

**Untersuchungen zur Interaktion von  
*B. burgdorferi* sensu lato mit Wirtszellen**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
an der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von Christiane Heimerl

eingereicht am 01. Oktober 2004

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Thomas Cremer
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Charles David
Sonderberichterstatterin:	Prof. Dr. med. Bettina Wilske
Tag der mündlichen Prüfung:	04. Oktober 2005

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

LINDER, S., HEIMERL C., FINGERLE, V., AEPFELBACHER, M., WILSKÉ, B. (2001) Coiling phagocytosis of *Borrelia burgdorferi* by primary human macrophages is controlled by CDC42Hs and Rac1 and involves recruitment of Wiskott-Aldrich Syndrome protein and Arp2/3 complex. *Infect. Immun.* 69:1739-1746

Kongreßbeiträge:

Vortrag auf der Tagung der DGHM vom 11. bis 14. Oktober 1999 in Regensburg: HEIMERL, C., LINDER, S., AEPFELBACHER, M., RITTIG, M., FINGERLE, V., WILSKÉ, B. (1999) Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts während der Interaktion von Borrelien mit humanen Makrophagen. *Am. J. Trop. Med. Hyg. Suppl.* 61:506

Posterpräsentation auf der Gordon Research Conference vom 16. bis 21. Januar 2000 in Ventura, CA, USA: HEIMERL, C., LINDER, S., AEPFELBACHER, M., RITTIG, M., FINGERLE, V., PFISTER, H.-W., WILSKÉ, B. (2000) Changes in the actin cytoskeleton of primary human macrophages induced by interaction with borreliae. in: Norris, S. J., Zuerner, R. I. (eds.) *Gordon Conference - Biology of Spirochetes*: P15

Posterpräsentation auf der gemeinschaftlichen Tagung der DGHM, ÖGHM und VAAM vom 12. bis 16. März 2000 in München: HEIMERL, C., LINDER, S., AEPFELBACHER, M., RITTIG, V., FINGERLE, V., WILSKÉ, B. (2000) Changes in the actin cytoskeleton of primary human macrophages induced by interaction with borreliae. in: Böck, A., Heesemann, J., Schleifer, K. H., Wagner, H., Vorstände der DGHM, ÖGHMP, VAAM. (eds.) 1. Gemeinsamer Kongreß der DGHM, ÖGHM und VAAM. *Microbiologie 2000 - Gesundheit – Ökologie - Biotechnologie*. Biospektrum, Spektrum Akademischer Verlag, 174:(15.P.18.07)

Vortrag auf der Tagung für Biomedizinische Forschung TIZ-BIFO vom 28. bis 30. März 2003: HEIMERL, C., FINGERLE, V., WILSKÉ, B. (2000) Expression relevanter outer surface Proteine von *B. burgdorferi* s.l. in Vektor- und Wirtszellsystemen im Vergleich zum Tiermodell (Gerbil, *Ixodes ricinus*). *Der Tierschutzbeauftragte* 9:10-11

Posterpräsentation auf dem VI<sup>th</sup> International Potsdam Symposium on Tick-Borne Diseases vom 26. bis 27. April 2001 in Berlin, Potsdam: HEIMERL, C., LINDER, S., FINGERLE, V., AEPFELBACHER, M., WILSKÉ, B. (2001) Coiling phagocytosis of *Borrelia burgdorferi* by primary human macrophages is controlled by CDC42Hs and Rac1 and involves recruitment of Wiskott-Aldrich Syndrome protein and Arp2/3 complex. in:

Süss, J., Dautel, H., Kahl, O., Schönberg, A. (eds.) VI<sup>th</sup> International Potsdam Symposium on Tick-Borne Diseases, Berlin: P39 und in: Int. J. Med. Microbiol. 291, Suppl. 33:235

Posterpräsentation auf dem Symposium on Tick-Transmitted Diseases Pathogenesis, Diagnosis and Management of Lyme borreliosis, Ehrlichiosis, and Tick-Borne Encephalitis vom 13. bis 15. September 2001 in Ljubljana/Slovenia: HEIMERL, C., LINDER, S., FINGERLE, V., AEPFELBACHER, M., WILSKÉ, B. (2001) Coiling phagocytosis of *Borrelia burgdorferi* by primary human macrophages - morphological aspects, molecular machinery and signal transduction pathways. in: Slovenian Society for Infectious Diseases and Austrian Society for Hygiene, Microbiology and Preventive Medicine (ÖGHMP). (eds.) Symposium on Tick-Transmitted Diseases Pathogenesis, Diagnosis and Management of Lyme borreliosis, Ehrlichiosis, and Tick-Borne Encephalitis, Ljubljana/Slovenia: P36

Posterpräsentation auf der Tagung der DGHM vom 30. Sept. bis 04. Okt. 2001 in Aachen: HEIMERL, C., LINDER, S., FINGERLE, V., AEPFELBACHER, M., WILSKÉ, B. (2001) Coiling phagocytosis of *Borrelia burgdorferi* by primary human macrophages - morphological aspects, molecular machinery and signal transduction pathways. in: Int. J. Med. Microbiol. 291 Suppl. 32: P 147

Vortrag auf der Gordon Research Conference 27. Jan. bis 01. Feb. 2002 in Ventura, CA, USA: HEIMERL, C., LINDER, S., AEPFELBACHER, M., FINGERLE, V., WILSKÉ, B. (2002) Actin skeleton rearrangements during coiling phagocytosis. in: Zuerner, R. I., Weis, J. (eds.) Gordon Conference - Biology of Spirochetes

Posterpräsentation auf der IX<sup>th</sup> International Conference on Lyme Borreliosis and other tick-borne diseases vom 18. bis 22. August 2002 in New York, USA: HEIMERL, C., LINDER, S., FINGERLE, V., AEPFELBACHER, M., WILSKÉ, B. (2002) Coiling phagocytosis of *Borrelia burgdorferi* by primary human macrophages - morphological aspects, molecular machinery and signal transduction pathways. in: Wormser, G. P. (eds.) IX<sup>th</sup> International Conference on Lyme Borreliosis and other tick-borne diseases. New York: P 222

**MEINER MUTTER**

---

Abkürzungsverzeichnis	9
1 Einleitung	11
1.1 Lyme-Borreliose – ein Überblick	12
1.1.1 Historie der Lyme-Borreliose	12
1.1.2 Epidemiologie der Lyme-Borreliose	13
1.1.3 Klinische Manifestationen der Lyme-Borreliose	14
1.1.4 Diagnostik der Lyme-Borreliose	16
1.1.5 Therapie der Lyme-Borreliose	16
1.1.6 Prävention der Lyme-Borreliose	17
1.1.7 <i>B. burgdorferi</i> sensu lato, der Erreger der Lyme-Borreliose	18
1.2 Lyme-Borreliose, der Themenkomplex der Dissertation	19
1.2.1 Aspekte der Adhäsion – Überblick über die aktuelle Literatur	20
1.2.2 Aspekte der Invasion – Überblick über die aktuelle Literatur	24
1.2.3 Ziele der Dissertation	27
2 Material	29
2.1 Bakterien	29
2.1.1 <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato Isolate	29
2.1.2 <i>Escherichia coli</i> Stämme	29
2.2 Säugerzellen	30
2.2.1 primäre Zellen	30
2.2.2 Zelllinien	30
2.3 Kulturmedien und -zusätze	31
2.4 Kulturgefäße und Zubehör	32
2.5 Chemikalien und Lösungen	32
2.6 Größenstandards für Gelelektrophorese	34
2.7 Proteine und Enzyme	34
2.8 Vektoren	34
2.9 Nukleotide	34
2.10 Oligonukleotide	35
2.11 DNA-Konstrukte	35
2.12 Kits	35
2.13 Antikörper	35
2.13.1 Monoklonale Mausantikörper	36
2.13.2 Polyklonale Mausantikörper	36
2.13.3 Polyklonale Kaninchenserum	36
2.13.4 Polyklonale Humanserum (Patientenserum)	36
2.13.5 Magnetbead-konjugierte monoklonale Mausantikörper	36
2.13.6 Fluorophor-konjugierte monoklonale Antikörper	37
2.13.7 Fluorophor-konjugierte sekundäre Antikörper	37
2.13.8 Peroxidase-konjugierte sekundäre Antikörper	37
2.14 Verbrauchsmaterialien	38
2.15 Chromatographiesäulen und -matrices	38
2.16 Geräte	38
2.17 Software	39
2.18 Mikroskope	40
3 Methoden	41
3.1 Nährmedien	41
3.1.1 MKP-Medium	41
3.1.2 LB-Medium	42
3.1.3 Zellkulturmedien	43
3.1.4 Kollagen- bzw. Gelatine-Beschichtung von Zellkulturgefäßen	44
3.2 Borrelienkultur	44
3.2.1 Kultivierung	44
3.2.2 Kryokonservierung	45
3.2.3 Vitalfärbung	45
3.2.4 Wachstumsmessungen (Wachstumskurve)	45

3.3	Zellkultur	46
3.3.1	Isolierung und Weiterkultivierung primärer humaner Monozyten	46
3.3.2	Isolierung und Kultur muriner Peritonealmakrophagen	47
3.3.3	Isolierung und Kultur humaner Nabelschnurzellen (HUVECs)	48
3.3.4	Kultur adhärent wachsender Zellen	48
3.3.5	Aufteilung adhärent wachsender Zelllinien	48
3.3.6	Einfrieren und Auftauen von eukaryoten Zellen	49
3.3.7	Mycoplasmen-Test	49
3.4	Koinkubation von <i>B. burgdorferi</i> sensu lato mit verschiedenen Säugerzellen	49
3.4.1	Vorbehandlung der Borrelien (Opsonierung)	49
3.4.2	Vorbehandlung der Zellen und Zelllinien	50
3.4.3	Koinkubation von Borrelien mit verschiedenen Säugerzellen	51
3.5	Koinkubation verschiedener Zellen und Zelllinien mit Mikrosphären	52
3.6	Mikroinjektion eukaryoter Zellen	52
3.7	Immunfluoreszenztest (IFT)	53
3.7.1	IFT an lebenden Borrelien	55
3.7.2	IFT an Luft- bzw. Methanol-fixierten Borrelien	55
3.7.3	IFT an fixierten Koinkubationspräparaten mit Borrelien	56
3.7.4	IFT an fixierten Koinkubationspräparaten mit Mikrosphären	57
3.7.5	Überblick über die angewandten Mehrfachimmunfluoreszenzmarkierungen	58
3.7.6	Analyse von Immunfluoreszenzpräparaten	59
3.7.7	Digitale Bearbeitung von Immunfluoreszenzaufnahmen	60
3.7.8	Statistische Auswertung	61
3.8	Durchflusszytometrie	61
3.8.1	Grundlagen	61
3.8.2	Durchführung	62
3.9	Molekularbiologische Methoden	62
3.9.1	Horizontale Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten	62
3.9.2	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	63
3.9.3	Reinigung und Konzentration von DNA	63
3.9.4	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA	63
3.9.5	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	64
3.9.6	Präparation und Reinigung von chromosomaler DNA aus Borrelien	64
3.9.7	Analytische Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	64
3.9.8	Präparative Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	65
3.9.9	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	65
3.9.10	DNA-Sequenzierung	67
3.9.11	Methoden der DNA-Klonierung	69
3.10	Methoden der Proteinanalytik	74
3.10.1	Anzucht und Induktion von <i>E. coli</i> -Transformanten	74
3.10.2	Expressionsanalyse mit Gesamtproteinextrakten	74
3.10.3	Zellaufschluss im präparativen Maßstab	75
3.10.4	Methoden der Proteinreinigung	76
3.10.5	Proteinkonzentrationsbestimmung	80
3.10.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	80
3.10.7	Coomassie-Brillant Blue-Färbung	81
3.10.8	Western Blot	81
3.10.9	Dot Blot	82
3.10.10	Immunnachweis	82
3.10.11	Beschichtung von Mikrosphären	83
4	Ergebnisse	85
4.1	Bindungsfähigkeit von <i>B. burgdorferi</i> sensu lato an Säugerzellen	85
4.1.1	Wachstumsanalysen von <i>B. burgdorferi</i>	86
4.1.2	Bindungsfähigkeit von <i>B. burgdorferi</i> an Säugerzellen	90
4.1.3	Vergleich des OspA- und OspC-Expressionsmusters bei zellassozierten und nicht-zellassozierten Borrelien	94
4.1.4	Einfluss von monoklonalen anti-Borrelien-Antikörpern auf die Adhärenz von <i>B. burgdorferi</i> sensu lato an Säugerzellen	100
4.2	Ist die Bindung von <i>B. burgdorferi</i> sensu lato an Säugerzellen $\alpha$ 2-Integrin-vermittelt?	104

