigkeit (Park et al., 2016). Ca^{2+} trägt hierbei zur Homodimerisierung des SWS 1 bei und steigert außerdem dadurch die F-Aktin Bündlungsaktivität. (Park et al., 2017) Weiterhin führt Ca^{2+} über die Bindung an den EF-Händen zu einer Steifheit des Swiprosins 1. Diese Starrheit des Proteins ist essentiell für dessen Aktin Bindungsseiten. Ist kein Ca^{2+} vorhanden, kann SWS 1 zwar F-Aktin binden, aber verliert die Bündlungsaktivität. (Park et al., 2016) Bei Fehlen der EF-Hände oder veränderter coiled-coil Region kommt es zu einer verminderten Aktinbündlung (Kwon et al., 2013b).

Die Funktion von SWS 1 wird durch Phosphorylierung reguliert. So führt eine Phosphorylierung an Ser183 zu einer Inhibition der F-Aktin Bündlung (Park et al., 2017).

SWS 1 ist an unterschiedlichen Funktionen beteiligt. So konnte eine Beteiligung an der Zelladhäsion und Membranzumstrukturierung nachgewiesen werden (Park et al., 2017). Durch die Aktinbündlung ermöglicht SWS 1 weiterhin einen zytoskelettalen Umbau innerhalb der Zelle. Es konnte festgestellt werden, dass SWS 1 sich an Mikrovilli ähnlichen Membranzausstülpungen und Lamellipodien anreichert und zu erhöhter Zellmotilität und Zellmigration führt (Kwon et al., 2013b). Zudem verhindert SWS 1 die durch Cofilin vermittelte Depolymerisation des Aktins. Hierzu inhibiert es die Bindung von Cofilin an F-Aktin (Huh et al., 2013).

SWS 1 hat eine wichtige Funktion bei der Reifung von neuronalen Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass SWS 1 das durch Kinesine hervorgerufene Mikrotubulusgleiten inhibiert. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass SWS 1 beim Kinesin abhängigen Transport entlang von Mikrotubuli interferiert. SWS 1 kommt reichlich in Hirnzellen vor und interagiert dort mit mutiertem Tau Protein. Dieses spielt wiederum eine wichtige Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen wie z.B. bei Alzheimer. (Purohit et al., 2014)

In hochmetastatischen Zellen des nicht-kleinen Lungenkarzinoms (NSCLC) kommt SWS 1 ebenfalls vor. Dort konnte eine Rolle bei der Umwandlung von Zellen vom epithelialen zum mesenchymalen Zustand beobachtet werden. Weiterhin ist SWS 1 bei diesem Tumor an der Ausbildung von invasiven Strukturen und der Zellmigration beteiligt. Aufgrund dessen könnte SWS 1 daher als Marker für ein Wiederauftreten von NSCLC nach einer Operation in Frage kommen. (Fan et al., 2017)

1.3.2 SKAP 2

Bei Skap2 handelt es sich um ein Substrat der Src Familien Kinasen (SFK). Das Protein ist auch unter den Namen Skap-Hom, Skap55R, Scap2, RA70 und PRAP in der Literatur beschrieben. (Shimamura et al., 2013) Es kommt vor allem in myeloischen als auch in lymphatischen Zellen vor. (Alenghat et al., 2012, Liu et al., 1998)

Aufgebaut ist Skap2 am N-Terminus aus einer coiled-coil Domäne und zahlreichen phosphorylierbaren Tyrosinresten. Es folgt eine Pleckstrin-homologe Domäne und am C-Terminus befindet sich eine SH3-Domäne. (Zhou et al., 2011) Die coiled-coil Struktur am N-Terminus dient der Homodimerisierung. Mithilfe der Pleckstrin Domäne kann Skap2 mit Lipiden an Membranen interagieren. (Swanson et al., 2008) Skap2 liegt selbst inhibiert bei ruhenden Zellen vor (Alenghat et al., 2012) und kann durch SFK's wie zum Beispiel Fyn, Lyn und Hck phosphoryliert werden (Kouroku et al., 1998).

Skap2 ist an unterschiedlichen Signalwegen beteiligt, da es ein Adapterprotein ist. Es spielt eine Rolle bei Integrin vermittelten Signalen, bei der Interaktion mit dem Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) family Verprolin-homologous protein 2 (WAVE2), Cortaktin und NCK2. (Timms et al., 1999, Pollard and Borisy, 2003, Zhou et al., 2011)

Normalerweise aktivieren Proteine wie WASP und WAVE2 die Aktinpolymerisation über den ARP (actin-related protein) 2/3 Komplex. (Pollard and Borisy, 2003) Für Skap2 konnte gezeigt werden, dass es die Aktinpolymerisation verhindert indem es mit WAVE2 und Cortaktin interagiert. (Ren et al., 2009, Takenawa and Miki, 2001) Im Gegensatz dazu konnte in Neutrophilen gezeigt werden, dass Skap2 über seine SH3 Domäne an WASP bindet und so zur Aktinpolymerisation und Modellierung des Aktinzytoskeletts führt. (Boras et al., 2017) Skap2 interagiert außerdem mit dem Tyrosinkinase Adapterprotein (NCK2) und bildet einen Komplex mit F-Aktin aus. Dieser Komplex wurde bei Lamellipodien an den „leading edges“ von Zellen bei der Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts gefunden. (Zhou et al., 2011)

Skap2 wird für die durch Selektine und Chemokine vermittelte Integrin-Aktivierung benötigt. Es konnte festgestellt werden, dass Skap2 bei der β_2 Integrinaktivierung wichtig ist und weniger Skap2 zu einer wesentlich geringeren Rekrutierung von Neutrophilen in vivo führt. (Boras et al., 2017)

Integrine interagieren in Makrophagen mit dem Signal regulatory Protein α (Sirp α , auch als SHPS-1 bekannt), welches selbst zwischen Membranen gebunden ist. Um diese Interaktion zu ermöglichen spielt das Adapterprotein Skap2 eine wichtige Rolle. Durch Skap2 kommt es, Integrin vermittelt, zur Phosphorylierung von dem Adhesion and degranulation-promoting adapter Proteins (ADAP) und Sirp α . Dabei ist das Binden von Phosphatidylinositol [3,4,5]-triphosphat an die Pleckstrin Domäne von Skap2 und die Phosphorylierung an den Tyrosinresten wichtig um das Protein selbst zu aktivieren. (Alenghat et al., 2012) Insgesamt bewirken Integrine eine Tyrosin Phosphorylierung bei Skap2, welches seinerseits dann mit ADAP interagiert. (Timms et al., 1999) Es wird aber nicht nur Skap2 bei der durch Integrine ausgelösten Signalkaskade phosphoryliert sondern auch das Sirp α . (Alenghat et al., 2012, Johansen and Brown, 2007) Durch diese Phosphorylierungen wird das Signal von außen nach innen in die Zelle transportiert. Skap2 bewirkt letztendlich eine Umstrukturierung des Aktinskeletts, indem es dieses Signal an Aktin weitergibt. Durch den folgenden Umbau des Aktinskeletts ergeben sich die Funktionen wie die Migration der Makrophagen. So ist es möglich, dass es bei einer chemotaktischen Anziehung der Makrophagen es zu einem Umbau des Aktinskeletts kommt und dann zur Gesamtbewegung der Zelle. (Alenghat et al., 2012, Inagaki et al., 2000) Außerdem wird für Skap2 angenommen, dass es an der Zelladhäsion beteiligt ist, durch seine Assoziation mit Integrinen und F-Aktin. (Bourette et al., 2005)

Skap2 lässt sich bei Makrophagen auch an Podosomen während der Zellmigration nachweisen. Erste Befunde aus der Arbeitsgruppe weisen darauf hin, dass Skap2 eine Rolle bei der Regulation der Podosomen-Anzahl spielt. Es wurde außerdem nachgewiesen, dass es bei Tumor assoziierten Makrophagen die Tumordinvasion fördert (Tanaka et al., 2016). Die Podosomeninteraktion beim Skap2 kommt durch die Wechselwirkung mit WASP zustande. In Knockout-Mäusen konnte bei Makrophagen ohne Skap2 gezeigt werden, dass diese nach einer Skap2 Wiederherstellung wieder invasiver wurden. Ferner wurde festgestellt, dass bei der Injektion von Skap2 negativen Makrophagen, diese keine soliden Tumore angreifen konnten und somit das Tumorstadium insgesamt förderten. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Skap2 in Makrophagen die Invasion von Tumoren fördert und somit ein interessantes Ziel sein könnte gegen TAM bedingte Tumor Progression. (Tanaka et al., 2016)

Auch beim Glioblastom scheint Skap2 eine Rolle zu spielen. In Glioblastomzellen ist Skap2 in der Zellperipherie angereichert und interagiert mit WAVE2 und Cortaktin. Skap2 inhibiert die Zusammenlagerung von WAVE2 und Cortaktin und inhibiert damit die Rekrutierung von WAVE2 an die Plasmamembran, was zur Supprimierung der WAVE2-abhängigen-Aktinpolymerisation führt. Durch Inhibierung der Aktinpolymerisation hat Skap2 einen negativen Effekt auf die Tumorprogression von Glioblastomzellen und auf deren Migration. (Shimamura et al., 2013)

Bei Knockoutmäusen wurde gezeigt, dass SKAP2 defiziente Mäuse vermehrt Arteriosklerose ausbildeten als die Kontrollgruppe. Weiterhin wurde festgestellt, dass SKAP2 keine Rolle in Monozyten spielt, aber eine Atherosklerose-protective Wirkung bei Schaumzellen (differenzierten Makrophagen) hat. (Hyatt et al., 2019)

Skap2 hat einen wichtigen Effekt bei der Immunabwehr. So konnte beispielsweise in Skap2 defizienten Mäusen gezeigt werden, dass es zu einer erhöhten Bakterienlast von *Klebsiella pneumoniae* kam. Daraus wurde geschlussfolgert, dass Skap2 wesentlich an der Immunabwehr beteiligt ist. (Nguyen et al., 2020)

1.3.3 Myosin 1f

Myo1f gehört zu den Myosinen der Klasse 1 und wird in Säugetieren exprimiert. Hierbei kommt Myo 1f vor allem in den Zellen des Immunsystems (Makrophagen, natürliche Killerzellen, dendritische Zellen) vor, aber auch in Zellen der Milz, Lunge, Thymus, mesenterischen Lymphknoten und lymphatischem Gewebe. (Kim et al., 2006) Das Protein wurde an sogenannten Aktinwellen lokalisiert gefunden. Bei Aktinwellen handelt es sich um F-Aktin reiche Bereiche innerhalb der Zelle, die sich an der Substrat-zugewandten Seite der Zelle wellenförmig ausbreiten. (Brzeska et al., 2016) Für Myosin 1f konnte eine Rolle bei der Endozytose, Exozytose, in Signalkaskaden, bei der Zelladhäsion, Zellmigration und allgemein der Zellbeweglichkeit gezeigt werden. (Maravillas-Montero and Santos-Argumedo, 2012, Mermall et al., 1998)

Myo1f ist ein Aktin-assoziiertes Motoprotein, welches chemische Energie aus der ATP-Hydrolyse gewinnt und in mechanische Energie umsetzt und so die Fortbewegung von Fracht wie Vesikeln entlang von Aktin-Filamenten bewirkt. Um dieser Aufgabe nachkommen zu können, ist der Aufbau des Proteins von entscheidender Bedeutung. Myo1f besteht aus einem N-Terminal gelegenen Kopf, der ATP hydrolysiert und Aktin bindet. Darauf folgt ein kurzer Hals mit einem Isoleucin-Gluatmin Motiv, welcher Calmodulin bindet und sensitiv für Ca^{2+} ist. Abschließend folgt der C-Terminus der als Proteinschwanz bezeichnet wird. Der Proteinschwanz von Myo1f besteht aus einer Pleckstrin Domäne und einer sogenannten „tail homology“ Domäne 1. Mithilfe dieser beiden Bestandteile kann Myo1f an Membranen binden. Außerdem besteht der Myo 1f-Schwanz noch aus einer- tail homology 2 Domäne, mit der Myo1f in der Lage ist Aktin zu binden. Als letzter Bestandteil des Proteinschwanzes folgt eine SRC homology 3 Domäne (SH3-Domäne). Die SH3-Domäne ermöglicht es dem Protein mit anderen Proteinen zu interagieren, indem eine Bindung an Prolin-reiche Sequenzen erfolgen kann. (Foth et al., 2006, Navinés-Ferrer and Martín, 2020)

Dadurch, dass Myo 1f an Aktin gebunden ist, kann es andere Proteine bzw. Substrate mit Aktin koppeln. So wurde in Mastzellen 3BP2 als Adaptormolekül gefunden, welches an Myo 1f gebunden ist. 3BP2 ist an der Zellmigration beteiligt. Folgerichtig kommt es bei siRNA-induzierter Depletierung von 3BP2 zu verringerter Zellmigration. Hierbei interagiert 3BP2 mit dem Stammzellfaktor, der für Mastzellen ein wichtiges Chemokin darstellt. Über die Bindung von 3BP2 an Myo1f und dieses an Aktin wird letztendlich eine Verbindung von Aktin und dem Stammzellfaktor hergestellt (Navinés-Ferrer et

al., 2019). Dies ist ein Beispiel dafür, dass Bindungen von Molekülen an Myosin 1f zu indirekter Assoziation an das Aktinskelett führen können.

Durch die Regulierung des Aktinzytoskeletts bei der Phagozytose kommt Myo 1f eine Bedeutung bei der Aufnahme und Verarbeitung von Pathogenen, toten Zellen oder Proteinen zu. Auch an der Zellmigration ist Myo 1f über die Beteiligung am Aktinzytoskelett involviert. Dabei spielt die Zellmigration allgemein eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von Infekten oder ist für Tumorzellen wichtig um zu metastasieren. (Navinés-Ferrer and Martín, 2020)

In Myo 1f Knockout Mäusen zeigten Immunzellen eine verminderte Motilität und eine erhöhte Adhäsion. Außerdem konnte bei einem Myosin 1f knockout in Neutrophilen eine geringere Extravasation und Hostabwehr festgestellt werden. Die Myo 1f defizienten Mäuse waren anfälliger für eine Infektion mit *Listeria monocytogenes* und hatten eine vermindert Neutrophilenreaktion. (Kim et al., 2006) Ebenfalls in Myo 1f defizienten Mäusen wurde gezeigt, dass weniger Neutrophile nach der Induktion einer Inflammation in der Lunge, im Kremastermuskel und in der Peritonealhöhle vorhanden waren. (Salvermoser et al., 2018)

Bei der Zellmigration von Neutrophilen hat man festgestellt, dass Myo1f eine Rolle bei der Deformation des Nukleus im Rahmen der Überwindung von 3D Barrieren spielt. In dem Experiment konnten sie bei Fehlen von Myo1f künstlich angelegte Spalten nicht überwinden. Dies bedeutet die Zellen waren nicht flexibel genug die künstlichen Spalten zu durchdringen. Diese Eigenschaft von Myo 1f ist bedingt durch die Fähigkeit des Proteins das Aktinzytoskelett mit Membranen verbinden zu können. Auch mechanischer Druck wird durch diese Bindung von Myosin 1f vom Aktinzytoskelett auf gebundene Membranen, zum Beispiel des Nukleus, übertragen. Es kann geschlussfolgert werden, dass Myo 1f somit auch zur zeitweiligen Formänderung von Zellen und deren Strukturen beiträgt. (Salvermoser et al., 2018)

Die Migration von Neutrophilen spielt eine wichtige Rolle beim ischämischen Schlaganfall. So konnte bei Mäusen mit ischämischem Schlaganfall gezeigt werden, dass Neutrophile als Erste in der akuten Phase des Schlaganfalls im Bereich des Infarkts vorkommen und dann andere Immunzellen anlocken. Für diese Migration der Neutrophilen hat das Myo1f eine wichtige Rolle gespielt in der Fortbewegung der Zelle. (Wang et al., 2019)

In Makrophagen wird Myo1f eine Rolle bei der Polarisation zum pro inflammatorischen M1-Typ zugeschrieben. So konnte gezeigt werden, dass ein Fehlen von Myo1f die Umwandlung zum pro inflammatorischen Typ reduzierte. Außerdem wurde bei dem Krankheitsbild der Kolitis festgestellt, dass bei Fehlen von Myo1f weniger durch Makrophagen verursachter Epithelschaden vorhanden war. Dies führt man darauf zurück, dass weniger proinflammatorische Makrophagen anwesend waren und die Ausschüttung von Zytokinen insgesamt vermindert wurden. (Piedra-Quintero et al., 2018)

Es wird außerdem berichtet, dass mutiertes Myosin 1f die Tumorprogression von Schilddrüsenkrebs begünstigen kann und einen Effekt auf die Mitochondrien hat. (Diquigiovanni et al., 2018) Weiterhin wird für Myo 1f beschrieben, dass es an Schwerhörigkeit bzw. Taubheit beteiligt ist, da bei Patienten entsprechende Mutationen im Myo1f Gen gefunden wurden. Worauf die Schwerhörigkeit genau zurückzuführen ist, auf eine erhöhte Infektanfälligkeit oder eine abnormale Neutrophilen Reaktion , bleibt aber noch zu klären. (Chen et al., 2001)

1.4 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Es wurden bereits einige Proteine und Mechanismen, die eine Rolle bei der Reifung von Borrelien-haltigen Phagolysosomen in Makrophagen spielen, identifiziert. Der genaue Mechanismus, wie Borrelien in Makrophagen letztendlich verdaut werden, ist bis jetzt jedoch unzureichend geklärt. Es wird eine Beteiligung weiterer Regulator- und Effektor-Proteine diskutiert.