---

4.3	Untersuchungen zu Fibronectin-bindenden Proteinen verschiedener <i>B. burgdorferi</i> sensu lato Spezies	107
4.3.1	Klonierung rekombinanter Fibronectin-bindender Proteine verschiedener <i>B. burgdorferi</i> sensu lato Spezies	107
4.3.2	Sequenzanalysen der <i>bbk32</i> -Expressionseinheiten	112
4.3.3	Proteinchemische Charakterisierung der rBBK32-Varianten	115
4.3.4	Diagnostische Relevanz der rekombinanten Fibronectin-bindenden Proteine	118
4.3.5	Zellbiologische Experimente	120
4.4	Interaktion von <i>B. burgdorferi</i> sensu lato mit phagozytierenden Zellen	132
4.4.1	Morphologische Charakterisierung des Interaktionsprozesses	132
4.4.2	Standardisierung der Genese von Coiling-Pseudopodien	136
4.4.3	Molekulare Charakterisierung der Coiling-Pseudopodien	138
4.4.4	Der Einfluss der Rho-GTPasen Rho, CDC42Hs und Rac auf die Genese Borrelien-induzierter Coiling-Pseudopodien	143
5	Diskussion	149
5.1	Untersuchungen zu Bindungsfähigkeit von <i>B. burgdorferi</i> sensu lato an Säugerzellen	149
5.2	Untersuchungen zur Adhärenz von <i>B. burgdorferi</i> sensu lato an CD18-defiziente Makrophagen	155
5.3	Untersuchungen zu Fibronectin-bindenden Proteinen verschiedener <i>B. burgdorferi</i> sensu lato Spezies	158
5.4	Untersuchungen zur Coiling-Phagozytose von <i>B. burgdorferi</i> sensu lato durch primäre humane Makrophagen	166
6	Zusammenfassung	172
7	Literaturverzeichnis	174
8	Anhang	198
	Danksagung	
	Lebenslauf	

## Abkürzungsverzeichnis

ad.	<b>addiere</b>
AG	<b>Antigen</b>
AK	<b>Antikörper</b>
AP	<b>Alkalische Phosphatase</b>
APS	<b>Amoniumpersulfat</b>
Aq. dest.	<b>Aqua destillata</b>
Arp2/3 Komplex	<b>aktin related protein 2/ aktin related protein 3 complex</b>
AS	<b>Aminosäure</b>
ATCC	<b>american type culture collection</b>
ATP	<b>Adenosintriphosphat</b>
BSA	<b>Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)</b>
BSK-Medium	<b>Barbour-Stoenner-Kelly-Medium</b>
°C	<b>Grad Celsius</b>
CDC42Hs	<b>cell division cycle protein 42 (Zellzyklus-Protein 42) aus <i>Homo sapiens</i></b>
Dabco	<b>1,4-Diazabicyclo [2.2.2] oktan</b>
DAPI	<b>Diamino-Phenylindol Dihydrochlorid Hydrat</b>
dbp	<b>Decorin bindendes Protein</b>
dest.	<b>destilliert</b>
DMEM	<b>Dulbecco's modified Eagle's Medium</b>
DMSO	<b>Dimethylsulfoxid</b>
DNA	<b>Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)</b>
ds	<b>doppelsträngig</b>
DSMZ	<b>Dt. Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH</b>
EDAC	<b>1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimid, Hydrochlorid</b>
EDTA	<b>Ethylendinitrilotetraacetic acid (Ethylendinitrilotetraessigsäure)</b>
ELISA	<b>Enzyme-linked immunosorbent assay</b>
ERG	<b>Eppendorf Reaktionsgefäß</b>
EtOH	<b>Ethanol</b>
F	<b>Farad (Kapazität)</b>
F12K	<b>Ham's F12 Medium, Kaighn's modifiziert</b>
FcγR	<b>Fcγ-Rezeptor</b>
FITC	<b>Fluoresceinisothiocyanat</b>
FKS	<b>Fötale Kälberserum</b>
FPLC	<b>Fast Protein Liquid-Chromatographie</b>
FSC	<b>forward light scatter, Vorwärtsstreulicht</b>
g	<b>Fallbeschleunigung</b>
ggf.	<b>gegebenenfalls</b>
GV-SOLAS	<b>G. f. Versuchstierkunde – Society f. Laboratory Animal Science</b>
h	<b>Stunde</b>
hPa	<b>Hektopascal (SI-Einheit, entspricht 1 Millibar)</b>
HRP	<b>horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)</b>
HS	<b>Humanserum</b>
HUVEC	<b>Human Umbilical Vein Cell (Nabelschnurzelle)</b>
ICAM-1	<b>intercellular adhesion molecule-1</b>
IEP	<b>isoelektrischer Punkt</b>
IFT	<b>Immunfluoreszenztest</b>
IL-8	<b>Interleukin 8</b>
IMAC	<b>Immobilisierte Metall-Affinitäts-Chromatographie</b>
IP-10	<b>interferon-gamma (IFN-γ)-inducible protein of 10 kDa</b>
IPTG	<b>Isopropyl-β-thiogalaktopyranosid (IPTG)</b>
kb	<b>Kilo Basen</b>
kBp	<b>Kilo Basenpaar</b>

kDa	<b>Kilo Dalton</b>
l	<b>Liter</b>
LB	Nährmedium nach S. E. <b>Luria</b> und G. <b>Bertani</b>
LM	<b>Lichtmikroskop</b>
M	<b>Mol</b>
M199	<b>Medium 199</b>
MAK	<b>monoklonaler Antikörper</b>
MBp	<b>Mega Basenpaar</b>
MCP-1	<b>monocyte chemotactic protein-1</b>
Mes	2[N- <b>Morpholino</b> ]ethansulfonsäure
Mig	<b>monokine induced by interferon-gamma (IFN-<math>\gamma</math>)</b>
min	<b>Minute</b>
MKP-Medium	<b>modifiziertes Kelly-Medium nach Preac-Mursic</b>
MvP	<b>Max von Pettenkofer-Institut</b>
ml	<b>Milliliter</b>
MOI	<b>multiplicity of infection</b>
NaAc	<b>Natriumacetat</b>
NCBI	<b>National Center for Biotechnology Information</b>
NGS	<b>normal goat serum (Ziegen Serum)</b>
NIH	<b>National Institute of Health</b>
no.	<i>engl.</i> : number
NTA	<b>Nitrioltriacetat</b>
OD	<b>optische Dichte</b>
ORF	<b>open reading frame (offener Leserahmen)</b>
Osp	<b>outer surface protein (Oberflächenprotein)</b>
OT	<b>Objektträger</b>
PBS	<b>phosphate buffered saline (physiologische Phosphat-Pufferlösung)</b>
PCR	<b>Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)</b>
PE	<b>Phycoerytherin</b>
pmol	<b>Pikomol</b> ( $10^{-12}$ Mol)
PMR-Agar	<b>Preac-Mursic-Reinhard-Agar</b>
rpm	<b>rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)</b>
RT	<b>Raumtemperatur</b>
s	<b>Sekunde</b>
S	<b>Svedberg-Konstante</b>
SDS	<b>Sodium-dodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)</b>
sek.	<b>Sekundär</b>
SSC	<i>side scatter</i> , Seitwärtsstreulicht
tag	<i>engl.</i> : Schwanz, Anhängsel
TEMED	<b>Tetramethylethylendiamin</b>
Temp.	<b>Temperatur</b>
Tris	<b>Tris-Hydroxy-Methyl-Ammonium-Methan</b>
U	<b>unit (Einheit)</b>
u.a.	<b>unter anderem</b>
üN	<b>über Nacht</b>
v/v	<b>volume per volume (Volumenanteil)</b>
VCAM-1	<b>vascular cell adhesion molecule-1</b>
Vol.	<b>Volumen</b>
w/v	<b>weight per volume (Gewichtsanteil)</b>
WASp	<b>Wiskott-Aldrich Syndrom Protein</b>
X-Gal	<b>5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-<math>\beta</math>-D-Galaktosid</b>
z.A.	<b>zur Analyse</b>
z.B.	<b>zum Beispiel</b>

## 1 Einleitung

Mit einer geschätzten Inzidenz von 0,1-0,2 % in Europa ist die Lyme-Borreliose die häufigste durch Zecken übertragene Infektionskrankheit in der nördlichen Hemisphäre (STANEK et al. 1993; O'CONNELL et al., 1998). In der Bundesrepublik Deutschland erkranken jährlich ca. 0,5 % der Gesamtbevölkerung an Lyme-Borreliose. In absoluten Zahlen entspricht das 40.000-80.000 Neuerkrankungen pro Jahr, wobei territoriale Unterschiede zu verzeichnen sind (HUPPERTZ et al., 1999; REIMERS et al., 1992). So ist beispielsweise für den Raum Oberbayern eine auffallend hohe Inzidenz von ca. 1,5 % beschrieben (REIMER et al., 1999). Genaue Zahlen sind jedoch schwer zu ermitteln, da es bisher keine generelle Meldepflicht für die Erkrankung gibt.

Die Lyme-Borreliose zählt neben der ebenfalls durch Zecken übertragenen Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME, bzw. TBE nach engl. *tickborne encephalitis*) in Mittel- und Nordeuropa, sowie in den Vereinigten Staaten zu den klimaabhängigen Vektor-Krankheiten. Während für die Zeckenenzephalitis, eine Virusinfektion, die zu Erkrankungen der Hirnhaut, des Gehirns und des Rückenmarks führen kann, bislang keine wirksame Therapie zur Verfügung steht, ist die durch Bakterien verursachte Lyme-Borreliose mit Hilfe von Antibiotika gut behandelbar. In den 1990er Jahren ist die Verbreitung der Lyme-Borreliose in den Vereinigten Staaten, nach einem ersten deutlichen Ausbruch in der Mitte der 70er Jahre im US-Staat Connecticut, stark angestiegen. Vor allem die in den letzten Jahrzehnten zunehmend milderen Wintertemperaturen, die auch von Klimamodellen als typische Folge des anthropogenen Treibhauseffekts berechnet wurden (ALBRITTON und MEIRA FILHO, 2001), haben die Überlebenschancen der Zecken und ihrer Wirtstiere (kleinere Waldnager und Rotwild) stark begünstigt (SUBAK, 2003). So hat sich beispielsweise in Schweden durch das frühere Einsetzen des Frühjahrs, den späteren Winterbeginn und mildere Wintertemperaturen in den 90er Jahren nicht nur die relative Zeckendichte signifikant erhöht, sondern die Vektorpopulationen haben sich zudem weiter nach Norden ausgebreitet (LINDGREN et al., 2000). Eine nicht zu vernachlässigende Rolle spielen auch das veränderte Freizeitverhalten des "Zwischenwirtes Mensch" und dessen Eingriffe in die Natur, z.B. im Rahmen von Renaturierungsmaßnahmen. Durch die verbesserten Habitatbedingungen von Vektor und Wirt, was insbesondere in Zentraleuropa und den baltischen Staaten zu einem signifikanten Anwachsen dortiger Zeckenpopulationen führte, stieg somit die Häufigkeit des Zeckenkontaktes (RANDOLPH, 2001). Die Summe aus globaler Klimaerwärmung, Verschiebung des

Jahreszeitenwechsels, dem veränderten Freizeitverhalten des Menschen und dessen Eingriffe in Natur und Landschaft, führt einerseits zu einer Wanderung der Endemiegebiete gen Norden und andererseits zu einer erhöhten und im Jahresverlauf verlängerten Aktivität stetig wachsender Zeckenpopulationen. Zusammen mit den immer sensibler werdenden Nachweismethoden resultiert beides in einem dramatischen Anstieg der Lyme-Borreliose-Fälle sowohl in den USA, wie auch in europäischen Breiten und rechtfertigt somit das große Interesse von Medizinern und Wissenschaftlern an dieser Spirochätose.