Im Rahmen einer früheren Vorarbeit wurden die Proteine SWS1, Skap2 und Myo1f an Borrelien-haltigen Phagosomen massenspektrometrisch nachgewiesen. Meine Arbeit verfolgt das Ziel zu klären, ob die oben genannten Proteine tatsächlich an Aufnahmestrukturen oder an Phagosomen lokalisieren und diese Prozesse beeinflussen. So könnten diese Proteine möglicherweise einen Einfluss auf den Kompaktierungsprozess von *Borrelia burgdorferi* in primären humanen Makrophagen haben, der eine notwendige Zwischenstufe in der intrazellulären Prozessierung der Spirochäte darstellt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tab. 1: Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklavierer	Thermo Scientific
Automatische Pipette	Eppendorf
Flockeneisbereiter AF-10	Scotsman
Gelkammer (SDS-Page)	PeqLab und Bio-Rad
Handschuhe	WRP Dermagrip
iBlot2	Life Technologies
Inkubatoren	Binder, Thermo Scientific, Sanyo
Li-Cor	Bioscience
Mikroskope: - Dragonfly 505 - ECLIPSE Cl - ECLIPSE TS100 - TCS SP8	- Andor - Nikon - Nikon - Leica
NanoDrop ND-1000	PeqLab
Neubauer Zählkammer	Hartenstein
NEON Transfektionssystem	Life Technologies
Netzgeräte (PeqPower 250/300)	PeqLab
pH-Meter	Mettler-Toledo
Pipetboy	Integra
Scanner (CanoScan 4400F)	Canon
Schüttelinkubator (Certomat BS-1)	Sartorius
Schüttler	Edmund Bühler GmbH
Spektrometer	Amersham Bioscience
Thermocycler	PeqLab
Vortexer	Janke&Kunkel GmbH&Co. KG
Waage (440-47N)	Kern
Wasserbad	Grant Instruments
Werkbank Hera Safe	Thermo Scientific
Zentrifugen - Sorvall RC-5B/ RC28S - 5417R/5810R/MiniSpin,	- Thermo Scientific - Eppendorf

2.1.2 Computerprogramme

Tab. 2: Computerprogramme

Computerprogramm	Hersteller
ImageJ	NIH
Image Studio	Li-Cor Biosciences
Imaris Viewer	Oxford Instruments Group
Leica LAS X Core	Leica Microsystems
Office (Word, Excel, Powerpoint)	Microsoft
Paint	Microsoft

2.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Medienlösungen

Tab. 3: chemische Substanzen

Name	Hersteller
2-Propanol	Chemsolute
Accutase	Invitrogen
Antifect	Schülke
APS	BioRad
Borrelienmedium: - BSK-H - Kanamycin - Gentamycin - Kaninchenserum	- Bio & Sell - Serva - Serva - Bio & Sell
Bradfordreagenz	BioRad
BSA	Roth
CD14 beads	Miltenyi Biotec
Dimethylsulfoxid	Roth
DPBS	Thermo Scientific
EDTA	Roth
Ethanol 96%	Roth
Formaldehyd-Lösung 37 %	Sigma-Aldrich
Hoechst 33342	Life Technologies
Lymphozyten Separations Medium 1077	PAA Laboratories
Milchpulver	Roth
Monozytenmedium - RPMI 1640 + - 20% Serum + - 1% (Penicillin und Streptomycin)	Im Labor hergestellt - Thermo Scientific - Von Spendern des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (Transfusionsmedizin) - Sigma-Aldrich
Mowiol	Roth
PageRuler Plus prestained	Thermo Scientific
Phalloidin	Thermo Scientific
Proteaseinhibitor	Roche
RPMI	Thermo Scientific
SDS	Roth
SuperSignal West Femto und Pico	Thermo Scientific
TEMED	BioRad
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Tween 20	Sigma-Aldrich

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Tab. 4: Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Deckplättchen	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG
Eppendorf tube: 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt
Falcon Röhrchen: 15 und 50 ml	Sarstedt
Multiwell Platte	Sarstedt
Objektträger	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG
Parafilm „M“	American Can Company
Pinzette	Manufactures D'Outils Dumont SA
Pipettenspitzen: 10 µl, 100µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt
Serologische Pipettenspitze: 5ml, 10 ml, 25ml	Sarstedt
Servietten	Tapira
Skalpel	B. Braun Melsungen AG
Sterilfilter	Sarstedt

2.1.5 Borrelienstämme

Tab. 5: *Borrelia burgdorferi* Stämme

Stammbezeichnung	Herkunft
B31 ATCC 35210 (wt-BB)	Peter Kraiczy (Universitätsklinikum Frankfurt am Main)
GBC726 5A4 NP1 (kanR) + pTM61 (GFP, genR) (GFP-BB)	(Moriarty et al., 2008)

2.1.6 Antikörper

Tab. 6: Primäre und sekundäre Antikörper

Name des Antikörpers	Spezies	Hersteller
Anti- <i>Borrelia burgdorferi</i>	Kaninchen	Antikoerper-online
Anti- <i>Borrelia burgdorferi</i>	Maus	Novus Biologicals
Anti-SWS1	Kaninchen	Invitrogen
Anti-SKAP2	Kaninchen	Proteintech
Anti-Myo1f	Maus	Santa Cruz
Anti-Maus-HRP	Schaf	GE Healthcare
Anti-Kaninchen-HRP	Esel	GE Healthcare
Anti-Maus-Alexa Fluor 488, 568, 647	Esel oder Ziege	Thermo Scientific
Anti-Kaninchen-Alexa Fluor 488, 568, 647	Esel oder Ziege	Thermo Scientific
Phalloidin Alexa Flour 488, 568, 647	-	Thermo Scientific
Hoechst 33342	-	Thermo Scientific

2.1.7 Proteinkonstrukte

Tab. 7: Plasmide für Konstrukte der Überexpression und live cell imaging

Name	Herkunft
GFP-SWS1	Von P. Cervero erhalten
mCherry-SWS1	Von P. Cervero erhalten
GFP-SKAP2	(Zhou et al., 2011)
GFP-Myo1f	Von M. Krendel erhalten
mCherry-Myo1f	Von M. Krendel erhalten
RFP-SNX3	(Pons et al., 2008)
RFP-Rab5a	Von S. Grinstein erhalten

2.1.8 siRNA

Tab. 8: Oligonucleotidsequenz der siRNA für Knockdown Experimente

Name	Referenz	Sequenz
SWS1 #1	Invitrogen	5'-GACUUUGACAGCAAGCUGA-3'
SKAP2 #1	Von P. Cervero erhalten	5'-CAGAUAUACUGAAAGGAGA-3'
Myo1f #7	Dharmacon	5'-ACAUGGAGCCCACCAGUA-3'

2.2 Methoden

2.2.1 Experimente mit Makrophagen

Es wurden Monozyten aus der humanen Vollblutspende isoliert und bei uns im Labor zu Makrophagen herangezogen. Der Name primäre humane Makrophagen leitet sich davon ab, dass ich die Experimente mit Makrophagen aus Vollblutspenden von humanen Blutspendern des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf durchgeführt habe, also keine Zelllinie benutzt habe, sondern Zellen direkt von unterschiedlichen Spendern.

Nach der Anzucht und Kultivierung der Makrophagen wurden Experimente mithilfe der Elektroporation oder mithilfe des Viromer Blue Transfektionsreagenz durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen im live cell imaging oder mittels Immunfluoreszenzfärbung im konfokalen Lasermikroskop ausgewertet.

2.2.1.1 Monozytenisolierung und Makrophagenanzucht

Die Monozytenisolierung erfolgte aus dem buffy coat, einer milchig aussehenden Schicht, nach Zentrifugation (Eppendorf 5810 R) von Vollblut. Der buffy coat bildet sich als optisch differenzierbare Schicht zwischen den Erythrozyten und dem Plasma und enthält Monozyten, Lymphozyten aber auch Thrombozyten. Die CD14 positiven Monozyten werden über magnetische Beads die gegen CD14 gerichtet sind an einer Magnetsäule festgehalten und isoliert.

Zunächst wird 15 ml vom Lymphozytenseparationsmedium in ein 50ml Falcon gefüllt. Hierauf wird vorsichtig 20ml vom buffy coat pipettiert, damit sich dieses nicht mit dem Lymphozytenseparationsmedium mischt, sondern sich darauf absetzt. Anschließend wird die zuvor schon auf 4°C heruntergekühlte Zentrifuge für 30 min bei 1500 rpm mit den Falcons beladen. Während der Zentrifugation wurden 50ml Röhren mit RPMI mit je 10 ml vorbereitet. In diese kommt dann der milchig weiße Teil, der nach der 30 minütigen Zentrifugation entstanden ist. Auch dieser Schritt wurde vorsichtig durchgeführt um nicht wieder zu vermischen. Anschließend wurden die 50 ml Falcons mit

RPMI auf 50 ml aufgefüllt und erneut bei gleichen Bedingungen für 10 Minuten zentrifugiert. Nachdem sich ein Sediment gebildet hatte, wurde der Überstand an RPMI verworfen und erneut die Zellen in RPMI resuspendiert und schließlich in ein Gefäß zusammengeführt. Dieses wurde erneut bei 4°C, 1500 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Es entstand nun ein Sediment am Boden des Falcons, welches mit Monozytenpuffer 1,5 ml resuspendiert wurde, nachdem der Überstand verworfen wurde. Der Monozytenpuffer besteht aus 5mM EDTA und 0,5% humanes Serumalbumin in DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline). Zu der Suspension aus Zellen und Monozytenpuffer wurden die auf Eis gelagerten magnetischen CD14-beads hinzugegeben. Man inkubiert diese Suspension für 15 Minuten auf Eis, damit die anti-CD14-beads binden können. Die Säulen am Magnetständer wurden mit 1 ml Monozytenpuffer benetzt, sodass nun die Monozyten mit den an CD14 gebundenen beads hinzugegeben wurden. Anschließend wurde die Säule 2x mit Monozytenpuffer gespült, sodass nur die Monozyten mit beads an der Magnetsäule hängenbleiben. Danach wurde die Säule vom Magnetständer entfernt und 3 ml Monozytenpuffer auf die Säule pipettiert in ein 20 ml Falcon mit RPMI. Es wurde dann mithilfe einer Neubauerzählkammer die Zellzahl bestimmt.

Anschließend begann die Aussaat von $2 \cdot 10^6$ Zellen mit 1ml RPMI in ein well einer 6 well Platte. Diese Platte wurde im Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit bebrütet. Das anfänglich benutzte RPMI wurde nach 3h mit teilweise toten bzw. nicht adhärenen Zellen entfernt und durch 1,5ml Monozytenmedium ersetzt. Das Monozytenmedium bestand aus Humanserum und einem Mix aus 100 mg/mL Penicillin-Streptomycin. Nach einem Tag wurde das Monozytenmedium gewechselt. Die im Monozytenmedium vorhandenen Wachstumsfaktoren und Zytokine des Humanserums führen nun innerhalb einer Woche im Inkubator unter oben genannten Konditionen zur Ausdifferenzierung der Monozyten zu primären humanen Makrophagen.

2.2.1.2 Ablösen der Makrophagen und Aussäen und Kultivierung auf Deckplättchen

Nachdem sich die Monozyten innerhalb einer Woche ausdifferenziert hatten, wurde das Monozytenmedium entfernt von der 6-well Platte und die Makrophagen mit DPBS einmal gewaschen. Anschließend wurde in ein well 500 µL Accutase hinzugegeben für 30 min, damit sich die Zellen von der Platte lösen lassen. Anschließend wurden weitere 500 µL Monozytenmedium hinzugegeben, wodurch die Reaktion gestoppt wurde. Durch Auf und Abpipettieren von dann insgesamt 1ml pro well wurden die Zellen abgelöst und in einem 15ml Falcon gesammelt. Dieses wurde dann bei 20°C für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 3ml DPBS resuspendiert. Es wurde dann mithilfe der Neubauerzählkammer die Zellzahl pro Volumeneinheit ermittelt. Nach Ermittlung der Zellkonzentration wurde erneut unter gleichen Bedingungen für 5 min zentrifugiert und die benötigten Zellen entnommen. Hierzu wurden Deckplättchen in einer 15-well Platte vorbereitet. Pro Plättchen wurden 100 - 200 000 Zellen ausgesät, die nun adhären werden konnten und mit denen nun die Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt werden konnte, beispielsweise um SWS1 endogen anzufärben. Weitere Zellen wurden entnommen und nicht direkt ausgesät für die Elektroporation oder Knockdown Experimente.

2.2.1.3 Elektroporation mittels Neon Elektroporationssystem (Invitrogen)

Die Transfektion erfolgt mit dem Neon Elektroporationssystem von Invitrogen. Hierbei werden jeweils Zellen auf ein Deckplättchen von 12 mm oder 18 mm Durchmesser verteilt. Für die Konstrukte GFP-SWS1, mCherry-SWS1, GFP-SKAP2 und mCherry-Myo1f wurde 0,5µg hochreiner Plasmid-DNA für 100 000 Zellen benutzt. Für die Konstrukte RFP-SNX 3 und RFP-Rab5a wurde 1µg hochreiner Plasmid-DNA verwendet.

Zunächst wurden die Zellen zentrifugiert und in 12µL R-Puffer resuspendiert. Es wurde dann jeweils die DNA zur Zellsuspension gegeben. Weiterhin wurde eine Küvette mit 3ml E2-Puffer in das Transfektionsgerät eingesetzt. Aus der Suspension von Zellen, R-Puffer und DNA wird mit den Transfektionsspitzen, ohne Luftblasenaufnahme, 10µL pipettiert. Luftblasen sind unbedingt zu vermeiden, da diese den elektrischen Stromimpuls stören könnten. Die Transfektionsspitze wird in die Küvette mit dem E2-Puffer gesetzt und anschließend erfolgt der Stromimpuls zweimal für 40 ms bei 1 000 V. Durch den Stromimpuls wird die Zellmembran permeabilisiert und die Plasmid-DNA kann aufgenommen werden in die Zelle.

Die transfizierten Zellen werden direkt auf das 12 mm Deckplättchen gegeben und mit 100µL Monozytenmedium, welches schon vorbereitet und auf 37°C erwärmt wurde. Die Zellen werden für 1h bei 37°C bebrütet. Nach einer Stunde wurde auf 1 ml mit Monozytenmedium aufgefüllt. Die Stunde dient den Zellen adhären auf dem Deckplättchen zu werden. Insgesamt wurde 4 Stunden gewartet, bis die Überexpression stattgefunden hatte, bevor die nächsten Schritte erfolgten.

Wurde das 18 mm Durchmesser fassende Deckplättchen verwendet, so wurde die Prozedur jeweils zweimal durchgeführt, sodass auf dem Plättchen 200 000 Zellen anstatt 100 000 vorhanden waren. Das Monozytenmedium wurde entsprechend verdoppelt und es wurde zweimal transfiziert, also auch doppelt so viel R-Puffer verwendet.

2.2.1.4 Knockdown Experimente

Die Knockdown Experimente erfolgten mit der Übertragung von siRNA (small interfering RNA) mittels Viromer Blue als Transfektionsreagenz in die Makrophagen. Zunächst wurden die Makrophagen, die auf der 6-well Platte ausgesät waren bereitgestellt. Dafür hat man das Monozytenmedium entfernt und die Zellen einmal mit DPBS gewaschen. Dann wurde frisches Monozytenmedium 2 ml pro well hinzugegeben. Währenddessen mixte man den Blue Buffer mit dem Viromerpolymer für 5 Sekunden auf dem Vortexer und ließ das Gemisch für 15 min bei Raumtemperatur wirken einschließlich der jeweils zu verwendenden siRNA.

Nach den 15 Minuten wurde das Gemisch auf die Zellen getropft und die Makrophagen wurden für 72 h inkubiert bzw. im Fall von Myo1f-siRNA für 96 h.

2.2.2 Experimente mit Borrelien

Makrophagen wurden mit Borrelien nativ infiziert und dann wurden die endogenen Proteine SWS1, SKAP2 und Myo1f angefärbt. Außerdem wurden die Makrophagen mit Borrelien infiziert nach erfolgtem Knockdown der oben genannten Proteine. Zusätzlich wurden die Makrophagen nach der Elektroporation zur Überexpression bzw. Expression bestimmter Konstrukte mit Borrelien infiziert und zwecks live cell imaging.

Für das Experiment der nativen Anfärbung der Proteine SWS1, SKAP2 und Myo1f wurden die nach Accutase Ablöseprozedur abgelösten Makrophagen auf 12 mm Deckplättchen ausplattiert. Anschließend erfolgte die Infektion mit wt-Borrelien (MOI = 100:1) bzw. GFP-exprimierende Borrelien (MOI = 15:1) jeweils in RPMI für 20 – 40 min bei 37°C im Inkubator. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen und mit 3,7 %-igem Methanol haltigem Formaldehyd für eine Dauer von 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Für die endogene Färbung wurde eine Permeabilisierung der Makrophagen mit 0,1 % Triton-X-100 in PBS erreicht bei einer Dauer von 10 min unter Raumtemperatur. Danach wurde das Triton abgesaugt und erneut mit PBS gewaschen. Nun standen die fixierten und permeabilisierten für die Immunfluoreszenzfärbung bereit.

Bei den Knockdownexperimenten wurden die Zellen nach der 3 bzw. 4-tägigen Inkubation mit dem Viromer-siRNA-Gemisch mittels Accutase wie oben beschrieben abgelöst. Analog zum Experiment der endogenen Färbung erfolgte die Ausplattierung auf 12 mm Deckplättchen. Anschließend wurde eine Infektion mit wt-Borrelien (MOI = 100:1) in RPMI für 40 min bei 37°C im Inkubator durchgeführt. Daraufhin erfolgte die Absaugung des RPMI-Borrelien-Gemisches, gefolgt von drei Waschschrritten mit PBS. Danach wurden die Zellen mit 3,7 %-igem Methanol haltigem Formaldehyd für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Genau wie bei der endogenen Färbung erfolgte die Permeabilisierung mit Triton für 10 min bei Raumtemperatur und folgendem Waschschrtritt. Anschließend wurde abgesaugt und erneut mit PBS gewaschen. Nun fand die Immunfluoreszenzfärbung statt.

Für die Experimente nach der Elektroporation zur Überexpression wurden die Zellen, die direkt auf Deckplättchen ausgesät waren nach einer Dauer von 4 h mit Borrelien infiziert. Hierzu wurde das Monozytenmedium abgesaugt und anschließend mit DPBS 2x gewaschen. Anschließend erfolgte die Infektion mit wt-Borrelien (MOI = 100:1) für 40 min im Inkubator bei 37°C. Danach wurde erneut abgesaugt und 3x mit PBS gewaschen. Es erfolgte nun die Fixierung mit 3,7 %-igem Methanol haltigem Formaldehyd für 10 min bei Raumtemperatur und einem erneuten Absaug- und Waschschrtritt mit PBS. Wie bei der endogenen Färbung als auch den Knockdown Experimenten wurden die Zellen mit Triton unter gleichen Bedingungen permeabilisiert und anschließend mit PBS gewaschen. Danach wurde die Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt.

Die Zellen, die auf dem 18mm Deckplättchen kultiviert wurden, wurden für das live cell imaging genutzt. Hier erfolgte die Infektion direkt nach dem Entfernen des Monozytenmediums. Anschließend wurde die Mikroskopie am Dragonfly 505 Mikroskop durchgeführt.

Die wt-Borrelien wurden in BSK-H (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) bzw. die GFP-Borrelien in BSK II Medium (mit 6% Kaninchenserum) aufbewahrt und unter Antibiotika Druck angezüchtet. Es wurde 100µg/ml Gentamicin und 200µg/ml Kanamycin genutzt. Die Borrelien wurden im Inkubator bei 33°C, 1% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit gehalten.

2.2.3 Herstellung eines Western Blots

Zunächst wurde das Gel für die SDS-Page hergestellt. Nachdem die Zellysate in richtiger Konzentration bereit standen, fand die elektrophoretische Auftrennung statt. Anschließend wurde der Western Blot durchgeführt und die Membran entwickelt und ausgewertet.