## **1.1 Lyme-Borreliose – ein Überblick**

### **1.1.1 Historie der Lyme-Borreliose**

*Borrelia burgdorferi*, der Erreger der Multisystemerkrankung Lyme-Borreliose, wurde 1981 von WILLY BURGDORFER in Zecken der Spezies *Ixodes dammini* entdeckt (BURGDORFER et al., 1982). Diese Entdeckung ermöglichte in der Folge zahlreiche, in ihrer Ätiologie bis dahin unklare klinische Manifestationen, einer gemeinsamen Entität zuzuordnen.

Bereits 1883 und 1909 wurden die Krankheitsbilder der Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA) sowie des Erythema migrans (EM), zwei Formen dermalen Manifestation der Lyme-Borreliose, in Europa erstmalig erwähnt (BUCHWALD, 1883; AFZELIUS, 1910). In den vierziger Jahren, lange vor der Entdeckung des Erregers, gab es erste Hinweise auf eine infektiöse Ursache der Erkrankung. Die Beobachtung einer positiven Pallidareaktion bei der ACA ließ die Autoren GRÜNEBERG (1952) und KAHLE (1942) unabhängig voneinander eine Spirochäten-Ätiologie mutmaßen. Eine Infektionsätiologie der ACA wurde auch 1954 nach Implantationsversuchen von GÖTZ (1954) vermutet, wobei dieser Autor jedoch die Idee einer Virusinfektion propagierte (GÖTZ und NASEMANN, 1956).

Ausgangspunkt der endgültigen Aufklärung des kausalen Agens der Lyme-Borreliose war schließlich die kleine Ortschaft Lyme, im amerikanischen Bundesstaat Connecticut. Dort traten ab 1975 gehäuft Fälle von juveniler rheumatoider Arthritis auf. Angeregt durch Polly Murray, der Mutter eines erkrankten Kindes, gelang es der Gruppe um den amerikanischen Rheumatologen ALAN STEERE 1976 einen epidemiologischen Zusammenhang zwischen vorausgegangenem Zeckenstich und endemischem Auftreten der schweren Arthritiden herzustellen, was zur Beschreibung einer bisher nicht bekannten Form der Arthritis, der Lyme Arthritis führte (STEERE et al., 1976). Die

Beobachtung von dermalen, neurologischen und kardialen Manifestationen erweiterten das klinische Spektrum der später als Lyme-Krankheit beschriebenen klinischen Entität (STEERE et al., 1977), die heute übereinstimmend als "Lyme-Borreliose" bezeichnet wird. Epidemiologische Hinweise sprachen für eine durch Arthropoden übertragene Infektionskrankheit (STEERE und MALAWISTA, 1979). Erst im Jahre 1981 entdeckte WILLY BURGDORFER mittels Dunkelfeldmikroskopie im Mitteldarm einer auf Shelter Island, New York, gesammelten Zecke der Art *Ixodes dammini* eine bisher unbekannte Spirochätenart. Der Nachweis der Spirochäten, die in einem modifizierten Kelly-Medium angezüchtet werden konnten, führte zur Isolierung des Agens der Lyme-Borreliose (BURGDORFER et al., 1982).

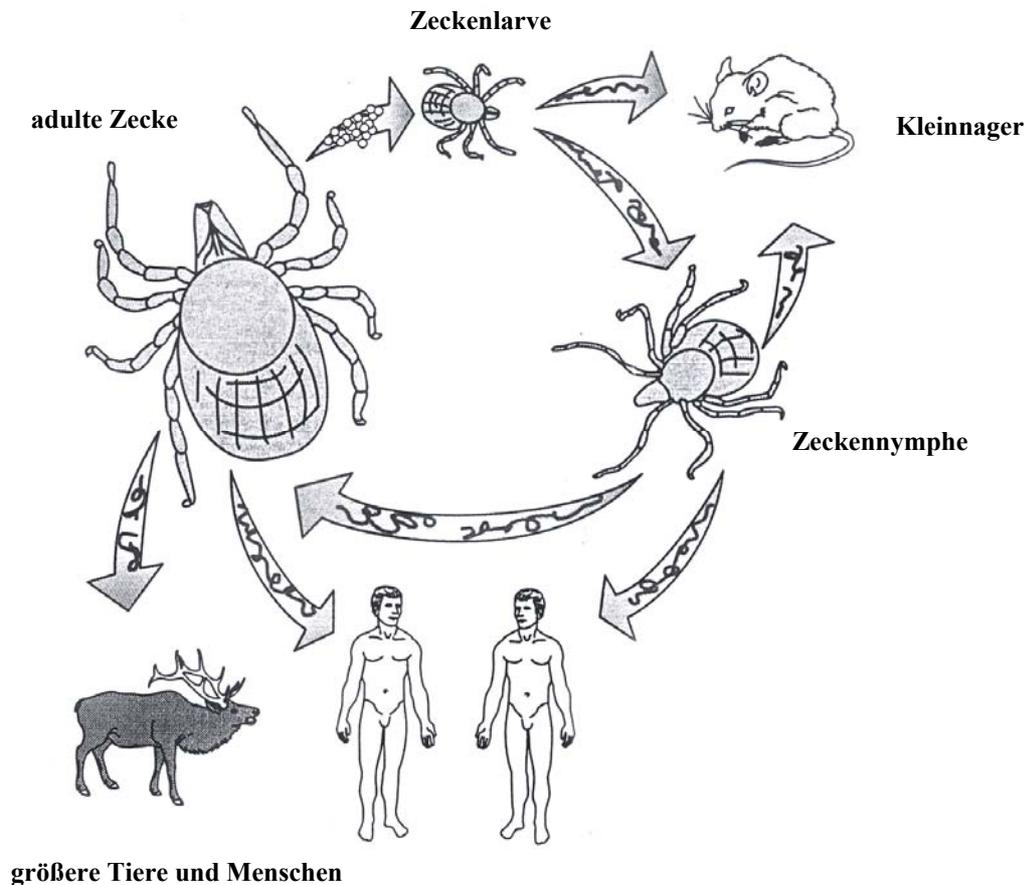
### 1.1.2 Epidemiologie der Lyme-Borreliose

*B. burgdorferi* sensu lato wird durch Zecken der Gattung *Ixodes* (*I.*) übertragen (BURGDORFER, 1984). Die Lyme-Borreliose ist die häufigste zeckenübertragene Infektionskrankheit des Menschen. Das Verbreitungsgebiet dieser Spirochätose erstreckt sich etwa zwischen dem 40. und 60. nördlichen Breitengrad gürtelförmig um die gesamte Welt. Weitaus begrenzter ist hingegen die Verbreitung der Virus-bedingten, ebenfalls durch Schildzecken übertragene Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME), die nur in wenigen Endemiegebieten auftritt.

Der Hauptvektor in Europa ist die Schildzecke *I. ricinus*, gemeinhin als "Holzbock" bekannt. In Asien wird *B. burgdorferi* von *I. persulcatus* (MÜLLER, 1989; ZHANG et al., 1997b), in Russland von *I. ricinus* und *I. persulcatus* (GERN et al., 1993; ANDERSON, 1989) übertragen. Hauptvektor im Süden und Osten Nordamerikas ist *I. scapularis* (BURGDORFER et al., 1982), im Westen hingegen *I. pacificus* (BARBOUR und FISH, 1993).

Die durchschnittliche Infektionsrate von *I. ricinus* beträgt 10-20 %, korrelierend mit dem Entwicklungsstadium der Zecken (GERN et al., 1993). So wurde beispielsweise für Süddeutschland eine Durchseuchung der Larven von 1-2 %, der Nymphen von 10 % und der adulten Tiere von 20 % beschrieben (FINGERLE et al., 1994; WILSKE et al., 1987). Dies spricht für eine Aufnahme der Borrelien mit der Blutmahlzeit, während die transovarielle Übertragung von Borrelien selten ist (BURGDORFER et al., 1989; FINGERLE et al., 1994; WILSKE et al., 1986). Die Zecke hat ein breites Wirtsspektrum, das neben Wildtieren (Nagetiere, Vögel, etc.) auch domestizierte Tiere umfasst. Das Bakterium kann jederzeit beim Blutsaugen von jedem Entwicklungsstadium der Zecke

auf einen Wirt, egal ob Reservoirtier oder Mensch, übertragen werden (vgl. Abbildung 1.1).



**Abbildung 1.1:** Entwicklungszyklus der Schildzecke *Ixodes ricinus* und Übertragung des Erregers der Lyme-Borreliose (nach BÖSEBECK, 1998)

### 1.1.3 Klinische Manifestationen der Lyme-Borreliose

Das Spektrum der Lyme-Borreliose umfasst im wesentlichen dermale, extraartikuläre, neurologische und kardiale Manifestationen, die sowohl isoliert, als auch in unterschiedlichen Kombinationen auftreten können (ÅSBRINK et al., 1993; HERZER, 1993; PFISTER et al., 1993; STANEK, 1985; STEERE et al., 1977, 1978).

Der spontane Verlauf der Erkrankungen reicht von der mild verlaufenden Lokalinfection Erythema migrans (EM) bis zu chronisch-persistierenden oder progredienten Systemerkrankungen (Acrodermatitis chronica atrophicans, chronische Enzephalomyelitis und Arthritis). Anhand der verschiedenen Symptome, die in einer bestimmten zeitlichen Abfolge nach dem Zeckenstich auftreten können, unterscheidet man bei der Erkrankung Frühstadien (Stadium I–II) und ein Spätstadium (Stadium III) (STEERE, 1989).

### **Stadium I**

Leitsymptom und häufigste Frühmanifestation der Lyme-Borreliose ist das Erythema migrans, oft als Wanderröte bezeichnet (ÅSBRINK et al., 1984; WEBER et al., 1993a). Die rote Effloreszenz tritt in 13-72 % der Infektionen (PETERSEN et al., 1989; WILSKE et al., 1989) Tage bis Wochen nach dem Zeckenstich auf und kann von grippeähnlichen Symptomen wie Myalgien, Arthralgien, Kopfschmerzen und Fieber begleitet sein (STEERE et al., 1977; WEBER et al., 1993b).

### **Stadium II**

Nach Wochen bis Monaten kann das Stadium I der Lyme-Borreliose in Folge einer disseminierten Infektion enden. Häufigste Manifestation ist die lymphozytäre Meningoradikulitis, auch bekannt als Bannwarth-Syndrom (BANNWARTH, 1941; GARIN und BUJADOUX, 1922; PFISTER et al., 1993). Leitsymptome sind heftige, meist nächtlich betonte, radikuläre Schmerzen, die mit sensiblen und/oder motorischen neurologischen Defiziten verbunden sein können, sowie Hirnnervenparesen, vorzugsweise Fazialis- und Abduzensparesen. Komplizierend kann eine Meningitis bis hin zur Meningoenzephalitis auftreten (HANSEN und LEBECH, 1991; KAISER, 1998; PFISTER et al., 1994; WILSKE et al., 1991). Seltener treten kardiale Manifestationen mit Myoperikarditis und Rhythmusstörungen auf, die in seltenen Fällen tödlich verlaufen können (BARTUNEK et al., 2001; DURAY und STEERE, 1986; VAN DER LINDE und BALLMER, 1993).

Das Borrelien-Lymphozytom, eine besondere Hautmanifestation, wird ebenfalls dem Stadium II der Lyme-Borreliose zugeordnet. Diese rötlich-blaue Schwellung, der eine lymphoretikuläre Zellproliferation der Kutis und Subkutis zugrunde liegt (ABERER et al., 1996), tritt typischerweise an Ohrläppchen, Mamille oder Skrotum auf (WEBER et al., 1985).

### **Stadium III**

Monate bis Jahre nach dem Zeckenstich kann die für das Stadium III der Lyme-Borreliose typische dermale Manifestation der Acrodermatitis chronica atrophicans auftreten (ÅSBRINK et al., 1993). Hierbei entwickelt die Haut primär ein fleckiges, unscharf begrenztes, rötlich-blaues Exanthem, bevorzugt an den Extremitäten, seltener am Rumpf (BUCHWALD, 1883). Die hochgradig atrophe Haut ist zigarettenpapierartig gefältelt, mit durchscheinenden Gefäßen. Eine weitere Spätmanifestation ist die Lyme-Arthritis. Die Symptome sind akute schmerzhaftige Schwellungen der großen

Extremitätengelenke, insbesondere des Kniegelenks, begleitet von Bewegungseinschränkungen. Die Beschwerden wechseln typischerweise z.B. vom Knie- zum Hüftgelenk, es können jedoch auch kleine Gelenke betroffen sein. Eine Spontanremission ist möglich, rezidivierende Beschwerden bis hin zur Gelenksdestruktion sind beschrieben (HERZER et al., 1986; STEERE, 1993). In den USA ist die Lyme-Arthritis die häufigste Organmanifestation, in Europa tritt sie in ca. 10-15 % der Erkrankungen auf (DATTWYLER et al., 1987).

Sehr selten werden neurologische Spätmanifestationen als Bild der chronischen Enzephalomyelitis mit Querschnittssymptomatik, psychischen Störungen, Demenz oder Sensibilitätsstörungen im Stadium III der Lyme-Borreliose beobachtet.

#### **1.1.4 Diagnostik der Lyme-Borreliose**

Die Lyme-Borreliose ist primär eine klinische Verdachtsdiagnose. Die klinische Einordnung kann hierbei wegen einer Vielzahl möglicher Differentialdiagnosen schwierig sein. Die Verdachtsdiagnose wird durch die Anamnese und die Labordiagnostik bestätigt, wobei der Nachweis spezifischer Antikörper im Serum und im Liquor im Vordergrund steht. Geeignete Testsysteme sind der ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), iIFT (indirekter Immunfluoreszenz Test) und der Immunblot (Western Blot). Ein direkter Erregernachweis ist wahlweise mittels Kultur oder molekularbiologischer Methoden (PCR) aus dem Patientenmaterial (z.B. Hautbiopsie, Liquor) möglich. Die Sensitivität von Kultur und PCR liegt bei 10-30 % für Liquorproben und 50-70 % für Hautbiopsien (PREAC-MURSIC, 1993; WILSKE et al., 2000c).

#### **1.1.5 Therapie der Lyme-Borreliose**

Prinzipiell sollte jede Manifestationsform der Lyme-Borreliose antibiotisch therapiert werden. Die Art und Dauer der Therapie hängt von Stadium und Ausprägung der Lyme-Borreliose ab. Aktuelle Therapieschemata empfehlen für die Therapie der Frühstadien eine orale Antibiotikagabe über 14 Tage, während die Behandlung des Spätstadiums eine 3-4 wöchige intravenöse Antibiotikagabe erfordert (PREAC-MURSIC et al., 1986; 1987; WEBER et al., 1988; WEBER, K. und PFISTER, H.-W., 1994; WILSKE et al., 1988a; WILSKE und FINGERLE, 2000a, 2000b).

### 1.1.6 Prävention der Lyme-Borreliose

Das Risiko in Europa nach einem Zeckenstich an Lyme-Borreliose zu erkranken, beträgt zwischen 2,5 und 4 % (PAUL et al., 1986; SCHMUTZHARD et al., 1988). Die wichtigste Maßnahme zur Prophylaxe der Lyme-Borreliose ist primär die Vermeidung von Zeckenstichen. Exponierte Personen wie z.B. Waldarbeiter, Förster oder Jäger, aber auch Wanderer sollten bedeckende Kleidung tragen, um so einen Zeckenstich zu verhindern. Auch das Auftragen von Insektenrepellents ist empfehlenswert, schützt jedoch nur für einen begrenzten Zeitraum von ca. zwei Stunden (WILSKE und FINGERLE, 2000b). Direkt nach der Exposition sollte der ganze Körper abgesucht und vorhandene Zecken umgehend entfernt werden, da die Wahrscheinlichkeit der Transmission mit der Dauer des Saugaktes steigt (KAHL et al., 1998; RIBEIRO et al., 1987). Eine saugende Zecke wird mittels einer Pinzette, besser einer speziellen Zeckenzange, entfernt ohne das Abdomen zu quetschen. Keinesfalls darf die Zecke mit Öl oder anderen viskosen Stoffen, wie z.B. Flüssigkleber benetzt werden, um ein Hervorwürgen der Spirochäten zu vermeiden (WEBER und BURGDORFER, 1993). Eine generelle antibiotische Infektionsprophylaxe nach Zeckenstich wird derzeit als nicht sinnvoll erachtet (KRAUSE, 1999).

Eine weitere Möglichkeit der Infektionsprophylaxe wäre der Einsatz einer Lyme-Borreliose-Vakzine auf der Basis rekombinanter Antigene. So konnten beispielsweise die Autoren FIKRIG et al. (1990; 1991) und SCHAIBLE et al. (1990) im Tierversuch die protektive Wirkung von OspA-Antikörpern zeigen. FIKRIG et al. (1992) postulierten in diesem Zusammenhang erstmals das neuartige Wirkprinzip einer OspA-Vakzine: durch die Immunisierung mit rekombinantem OspA wird im Wirt die Bildung von OspA-Antikörpern induziert, die im Falle eines Zeckenstichs noch während des Saugaktes die Spirochäten im Darm der Zecke abtöten und somit die Übertragung der Borrelien vom Vektor auf den Wirt verhindern (AGUERO-ROSENFELD et al., 1999; DE SILVA et al., 1996). In Anlehnung an dieses Wirkprinzip lancierte der Pharmakonzern Glaxo SmithKline im Dezember 1998 mit LYMERix™ einen auf rekombinantem OspA basierenden Impfstoff gegen *B. burgdorferi* s.s. auf dem amerikanischen Markt. Trotz guter Protektionsraten in Höhe von 70-90 % (SIGAL et al., 1998; STEERE et al., 1998; JACOBSON et al., 1999) wurde der Verkauf jedoch aufgrund der rückläufigen Nachfrage im Februar 2002 wieder eingestellt. In europäischen Breiten fand der monovalente Impfstoff keine Anwendung, da er gegen die in Europa vorherrschenden Spezies *B. afzelii* und *B. garinii* nicht kreuzprotektiv war. Insgesamt gestaltet sich die

Impfstoffentwicklung für europäische Belange aufgrund der beschriebenen Heterogenität der Borrelien sehr komplex (WILSKE et al., 1996b). Aussichtsreichste Impf-Antigene sind hierbei die Proteine OspA und OspC (EVANS, 2000; PREAC-MURSIC et al., 1992; SIMON et al., 1999; WILSKE et al., 1996b).

Derzeit ist also weltweit keine Impfung gegen die Lyme-Borreliose verfügbar, im Gegensatz zur, ebenfalls durch Schildzecken übertragenen, viralen Frühsommer-Meningoenzephalitis, FSME.

### 1.1.7 *B. burgdorferi* sensu lato, der Erreger der Lyme-Borreliose

Der Erreger der Lyme-Borreliose wird wegen seiner für Spirochäten typischen morphologischen Merkmale in die Ordnung der Spirochaetales eingeordnet.

Die Ordnung der Spirochaetales teilt sich in zwei Familien: Leptospiraceae und Spirochaetaceae. (BARBOUR und HAYES, 1986). *B. burgdorferi* sensu lato gehört zur Familie der Spirochaetaceae, die sich in drei wichtige Gattungen unterteilt: *Spirochaeta*, *Treponema* und *Borrelia*. Die Gattung *Spirochaeta* ist apathogen und hauptsächlich im Süß- und Salzwassersediment verbreitet (PASTER et al., 1991). Die Gattung *Treponema* enthält einige wichtige humanpathogene Erreger (z.B. *T. pallidum* subsp. *pallidum*, Erreger der Syphilis).

*B. burgdorferi* gehört der Gattung *Borrelia* an. Der Name wurde von dem französischen Bakteriologen ALFRED BORREL abgeleitet. Während *B. burgdorferi* 1984 ursprünglich als eine Spezies identifiziert wurde, unterscheidet man mittlerweile zwischen den unter dem Begriff *B. burgdorferi* sensu lato (s.l.) zusammengefassten humanpathogenen Spezies *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii* und *B. garinii*, den apathogenen Spezies *B. japonica* und *B. andersonii* (BARANTON et al., 1992; CANICA et al., 1993; KAWABATA et al., 1993; POSTIC et al., 1990, 1993; BELFAIZA et al., 1993; WILSKE et al., 1993a; LIVERIS et al., 1995; MARCONI und GARON, 1992; MARCONI et al., 1995) sowie den bezüglich ihrer Pathogenität noch nicht einzuordnenden Spezies *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. tanukii* und *B. bissetii* (BARANTON et al., 1998; MARCONI et al., 1995; WANG et al., 1999; WILSKE et al., 1993b).

*Borrelia burgdorferi* s.l. ist ein gram-negatives, schraubenförmiges, stark bewegliches Bakterium. Die Zellen sind 8-22 µm lang, 0,25-0,3 µm breit und weisen 3 bis 10 Windungen auf (BURGDORFER et al., 1982). Die mikroaerophilen Bakterien sind im Gegensatz zu einigen anderen Spirochäten, wie z.B. *Treponema pallidum*, dem Erreger der Syphilis, auf künstlichem flüssigen (BSK, MKP) und festen Nährboden (PMR)

unter anaeroben Bedingungen bei 33°C anzüchtbar (BARBOUR 1984; PREAC-MURSIC et al., 1986, 1991; KURTTI et al., 1987).

*B. burgdorferi* s.l. und andere Vertreter des Genus *Borrelia* haben ein lineares Chromosom, mit einem sehr geringen Guanosin/Cytosin (G/C)-Gehalt zwischen 27 und 32 mol % (JOHNSON et al., 1984). Die Chromosomengröße ist mit 950 kBp relativ klein (vgl. *Brucella melitensis* 2600 kBp, *Escherichia coli* 4700 kBp und *Pseudomonas aeruginosa* 5900 kBp; nach KRAVIEC und RILEY, 1990). Nur einige Mycoplasmen und Ureaplasmen verfügen über noch kleinere Genome (*Mycoplasma genitalium* 580 kBp, *Ureaplasma urealyticum* 900 kBp). Der Erreger verfügt über eine relativ große, variable Zahl von linearen (12) und zirkulären (9) Plasmiden, wobei die linearen Plasmide den größten Teil der extrachromosomalen DNA enthalten. Die Plasmide, zum Teil auch als Minichromosomen bezeichnet, kodieren beispielsweise für sog. "outer surface" Proteine (Osp-Proteine) (BARBOUR und GARON, 1987; JAURIS-HEIPKE et al., 1999; LAM et al., 1994; MARCONI et al., 1993, NORRIS et al., 1992; SADZIENE et al., 1993; WILSKE et al., 1988b, 1992a, 1993a und 1993b). Osp-Proteine sind äußere Membranlipoproteine (BRANDT et al., 1990, JAURIS-HEIPKE et al., 1999) und repräsentieren die wichtigsten Antigenstrukturen von *B. burgdorferi* sensu lato. Zudem spielen sie, wie z.B. die "outer surface" Proteine A und C (OspA und OspC) eine wesentliche Rolle bei der Infektion der verschiedenen Wirte sowie bei der Dissemination in die verschiedenen Organe infizierter Wirtstiere (FINGERLE et al., 1995, 2002; FUCHS et al., 1994; PAL et al., 2000; WILSKE und PFISTER, 1995b).