2.2.3.1 Gelherstellung für die Proteinauftrennung

Es wurde ein Gel der Firma BioRad für die SDS-PAGE hergestellt. Dieses bestand aus einem Trenngel und einem Sammelgel. Zunächst hat man die Kammer für das Gel zusammengesetzt. Anschließend wurde das Trenngel gegossen, hierzu wurde jeweils 3ml des Produktes Resolver A und Resolver B gemischt. Anschließend wurde 30 µL 10 %-iges APS und 3 µL TEMED hinzugegeben um die Reaktion der Polymerisation zu starten. Anschließend wurde eine kleine Schicht Ethanol hinzugefügt, damit ein glatter Rand entsteht bevor das Sammelgel gegossen wurde. Nach Verdampfen des Ethanols wurde das Sammelgel bestehend aus jeweils 1 ml Stacker A und Stacker B sowie 10 %-igem APS der Menge 10 µL und 2 µL TEMED hergestellt. Nach ca. 1h war das Gel bereit zur Benutzung oder wurde mit Wasser angefeuchtet bei 4°C gelagert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer Spannung von 200 V für 45 min.

2.2.3.2 Zellysate Herstellung

Zur Herstellung der Zellysate wurden die mit dem Viromer-siRNA-Gemisch behandelten Zellen zunächst auf Eis gestellt und das Nährmedium abgesaugt. Anschließend wurde 1 ml Lysepuffer bestehend aus 50 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100 und Proteaseinhibitor hinzugegeben je well und für 10 min auf Eis wirken gelassen. Dann wurden mit einem Zellschaber die Zellen aus dem well abgekratzt und jeweils in ein Eppendorf tube überführt. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 12 000 rpm bei 4°C für 10 min, sodass die Zelltrümmer getrennt werden konnten. Anschließend erfolgte die Proteinkonzentrationsbestimmung des Überstandes und die Beladung mit dem SDS-Ladepuffer (125 mM Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS, 10% Glycerin, 10% β -Mercaptoethanol und 0,02% Bromphenolblau)

2.2.3.3 Proteinkonzentrationsbestimmung mithilfe der Methode nach Bradford

Damit im Polyacrylamid Gel eine Beladung ähnlicher Proteinkonzentrationen erfolgen kann, wird eine Konzentrationsbestimmung durchgeführt. 1 ml Bradford Reagenz wurde hierzu in ein Eppendorf tube gegeben und dazu 2 μ L vom Lysat bzw. für die Kalibrierlösung 2 μ L Lysepuffer. Die Eppendorf tubes wurden kurz gevortext und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte nach Kalibrierung die Messung am Spektrometer (Ultraspec 3100 pro, Amersham Bioscience). Je nach Abweichung der auf eindeutigen BSA-Verdünnungen basierenden Kalibrierkurve wurden die Proben verdünnt.

2.2.3.4 Proteinübertragung auf die Membran

Die Proteinübertragung auf die Nitrocellulosemembran von der SDS-Page erfolgte am iBlot2 (Thermo Scientific). Hierzu wurde das Sammelgel vom Trenngel getrennt und das Gel kurz mit ddH₂O gewaschen und in die zuvor aufgebaute Transferkammer des iBlot ohne Blasenbildung gebracht. Die Blasenbildung ist zu vermeiden, da dadurch die Proteine nicht vom Gel auf die Membran übergehen können. Die Proteinübertragung erfolgte bei Auswahl des Programm P3 (7min, 20V). Anschließend wurde die Membran angefärbt und entwickelt.

2.2.3.5 Färbung und Entwicklung des Western Blots

Die Membran wurde zunächst mit 5%igem Magermilchpulver in TBS-T bestehend aus 50 mM Tris-HCl pH 7,8; 150 mM NaCl und 0,3% Tween 20 für 1h behandelt. Anschließend wurde der erste Antikörper (gegen SWS1, SKAP2, Myo1f und BB) in einer 5 %-igen BSA Lösung in TBS-T über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde drei mal mit TBS-T für 5 min auf dem Schüttler gewaschen. Es wurde nun der sekundäre Antikörper in einer 5 %-igen Magermilchlösung in TBS-T, welcher die Peroxidase enthält, die später das Substrat umsetzt, für 1h mit der Membran auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgten drei 10-minütige Waschschrte mit TBS-T. Das Substrat für die Peroxidase stammt aus dem SuperSignal West Pico oder Femto Chemiluminescent Produkt der Firma Thermo Scientific. Die Detektion erfolgte mit dem Li-Cor der Firma Bioscience.

2.2.4 Immunfluoreszenzfärbung

Die permeabilisierten und gewaschenen Zellen wurden nun mit 30 μ L einer 3 %-igen BSA Lösung für 45 min geblockt. Danach wurde die Blocklösung abgesaugt und der erste Antikörper (gegen wt-BB, SWS1, SKAP2 oder Myo1f) ebenfalls in einer Blockierlösung aber 1:1000 verdünnt für 1h hinzugegeben und bei Raumtemperatur inkubiert. Nach abgelaufener Zeit wurde abgesaugt und drei mal mit PBS gewaschen. Der sekundäre Antikörper, welcher jeweils gegen den Fc-Teil des ersten Antikörpers gerichtet war, wurde in 1:200 Verdünnung und das Phalloidin in 1:50 Verdünnung jeweils in PBS für 45 min inkubiert bei Raumtemperatur. Hierzu fand eine Abdunkelung der Platte statt, da am sekundären Antikörper jeweils das lichtsensible Fluorophor gebunden war. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde zweimal mit PBS gewaschen und die Deckplättchen standen für Übertragung auf den Objektträger bereit. Hierzu wurde 6 μ L Mowiol Lösung (100 mM Tris-HCl pH 8,5; 10% Mowiol, 25 % Glycerol und 2,5% Triethylendiamin) auf den Objektträger pipettiert. Die Deckplättchen wurden luftblasenfrei auf die Lösung mit einer desinfizierten Pinzette gebracht. Nach Abdunkelung der Objektträger aufgrund der gebundenen Fluorophore, wurden diese über Nacht zum Aushärten der Mowiol Lösung gelagert. Anschließend wurden die Präparate mikroskopiert.

2.2.5 Mikroskopie

Mikroskopiert wurden die fixierten als auch die lebenden Zellen am konfokalen Mikroskop. Genutzt habe ich hierzu das Leica SP8 X und das Andor Dragonfly 505. Dabei werden die Fluorophore mit einem Laser angeregt und ein Detektor nimmt das dann emittierte Licht auf und überträgt dieses Signal an den Computer. So kann mit dem Laser Punkt für Punkt die Zelle durchgerastert werden und die mit Fluorophor markierten Proteine bzw. Bestandteile sichtbar gemacht werden.

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Interaktionen der drei Proteine SWS1, SKAP2 und Myo1f bei der intrazellulären Prozessierung von *Borrelia burgdorferi* an Aufnahmestrukturen und Borrelien-haltigen Phagosomen untersucht, wenn diese in primären humanen Makrophagen aufgenommen werden. Die Resultate für die drei Proteine sind nachfolgend dargestellt.

3.1 SWS1 ist an Podosomen, Filopodien und Pseudopodien lokalisiert

Zunächst wurde die Verteilung von SWS1 in primären humanen Makrophagen dargestellt. In fixierten Zellen wurde endogenes SWS1 mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers sichtbar gemacht. Eine Rolle von SWS1 an Lamellipodien und Zellprotrusionen wurde beschrieben in Krebszellen z.B. des malignen Melanoms. (Huh et al., 2015)

Eine Co-Färbung in fixierten Zellen von F-Aktin durch Alexa568-Phalloidin zeigte, dass SWS1 wie zu erwarten an Podosomen lokalisiert ist (Abb. 2)

Im live cell imaging konnten die sogenannten „membrane ruffles“ zu deutsch Pseudopodien sichtbar gemacht werden. Hierfür wurde ein mCherry-SWS1-Konstrukt in die Makrophagen mittels Elektroporation eingebracht und dadurch im konfokalen Lasermikroskop sichtbar. Im Querschnitt zweier Makrophagen (Abb. 3) zeigt sich eine Verteilung des mCherry-SWS1 in den Pseudopodien.

Anschließend wurde eine weitere Zelle im live cell imaging beobachtet, die ebenfalls mCherry-SWS1 exprimiert und lifeact blue. Dieses dient dazu F-Aktin sichtbar zu machen. In dieser Zelle wurde ein Filopodium beobachtet, dass gerade nach einer Borrelie greift. Man erkennt, dass mCherry-SWS1 nebst lifeact blue in dem Filopodium lokalisiert ist. (Abb. 4 H-H1)

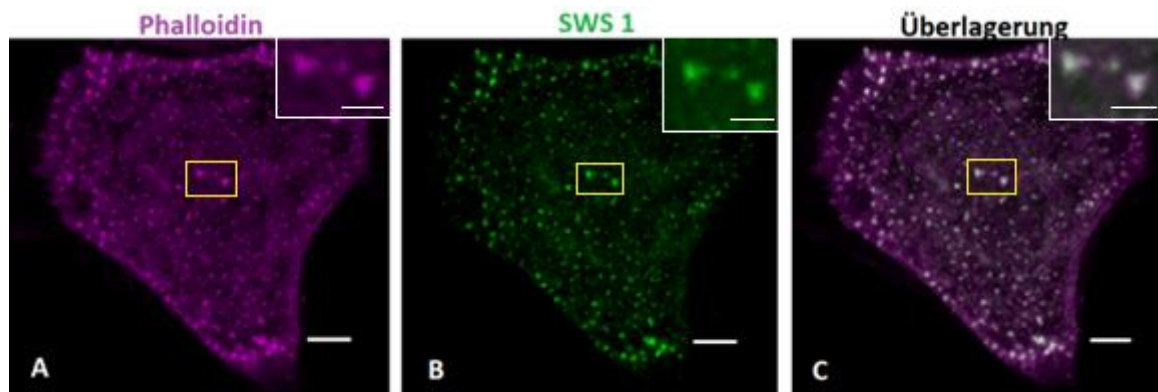


Abb. 2: SWS1 reichert sich in Podosomen in primären humanen Makrophagen an. A: Übersicht über das F-Aktin in der Zelle mittels Alexa568-Phalloidin. B: endogenes Staining von SWS1 mittels eines SWS1 spezifischen Antikörpers. C: Überlagerung beider Kanäle. Man erkennt anhand der weißen Punkte in der Überlagerung, dass SWS1 in Podosomen vorkommt. Maßstab 10 μ M und 1 μ M.

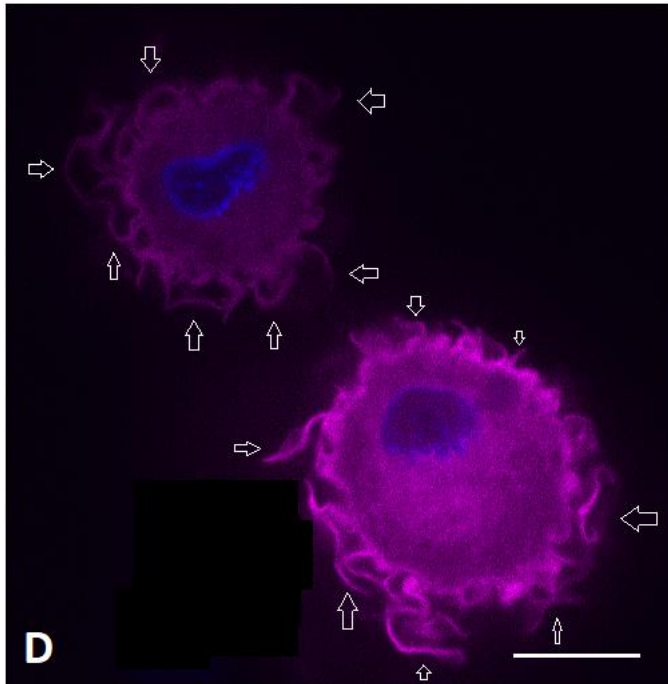


Abb. 3: Querschnitt zweier Makrophagen im live cell imaging bei der Expression von mCherry-SWS1. D: Man erkennt im Querschnitt den Nukleus in blau bei einer konfokalen Aufnahme. Man sieht die Verteilung des mCherry-SWS1 in den Zellen, wobei vor allem in den mit Pfeilen markierten Zellprotrusionen SWS1 angereichert ist. Maßstab 10µM.

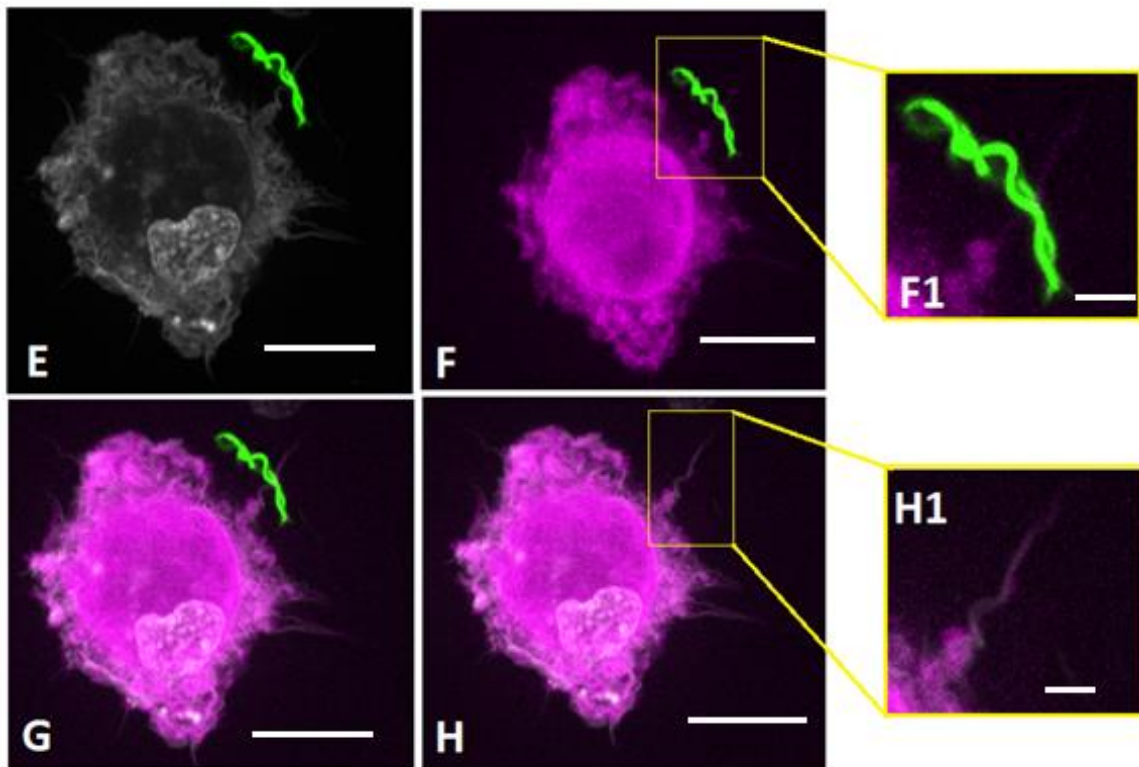


Abb. 4: mCherry-SWS1 und lifeact blue in einem Makrophagen, welches dabei war eine GFP-Borrelie mit seinem „Arm“ dem Filopodium zu fangen. E: lifeact blue Verteilung in der Zelle. Man erkennt das Grundgerüst der Zelle und die GFP-Borrelie. F – F1: mCherry-SWS1 mit in der Zellprotrusion welche nach der Borrelie greift. G: Überlagerung von lifeact blue, mCherry-SWS1 und GFP-Borrelie. H-H1: Man erkennt, dass lifeact blue und SWS1 in dem Filopodium kolokalisieren. Maßstab 1 und 10 µM

3.2 SKAP2 und Myo1f lassen sich an Podosomen nachweisen

Wie bereits die Arbeiten (Tanaka et al., 2016) und (Zhang et al., 2019) nahelegen, sind die Proteine SKAP2 und Myo 1e am Aufbau und der Regulation der Podosomen beteiligt. Es wurde SKAP2 und Myo1f wie bereits SWS1 endogen mit einem spezifischen Antikörper und Alexa568-Phalloidin dargestellt, um die Verteilung der Proteine in primären, humanen Makrophagen darzustellen. In meinen Experimenten konnte ich eine Beteiligung an den Podosomen in den Makrophagen ebenfalls nachweisen und die bisherigen Ergebnisse verifizieren.

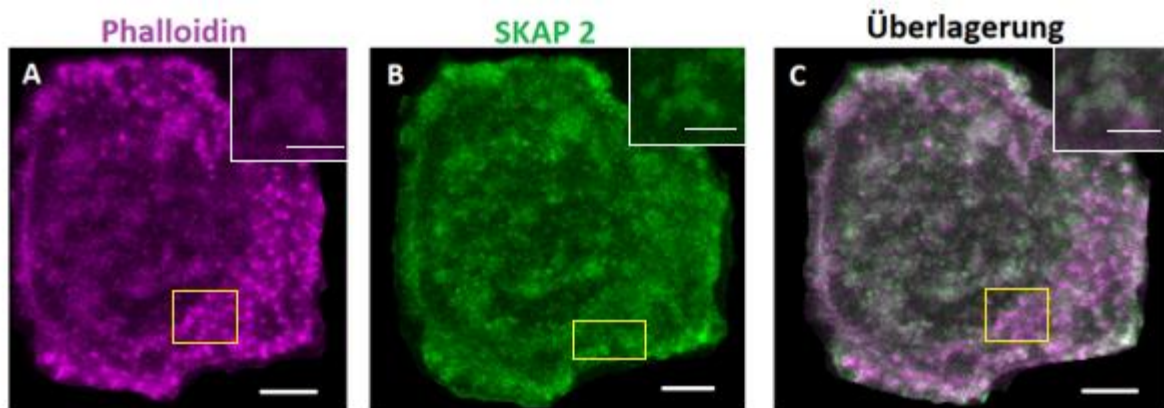


Abb. 4: SKAP2 ist teilweise an Podosomen in primären humanen Makrophagen lokalisiert. A: Übersicht über das F-Aktin in der Zelle mittels Phalloidin. B: endogenes Staining von SKAP2 mittels eines SKAP2 spezifischen Antikörpers. C: Überlagerung der Phalloidin und SKAP2. Man erkennt, dass SKAP2 an den Podosomen lokalisiert ist. Maßstab 10µM und 1 µM.

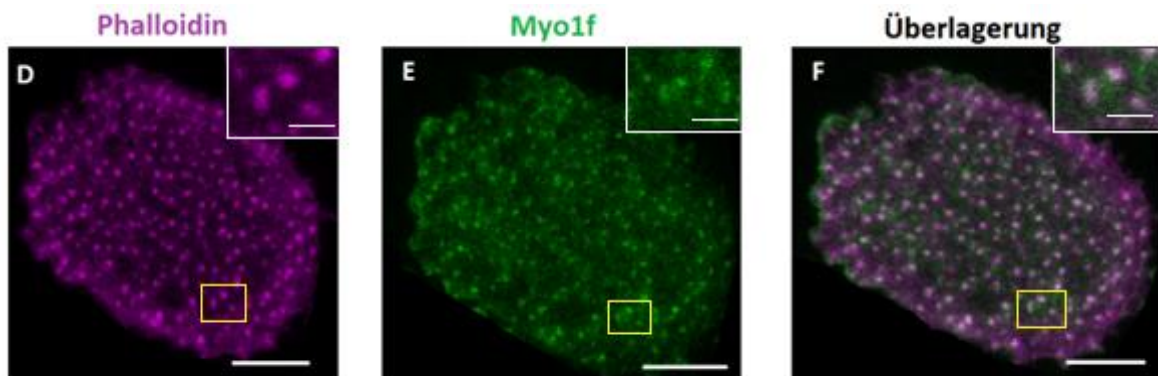


Abb. 5 Myo1f lokalisiert an den Podosomen in primären humanen Makrophagen. A: Übersicht über das F-Aktin in der Zelle mittels Alexa568-Phalloidin. B: endogenes Staining von Myo1f mittels eines Myo1f spezifischen Antikörpers. C: Überlagerung der Phalloidin und Myo1f markierten Bereiche. Man erkennt anhand der weißen Punkte in der Überlagerung, dass Myo1f mit F-Aktin am Aufbau von Podosomen beteiligt ist. Maßstab 10 µM und 1 µM.

3.3 SWS1 lokalisiert an Aufnahmestrukturen von Borrelien und an Phagosomen

Es wurden Versuche gemacht, um zu prüfen ob SWS1 an Borrelien-haltigen Phagosomen lokalisiert und ob es auch an Zellprotrusionen vorzufinden ist, bei der intrazellulären Aufnahme von Borrelien.

Hierzu wurden die Makrophagen mit Borrelien infiziert und anschließend nach 10, 20, 30 und 40 Minuten Infektionsdauer fixiert. Ziel war es zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu untersuchen, wo das SWS1 lokalisiert. Es erfolgte eine Immunfärbung. Durch die frühzeitige Fixierung nach 10 Minuten Infektionsdauer sollte geprüft werden, ob SWS1 an den Aufnahmestrukturen der Makrophagen beteiligt ist. Durch spätere Zeitpunkte sollte der schon ablaufende Verdauungsprozess untersucht

werden, ob das SWS1 an den Borrelien-haltigen Phagosomen beteiligt ist im Sinne einer Anreicherung und Lokalisierung. Ausgewertet wurden die Slides am konfokalen Lasermikroskop.

Es konnte gezeigt werden, dass SWS1 sowohl bei der Aufnahme der Borrelien in den Makrophagen an Zellprotrusionen vorhanden ist, als auch an den Borrelien-haltigen Phagosomen selbst akkumuliert.

Hierbei war das SWS1 an allen Formen von langgestreckter Borrelië bis intermediärem Zustand, als auch globulärer, also schon kugelförmig, verdichteter Form, angereichert.

Insgesamt ließ sich eine Akkumulation von SWS1 an den Borrelien-haltigen Phagosomen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Borrelienprozessierung feststellen. SWS1 konnte an Windungen (Abb. 6) als auch an den Enden der Borrelien (Abb. 7) nachgewiesen werden.

Dies bedeutet, dass das SWS1 zumindest eine Relevanz im Prozess der Aufnahme von Borrelien in Makrophagen als auch bei der intrazellulären Prozessierung von *Borrelia burgdorferi* zu haben scheint, da es sich an den Aufnahmestrukturen und den Borrelien-Phagosomen während der Prozessierung anreichert.

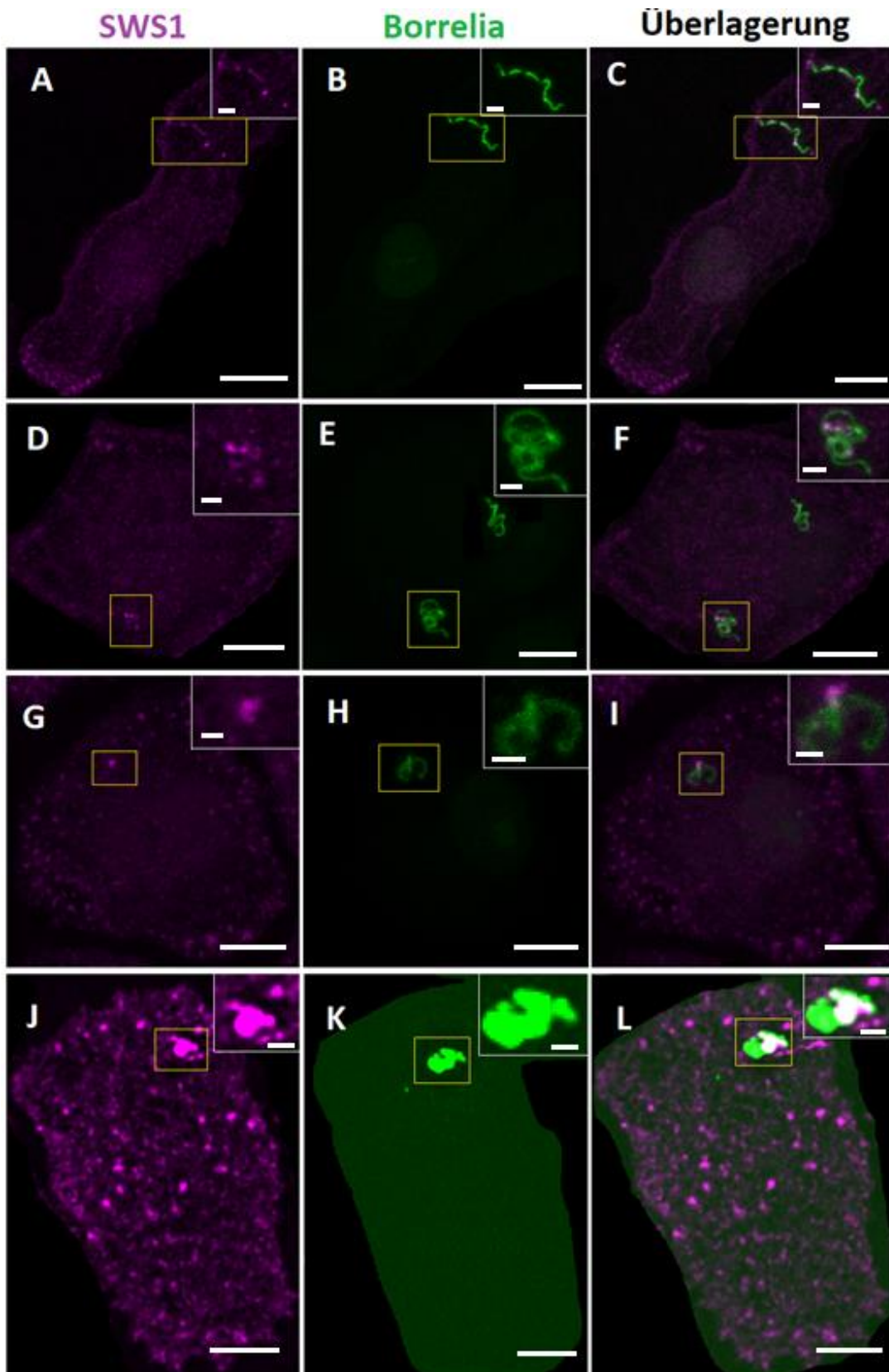


Abb. 6: SWS1 akkumuliert an Borrelien-haltigen Phagosomen in primären humanen Makrophagen. In den Abbildungen A-I erkennt man, dass das SWS1 an Windungen der Borrelien sowohl an der gestreckten Form (A-C) der Borrelien akkumuliert als auch an den Zwischenformen zwischen gestreckt und globulär (D-I). J-K zeigt die Anreicherung von endogenem SWS1 an der globulären Form.

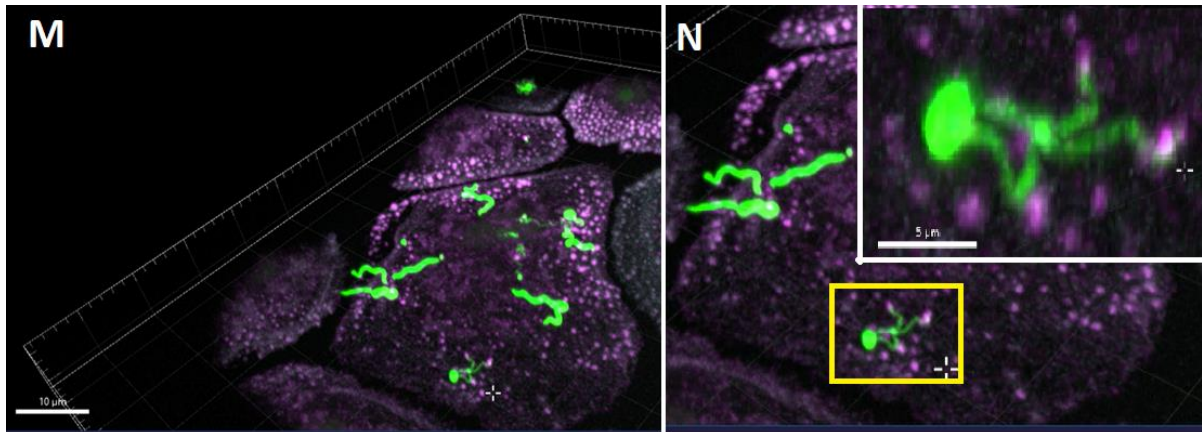


Abb. 7: 3D-Darstellung eines Makrophagen in dem sich mehrere Borrelien befinden und SWS1 in magenta dargestellt ist. Die Borrelie hängt mit ihren Enden in zwei Podosomen fest, an den SWS1 angereichert ist. In der Mitte beginnt sie sich einzurollen in die globuläre Form.

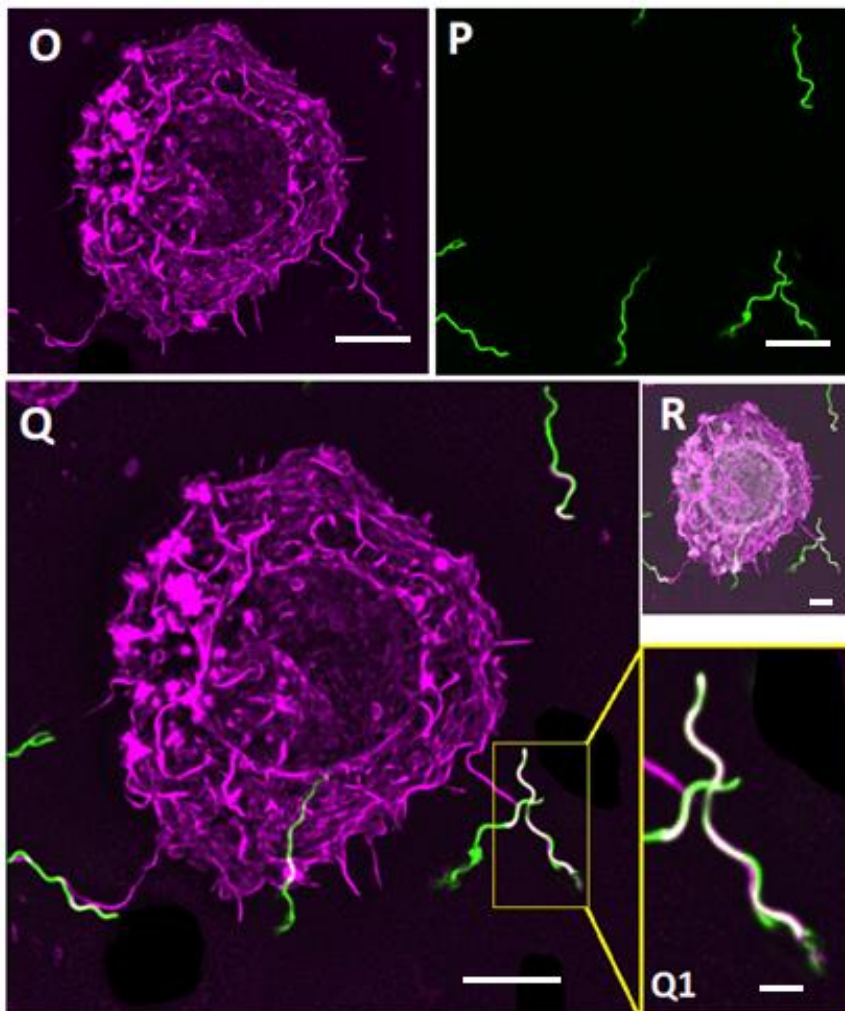


Abb. 8: Makrophage mit mCherry-SWS1, lifeact blue und GFP-Borrelien im live imaging. O: mCherry-SWS1 im live cell imaging, Man erkennt wieder die Pseudopodien und auch Filopodien, die SWS1 haltig sind und an den Borrelien anliegen. P: GFP-Borrelien in der Lösung. Q: Überlagerung von mCherry-SWS1 und GFP-Borrelien. Man sieht wie das SWS1 sich direkt an die Borrelien anlegt. In der Vergrößerung Q1 erkennt man, dass ein SWS1 haltiger Zellfortsatz direkt an die Borrelie angelagert ist. R: Überlagerung mit lifeact blue und mCherry-SWS1 plus die GFP-Borrelien. Maßstab 10 µM.

3.4 SKAP2 und Myo1f sind nicht an Borrelien-haltigen Phagosomen angereichert

In ersten Experimenten wurden die Proteine SKAP2 und Myo1f endogen angefärbt und die Verteilung in den Makrophagen dargestellt.

Es wurde anschließend in mehreren Experimenten nach Infektion, Fixation und Immunfärbung, zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht, ob Myo1f und SKAP2 an Borrelien-haltigen Phagosomen lokalisieren.

Es konnte keine Anreicherung an *Borrelien*-haltigen Phagosomen gefunden werden. Sowohl bei der Aufnahme der Borrelien in die Zelle als auch bei *Borrelien*, die in den Makrophagen prozessiert wurden, konnte keine spezifische Anreicherung von SKAP2 oder Myo1f gefunden werden. Es ist somit von keiner spezifischen Rolle der genannten Proteine bei der Prozessierung auszugehen.

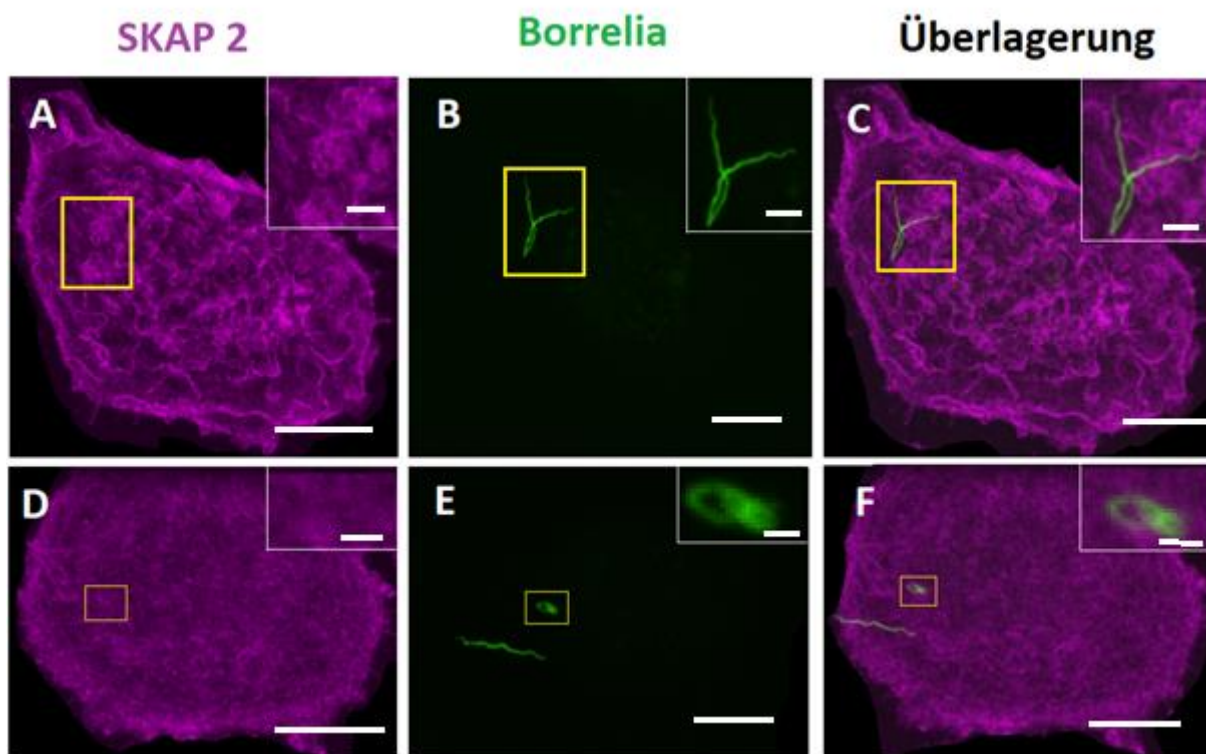


Abb. 9 SKAP2 endogene Anfärbung mit Borrelien. Es wird die langgestreckte Form (A-C) der Borrelie und SKAP2 dargestellt, wobei keine spezifische Akkumulation des SKAP2 an der Borrelie zu eruieren ist. Auch bei der globulären Form (D-F) erkennt man keine SKAP2 Anreicherung. Maßstab 1 μ M bzw. 10 μ M