FRASER et al. veröffentlichten 1997 die vollständige Genomsequenz von *Borrelia burgdorferi* s.s. (Stamm B31) und beschrieben neben 853 chromosomalen Genloci insgesamt 430 Plasmid-kodierte Gene (CASJENS et al., 1997; FRASER et al., 1997; JUNGBLUT et al., 1999).

## **1.2 Lyme-Borreliose – der Themenkomplex der Dissertation**

Die vorliegende Dissertation umfasst mehrere komplexe Untersuchungen im Rahmen der Pathogeneseforschung der Lyme-Borreliose. Unter der Thematik der "Interaktionen von *Borrelia burgdorferi* sensu lato mit Wirtszellen" setzt sich die Arbeit mit verschiedenen Komponenten des Zusammenspiels humanpathogener Spirochäten mit Zielzellen im Verlauf infektiöser Prozesse auseinander. Insgesamt stehen die Untersuchungen im Kontext der übergeordneten Fragen nach Adhäsion und Invasion von *B. burgdorferi* an bzw. in Wirtszellen. Die Ergebnisse sollen das Verständnis für

Organotropismus und Persistenz des Erregers der Lyme-Borreliose im Wirtsorganismus Mensch erweitern.

### 1.2.1 Aspekte der Adhäsion - Überblick über die aktuelle Literatur

Die Bindung an Wirtszellen ist ein essentielles pathogenetisches Wirkprinzip vieler bakterieller Krankheitserreger. *B. burgdorferi*, der Erreger der Lyme-Borreliose, migriert im Verlauf der Infektion in verschiedene Gewebe des Wirts, um diese zu besiedeln oder um sich beispielsweise in sog. immunprivilegierten Orten der Immunantwort des Wirts zu entziehen. Die Fähigkeit der Spirochäten an verschiedenen Organsystemen und an unterschiedlichen Zelltypen des Wirts zu haften ist hierbei eine grundlegende Voraussetzung für nachfolgende organspezifische pathologische Prozesse. Verschiedene *in vitro*-Bindungsstudien beschreiben die Adhärenz des Erregers der Lyme-Borreliose an humane Blutplättchen (COBURN et al., 1993, 1994), epitheliale Zelllinien (HECHEMY et al., 1989, 1992; LEONG et al., 1995; THOMAS und COMSTOCK, 1989), endotheliale Zellen, wie z.B. human umbilical vein cells (HUVECs) (BENACH et al., 1990; MA et al., 1991; SZCZEPANSKI et al., 1990), humane Fibroblasten (KLEMPNER et al., 1993) und humane Lymphozyten (DORWARD et al., 1997; DORWARD, 1998). *B. burgdorferi* kann jedoch nicht nur an verschiedene eukaryote Gewebe adhären, sondern diese auch invadieren. So wurde beispielsweise die als Transzytose bezeichnete Penetration konfluenter Nabelschnurzellkulturen (HUVEC-Monolayer) durch *B. burgdorferi* elektronenmikroskopisch gezeigt (COMSTOCK und THOMAS, 1989). Experimentelle Parameter wie Temperatur, Vitalität der Spirochäten, Antibiotika (Hemmung der bakteriellen Proteinbiosynthese) beeinflussen hierbei die *in vitro*-Bindungsfähigkeit der Bakterien (COMSTOCK und THOMAS, 1991) ebenso wie deren Kulturbedingungen. Unter *in vivo*-Bedingungen kultivierte Borrelien, simuliert z.B. durch die Anzüchtung des Erregers in dialytisch aktiven Reservoirten, die Kleinsäugetern (z.B. Ratten) implantiert werden, zeichnen sich gegenüber *in vitro*-kultivierten Spirochäten durch eine signifikant erhöhte Affinität an bestimmte zelluläre Liganden aus. Die erhöhte Bindungsfähigkeit der Säuger-adaptierten Borrelien korreliert hierbei mit einer vermehrten Expression der Dekorin-bindenden Proteine (Dbp) A und DbpB (PARVEEN et al., 2003). Übertragen auf den *in vivo*-Infektionsverlauf impliziert dies, dass sich bei der einzelnen Borrelie bereits während der Blutmahlzeit die Dichte bestimmter Adhäsionsmoleküle erhöht. Diese unmittelbare Antwort der Spirochäte auf die Änderung der physiologischen Bedingungen trägt möglicherweise zu einer sehr

schnellen Besiedelung des Wirtsorganismus bei. Neben DbpA und DbpB (FISCHER et al., 2003), ist das outer surface Protein OspA einer der wichtigsten Adhärenz-vermittelnden Virulenzfaktoren von *B. burgdorferi* (COMSTOCK et al., 1993). Mit BBK32, dem Fibronectin-bindenden Protein von *B. burgdorferi*, wurde unlängst ein weiteres wichtiges Adhäsion identifiziert (GRAB et al., 1998; PROBERT und JOHNSON, 1998). Ähnlich dem Membranlipoprotein OspC wird BBK32 in der Zecke nur kurzzeitig während des Saugaktes exprimiert (FIKRIG et al., 2000; SCHWAN et al., 1995). Zeitgleich entwickelt der Säugetierwirt eine erste unspezifische humorale Immunreaktion, die im Bereich der Einstichstelle der Zecke zu einer verstärkten Bildung von Zelladhäsionsmolekülen, wie beispielsweise Fibronectin führt (WUNDERLICH et al., 1996; ALBELDA et al., 1990). Naheliegender scheint eine Rezeptor-Ligand-Interaktion von BBK32 mit wirtseigenem Fibronectin, die eine Fibronectin-vermittelte Adhäsion von *B. burgdorferi* an Wirtsfibroblasten vermittelt und somit möglicherweise die Besiedelung des Wirtsorganismus initiiert. GÜNER (1996) konnte weiterhin zeigen, dass Fibronectin die Borrelien vor Komplement-vermittelter Lyse während der Dissemination im Wirt schützt. Unter *in vitro* Kulturbedingungen scheinen die meisten Vertreter von *B. burgdorferi* s.l. die Expression des Fibronectin-bindenden Proteins herabreguliert zu haben (PROBERT und JOHNSON, 1998 und FIKRIG et al., 2000). Die fehlende Expression des *bbk32*-Genprodukts stellt hierbei jedoch weniger dessen essentielle Rolle als initiales Adhäsion während einer Borrelieninfektion in Frage, als dass dies vielmehr die differentielle Expression unter *in vitro* bzw. *in vivo* Kulturbedingungen widerspiegelt. Gestützt wird diese Hypothese durch eine Reihe von Untersuchungen zu differentiell exprimierten Borrelien-Lipoproteinen, wie beispielsweise p35 und p37 (FIKRIG et al., 1997), "outer surface" Protein pG (WALLICH et al., 1995), einem OspF-Homolog (AKINS et al., 1995) und VlsE (ZHANG et al., 1997a). Neben einigen wenigen Untersuchungen zu proteinbiochemischer Charakterisierung und Genregulation von BBK32 (PROBERT und JOHNSON, 1998; PROBERT et al., 2001; FIKRIG et al., 2000) konzentriert sich das aktuelle Interesse jedoch hauptsächlich auf die diagnostische Relevanz dieses Fibronectin-Rezeptors (AKIN et al., 1999; FIKRIG et al., 1997; 1998; HEIKKILÄ et al., 2000, PANELIUS et al., 2003).

Auf Wirtszell-Ebene dient eine Vielfalt verschiedener Moleküle als Liganden für die bakteriellen Adhäsine. So vermitteln Glykosphingolipide (BENACH et al., 1995), Glykosaminoglykane (GAGs) (LEONG et al., 1998a; 1998b), und Moleküle der extrazellulären Matrix, wie beispielsweise Fibronectin (KOPP et al., 1995), Heparin

(ISAACS et al., 1994), Plasminogen (FUCHS et al., 1994; COLEMAN et al., 1995, 1999) und Dekorin (GUO et al., 1995) die Bindungsfähigkeit von *B. burgdorferi* sensu lato an eukaryote Zellen. Als weitere wichtige Liganden für die bakteriellen Adhäsine sind spezifische zelluläre Rezeptoren wie Integrine (CINCO et al., 2000; COBURN et al., 1993, 1994, 1998, 1999; COBURN und CUGINI, 2003), Toll-like Rezeptor 2 (HIRSCHFELD et al., 1999) und Mannose-Rezeptor (CINCO et al., 2001) beschrieben.

Die Untersuchungen zur Integrin-vermittelten Adhäsion konzentrierten sich bislang hauptsächlich auf Mitglieder der  $\beta_3$ -Integrin-Familie (COBURN et al., 1993, 1994, 1999; COBURN und CUGINI, 2003). Demgegenüber diskutieren CINCO et al. (1997, 2000) erstmals eine direkte Beteiligung der  $\beta_2$ -Integrin-Familie. Die Autoren zeigten in Bindungsstudien eine Borrelien-induzierte Steigerung der  $\beta_2$ -Integrin-Expression bei Makrophagen, die letztlich in einer vermehrten Fibronektin-Bindungsaffinität der Phagozyten resultierte. Bislang ist jedoch unklar, ob dieser Effekt auf eine direkte Interaktion der Spirochäten mit  $\beta_2$ -Integrinen zurückzuführen ist und diese somit möglicherweise die Gruppe der bisher bekannten zellulären Rezeptoren für *B. burgdorferi* erweitern.

Unmittelbare Folge der Interaktion von *B. burgdorferi* Lipoproteinen (z.B. OspA) mit endotheliale Gewebe ist die Aktivierung des Endothels, wodurch die Expression verschiedener Entzündungsmediatoren induziert wird (MA und WEIS, 1993). So wird beispielsweise die Expression der Chemokine RANTES, MCP-1, IL-8, IP-10 und mig (EBNET et al., 1996, 1997) hochreguliert. Die Chemokine rekrutieren über ihr chemotaktisches Potential zirkulierende Leukozyten an den Infektionsherd (oder zur Verletzung) (GERGEL und FURIE, 2001). Die Lipoprotein-vermittelte Endothelaktivierung induziert zudem die Expression zellulärer Adhäsionsmoleküle wie z.B. E-Selektin, P-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 (BOGGEMEYER et al., 1994; BURNS et al., 1997 und 1998; EBNET et al., 1996 und 1997). Die Adhäsion des bakteriellen Agens an bzw. dessen Invasion in das Wirtsendothelium wird dadurch jedoch nicht beeinflusst (MA et al., 1991). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der endotheliale Rezeptor für *B. burgdorferi* konstitutiv exprimiert wird. Die Adhäsionsmoleküle endothelialer Zellen vermitteln im Zusammenspiel mit den Chemokinen die Bindung der rekrutierten Leukozyten an die Blutgefäßwände und deren anschließende Extravasation in das perivaskuläre Wirtsgewebe. Die Akkumulation von Leukozyten-Infiltraten, Monozyten und aktivierten Plättchen in das perivaskuläre Gewebe (SELLATI

et al., 1995) resultiert letztlich in lokalen Entzündungsherden, die möglicherweise zu chronischen entzündlichen Störungen und z.B. zum Krankheitsbild der Lyme Arthritis führen können (WOOTEN et al., 1996).