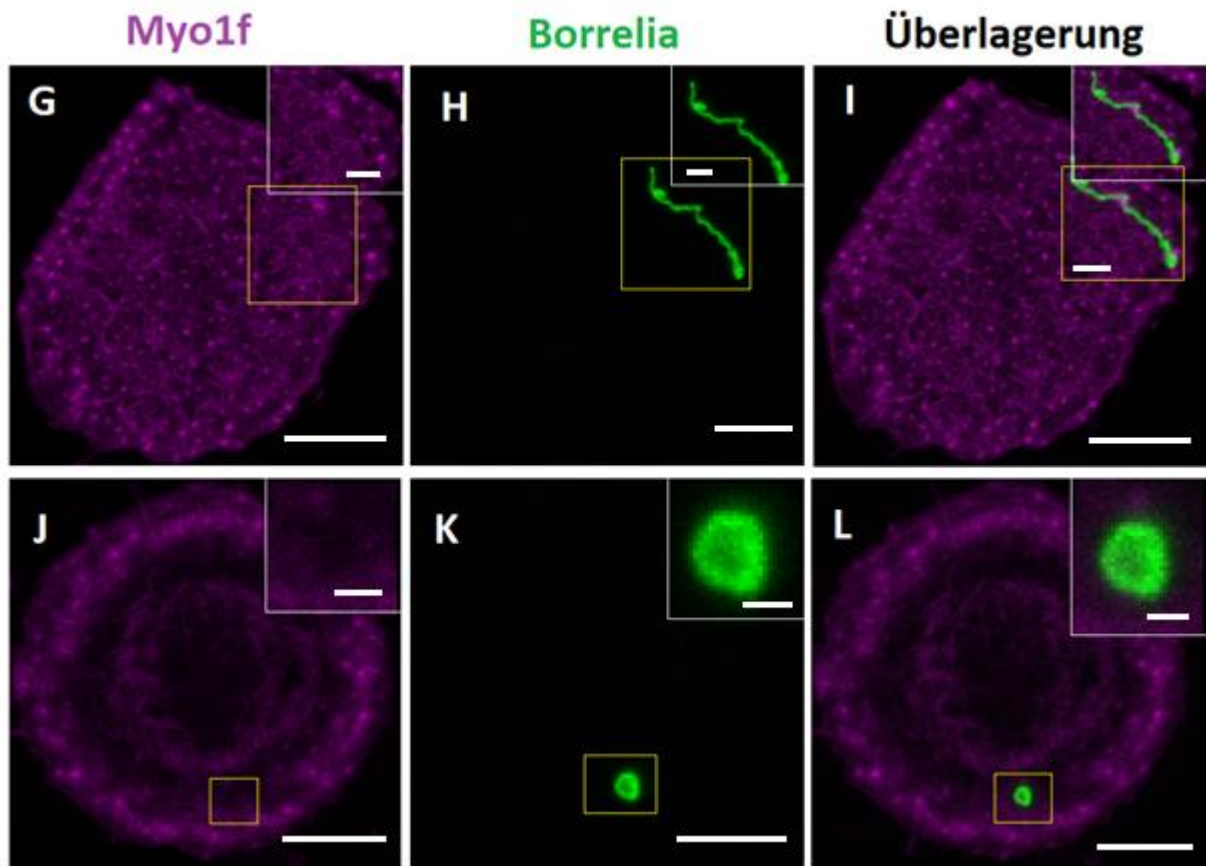


Abb. 10: Myo1f endogene Anfärbung mit Borrelie. Man erkennt in den Bildern G-L wieder deutlich die Myo1f haltigen Podosomen. Es sind in den Bildern G-I die langgestreckte Form der Borrelien und in den Bildern J-L die globuläre Form erkennbar. Im Gegensatz zu Abb. 6 bei der SWS1 eindeutig angereichert war, lässt sich hier keine Anreicherung an den Phagosomen erkennen. Maßstab 1 μ M bzw. 10 μ M

Ergänzend zu den Färbungen der endogenen Proteine wurden anschließend Experimente mit einer SKAP2 Überexpression und einer Myo1f Überexpression durchgeführt mit entsprechend Fluoreszenz markierten Konstrukten (GFP-SKAP2, GFP-Myo1f). Nach Elektroporation und Aufnahme der Konstrukte wurde am konfokalen Mikroskop geprüft, ob eine Anreicherung besteht. Auch in den Überexpressionsexperimenten konnte keine Anreicherung an Borrelien-haltigen Phagosomen gefunden werden.

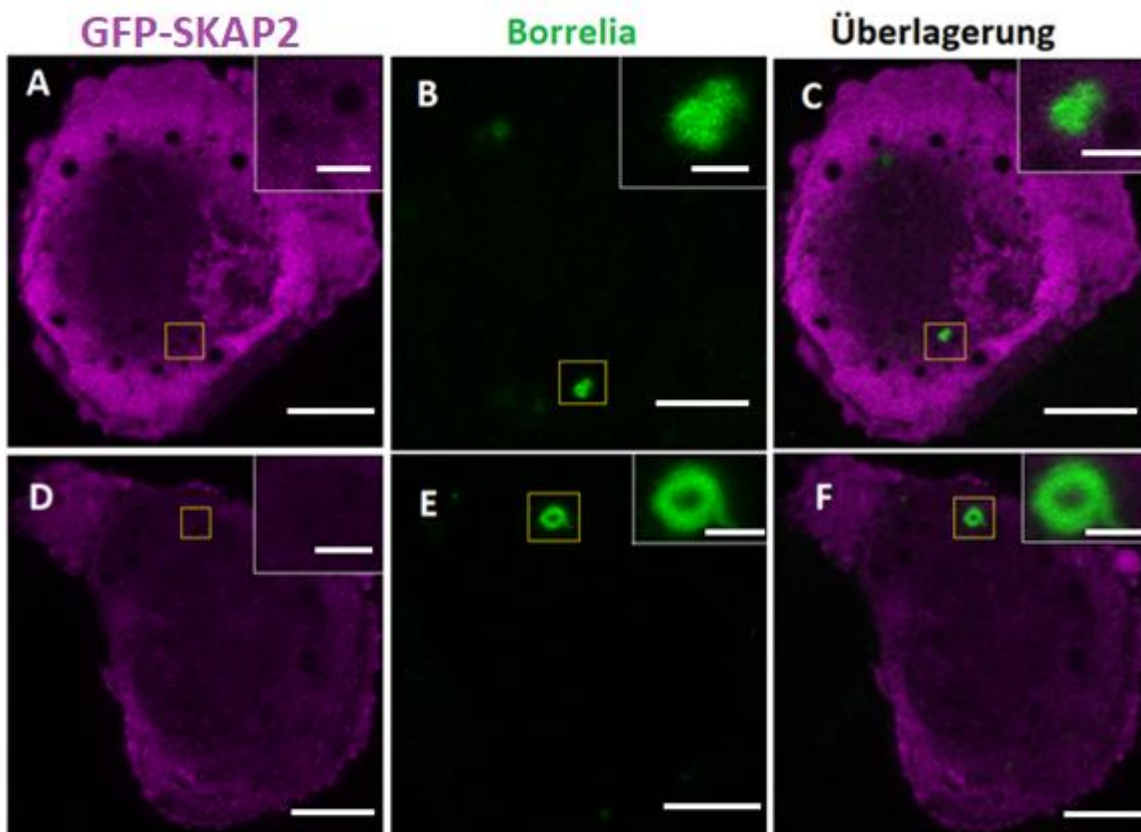


Abb. 11: GFP-SKAP2 Überexpression mit je einer globulären Borrelie. Auch bei der Überexpression von SKAP2 zeigt sich keine spezifische Anreicherung des Proteins an den Borrelien. Maßstab 1 μ M bzw. 10 μ M

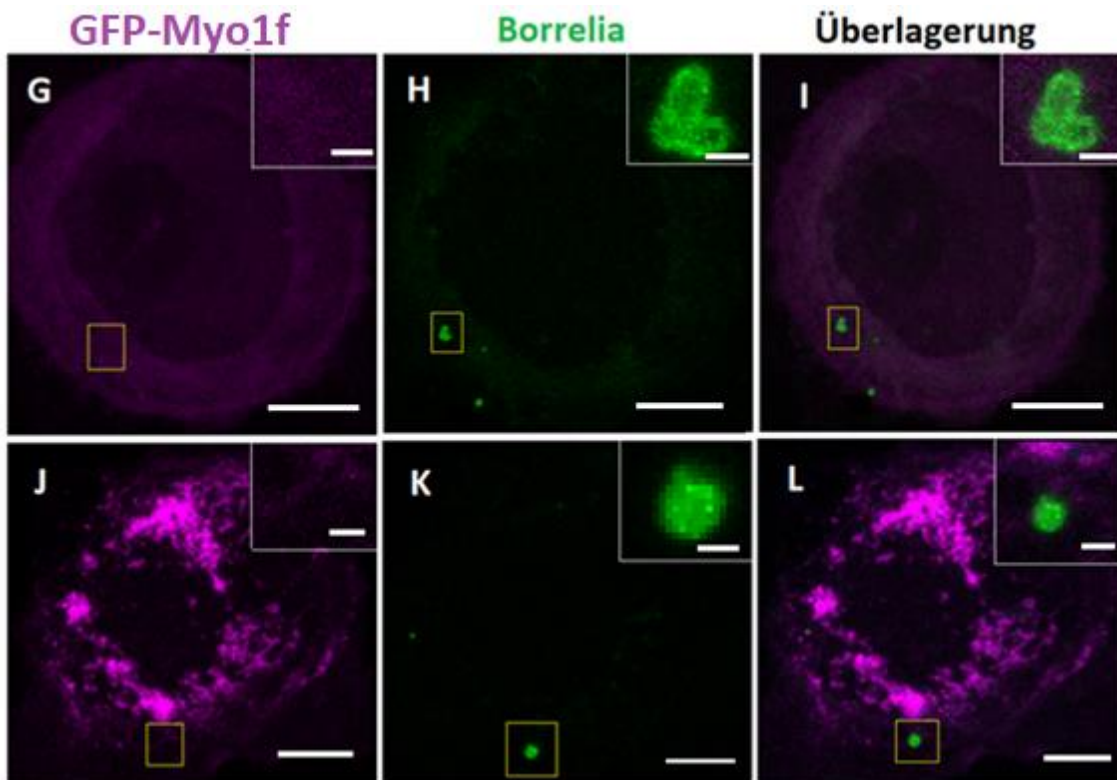


Abb. 12: GFP-Myo1f Überexpression mit je einer globulären Borrelie. Auch bei der Überexpression von Myo1f zeigt sich keine spezifische Anreicherung des Proteins an den Borrelien. Es fällt auf, dass Zellen mit Myo1f etwas runder aussehen als Zellen ohne Myo1f Überexpression. Maßstab 1 μ M bzw. 10 μ M.

3.5 SWS1 beeinflusst die phagosomale Kompaktierung von Borrelien

Nachdem gezeigt wurde, dass SWS1 an den Borrelien-haltigen Phagosomen lokalisiert, wurde nun ein möglicher Einfluss auf die Kompaktierung Borrelien-haltiger Phagosomen untersucht.

Hierbei wurde mittels siRNA ein Knockdown des SWS1 in den Makrophagen hervorgerufen. Die Depletion von SWS1 wurde mittels Western Blot für die jeweiligen Experimente überprüft. Die Restexpression von SWS1 betrug 14,11%, sodass von einem ausreichenden Knockdown ausgegangen werden kann. Nach dem Knockdown fand die Infektion statt mit anschließender Fixation und die Auszählung der Borrelienformen (elongiert, intermediär, kompaktiert) in den Makrophagen.

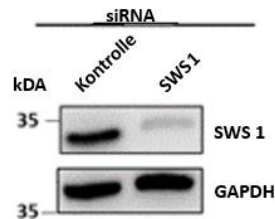


Abb. 13: Western Blot für SWS1 Knockdown. Es ist der Western Blot für ein Lysat, Makrophagen, die mit siRNA für SWS1 bzw. einer Kontroll-siRNA (Luziferase) transfiziert wurden, dargestellt.

Es wurden die Formen elongiert und intermediär als gestreckt von kompaktierten Borrelien-haltigen Phagosomen unterschieden. Borrelien, die teilweise in der Zelle und außerhalb oder ganz außerhalb der Zellen in der 3D Projektion sich darstellten, wurden vom Zählprozess ausgeschlossen.

Nach Auswertung der Datensätze, ist von einem signifikanten Unterschied zwischen den SWS1-Knockdownzellen im Vergleich zu den Kontrollzellen auszugehen von 57% in Bezug auf die kompaktierten Borrelien.

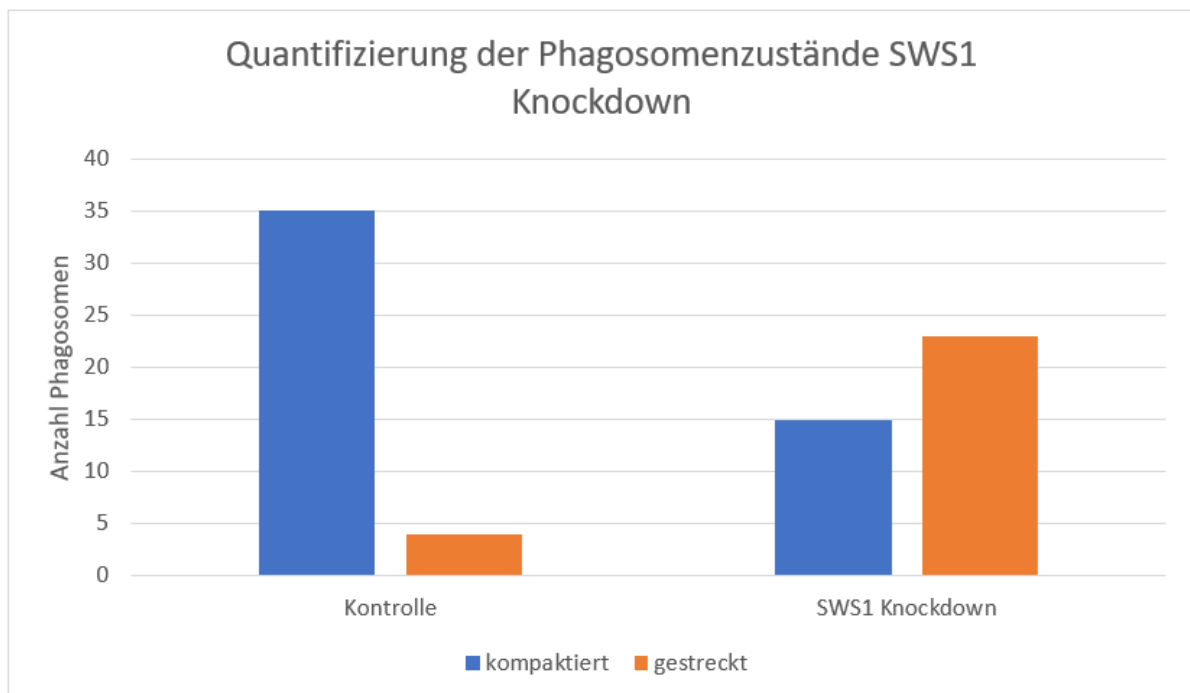


Abb. 14: Anzahl der Phagosomen abhängig vom Phagosomenzustand. Balken zeigen die internalisierten Borrelienanzahl, die kompaktiert oder gestreckt vorliegen (n= 30 Makrophagenzellen) für die Kontrolle und die Anzahl bei den SWS1 depletierten Zellen an.

3.6 SKAP2 und Myo1f haben einen geringen Effekt auf die Kompaktierung

Nachdem keine Lokalisation an *Borrelien*-haltigen Phagosomen gezeigt werden konnte, sollte dennoch ein möglicher Einfluss auf die intrazelluläre *Borrelien*prozessierung untersucht werden. Hierzu wurde jeweils ein Knockdown mittels siRNA etabliert, der mittels Western Blots quantifiziert wurde. Die Restexpression für SKAP2 betrug 55,77% und für Myo1f 32,37%, sodass von einem ausreichenden Knockdown auszugehen ist.

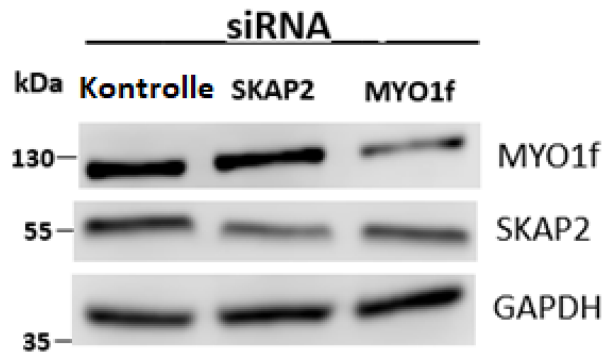


Abb. 15: Western Blot für SKAP2 und MYO1f Knockdown. Es ist der Western Blot für ein Lysat, Makrophagen, die mit siRNA für SKAP2 einmal bzw. ein anderes Mal für MYO1f, sowie einer Kontroll-siRNA (Luziferase) transfiziert wurden, dargestellt.

Es wurden die Formen elongiert und intermediär als gestreckt von kompaktierten *Borrelien*-haltigen Phagosomen unterschieden. *Borrelien*, die teilweise in der Zelle und außerhalb oder ganz außerhalb der Zellen in der 3D Projektion sich darstellten, wurden vom Zählprozess ausgeschlossen.

Für die SKAP2- und Myo1f-Depletion ergab sich jeweils ein nicht signifikanter Unterschied von 26%. Schlussfolgernd kann von keinem wesentlichen Effekt bei dem Prozess der *Borrelien*prozessierung für SKAP2 und Myo1f ausgegangen werden, der sich auch mit einer nicht vorhandenen Kolo-kalisation an den *Borrelien*-haltigen Phagosomen deckt.

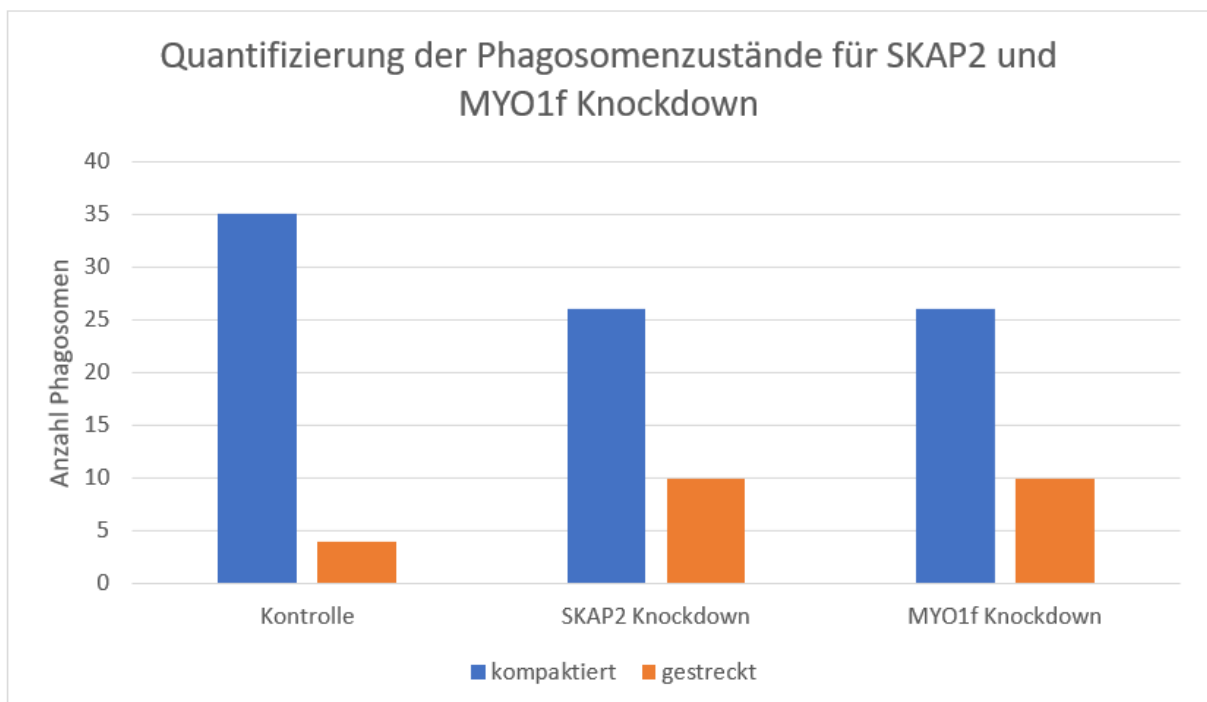


Abb. 16: Anzahl der Phagosomen abhängig vom Phagosomenzustand. Balken zeigen die internalisierten *Borrelien*anzahl (n= 30 Zellen) für die Kontrolle und die SKAP2 bzw. MYO1f depletierten Zellen an.