Das hohe inflammatorische Potential von *B. burgdorferi*-Lipoprotein spielt somit eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Lyme-Borreliose. Insbesondere OspA und OspB spielen bei der Regulation der Spirochäten-induzierten Entzündungsreaktion und der nachfolgenden humoralen Immunantwort eine zentrale Rolle (MA und WEIS, 1993). Obwohl dem outer-surface Protein OspA innerhalb der Kaskade entzündlicher Prozesse eine Schlüsselrolle zugedacht wird, handelt es sich insgesamt um einen multifaktoriellen synergistischen Effekt unter Beteiligung verschiedenster Komponenten, die letztlich noch einer genauen Aufklärung bedürfen (SELATTI et al., 1996). BURNS et al. (1998) gehen sogar soweit, zu vermuten, dass *B. burgdorferi* die Chemokinexpression über einen direkten, Osp-vermittelten Signaltransduktionsweg oder über ein neues, bisher unbekanntes Zytokin stimulieren.

Die wichtigsten Antigenstrukturen von *B. burgdorferi* sensu lato sind die als "outer surface" Proteine bezeichneten äußeren Membranlipoproteine (BARBOUR et al., 1983; BRANDT et al., 1990; WILSKE et al., 1993b; JAURIS-HEIPKE et al., 1999). So spielen beispielsweise die "outer surface" Proteine A und C (OspA und OspC) eine wesentliche Rolle bei der Infektion der verschiedenen Wirte sowie bei der Dissemination in die verschiedenen Organe infizierter Wirtstiere (FINGERLE et al., 1995, 2002; FUCHS et al., 1994; PAL et al., 2000; WILSKE und PFISTER, 1995b). WILSKE et al. (1993a) konnten mit 8 verschiedenen monoklonalen Antikörpern ein OspA-Serotypisierungsschema entwickeln, das insgesamt 7 verschiedene OspA-Serotypen für *B. burgdorferi* s. l. unterscheidet. Während *B. burgdorferi* s.s. und *B. afzelii* jeweils einem einzelnen OspA-Serotyp (OspA-Serotyp 1 bzw. 2) zugeordnet werden, entsprechen die OspA-Serotypen 3–7 *B. garinii* (WILSKE et al., 1993a). Weiterhin konnten WILSKE et al. (1996b) in Studien zur Verteilung der drei humanpathogenen Spezies von *B. burgdorferi* s.l. zeigen, dass eine Prävalenz von *B. afzelii* (OspA-Serotyp 2) in Höhe von 84 % bei Hautisolaten besteht. Liquorisolaten wiesen hingegen eine auffallend heterogene Verteilung der drei Spezies auf, wobei eine Prävalenz von *B. garinii* in Höhe von 66 % beschrieben wurde (WILSKE et al., 1996a). Insbesondere die ACA ist nahezu immer *B. afzelii* assoziiert (ASSOUS et al., 1994; BALMELLI und PIFFARETTI, 1995; VAN DAM et al., 1993; WIENECKE et al., 1994) und in den USA wurden weder Fälle von ACA beobachtet noch *B. afzelii* aus menschlichen Hautproben oder Zecken isoliert. Trotz der

hohen Prävalenz von *B. garinii* bei Neuroborreliose (BALMELLI und PIFFARETTI, 1995; BUSCH et al., 1996; HUBALEK und HALOUZKA, 1997; LEBECH et al., 1994; PETER et al., 1997; VAN DAM et al., 1993; WILSKE et al., 1996a) wurde hingegen ein kausaler Zusammenhang kontrovers diskutiert (EIFFERT et al., 1995). Im Hinblick auf Unterschiede in Virulenz und Organotropismus zwischen verschiedenen *B. burgdorferi* Stämmen ist daher interessant, ob eine Beziehung zum OspA-Serotyp oder der Expression dieser äußeren Membranlipoproteine besteht. Unklar ist ebenfalls, ob Unterschiede in der Expression von Osp-Proteinen eine Rolle für den klinischen Verlauf spielen, so wie es z.B. für die variablen Membranproteine (Vmps) der Rückfallfieberborrelien *B. turicatae*, *B. hermsii*, *B. duttonii* und *B. parkeri* beschrieben wurde. In diesem Zusammenhang könnten Unterschiede im Typ und eine Variation in der Expression der Osp-Proteine sehr wohl für Unterschiede im Organotropismus und "immune escape" Mechanismen verantwortlich sein.

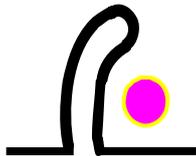
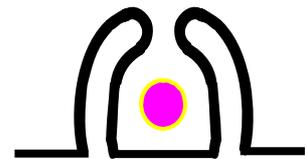
Insgesamt konzentrieren sich die bisher veröffentlichten Arbeiten zur Adhäsion von *B. burgdorferi* an eukaryote Zellen hauptsächlich auf die Identifizierung bakterieller Adhäsine und zellulärer Liganden. In diesem Zusammenhang blieb bislang beispielsweise die Frage nach strukturellen und funktionellen Unterschieden der Fibronektin-bindenden Proteine (BBK32) verschiedener humanpathogener Borrelienspezies, ebenso wie die Rolle der  $\beta_2$ -Integrine bei der Adhäsion von *B. burgdorferi* an eukaryote Zellen ungeklärt. Des Weiteren wurden die Auswirkungen von Adhärenz und Invasion auf das Wirtsgewebe im Kontext der humoralen Immunantwort untersucht. Diese Studien wurden meist mit Zellen epithelialen Ursprungs durchgeführt. Bislang wenig gut erforscht ist hingegen die Adhäsion des Erregers der Lyme-Borreliose an neuronales Gewebe. Dies ist jedoch gerade vor dem Hintergrund möglicher Korrelationen zwischen bestimmten *B. burgdorferi* s.l. Spezies und verschiedenen klinischen Manifestationen von besonderem Interesse.

### 1.2.2 Aspekte der Invasion – Überblick über die aktuelle Literatur

*B. burgdorferi* ist, wie *T. pallidum*, ein invasives Bakterium, das endotheliales Gewebe durchdringen und auf diese Weise in verschiedene Wirtsgewebe disseminieren kann. Die Fähigkeit von *B. burgdorferi* sich in immunologisch privilegierte Orte, wie beispielsweise das ZNS, zurückzuziehen, wurde hierbei meist im Kontext Persistenzvermittelnder Strategien diskutiert. Demgegenüber konstatierte v.a. die Gruppe um MALAWIASTA das Überleben des Erregers in bestimmten Kompartimenten von

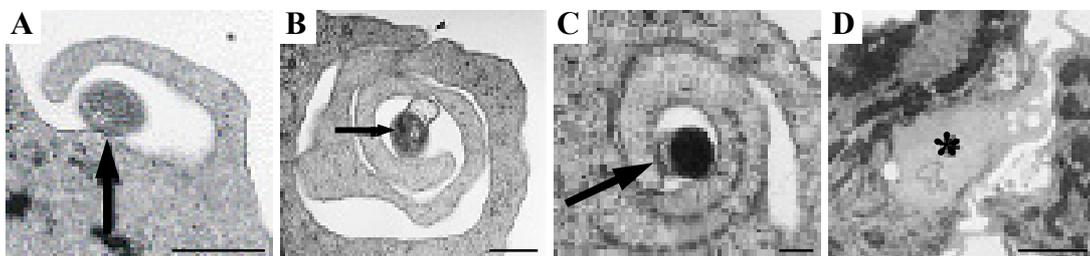
Makrophagen (MONTGOMERY et al., 1993; MONTGOMERY und MALAWISTA, 1996). Diese Untersuchungen waren jedoch nicht nur aus Sicht der Spirochäten und deren Überlebensstrategien im Wirt von Interesse, sondern vielmehr aufgrund des Mechanismus, über den die Makrophagen die Erreger aufnehmen: Borrelien werden von Makrophagen, im Folgenden auch als professionelle Phagozyten bezeichnet, durch Coiling-Phagozytose internalisiert (RITTIG et al., 1992). Diese spezielle Art der Phagozytose wurde 1984 erstmals von HORWITZ bei *Legionella pneumophila* beschrieben (HORWITZ, 1984).

Während bei konventionellen Phagozytose-Vorgängen zelluläre Ausstülpungen den Keim/ Partikel symmetrisch umschließen,



wird bei der Coiling-Phagozytose die Bakterienzelle von einem einzelnen, unilateralen Pseudopodium umwickelt, um anschließend als Komplex aus Pathogen und Pseudopodium phagozytiert zu werden.

Die morphologischen Merkmale der Coiling-Phagozytose sind in Abbildung 1.2 anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen verschiedener Spirochäten dargestellt. Nach dem Ausstülpfen des unilateralen Pseudopodiums (A), wird die Bakterienzelle von diesem umwickelt (B), wobei anschließend die zellulären Membranschichten fusionieren (C) und die lysosomale Degradation einsetzt (D).



**Abbildung 1.2:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen verschiedener Spirochäten während der Coiling-Phagozytose aus RITTIG et al., 1992, 1998. Dargestellt sind die verschiedenen Stadien der Coiling-Phagozytose mit Ausstülpfen des unilateralen Pseudopodiums (A), Umwickeln der Bakterienzelle (B), Fusion der zellulären Membranschichten (C) und lysosomaler Degradation (D). Der weiße Balken repräsentiert in A und D 1  $\mu\text{m}$ , in B und C jeweils ca. 0,1  $\mu\text{m}$ .

Am Ende des Coiling-Phagozytoseprozesses steht die Degradierung der internalisierten Bakterienzelle. RITTIG et al. (1994) konstatieren in diesem Zusammenhang eine nicht-lysosomale Degradation der Spirochäten in Form einer zytosolischen Destruktion. Dieser extra-lysosomale Degradierungsmechanismus führt möglicherweise zu einer MHC-Klasse I-restringierten Antigen-Präsentation (AG-Präsentation durch kernhaltige Zellen, AG-Erkennung durch zytotoxische T-Zellen), während die aus konventioneller lysosomaler Degradierung stammenden Antigene (AG) für MHC-Klasse II-restringierte Präsentation (AG-Präsentation durch antigenpräsentierende Zellen und Lymphozyten, AG-Erkennung durch Helfer-T-Zellen) prozessiert werden. Das parallele Auftreten beider Arten der *B. burgdorferi*-AG-Präsentation trägt möglicherweise zu ungewöhnlichen immunologischen Aspekten der Lyme-Borreliose bei, wie dem Nicht-Erkennen des infektiösen Agens durch immunkompetente Zellen (RITTIG et al. 1994). Die von RITTIG et al. (1994) in diesem Zusammenhang beschriebene extra-lysosomale Degradierung der per Coiling-Phagozytose internalisierten Borrelien spiegelt hierbei entsprechende Ergebnisse von MONTGOMERY et al. (1993) wider. Die Degradation *per se* erfolgt nach CINCO et al. (1994) und MODOLELL et al. (1994) durch sauerstoffabhängige Abtötungsmechanismen, dem sog. *oxidative burst*, wobei nicht zwischen Coiling- und konventioneller Phagozytose unterschieden wird.

Phagozyten können bis zu einem gewissen Ausmaß direkt an den Infektionserreger binden. Diese Fähigkeit wird durch aktiviertes Komplement und/oder Antikörper, verstärkt. In diesem, gemeinhin als Opsonierung bezeichneten Vorgang, binden die sog. Opsonine (= aktiviertes Komplement und/oder Antikörper) an die Bakterienoberfläche. Der Phagozyt kann den Erreger daraufhin über Komplement (CR3)- und/oder über Fc $\gamma$ -Rezeptoren erkennen, um ihn anschließend zu phagozytieren.