3.7 SWS1 ko-lokalisiert weder mit SNX3 noch mit RAB5a in primären, humanen Makrophagen

Ergebnisse aus (Klose et al., 2019) hatten gezeigt, dass das Adaptorprotein Sorting Nexin-3 (SNX3) mit Borrelien-haltigen Phagosomen lokalisiert und bei der Prozessierung der Bakterien in primären humanen Makrophagen eine Rolle spielt. Auch für die kleine GTPase RAB5a zeigte die Arbeit von (Naj and Linder, 2015) in diesem Prozess eine Funktion. Im live cell imaging am Dragonfly-Mikroskop wurde geprüft, ob im Makrophagen eine Ko-Lokalisation für GFP-SWS1 und RFP-SNX3 bzw. für GFP-SWS1 und RFP-Rab5a vorliegt. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Proteine nicht miteinander in der Nativzelle colokalisieren. Ob ein Zusammenspiel bei der Prozessierung der Borrelien vorhanden ist, muss noch geprüft werden, da alle drei Proteine an diesem Prozess beteiligt zu sein scheinen.

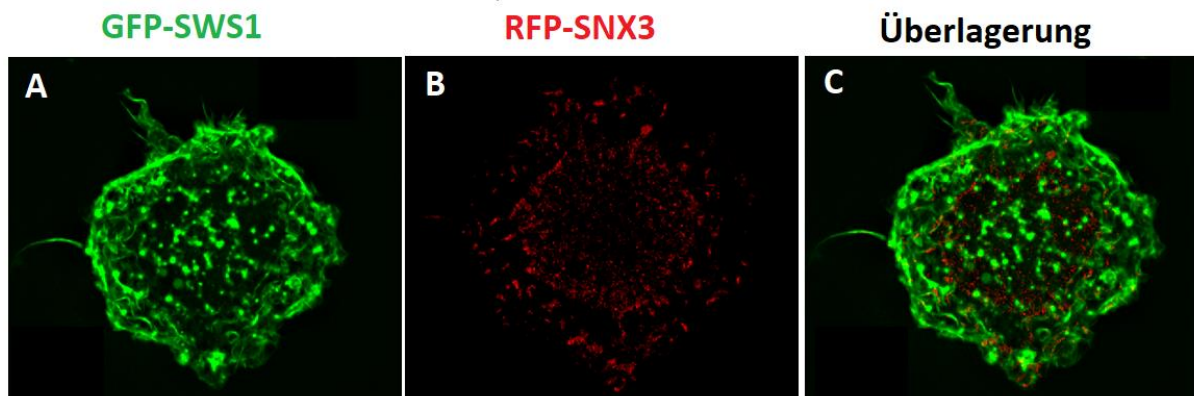


Abb. 17: GFP-SWS1 und RFP-SNX3 zusammen exprimiert in einem Makrophagen. A: Man erkennt die Verteilung des GFP-SWS1 in der Zelle. B: Dargestellt sind die RFP-SNX3 Vesikel in der gleichen Zelle. C: Bei der Überlagerung zeigt sich keine Kolokalisation für GFP-SWS1 und RFP-SNX3, da es zu keinen gelben Überlagerungen kommt.

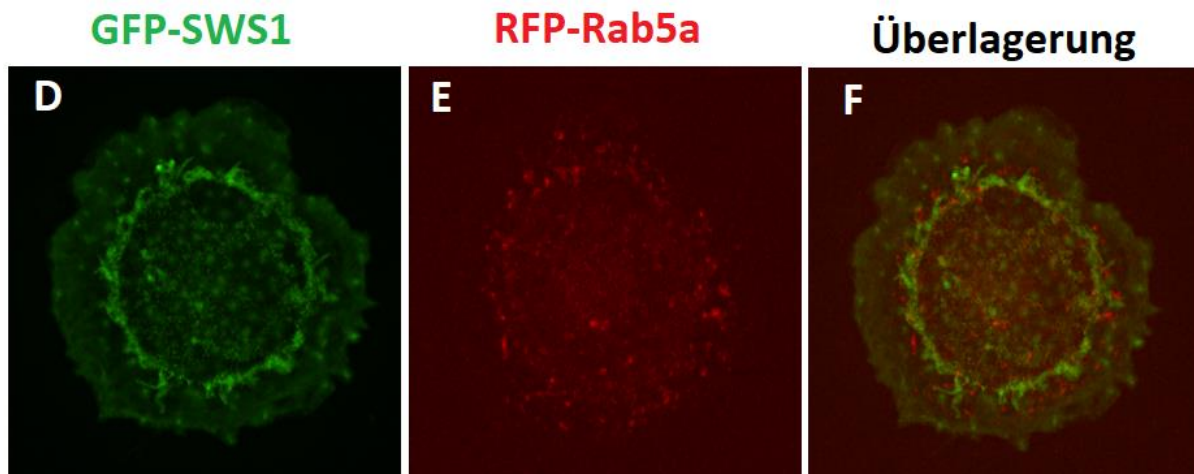


Abb. 18: GFP-SWS1 und RFP-Rab5a zusammen exprimiert in einem Makrophagen. D: Man erkennt die Verteilung des GFP-SWS1 im Makrophagen. E: Das RFP-Rab5a ist dargestellt in der Zelle. F: Bei der Überlagerung beider Proteine, zeigte sich keine Ko-Lokalisation.

4 Diskussion

Ziel meiner Fragestellung war es, die Relevanz der Proteine SWS1, SKAP2 und Myo1f für die Verarbeitung und intrazelluläre Prozessierung von *Borrelia burgdorferi* durch humane Makrophagen zu prüfen. Auch die Beteiligung der Proteine an Podosomen in humanen Makrophagen wurde untersucht. Dabei nutzte ich unterschiedliche Methoden wie die Überexpression, den siRNA-vermittelten Knockdown und das live cell imaging.

Meine Ergebnisse können einmal hinsichtlich der Podosomen betrachtet werden und andermal bezüglich der Beteiligung an der Borrelienprozessierung.

Zum ersten Punkt haben meine Ergebnisse eine Anreicherung von SWS1, SKAP2 und Myo1f an Podosomen in primären humanen Makrophagen gezeigt. Bei SKAP2 ist die Anreicherung an Podosomen bereits beschrieben worden, sodass meine Ergebnisse diese Kenntnis bestätigen (Tanaka et al., 2016). Die Anreicherung von SWS1 und Myo1f an Podosomen wurde bis jetzt (April 2023) noch nicht beschrieben, sodass sich die Frage, um die Bedeutung und die Funktion stellt.

Weiterhin zeigte sich in meinen Ergebnissen, dass die Proteine SKAP2 und Myo1f keine spezifische Anreicherung an Borrelien-haltigen Phagosomen haben noch eine Beteiligung bei der Aufnahme dieses Erregers aufweisen. Auch eine funktionelle Bedeutung bei Depletion der Proteine blieb nicht signifikant. Für SWS1 konnte ich eine Anreicherung in verschiedenen Stadien der Borrelienprozessierung feststellen. So akkumulierte SWS1 sowohl bei der Aufnahme als auch bei der intrazellulären Verarbeitung. Hierbei zeigte sich sowohl an der lang-gestreckten Borrelie, als auch an der globulären und der Zwischenform zwischen gestreckt und globulär eine Anreicherung am borrelienhaltigen-Phagolysosom. Im live cell imaging konnte das SWS1 direkt an der lebenden Borrelie nachgewiesen werden, sodass auch hier von einer Funktion auszugehen ist. Bei der Depletion von SWS1 konnte ein signifikantes Ergebnis festgestellt werden. Es kam zu einer geringeren Kompaktierung und damit Verdichtung der Borrelien in SWS1-Knockdownzellen, sodass das SWS1 funktionell als bedeutend für den Prozess der Kompaktierung einzustufen ist. Es stellt sich nun die Frage, ob SWS1 ein neuer Regulator der Aufnahme von Borrelien und deren Verarbeitung im Makrophagen ist.

4.1 SWS1 und Myo1f - neue Kandidaten für die Podosomenstruktur in Makrophagen?

Podosomen wurden als aktinreiche Adhäsionsstrukturen in primären humanen Makrophagen beschrieben, die auch der Fortbewegung der Zelle dienen (Linder et al., 1999). Über 300 Bestandteile bilden den Podosomen des Makrophagen und sind am Lebenszyklus dieser Zellstruktur beteiligt. In Bezug auf meine Ergebnisse wurde bereits gezeigt, dass das Myosin IIa mit Forminen, die in Podosomen eine Rolle spielen, interagiert (Linder and Cervero, 2020). Das Myosin IIa wird hierbei an neue Aktin Strukturen rekrutiert (Gateva et al., 2017).

In meinen Ergebnissen konnte ich die Anreicherung von einem weiteren Myosin, nämlich dem Myo1f an Podosomen in Makrophagen bei der Anfärbung von endogenem Myo1f nachweisen. Es stellt sich nun die Frage, ob Myo1f ein weiteres Myosin ist, welches beispielsweise mit Forminen in Podosomen interagiert oder generell welche Rolle es im Lebenszyklus eines Podosomen hat. Die Beteiligung weiterer Myosine in den Podosomen, so z.B. des Myo1f, würde auch die gute mechanische Fähigkeit des Podosomen erklären (Linder and Cervero, 2020).

Für SWS1 zeigte sich ebenfalls bei der Anfärbung von endogenem SWS1 eine Anreicherung in den Podosomen in meinen Ergebnissen. Diese Anreicherung war wie beim Myo1f oder nicht infizierten Zellen vorhanden, sodass auch von einem weiteren Bestandteil an der Podosomenbildung im

Makrophagen gesprochen werden kann. Ein möglicher Grund der Beteiligung von SWS1 an Podosomen, könnte dessen Funktion sein. So ist das Protein in der Lage Aktin zu bündeln und da es sich bei Podosomen um aktinreiche Strukturen handelt, könnte dies die Beteiligung von SWS1 an Podosomen erklären.

4.2 Swiprosin 1 – Ein neuer Kandidat für die Aufnahme von Borrelien und Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts in den Makrophagen?

Das Zytoskelett ist ein Netzwerk von Proteinen, das die Form und Bewegung von Zellen beeinflusst. In meinen Experimenten konnte ich nachweisen, dass SWS1 an verschiedenen Strukturen wie Filopodien, Membranprotrusionen und Podosomen beteiligt ist. Diese sind an der Fortbewegung und Adhäsion der Zelle beteiligt.

Makrophagen als mobile Zellen bewegen sich an den Ort der Infektion mit Borrelien, wie beim Erythema migrans nachgewiesen wurde (Jones et al., 2008). Ich konnte in meiner Arbeit die Mitbeteiligung des SWS1 an Filopodien und coiling-Pseudopodien nachweisen. Filopodien und coiling-Pseudopodien sind Strukturen, mit denen der Makrophage Borrelien fängt und immobilisiert. Das SWS1 als Bestandteil beider Strukturen könnte maßgeblich an der Ausbildung und Motilität beteiligt sein.

Die Bedeutung von SWS1 für die Migration des Makrophagen müsste noch weiter geklärt werden, hinsichtlich, ob die Beweglichkeit der Zellen bei einem Knockdown oder Knockout beeinflusst wird. So wurde in Kardiomyozyten nach einem Herzinfarkt gezeigt, dass SWS1 vermehrt angereichert war. Nach einem Herzinfarkt findet generell ein Umbau der Zellstrukturen im Herzen statt. Die Anreicherung von SWS1 in den sich reorganisierenden und migrierenden Zellen spricht für eine Funktion des SWS1 bei der Bewegung der Zellen (Giricz et al., 2020).

Weiterhin wurde herausgefunden, dass SWS1 bei der Invasion und Migration von Melanomzellen eine Rolle haben könnte. So metastasierten Melanomzellen, die endogenes SWS1 exprimieren mehr als Melanomzellen, bei denen ein Knockdown von SWS1 durchgeführt wurde. Die Überexpression von SWS1 in Melanomzellen führte im Mausmodell beispielsweise zu mehr Lungenmetastasen (Huh et al., 2015).

Mittels KEGG Untersuchung wurde außerdem gezeigt, dass SWS1 reichlich an Phagosomen, aber auch bei Epstein Barr Virus Infektion oder *Staphylococcus aureus* Infektion vorkommt (Wang et al., 2022). Meine Resultate stützen die Tatsache, dass an Phagosomen in diesem Fall borrelienhaltigen Phagosomen SWS1 vermehrt aufzufinden ist, sodass generell ein Einfluss bei Infektionen vorhanden zu sein scheint und das SWS1 eine Rolle am Reifungsprozess des Phagosomen zu spielen scheint.

SWS1 im Allgemeinen bündelt F-Aktin nachdem es zu einer Homodimerisierung des Proteins gekommen ist. Hierfür ist das Ca²⁺ von wichtiger Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass bestimmte Bakterien wie *P. aeruginosa*, Salmonellen oder *Escherichia coli* in der Lage sind, die Calciumkonzentrationen der Wirtszellen zu ändern. (King et al., 2020) Ob *Borrelia burgdorferi* ebenfalls zu einer Kalziummobilisation in Makrophagen führt und damit zur Homodimerisierung des SWS1 beiträgt, bleibt weiter zu erforschen. Es konnte bis jetzt gezeigt werden, dass *Borrelia burgdorferi* zur Calciummobilisation in Neutrophilen führt. (Suhonen et al., 2000) Für Makrophagen müsste dieser Zusammenhang noch eruiert werden, würde aber einen möglichen Mechanismus für die Anreicherung und Funktion des SWS1 an den borrelienhaltigen Phagosomen erklären.

Weiterhin scheint SWS1 an der generellen Entzündungsreaktion beteiligt zu sein. So konnte gezeigt werden, dass SWS1 proinflammatorische Zytokine wie z.B. TNF alpha in Mastzellen verstärkt. (Thylur et al., 2009) Ob dies auch bei der Borrelienbekämpfung des Organismus in Makrophagen eine Rolle spielt, müsste noch weiter erforscht werden.

4.3 Steigert SWS1 Knockdown das intrazelluläre Überleben der Borrelien?

Ich konnte zeigen, dass ein Knockdown von SWS1 in Makrophagen zu einer signifikant geringeren Kompaktierung und damit Prozessierung der Borrelien führt. Ob dies auch mit einem längerem intrazellulären Überleben der Borrelien einhergeht, müsste in einem Überlebensassay beispielsweise weiter erforscht werden.

Es wird zudem berichtet, dass SWS1 in septischen Mäusen eine wichtige Rolle spielt. So führte eine SWS1 Depletion in septischen Mäusen zu einer erhöhten Mortalität, schwererem Organschaden und einer geringeren Makrophagenrekutierung in Niere und Lunge. Der SWS1 Mangel ging mit einer Immunsuppression einher und es wurden weniger HLA- Moleküle auf den Makrophagen repräsentiert. Außerdem wurden weniger proinflammatorische Zytokine hergestellt (Zhang et al., 2018) Dies zeigt, dass SWS1 eine wichtige Rolle bei einer Bakterieninfektion wie einer Sepsis für die Makrophagen zu haben scheint. Es zeigt sich, dass SWS1 eine wichtige Rolle bei der Migration von Makrophagen in Organen bei der bakteriellen Abwehr hat, als auch bei der Herstellung proinflammatorischer Zytokine und der besseren Antigenpräsentierung. So könnte ein SWS1 Mangel den erhöhten Organschaden durch Bakterien und die höhere Mortalität septischer Mäuse erklären und damit auch das verlängerte Überleben der Bakterien.

Weiterhin konnte (Tu et al., 2018) nachweisen, dass mehr SWS1 in Makrophagen produziert wird, wenn die Makrophagen durch LPS stimuliert werden. Das bedeutet, dass das SWS1 eine zentrale Rolle bei der bakteriellen Abwehr zu spielen scheint. Ich konnte ebenfalls eine Anreicherung des SWS1 an Borrelien-haltigen Phagosomen feststellen. Es handelt sich bei BB um ein gramnegatives und ein LPS negatives Bakterium. Es bleibt zu diskutieren auf welchem Weg das SWS1 bei BB aktiviert wird, möglicherweise wie oben beschrieben über eine Calciummobilisation. Weiterhin müsste eruiert werden, ob Bakterien mit einer ausgeprägten LPS Exprimierung zu mehr SWS1 führen und somit besser abgewehrt und prozessiert werden als Bakterien mit geringerer LPS Exprimierung.

4.4 Ausblick

Meine Experimente und Ergebnisse lassen sich in den aktuellen Stand der Forschung um Podosomen und deren Aufbau als auch um die Prozessierung von Borrelien in Makrophagen einbetten.

Fortführen könnte man die Forschung von SWS1 und Myo1f an den Podosomen, indem man untersucht, wie sich ein Knockdown dieser Proteine auf die Podosomenformation, den Aufbau und den Lebenszyklus auswirkt. Man könnte hierzu die Anzahl der Podosomen und deren Lebensdauer begutachten.

Weiterhin bliebe der molekulare Mechanismus des SWS1 für die Borrelienprozessierung zu eruieren. So könnte man Plasmide mit unterschiedlichen Domänenanteilen des Proteins herstellen. Dann würde man das SWS1 in den Zellen herunterregulieren und die Plasmide einschleusen und sehen, wie sich das Protein ohne bestimmte Domänen verhält. So könnte man die Signifikanz der einzelnen Proteindomänen für die Funktion des SWS1 entschlüsseln. So wird beispielsweise postuliert, dass die

Calciumbindung für die Homodimerisierung und damit die Funktion wichtig ist. Ein Knockout dieser Domäne, müsste das SWS1 beispielsweise funktionslos machen.

Des Weiteren ließ sich das Projekt mit anderen Bakterien erweitern um die Bedeutung des SWS1 wie bereits in der KEGG Untersuchung von Wang et al. zu untersuchen.

Ein weiteres aktuelles Paper von (Moreno-Layseca et al., 2020) bringt außerdem das Rab21 und Integrine mit SWS1 in Verbindung. So habe ich mich mit dem Rab5a und einer möglichen Kolo-kalisation beschäftigt, jedoch wäre das Rab21 ebenfalls ein interessanter zu untersuchender Kandidat in Zusammenhang mit Borrelien. Es lassen sich insgesamt viele weitere Experimente basierend auf meinen Ergebnissen und der aktuellen Literatur anschließen, um die neuen Resultate einordnen zu können.