Die Rolle von Signaltransduktionsprozessen und die Beteiligung des Aktin-Zytoskeletts bei der Phagozytose und Invasion pathogener Keime hat in den letzten Jahren starke Beachtung gefunden (Überblick bei DRAMSI und COSSART, 1998; KNODLER et al., 2001). Die kleinen GTPasen der Rho-Familie scheinen hierbei eine zentrale Rolle zu spielen (KOZMA et al., 1995; RIDLEY und HALL, 1992; RIDLEY et al., 1992). Die Beteiligung der verschiedenen Rho-GTPasen (CDC42Hs, Rac und Rho) beruht möglicherweise auf der spezifischen Erkennung des Pathogens durch den Phagozyt. Die Interaktion bestimmter bakterieller Liganden mit entsprechenden zellulären Rezeptoren kann somit verschiedene Phagozytosemechanismen in Gang setzen indem entweder Komplement-Rezeptor (CR3)- oder Fc $\gamma$ -Rezeptor-vermittelte Signaltransduktionswege

aktiviert werden. Jüngst gelang es Mitglieder der Familie der "Wiskott-Aldrich Syndrom (WASp) Proteine" und einen ihrer Effektoren, Arp2/3 Komplex, als zentrale Regulatoren des F-Aktins zu identifizieren (HIGGS et al., 1999 und MACHESKY et al., 1998). MAY et al. (2000) zeigten zudem die Beteiligung von Arp2/3 Komplex an Komplement-Rezeptor (CR3)- und Fc $\gamma$ -Rezeptor (Fc $\gamma$ -R)-vermittelter Phagozytose und folgerten eine Verflechtung von WASp in diese Prozesse. Insbesondere die Fc $\gamma$ -Rezeptor-vermittelte Phagozytose und die damit einhergehende Rekrutierung des Arp2/3 Komplexes zu den Phagosomen wurden als CDC42Hs- und Rac-abhängige Prozesse beschrieben, während die CR3-vermittelte Phagozytose durch die kleine GTPase Rho kontrolliert wird (CARON und HALL, 1998; COX et al., 1997 und MAY et al. 2000). Der aktuellen Modellvorstellung zufolge aktiviert CDC42Hs das für die hämatopoietischen Zellen spezifische WASp, welches wiederum die Aktin-Polymerisationsaktivität von Arp2/3 Komplex anregt (MULLINS, 2000).

Insgesamt konzentrierten sich die veröffentlichten Arbeiten zur Coiling-Phagozytose von *B. burgdorferi* auf die morphologische Charakterisierung der unilateralen Pseudopodien und der Identifizierung bioaktiver Substanzen, wie z.B. Opsonine, die wiederum die Bildung dieser Phagozytosestrukturen stimulieren. Bislang wenig erforscht ist die molekulare Maschinerie, welche die Coiling-Phagozytose reguliert. Insbesondere vor dem Hintergrund der Erkenntnisse, welche die Signaltransduktionsprozesse und die Beteiligung des Aktin-Zytoskeletts bei der Phagozytose und Invasion pathogener Keime betreffen, eröffnen sich vollkommen neue Perspektiven: es gilt v.a. die Frage zu klären, ob es sich bei dem Phänomen der Coiling-Phagozytose um einen eigenständigen Phagozytosemechanismus oder um eine Variante der konventionellen Phagozytose handelt.

### **1.2.3 Ziele der Dissertation**

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass Unterschiede in der Prävalenz bestimmter Spezies und Subspezies (OspA-Serotypen) von *B. burgdorferi* s.l. zwischen Isolaten von Patienten mit Hautmanifestationen und solchen von Neuroborreliose (Liquorisolat) bestehen (WILSKE et al., 1993a, 1996a). Unterschiede in der Adhäsion an Wirtszellen können eine Rolle für Unterschiede im Organotropismus spielen. In Studien zur Bindungsfähigkeit von *B. burgdorferi* s.l. an Säugerzellen endothelialen und neuronalen Ursprungs sollte eine mögliche Korrelation zwischen Bindungsfähigkeit und

Variation im *osp*-Expressionsmuster (OspA und OspC) und/oder unterschiedlichen Osp-Serotypen untersucht werden.

In weiteren Experimenten mit Phagozyten CD18-defizienter Mäuse sollte eine mögliche Beteiligung der  $\beta_2$ -Integrin-Familie an der Interaktion von *B. burgdorferi* s.l. mit professionellen Phagozyten geklärt werden.

In diesem Zusammenhang sollten etablierte Nachweismethoden an die Fragestellungen adaptiert werden. Neben konventioneller Immunfluoreszenzmikroskopie sollte zusätzlich, als quantitative Methode, die Immunfluoreszenzmessung im Durchflusszytometer etabliert werden.

Zusätzlich sollten funktionelle und strukturelle Unterschiede der Fibronectin-bindenden Proteine verschiedener *Borrelia burgdorferi* s.l. Spezies untersucht werden. Im Anschluss an die Herstellung rekombinanter Fibronectin-bindender Proteine verschiedener *B. burgdorferi* s.l. Spezies sollten diese auf DNA- und Protein-Ebene charakterisiert und die Auswirkungen möglicher struktureller Unterschiede auf die Fibronectin-Bindungsfähigkeit analysiert werden.

In Zusammenarbeit mit PD Dr. Stefan Linder aus der Arbeitsgruppe um Prof. Martin Aepfelbacher (Max von Pettenkofer-Intstitut, LMU) sollten in Untersuchungen mit primären humanen Makrophagen mögliche Veränderungen des zellulären Zytoskeletts der Fresszellen während der Internalisierung von *B. burgdorferi* s.l. morphologisch charakterisiert werden. In weiteren Experimenten sollte die Regulation und molekulare Maschinerie bei der Modulation des Zytoskeletts der professionellen Phagozyten untersucht werden. Von besonderem Interesse war hierbei die Rolle der Rho-Familie der GTPasen Rho, Rac und CDC42Hs bei der Aufnahme des Erregers der Lyme-Borreliose durch Makrophagen.

## 2 Material

### 2.1 Bakterien

#### 2.1.1 *Borrelia burgdorferi* sensu lato Isolate

Spezies	Bezeichnung	Stamm/ Klon	OspA- Serotyp	Ursprung	infektiös	Referenz
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	B31	Stamm	1	Zecke	ja	WILSKE et al. (1993a)
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	N40	Stamm	1	Zecke	ja	FINGERLE et al. (2000)
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	PKa2	Stamm	1	Liquor	ja	WILSKE et al. (1993a)
<i>B. afzelii</i>	PKo	Stamm	2	Haut	ja	WILSKE et al. (1985)
<i>B. afzelii</i>	PKo97 K37	Klon	2	Niere	ja	FINGERLE et al. (2000)
<i>B. afzelii</i>	PKo345 II-2-3	Klon	2	Gelenk	nein	FINGERLE et al. (2000)
<i>B. garinii</i>	PBr	Stamm	3	Liquor	ja	WILSKE et al. (1985)
<i>B. garinii</i>	PBi	Stamm	4	Liquor	ja	WILSKE et al. (1985)
<i>B. garinii</i>	PHei	Stamm	5	Liquor	ja	WILSKE et al. (1993a)
<i>B. garinii</i>	TN	Stamm	6	Zecke	ja	WILSKE et al. (1985)

Die Stämme B31, N40, PKa2, PKo, PBr, PBi, TN und PHei waren, wie angegeben, aus Zecken oder Patientenmaterial isoliert worden. Die Klone PKo97 K37 und PKo345 II-2-3 (Wildtyp: *B. afzelii* Stamm PKo) wurden nach Isolierung aus einem infizierten Gerbil (*Meriones unguiculatu*; intra peritoneale Injektion von PKo) und anschließender Kolonie-Selektion (3-fach) gewonnen (PKo345 = Gelenkisolat, PKo97 K37 = Nierenreisolat). PKo345 II-2-3 ist durch den Verlust der Fähigkeit zur OspC-Expression, PKo97 K37 durch starke OspC-Expression charakterisiert.

#### 2.1.2 *Escherichia coli*-Stämme

Bezeichnung	Genotyp	Referenz	Bezugsquelle
SURE <sup>®</sup>	E14 <sup>+</sup> (mcrA), Δ(mcrB-hsd SMR-mrv) 171, endA1, supE44, thi-1, gyrA96, relA1, lac, recB, recJ, sbcC, umuc:Tn5(Kan <sup>r</sup> ), uvC[F <sup>+</sup> proAB, lacI <sup>q</sup> ZΔM15, Tn10(tet <sup>r</sup> )]	GREENER (1990)	Stratagene
XL1-Blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac[F <sup>+</sup> proAB, lacI <sup>q</sup> ZΔM15, Tn10(tet <sup>r</sup> )]	BULLOCK et al. (1987)	Stratagene

## 2.2 Säugerzellen

### 2.2.1 primäre Zellen

Bezeichnung	Zelltyp	Morphologie	Ursprung
Makrophagen	Monozyten, human	adhärent	Spenderblut
CD18 <sup>-/-</sup> Makrophagen	Makrophagen, murin	adhärent	Peritoneum
HUVEC	Endothelzellen, human	adhärent	Nabelschnur

Die CD18-defizienten murinen Makrophagen wurden aus dem Peritoneum entsprechend mutagenisierter Mäuse (genetischer Hintergrund: C57 BL/6) präpariert. Es handelt sich hierbei um einen sog. heteromorphen knock-out des CD18-Genlokus in C57 BL/6-Mäusen, d.h. unter stressfreien Bedingungen wurde eine Restexpression des CD18-Moleküls von 2 %, unter Stress von bis zu 16 %, verglichen zum Wildtyp beschrieben (WILSON et al., 1993). Die Tiere wurden wie C57 BL/6-Wildtyp-Kontrollmäuse von der Firma Charles River, Sulzfeld bezogen und im Tierstall des Max von Pettenkofer-Institutes als CD18-knock-out Mausmodell etabliert.

### 2.2.2 Zelllinien

Bezeichnung	Zelltyp	Morphologie	Referenz
1321N1	Astrozytomazellen, human	glial, adhärent	SHAW et al. (1972)
ECV304	Nabelschnur, human, asiatisch	endothelial, adhärent	TAKAHASHI et al. (1990)
CRL-2480	Nabelschnur, human	endothelial, adhärent	HAY et al. (1992)

Die Zelllinien 1321N1, ECV304 und CR-2480 wurden über ATCC bezogen. 1321N1, eine Astrozytoma-Zelllinie glialen Ursprungs, ist ein geläufiges Zellkulturmodell für neuronales Gewebe. ECV304, zu Beginn der Arbeit noch ein etabliertes Endothelzellmodell, ist mittlerweile als Zellkultursystem umstritten: dem 1999 aktualisierten ATCC-Datenblatt der Zelllinie ist zu entnehmen, dass ECV304-Zellen neben Übereinstimmungen mit der Blasen-Zelllinie T24 zusätzlich Endothelzell-fremde Biomarker aufzuweisen scheinen. Vorbehaltlich einer endgültigen Klärung des Sachverhalts wird die Zelllinie derzeit als "misidentified cell line" geführt (Quelle: ATCC (website); Stand Dezember 2003). Dr. MATHIEU, IGM, Montpellier, Frankreich, identifizierte ECV304 als eine Zelllinie epithelialen Ursprungs (Quelle: DSMZ (website), 1999). Den Hinweisen von ATCC und MATHIEU sind jedoch aktuelle Veröffentlichungen entgegenzuhalten, die ECV304 durchaus als geeignetes Endothelzellmodell erachten (GENERSCH et al., 2003). Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher ECV304-Zellen im Kontext eines Endothelzellmodells diskutiert. Die Zelllinie CRL-2480 (*Wistar Special Collection*) wurde als alternatives Endothelzellmodell in die Untersuchungen miteinbezogen.