5 Zusammenfassung

Borrelia burgdorferi ist der Erreger der Lyme Borreliose und wird durch Zeckenstiche auf den Menschen übertragen. Makrophagen als Teil des Immunsystems sind an der Beseitigung dieses Erregers mitbeteiligt. Hierbei wird das Bakterium über Membranprotrusionen aufgenommen und im Makrophagen im Phagolysosomen prozessiert. Am Prozess der Verdichtung des lang gestreckten Bakteriums in die globulär, verdichtete Form sind verschiedene Proteine beteiligt.

In meiner Arbeit habe ich mich mit der Bedeutung der Proteine SWS1, SKAP2 und Myo1f beim Prozess der Borrelienprozessierung und bei der Bedeutung für die intrazelluläre Aufnahme des Bakteriums beschäftigt. In meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass alle drei Proteine an Podosomen des Makrophagen beteiligt sind. Weiterhin konnte ich die Beteiligung von SWS1 an Aufnahmestrukturen für Borrelien nachweisen.

Für den Prozess der Phagolysosomreifung konnte ich zeigen, dass die Proteine SKAP2 und Myo1f keinen wesentlichen Einfluss haben. Sodass diese weder an den Phagolysosomen selbst beteiligt waren, als auch keinen signifikanten Einfluss auf die Kompaktierung der Borrelien haben. Jedoch konnte für SWS1 eine Akkumulation spezifisch an den Phagolysosomen gezeigt werden, sowohl bei lang gestreckten als auch bei schon verdichteten, globulären Borrelien. Außerdem konnte in Knockdown Experimenten eine wichtige Funktion für die Borrelienprozessierung dargestellt werden.

Summary

Borrelia burgdorferi is the causative agent of Lyme borreliosis and is transmitted to humans through tick bites. Macrophages as part of the immune system are involved in the elimination of this pathogen. Here, the bacterium is taken up via membrane protrusions and processed in the macrophage in the phagolysosome. Various proteins are involved in the process of condensing the elongated bacterium into the globular, condensed form.

In my work, I dealt with the importance of the proteins SWS1, SKAP2 and Myo1f in the process of *Borrelia* processing and in the importance for the uptake of the bacterium. I was able to show that all three proteins are involved in podosomes of the macrophage. Furthermore, I could prove the involvement of SWS1 in uptake structures for *Borrelia*.

For the process of phagolysosome maturation, I could show that the proteins SKAP2 and Myo1f have no significant influence. Thus, they were neither involved in the phagolysosomes themselves, nor did they have any significant influence on the compaction of the *Borrelia*. However, SWS1 was shown to accumulate specifically at the phagolysosomes, both in elongated and in already compacted globular *Borrelia*. In addition, an important function for *Borrelia* processing could be shown in knockdown experiments.

6 Abkürzungsverzeichnis

ADAP	Adhesion and degranulation-promoting adapter protein
Arp	actin related protein
Bb	<i>Borrelia burgdorferi</i>
BSA	bovines Serumalbumin
BSK-H	Barbour-Stoenner-Kelly H
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
ECM	Erythema chronicum migrans
EFHD2	EF-hand domain-containing protein D2
EZM	Extrazelluläre Matrix
F-Aktin	filamentöses Aktin
FcγR	Fc gamma receptors
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	green fluorescent protein
GTP	Guanosintriphosphat
IFN-γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
Lamp1	Lysosomal-associated membrane protein 1
LCB	Lymphadenosis cutis benigna
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure
M-CSF	Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
MHC	major histocompatibility complex
MOI	multiplicity of infection
Myo1f	Myosin 1f
OspA	outer surface protein A
Ospc	outer surface protein c
Page	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
Rab	Ras-related proteins in brain
Rpm	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SFK	Src Familien Kinasen
SH3-Domäne	SRC homology 3 Domäne
Sirpα	Signal regulatory protein α
SKAP2	Src kinase-associated phosphoprotein 2
SNX3	Sorting nexin 3
SWS1	Swiprosin-1
TAM	Tumor assoziierte Makrophagen
TBS-T	Tris buffered saline with tween
Temed	Tetramethylethylendiamin
TGF β	Transforming growth factor β
TLR	Toll like receptor
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor α
Wt-Borrelien	wild type Borrelien

7 Literaturverzeichnis

- ABERER, E. & DURAY, P. H. 1991. Morphology of *Borrelia burgdorferi*: structural patterns of cultured borreliae in relation to staining methods. *J Clin Microbiol*, 29, 764-72.
- ALBRECHT, S., HOFSTADTER, S., ARTSOB, H., CHABAN, O. & FROM, L. 1991. Lymphadenosis benigna cutis resulting from *Borrelia* infection (*Borrelia lymphocytoma*). *J Am Acad Dermatol*, 24, 621-5.
- ALENGHAT, F. J., BACA, Q. J., RUBIN, N. T., PAO, L. I., MATOZAKI, T., LOWELL, C. A., GOLAN, D. E., NEEL, B. G. & SWANSON, K. D. 2012. Macrophages require Skap2 and Sirp α for integrin-stimulated cytoskeletal rearrangement. *J Cell Sci*, 125, 5535-45.
- BARANTON, G., POSTIC, D., SAINT GIRONS, I., BOERLIN, P., PIFFARETTI, J. C., ASSOUS, M. & GRIMONT, P. A. 1992. Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *Int J Syst Bacteriol*, 42, 378-83.
- BENACH, J. L., FLEIT, H. B., HABICHT, G. S., COLEMAN, J. L., BOSLER, E. M. & LANE, B. P. 1984. Interactions of phagocytes with the Lyme disease spirochete: role of the Fc receptor. *J Infect Dis*, 150, 497-507.
- BORAS, M., VOLMERING, S., BOKEMEYER, A., ROSSAINT, J., BLOCK, H., BARDEL, B., VAN MARCK, V., HEITPLATZ, B., KLICHE, S., REINHOLD, A., LOWELL, C. & ZARBOCK, A. 2017. Skap2 is required for $\beta(2)$ integrin-mediated neutrophil recruitment and functions. *J Exp Med*, 214, 851-874.
- BORGER, E., HERRMANN, A., MANN, D. A., SPIRES-JONES, T. & GUNN-MOORE, F. 2014. The calcium-binding protein EFhd2 modulates synapse formation in vitro and is linked to human dementia. *J Neuropathol Exp Neurol*, 73, 1166-82.
- BORGERMANS, L., GODERIS, G., VANDEVOORDE, J. & DEVROEY, D. 2014. Relevance of chronic lyme disease to family medicine as a complex multidimensional chronic disease construct: a systematic review. *Int J Family Med*, 2014, 138016.
- BOURETTE, R. P., THÉRIER, J. & MOUCHIROUD, G. 2005. Macrophage colony-stimulating factor receptor induces tyrosine phosphorylation of SKAP55R adaptor and its association with actin. *Cellular signalling*, 17, 941-949.
- BRZESKA, H., KOECH, H., PRIDHAM, K. J., KORN, E. D. & TITUS, M. A. 2016. Selective localization of myosin-I proteins in macropinosomes and actin waves. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 73, 68-82.
- BUECHNER, S. A., LAUTENSCHLAGER, S., ITIN, P., BIRCHER, A. & ERB, P. 1995. Lymphoproliferative responses to *Borrelia burgdorferi* in patients with erythema migrans, acrodermatitis chronica atrophicans, lymphadenosis benigna cutis, and morphea. *Arch Dermatol*, 131, 673-7.
- BURGDORFER, W., BARBOUR, A. G., HAYES, S. F., BENACH, J. L., GRUNWALDT, E. & DAVIS, J. P. 1982. Lyme disease--a tick-borne spirochetosis? *Science*, 216, 1317-9.
- CERAR, D., CERAR, T., RUŽIĆ-SABLJIĆ, E., WORMSER, G. P. & STRLE, F. 2010. Subjective symptoms after treatment of early Lyme disease. *Am J Med*, 123, 79-86.
- CERVANTES, J. L., DUNHAM-EMS, S. M., LA VAKE, C. J., PETZKE, M. M., SAHAY, B., SELLATI, T. J., RADOLF, J. D. & SALAZAR, J. C. 2011. Phagosomal signaling by *Borrelia burgdorferi* in human monocytes involves Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR8 cooperativity and TLR8-mediated induction of IFN- β . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 3683-3688.
- CHEN, A. H., STEPHAN, D. A., HASSON, T., FUKUSHIMA, K., NELISSEN, C. M., CHEN, A. F., JUN, A. I., RAMESH, A., VAN CAMP, G. & SMITH, R. J. 2001. MYO1F as a candidate gene for nonsyndromic deafness, DFNB15. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 127, 921-5.
- CUTLER, S. J. 2010. Relapsing fever--a forgotten disease revealed. *J Appl Microbiol*, 108, 1115-22.
- DANDEKAR, R. C., KINGAONKAR, A. V. & DHABEKAR, G. S. 2011. Role of macrophages in malignancy. *Ann Maxillofac Surg*, 1, 150-4.
- DIQUIGIOVANNI, C., BERGAMINI, C., EVANGELISTI, C., ISIDORI, F., VETTORI, A., TISO, N., ARGENTON, F., COSTANZINI, A., IOMMARINI, L., ANBUNATHAN, H., PAGOTTO, U., REPACI, A., BABBI, G., CASADIO, R., LENA, G., RHODEN, K. J., PORCELLI, A. M., FATO, R., BOWCOCK, A., SERI, M., ROMEO, G. & BONORA, E. 2018. Mutant MYO1F alters the mitochondrial network and induces tumor proliferation in thyroid cancer. *Int J Cancer*, 143, 1706-1719.

- DOMBROWSKI, C., KAN, W., MOTALEB, M. A., CHARON, N. W., GOLDSTEIN, R. E. & WOLGEMUTH, C. W. 2009. The elastic basis for the shape of *Borrelia burgdorferi*. *Biophys J*, 96, 4409-17.
- ELHELU, M. A. 1983. The role of macrophages in immunology. *J Natl Med Assoc*, 75, 314-7.
- FAIRN, G. D. & GRINSTEIN, S. 2012. How nascent phagosomes mature to become phagolysosomes. *Trends Immunol*, 33, 397-405.
- FAN, C. C., CHENG, W. C., HUANG, Y. C., SHER, Y. P., LIOU, N. J., CHIEN, Y. C., LIN, P. S., LIN, P. S., CHEN, C. H. & CHANG, W. C. 2017. EFHD2 promotes epithelial-to-mesenchymal transition and correlates with postsurgical recurrence of stage I lung adenocarcinoma. *Sci Rep*, 7, 14617.
- FINGERLE, V., BERGMEISTER, H., LIEGL, G., VANEK, E. & WILSKE, B. 1994. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* in Southern Germany. *J Spiroch Tick Dis*, 1, 41-45.
- FOTH, B. J., GOEDECKE, M. C. & SOLDATI, D. 2006. New insights into myosin evolution and classification. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 3681-6.
- FRASER, C. M., CASJENS, S., HUANG, W. M., SUTTON, G. G., CLAYTON, R., LATHIGRA, R., WHITE, O., KETCHUM, K. A., DODSON, R., HICKEY, E. K., GWINN, M., DOUGHERTY, B., 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., ARTIACH, P., BOWMAN, C., GARLAND, S., FUJI, C., COTTON, M. D., HORST, K., ROBERTS, K., HATCH, B., SMITH, H. O. & VENTER, J. C. 1997. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature*, 390, 580-6.
- GATEVA, G., KREMNEVA, E., REINDL, T., KOTILA, T., KOGAN, K., GRESSIN, L., GUNNING, P. W., MANSTEIN, D. J., MICHELOT, A. & LAPPALAINEN, P. 2017. Tropomyosin isoforms specify functionally distinct actin filament populations in vitro. *Current biology*, 27, 705-713.
- GEISSMANN, F., MANZ, M. G., JUNG, S., SIEWEKE, M. H., MERAD, M. & LEY, K. 2010. Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. *Science*, 327, 656-661.
- GINHOUX, F. & JUNG, S. 2014. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol*, 14, 392-404.
- GIRICZ, Z., MAKKOS, A., SCHRECKENBERG, R., PÖLING, J., LÖRCHNER, H., KISS, K., BENCSIK, P., BRAUN, T., SCHULZ, R., FERDINANDY, P. & SCHLÜTER, K. D. 2020. Swiprosin-1/EFhD-2 Expression in Cardiac Remodeling and Post-Infarct Repair: Effect of Ischemic Conditioning. *Int J Mol Sci*, 21.
- GORDON, S. 2016. Phagocytosis: An Immunobiologic Process. *Immunity*, 44, 463-475.
- GUPTA, N. & TRIPATHY, K. 2020. Retinitis. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
- Copyright © 2020, StatPearls Publishing LLC.
- HAWLEY, K. L., OLSON, C. M., IGLESIAS-PEDRAZ, J. M., NAVASA, N., CERVANTES, J. L., CAIMANO, M. J., IZADI, H., INGALLS, R. R., PAL, U., SALAZAR, J. C., RADOLF, J. D. & ANGUITA, J. 2012. CD14 cooperates with complement receptor 3 to mediate MyD88-independent phagocytosis of *Borrelia burgdorferi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 1228-1232.
- HOFFMANN, A. K., NAJ, X. & LINDER, S. 2014. Daam1 is a regulator of filopodia formation and phagocytic uptake of *Borrelia burgdorferi* by primary human macrophages. *Faseb j*, 28, 3075-89.
- HUH, Y. H., KIM, S. H., CHUNG, K.-H., OH, S., KWON, M.-S., CHOI, H.-W., RHEE, S., RYU, J.-H., PARK, Z. Y. & JUN, C.-D. 2013. Swiprosin-1 modulates actin dynamics by regulating the F-actin accessibility to cofilin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70, 4841-4854.
- HUH, Y. H., OH, S., YEO, Y. R., CHAE, I. H., KIM, S. H., LEE, J. S., YUN, S. J., CHOI, K. Y., RYU, J. H., JUN, C. D. & SONG, W. K. 2015. Swiprosin-1 stimulates cancer invasion and metastasis by increasing the Rho family of GTPase signaling. *Oncotarget*, 6, 13060-71.
- HUNFELD, K. P., RUZIC-SABLJIC, E., NORRIS, D. E., KRAICZY, P. & STRLE, F. 2005. In vitro susceptibility testing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates cultured from patients with erythema migrans before and after antimicrobial chemotherapy. *Antimicrob Agents Chemother*, 49, 1294-301.

- HUPPERTZ, H. I., BÖHME, M., STANDAERT, S. M., KARCH, H. & PLOTKIN, S. A. 1999. Incidence of Lyme borreliosis in the Würzburg region of Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 18, 697-703.
- HUTAGALUNG, A. H. & NOVICK, P. J. 2011. Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiol Rev*, 91, 119-49.
- HYATT, D., SCHROEDER, A. E., BHATNAGAR, A., GOLAN, D. E., SWANSON, K. D. & ALENGHAT, F. J. 2019. Skap2 Regulates Atherosclerosis through Macrophage Polarization and Efferocytosis. *bioRxiv*, 857649.
- INAGAKI, K., YAMAO, T., NOGUCHI, T., MATOZAKI, T., FUKUNAGA, K., TAKADA, T., HOSOOKA, T., AKIRA, S. & KASUGA, M. 2000. SHPS-1 regulates integrin-mediated cytoskeletal reorganization and cell motility. *Embo j*, 19, 6721-31.
- JOHANSEN, M. L. & BROWN, E. J. 2007. Dual regulation of SIRPalpha phosphorylation by integrins and CD47. *J Biol Chem*, 282, 24219-30.
- JOHNSON, L., WILCOX, S., MANKOFF, J. & STRICKER, R. B. 2014. Severity of chronic Lyme disease compared to other chronic conditions: a quality of life survey. *PeerJ*, 2, e322.
- JONES, K. L., MUELLEGGER, R. R., MEANS, T. K., LEE, M., GLICKSTEIN, L. J., DAMLE, N., SIKAND, V. K., LUSTER, A. D. & STEERE, A. C. 2008. Higher mRNA levels of chemokines and cytokines associated with macrophage activation in erythema migrans skin lesions in patients from the United States than in patients from Austria with Lyme borreliosis. *Clin Infect Dis*, 46, 85-92.
- KENEDY, M. R., LENHART, T. R. & AKINS, D. R. 2012. The role of *Borrelia burgdorferi* outer surface proteins. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 66, 1-19.
- KIM, S. V., MEHAL, W. Z., DONG, X., HEINRICH, V., PYPAERT, M., MELLMAN, I., DEMBO, M., MOOSEKER, M. S., WU, D. & FLAVELL, R. A. 2006. Modulation of cell adhesion and motility in the immune system by Myo1f. *Science*, 314, 136-9.
- KING, M. M., KAYASTHA, B. B., FRANKLIN, M. J. & PATRAUCHAN, M. A. 2020. Calcium Regulation of Bacterial Virulence. *Adv Exp Med Biol*, 1131, 827-855.
- KLOSE, M., SALLOUM, J. E., GONSCHIOR, H. & LINDER, S. 2019. SNX3 drives maturation of *Borrelia* phagosomes by forming a hub for PI(3)P, Rab5a, and galectin-9. *Journal of Cell Biology*, 218, 3039-3059.
- KOGIAS, G., KORNHUBER, J., REIMER, D., MIELENZ, D. & MÜLLER, C. P. 2019. Swi-prosin-1/EFhd2: from Immune Regulator to Personality and Brain Disorders. *Neurosignals*, 27, 1-19.
- KOUROKU, Y., SOYAMA, A., FUJITA, E., URASE, K., TSUKAHARA, T. & MOMOI, T. 1998. RA70 is a src kinase-associated protein expressed ubiquitously. *Biochemical and biophysical research communications*, 252, 738-742.
- KWON, M.-S., PARK, K. R., KIM, Y.-D., NA, B.-R., KIM, H.-R., CHOI, H.-J., PIRAGYTE, I., JEON, H., CHUNG, K. H. & SONG, W. K. 2013a. Swi-prosin-1 is a novel actin bundling protein that regulates cell spreading and migration. *PLoS one*, 8, e71626.
- KWON, M. S., PARK, K. R., KIM, Y. D., NA, B. R., KIM, H. R., CHOI, H. J., PIRAGYTE, I., JEON, H., CHUNG, K. H., SONG, W. K., EOM, S. H. & JUN, C. D. 2013b. Swi-prosin-1 is a novel actin bundling protein that regulates cell spreading and migration. *PLoS One*, 8, e71626.
- LANE, R. S. & LOYE, J. E. 1991. Lyme disease in California: interrelationship of ixodid ticks (Acari), rodents, and *Borrelia burgdorferi*. *J Med Entomol*, 28, 719-25.
- LANE, R. S., PIESMAN, J. & BURGDORFER, W. 1991. Lyme borreliosis: relation of its causative agent to its vectors and hosts in North America and Europe. *Annu Rev Entomol*, 36, 587-609.
- LINDER, S. & CERVERO, P. 2020. The podosome cap: past, present, perspective. *Eur J Cell Biol*, 99, 151087.
- LINDER, S., NELSON, D., WEISS, M. & AEPFELBACHER, M. 1999. Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates podosomes in primary human macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 9648-9653.
- LINDER, S., WIESNER, C. & HIMMEL, M. 2011. Degrading devices: invadosomes in proteolytic cell invasion. *Annual review of cell and developmental biology*, 27, 185-211.

- LINDGREN, E., JAENSON, T. G., MENNE, B. & ORGANIZATION, W. H. 2006. Lyme borreliosis in Europe: influences of climate and climate change, epidemiology, ecology and adaptation measures. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe.
- LIU, J., KANG, H., RAAB, M., DA SILVA, A. J., KRAEFT, S. K. & RUDD, C. E. 1998. FYB (FYN binding protein) serves as a binding partner for lymphoid protein and FYN kinase substrate SKAP55 and a SKAP55-related protein in T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 8779-84.
- MANTOVANI, A., SICA, A., SOZZANI, S., ALLAVENA, P., VECCHI, A. & LOCATI, M. 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*, 25, 677-86.
- MARAVILLAS-MONTERO, J. L. & SANTOS-ARGUMEDO, L. 2012. The myosin family: unconventional roles of actin-dependent molecular motors in immune cells. *Journal of leukocyte biology*, 91, 35-46.
- MATHER, T. N., WILSON, M. L., MOORE, S. I., RIBEIRO, J. M. & SPIELMAN, A. 1989. Comparing the relative potential of rodents as reservoirs of the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*). *Am J Epidemiol*, 130, 143-50.
- MERMALL, V., POST, P. L. & MOOSEKER, M. S. 1998. Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. *Science*, 279, 527-533.
- MIELENZ, D., VETTERMANN, C., HAMPEL, M., LANG, C., AVRAMIDOU, A., KARAS, M. & JÄCK, H.-M. 2005. Lipid rafts associate with intracellular B cell receptors and exhibit a B cell stage-specific protein composition. *The Journal of Immunology*, 174, 3508-3517.
- MORENO-LAYSECA, P., JÄNTTI, N. Z., GODBOLE, R., SOMMER, C., JACQUEMET, G., AL-AKHRASS, H., KRONQVIST, P., KALLIONPÄÄ, R. E., OLIVEIRA-FERRER, L., CERVERO, P., LINDER, S., AEPFELBACHER, M., RAE, J., PARTON, R. G., DISANZA, A., SCITA, G., MAYOR, S., SELBACH, M., VELTEL, S. & IVASKA, J. 2020. Cargo-specific recruitment in clathrin and dynamin-independent endocytosis. *bioRxiv*, 2020.10.05.323295.
- MORIARTY, T. J., NORMAN, M. U., COLARUSSO, P., BANKHEAD, T., KUBES, P. & CHACONAS, G. 2008. Real-time high resolution 3D imaging of the Lyme disease spirochete adhering to and escaping from the vasculature of a living host. *PLoS Pathog*, 4, e1000090.
- NAJ, X., HOFFMANN, A. K., HIMMEL, M. & LINDER, S. 2013. The formins FMNL1 and mDia1 regulate coiling phagocytosis of *Borrelia burgdorferi* by primary human macrophages. *Infect Immun*, 81, 1683-95.
- NAJ, X. & LINDER, S. 2015. ER-Coordinated Activities of Rab22a and Rab5a Drive Phagosomal Compaction and Intracellular Processing of *Borrelia burgdorferi* by Macrophages. *Cell Rep*, 12, 1816-30.
- NAVINÉS-FERRER, A., AINSUA-ENRICH, E., SERRANO-CANDELAS, E., SAYÓS, J. & MARTIN, M. 2019. Myo1f, an Unconventional Long-Tailed Myosin, Is a New Partner for the Adaptor 3BP2 Involved in Mast Cell Migration. *Front Immunol*, 10, 1058.
- NAVINÉS-FERRER, A. & MARTÍN, M. 2020. Long-Tailed Unconventional Class I Myosins in Health and Disease. *Int J Mol Sci*, 21.
- NEUBERT, U. 1984. [Etiology of erythema migrans disease and Lyme disease. Review and results of personal study]. *Hautarzt*, 35, 563-70.
- NGUYEN, G. T., SHABAN, L., MACK, M., SWANSON, K. D., BUNNELL, S. C., SYKES, D. B. & MECSAS, J. 2020. SKAP2 is required for defense against *K. pneumoniae* infection and neutrophil respiratory burst. *Elife*, 9.
- PAL, U., DE SILVA, A. M., MONTGOMERY, R. R., FISH, D., ANGUITA, J., ANDERSON, J. F., LOBET, Y. & FIKRIG, E. 2000. Attachment of *Borrelia burgdorferi* within *Ixodes scapularis* mediated by outer surface protein A. *J Clin Invest*, 106, 561-9.
- PARIHAR, A., EUBANK, T. D. & DOSEFF, A. I. 2010. Monocytes and macrophages regulate immunity through dynamic networks of survival and cell death. *J Innate Immun*, 2, 204-15.
- PARK, K. R., AN, J. Y., KANG, J. Y., LEE, J. G., LEE, Y., MUN, S. A., JUN, C. D., SONG, W. K. & EOM, S. H. 2017. Structural mechanism underlying regulation of human EFhd2/Swiprosin-1 actin-bundling activity by Ser183 phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun*, 483, 442-448.

- PARK, K. R., KWON, M. S., AN, J. Y., LEE, J. G., YOUN, H. S., LEE, Y., KANG, J. Y., KIM, T. G., LIM, J. J., PARK, J. S., LEE, S. H., SONG, W. K., CHEONG, H. K., JUN, C. D. & EOM, S. H. 2016. Structural implications of Ca(2+)-dependent actin-bundling function of human EFhd2/Swiprosin-1. *Sci Rep*, 6, 39095.
- PELLETIER, I., HASHIDATE, T., URASHIMA, T., NISHI, N., NAKAMURA, T., FUTAI, M., ARATA, Y., KASAI, K., HIRASHIMA, M., HIRABAYASHI, J. & SATO, S. 2003. Specific recognition of Leishmania major poly-beta-galactosyl epitopes by galectin-9: possible implication of galectin-9 in interaction between L. major and host cells. *J Biol Chem*, 278, 22223-30.
- PIEDRA-QUINTERO, Z. L., SERRANO, C., VILLEGAS-SEPÚLVEDA, N., MARAVILLAS-MONTERO, J. L., ROMERO-RAMÍREZ, S., SHIBAYAMA, M., MEDINA-CONTRERAS, O., NAVA, P. & SANTOS-ARGUMEDO, L. 2018. Myosin 1F Regulates M1-Polarization by Stimulating Intercellular Adhesion in Macrophages. *Front Immunol*, 9, 3118.
- POGGENSEE, G., FINGERLE, V., HUNFELD, K.-P., KRAICZY, P., KRAUSE, A., MATUSCHKA, F.-R., RICHTER, D., SIMON, M., WALLICH, R., HOFMAN, H., KOHN, B., LIERZ, M., LINDE, A., SCHNEIDER, T., STRAUBINGER, R., STARK, K., SÜSS, J., TALASKA, T. & JANSEN, A. 2008. Lyme-Borreliose: Forschungsbedarf und Forschungsansätze. Robert Koch-Institut, Infektionsepidemiologie.
- POLLARD, T. D. & BORISY, G. G. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, 112, 453-465.
- PONS, V., LUYET, P. P., MOREL, E., ABRAMI, L., VAN DER GOOT, F. G., PARTON, R. G. & GRUENBERG, J. 2008. Hrs and SNX3 functions in sorting and membrane invagination within multivesicular bodies. *PLoS Biol*, 6, e214.
- PUROHIT, P., PEREZ-BRANGULI, F., PROTS, I., BORGER, E., GUNN-MOORE, F., WELZEL, O., LOY, K., WENZEL, E. M., GRÖMER, T. W., BRACHS, S., HOLZER, M., BUSLEI, R., FRITSCH, K., REGENSBURGER, M., BÖHM, K. J., WINNER, B. & MIELENZ, D. 2014. The Ca²⁺ sensor protein swiprosin-1/EFhd2 is present in neurites and involved in kinesin-mediated transport in neurons. *PLoS One*, 9, e103976.
- QUATROMONI, J. G. & ERUSLANOV, E. 2012. Tumor-associated macrophages: function, phenotype, and link to prognosis in human lung cancer. *Am J Transl Res*, 4, 376-89.
- RAMESH, T., KIM, Y.-D., KWON, M.-S., JUN, C.-D. & KIM, S.-W. 2009. Swiprosin-1 regulates cytokine expression of human mast cell line HMC-1 through actin remodeling. *Immune network*, 9, 274-284.
- RAUTER, C. & HARTUNG, T. 2005. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in Ixodes ricinus ticks in Europe: a metaanalysis. *Appl Environ Microbiol*, 71, 7203-16.
- REN, G., CRAMPTON, M. S. & YAP, A. S. 2009. Cortactin: Coordinating adhesion and the actin cytoskeleton at cellular protrusions. *Cell motility and the cytoskeleton*, 66, 865-873.
- RITTIG, M. G., KRAUSE, A., HÄUPL, T., SCHAIBLE, U. E., MODOLELL, M., KRAMER, M. D., LÜTJEN-DRECOLL, E., SIMON, M. M. & BURMESTER, G. R. 1992. Coiling phagocytosis is the preferential phagocytic mechanism for *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun*, 60, 4205-12.
- RUDENKO, N., GOLOVCHENKO, M., GRUBHOFFER, L. & OLIVER, J. H., JR. 2011. Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. *Ticks Tick Borne Dis*, 2, 123-8.
- SALVERMOSER, M., PICK, R., WECKBACH, L. T., ZEHRER, A., LÖHR, P., DRECHSLER, M., SPERANDIO, M., SOEHNLEIN, O. & WALZOG, B. 2018. Myosin 1f is specifically required for neutrophil migration in 3D environments during acute inflammation. *Blood*, 131, 1887-1898.
- SCHWAN, T. G. & PIESMAN, J. 2000. Temporal changes in outer surface proteins A and C of the Lyme disease-associated spirochete, *Borrelia burgdorferi*, during the chain of infection in ticks and mice. *J Clin Microbiol*, 38, 382-8.
- SHAND, F. H., UEHA, S., OTSUJI, M., KOID, S. S., SHICHINO, S., TSUKUI, T., KOSUGI-KANAYA, M., ABE, J., TOMURA, M., ZIOGAS, J. & MATSUSHIMA, K. 2014. Tracking of intertissue migration reveals the origins of tumor-infiltrating monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 7771-6.
- SHIMAMURA, S., SASAKI, K. & TANAKA, M. 2013. The Src substrate SKAP2 regulates actin assembly by interacting with WAVE2 and cortactin proteins. *J Biol Chem*, 288, 1171-83.

- SICA, A. & MANTOVANI, A. 2012. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*, 122, 787-95.
- SMITH, A., BRACKE, M., LEITINGER, B., PORTER, J. C. & HOGG, N. 2003. LFA-1-induced T cell migration on ICAM-1 involves regulation of MLCK-mediated attachment and ROCK-dependent detachment. *Journal of cell science*, 116, 3123-3133.
- SMITH, R., TAKKINEN, J. & EDITORIAL TEAM, C. 2006. Lyme borreliosis: Europe-wide coordinated surveillance and action needed? *Weekly releases (1997–2007)*, 11, 2977.
- STEERE, A. C., BARTENHAGEN, N. H., CRAFT, J. E., HUTCHINSON, G. J., NEWMAN, J. H., RAHN, D. W., SIGAL, L. H., SPIELER, P. N., STENN, K. S. & MALAWISTA, S. E. 1983. The early clinical manifestations of Lyme disease. *Ann Intern Med*, 99, 76-82.
- STEERE, A. C., COBURN, J. & GLICKSTEIN, L. 2004. The emergence of Lyme disease. *J Clin Invest*, 113, 1093-101.
- STEERE, A. C., MALAWISTA, S. E., SNYDMAN, D. R., SHOPE, R. E., ANDIMAN, W. A., ROSS, M. R. & STEELE, F. M. 1977. Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three connecticut communities. *Arthritis Rheum*, 20, 7-17.
- SUHONEN, J., HARTIALA, K., TUOMINEN-GUSTAFSSON, H. & VILJANEN, M. K. 2000. Borrelia burgdorferi--induced oxidative burst, calcium mobilization, and phagocytosis of human neutrophils are complement dependent. *J Infect Dis*, 181, 195-202.
- SWANSON, K. D., TANG, Y., CECCARELLI, D. F., POY, F., SLIWA, J. P., NEEL, B. G. & ECK, M. J. 2008. The Skap-hom dimerization and PH domains comprise a 3'-phosphoinositide-gated molecular switch. *Molecular cell*, 32, 564-575.
- TAKENAWA, T. & MIKI, H. 2001. WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *Journal of cell science*, 114, 1801-1809.
- TANAKA, M., SHIMAMURA, S., KURIYAMA, S., MAEDA, D., GOTO, A. & AIBA, N. 2016. SKAP2 Promotes Podosome Formation to Facilitate Tumor-Associated Macrophage Infiltration and Metastatic Progression. *Cancer Res*, 76, 358-69.
- THYLUR, R. P., KIM, Y. D., KWON, M. S., OH, H. M., KWON, H. K., KIM, S. H., IM, S. H., CHUN, J. S., PARK, Z. Y. & JUN, C. D. 2009. Swi-prosin-1 is expressed in mast cells and up-regulated through the protein kinase C beta I/eta pathway. *J Cell Biochem*, 108, 705-15.
- TILLY, K., KRUM, J. G., BESTOR, A., JEWETT, M. W., GRIMM, D., BUESCHEL, D., BYRAM, R., DORWARD, D., VANRADEN, M. J., STEWART, P. & ROSA, P. 2006. Borrelia burgdorferi OspC protein required exclusively in a crucial early stage of mammalian infection. *Infect Immun*, 74, 3554-64.
- TIMMS, J. F., SWANSON, K. D., MARIE-CARDINE, A., RAAB, M., RUDD, C. E., SCHRAVEN, B. & NEEL, B. G. 1999. SHPS-1 is a scaffold for assembling distinct adhesion-regulated multi-protein complexes in macrophages. *Curr Biol*, 9, 927-30.
- TU, Y., ZHANG, L., TONG, L., WANG, Y., ZHANG, S., WANG, R., LI, L. & WANG, Z. 2018. EFhd2/swi-prosin-1 regulates LPS-induced macrophage recruitment via enhancing actin polymerization and cell migration. *Int Immunopharmacol*, 55, 263-271.
- VAROL, C., MILDNER, A. & JUNG, S. 2015. Macrophages: development and tissue specialization. *Annu Rev Immunol*, 33, 643-75.
- VEGA, I. E., TRAVERSO, E. E., FERRER-ACOSTA, Y., MATOS, E., COLON, M., GONZALEZ, J., DICKSON, D., HUTTON, M., LEWIS, J. & YEN, S. H. 2008. A novel calcium-binding protein is associated with tau proteins in tauopathy. *Journal of neurochemistry*, 106, 96-106.
- VUADENS, F., RUFER, N., KRESS, A., CORTHÉSY, P., SCHNEIDER, P. & TISSOT, J. D. 2004. Identification of swi-prosin 1 in human lymphocytes. *Proteomics*, 4, 2216-2220.
- WANG, Y., JIN, H., WANG, W., WANG, F. & ZHAO, H. 2019. Myosin1f-mediated neutrophil migration contributes to acute neuroinflammation and brain injury after stroke in mice. *J Neuroinflammation*, 16, 77.

- WANG, Y., SONG, M. & GAO, B. 2022. EF-Hand Domain-Containing Protein D2 (EFHD2) Correlates with Immune Infiltration and Predicts the Prognosis of Patients: A Pan-Cancer Analysis. *Comput Math Methods Med*, 2022, 4878378.
- WIESNER, C., LE-CABEC, V., EL AZZOZI, K., MARIDONNEAU-PARINI, I. & LINDER, S. 2014. Podosomes in space: macrophage migration and matrix degradation in 2D and 3D settings. *Cell adhesion & migration*, 8, 179-191.
- ZAJKOWSKA, J., LEWCZUK, P., STRLE, F. & STANEK, G. 2012. Lyme borreliosis: from pathogenesis to diagnosis and treatment. *Clin Dev Immunol*, 2012, 231657.
- ZHANG, S., TU, Y., SUN, Y. M., LI, Y., WANG, R. M., CAO, Y., LI, L., ZHANG, L. C. & WANG, Z. B. 2018. Swiprosin-1 deficiency impairs macrophage immune response of septic mice. *JCI Insight*, 3.
- ZHANG, Y., CAO, F., ZHOU, Y., FENG, Z., SIT, B., KRENDEL, M. & YU, C. H. 2019. Tail domains of myosin-1e regulate phosphatidylinositol signaling and F-actin polymerization at the ventral layer of podosomes. *Mol Biol Cell*, 30, 622-635.
- ZHOU, L., ZHANG, Z., ZHENG, Y., ZHU, Y., WEI, Z., XU, H., TANG, Q., KONG, X. & HU, L. 2011. SKAP2, a novel target of HSF4b, associates with NCK2/F-actin at membrane ruffles and regulates actin reorganization in lens cell. *J Cell Mol Med*, 15, 783-95.

8 Danksagung

Zu Beginn möchte ich mich bei Prof. Dr. Stefan Linder bedanken, der mich von Beginn an der Doktorarbeit begleitet hat. Sei es durch die regelmäßigen Gespräche zur Versuchsplanung und Experimentenplanung oder die Übernahme der Betreuung der Doktorarbeit, nachdem mein Betreuer berufsbedingt aus der Laborgruppe ausgeschieden ist. Prof. Linder war immer an meiner Seite, wofür ich sehr dankbar bin.

Weiterhin möchte ich mich bei den Mitgliedern der Laborgruppe bedanken, die mir während meiner Versuche stets mit ihrem Wissen und ihren Ratschlägen beiseite standen. Sei es die Einarbeitung als auch die Versuchsoptimierungen, ich konnte mich jederzeit an Postdoktoranden, Doktoranden, Masterstudenten und technische Assistenz wenden und mein Anliegen besprechen. Ich bin allen Wissenschaftlern und der technischen Assistenz dankbar für die Zeit.

Zudem möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mir immer zur Seite stand, dazu gehört insbesondere meine kleine Schwester und meine Tante als auch mein Onkel.

Größter Dank gilt meiner Mutter, die immer für mich da war zu Hochs als auch Tiefs während des Studiums und mich immer begleitet hat. Sie hat mir das Medizinstudium so wie ich es mir vorgestellt habe, ermöglicht und war auch während der Zeit der Dissertation, während der Experimentierphase als auch während des Schreibprozess stets an meiner Seite und hat mir Kopf und Rücken frei gehalten, sodass ich mich auf meine Arbeit konzentrieren konnte. Dafür mein größter Dank.

Yousef Barsoom

9 Lebenslauf

Lebenslauf aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht enthalten

10 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: Yousef Barsoom