### 2.3 Kulturmedien und -zusätze

Alle Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, in z.A. Qualität von den genannten Firmen bezogen. Für die Zellkultur wurde ausschließlich "Aqua ad injectabilia" der Firma Roche bzw. Ampuwa<sup>®</sup> (pyrogenfreies Aqua dest.) der Firma Fresenius benutzt. Falls nicht anders angegeben, wurde für Zellkultur und/oder Immunfluoreszenztest (IFT) ausschließlich PBS (physiologische Phosphatpufferlösung) der Firma Sigma (ohne CaCl<sub>2</sub> und MgCl<sub>2</sub>) verwendet.

$\alpha$ -Chymotrypsin	Sigma
Ampicillin, Natriumsalz	Biomol
Bacto <sup>™</sup> -Trypton	Becton Dickinson
Bitek <sup>™</sup> -Agar	DIFCO
CMRL 1066 (10x) ohne Glutamin	GIBCO BRL
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma
ECGS	Sigma
ECGS/H2	Promo Cell
EGF	Sigma
EGM	Promo Cell
Fötale Kälberserum (FKS)	GIBCO BRL
Gelatine	Sigma
Glucose	Sigma
Glycerin p.a.	Merck
Hanks buffered Saline (pH 7,4)	Biochrom
Hefeextrakt	ICN Biomedicals
Heparin	Sigma
Hepes	Sigma
Kaninchenserum (partiell hämolysiert)	GIBCO BRL
Kollagen G	Biochrom
L-Glutamin	Sigma
Medium 199	Sigma
N,N-Dimethylformamid	Sigma
N-Acetylglucosamin	Sigma
Natriumbicarbonat	Sigma
Natriumcitrat	Sigma
Natriumpyruvat	Sigma
Neopepton	DIFCO
PBS, ohne CaCl <sub>2</sub> und MgCl <sub>2</sub>	Sigma

Penicillin/Streptavidin	Sigma
Penicillin/Streptomycin	Sigma
Serumalbumin, bovines	Sigma
Serumalbumin, humanes	Sigma
Tetracyclin	Sigma
Trypsin-EDTA	Sigma

## 2.4 Kulturgefäße und Zubehör

Cryo 1 °C Freezing Container	Nalgene™
Cellocate Deckgläschen (13,8 x 13,8 mm)	Eppendorf
Deckgläschen, quadratisch	Eppendorf
Deckgläschen, rund (Ø 12 mm)	Langenbrinck
Gefrieröhrchen mit Metallkappe (2ml)	Schultheiß
Glasflaschen mit Schraubverschluß (100 ml)	Schott
Glaskulturröhrchen mit Schraubverschluß (7 ml)	Schott
Kryoröhrchen (1,8 ml)	Nalge Nunc®
Multiwell-Gewebekulturplatten (8-, 12- und 24-Well)	Falcon
Neubauer Zählkammer	Assistent
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> )	Becton Dickinson
Zellschaber	Becton Dickinson

## 2.5 Chemikalien und Lösungen

Alle Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, in z.A. Qualität von den genannten Firmen bezogen. Wässrige Lösungen wurden mit Wasser aus der hauseigenen Entmineralisierungsanlage (Firma Millipore) hergestellt. Es handelt sich bei allen Lösungen und Puffern um wässrige Lösungen, sofern dies nicht aus der Zusammensetzung hervorgeht.

1, 4-Diazabicyclo [2.2.2] octane (Dabco)	Sigma
Aceton, p.a.	Merck
Acrylamid	Biozym
Agarose	Seakem
Alexa Phalloidin 568	Molecular Probes
Amino-Caprinsäure	Sigma
Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad
Bisacrylamid	Biozym
Bromphenolblau	BioRad
Coomassie Brilliant Blue R250	Sigma
Diaminobenzidin	Sigma
di-Kaliumhydrogenphosphat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ), p.a.	Merck

---

di-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat ( $K_2HPO_4 \times 3 H_2O$ ), p.a.	Merck
di-Natriumhydrogenphosphat ( $Na_2HPO_4$ ), p.a.	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Biomol
EDAC	Molecular Probes
Essigsäure, 96 %ig	Merck
Ethanol, p.a.	Merck
Ethidiumbromid	BioRad
Evans-Blue	Sigma
Ficoll®	Biochrom
Formaldehyd	Sigma
Glutathion, reduzierend	Roche
Glycerin, p.a.	Merck
Glycin, p.a.	Serva
Guanidin	Merck
Harnstoff	Merck
Heparin	Sigma
Humanserum (HS)	Sigma
Immersionsöl	Merck
Isopropyl- $\beta$ -thiogalaktopyranosid (IPTG)	Sigma
Kaliumdihydrogenphosphat ( $KH_2PO_4$ ), p.a.	Merck
Magermilchpulver	Glücksklee
Magnesiumchlorid-Hexahydrat ( $MgCl_2 \times 6 H_2O$ ), p.a.	Merck
Mes (2[N-Morpholino]ethansulfonsäure)	Sigma
Methanol, p.a.	Merck
Nagellack	MAC
Natriumazid ( $NaN_3$ )	Merck
Natriumchlorid (NaCl), p.a.	Merck
Natrium-di-Hydrogenphosphat ( $NaH_2PO_4$ ), p.a.	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma
Nickelsulfat ( $NiSO_4$ ), p.a.	Merck
Normal Goat Serum (NGS)	Sigma
PMSF	Applichem
Ponceau S Solution	Serva
p-Phenyldiamin	Sigma
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	BioRad
Repell-Silane	Pharmacia Biotech
Rinderserunalbumin (BSA)	Sigma
Salzsäure (HCl), rauchend	Merck
Schwefelsäure ( $H_2SO_4$ ), 95-97 %ig	Merck
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva

Trichloressigsäure	Merck
Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan (Tris)	Sigma
Triton X 100	Merck
Tween <sup>®</sup> 20	Serva
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), 30 %ig	Merck
X-Gal	Biomol
Xylencyanol	Sigma

## 2.6 Größenstandards für Gelelektrophorese

DNA-Molekulargewichtsmarker II	Roche
DNA-Molekulargewichtsmarker VIII	Roche
Protein-Molekulargewichtstandard "Low"	GIBCO BRL
Protein-Molekulargewichtstandard "High"	GIBCO BRL

## 2.7 Proteine und Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIP)	Roche
Benzonase	Roche
Fibronektin, humanes	Sigma
Gelatine	Sigma
Lysozym	Roche
Proteinase K	Roche
Proteinstandard (Bovine Plasma $\gamma$ -Globulin)	BioRad
Ratten-IgG, gereinigt	Dianova
Restriktionsendonukleasen, diverse	GIBCO BRL, Roche
RNase A	Roche
T4-DNA Ligase	Roche
<i>Taq</i> -Polymerase	Perkin Elmer
Thrombin	Th. Geyer
rOspC (von <i>B. afzelii</i> -Isolat PKo für Antigen)	AG Wilske

## 2.8 Vektoren

pCR <sup>®</sup> II	Invitrogen
pQE-30	Qiagen

## 2.9 Nukleotide

dNTP-Mix	Perkin Elmer
BigDye Mix	Perkin Elmer

## 2.10 Oligonukleotide

Bezeichnung	Verwendung	Target	Sequenz (5' → 3')	T <sub>m</sub> [°C]
1233rev	Sequenzierung	pCR <sup>®</sup> II	agcggataacaatttcacacagga	43
plaz-41	Sequenzierung	pCR <sup>®</sup> II	gcgattaagttgggtaacgccagg	43
PQE-R	Sequenzierung	pQE-30	gttctgaggtcattactgg	42
PQE-F	Sequenzierung	pQE-30	cggataacaatttcacacag	42
bbk32- <i>Bam</i> HI-for	Amplifikation	<i>bbk32</i>	<u>gagggatccgatttattcataagatatgaaatg</u>	53
bbk32- <i>Hind</i> III-rev	Amplifikation	<i>bbk32</i>	<u>aaaagcttttagtaccaaacgccattcttgcaatg</u>	56

Bei den Oligonukleotiden für die Sequenzreaktionen handelt es sich um Standardprimer für kommerziell erhältliche Klonierungs- und Expressionssysteme, die mit dem jeweiligen System erworben wurden. Die Oligonukleotide für die Amplifikation des *bbk32*-Genlokus von *B. burgdorferi sensu lato* wurden im Rahmen dieser Arbeit entworfen und von der Firma Roth synthetisiert.

## 2.11 DNA-Konstrukte

Die GTPase-Konstrukte (CDC42HsV12, CDC42HsN17, RacV12 und RacN17) und das Konstrukt für das GST-C3-Transferase-Fusionsprotein wurden, transformiert in *E. coli* Zellen, freundlicherweise von Alan Hall bzw. Dr. Stefan Linder zur Verfügung gestellt.

## 2.12 Kits

High Pure PCR Product Purification Kit	Roche
His Micro Spin Purification Module	Amersham
Plasmid Mini- und Midi-Kit	Qiagen
Live/Death Stain <sup>®</sup> <i>BacLight</i> <sup>™</sup>	Molecular Probes
TA-Cloning <sup>®</sup> Kit	Invitrogen

## 2.13 Antikörper

Die monoklonalen Mausantikörper lagen als Zellkulturüberstände vor, die polyklonalen Kaninchenantikörper als Immunsereen. Jede Charge wurde routinemäßig vor Gebrauch serologisch getestet (IFT, Borrelien-Ganzzelllysat-Blot und Rekomb-Blot) und die jeweiligen Verdünnungsfaktoren durch Schachbretttitration für Western Blot und IFT bestimmt. Der monoklonale anti-WASp- und die polyklonalen anti-Arp2/3p41-, anti-CDC42Hs- und anti-Rac1/2-Antikörper wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Linder zur Verfügung gestellt. Die aufgeführten Humanseren wurden vorwiegend für Immunfluoreszenzmarkierungen eingesetzt. Für Fragestellungen zur Antigenizität von rBBK32 (vgl. 4.3.3.4) wurden in Western Blot-Analysen standardisierte Serenpanels nach SCHULTE-SPECHTEL et al. (2003), bestehend aus Patientenseren und entsprechenden Kontrollseren verwendet.

### 2.13.1 Monoklonale Mausantikörper

AK	Isotyp	Antigen	Spezifität	Referenz	Verdünnung	
					IFT	WB
L22 1F8	IgG <sub>1</sub>	OspC	<i>B. b. ss</i> , <i>B. a.</i> , <i>B. g.</i>	WILSKE et al. (1993b)	1:8	1:8
L32 1F11	IgG <sub>2a</sub>	OspA	<i>B. b. ss</i> , <i>B. a.</i> , <i>B. g.</i>	WILSKE et al. (1992a)	1:2	1:2
L22 22C11	IgG <sub>2a</sub>	OspC	<i>B. afzelii</i> , <i>B. garinii</i>	WILSKE et al. (1995a)	1:4	1:4
L22 6C4	IgG <sub>1</sub>	OspC	<i>B. b. ss</i> , <i>B. a.</i> , <i>B. g.</i>	WILSKE et al. (1995a)	1:8	1:8
L41 1C11	IgG <sub>2b</sub>	Flagellin	<i>B. afzelii</i> , <i>B. garinii</i>	WILSKE et al. (1990)	1:20	1:20
3D8.H5	IgG <sub>1</sub>	WASp	humanes WASp	STEWART et al. (1996)	1:50	1:50

(*B. b. ss* = *B. burgdorferi* sensu stricto; *B. a.* = *B. afzelii*; *B. g.* = *B. garinii*)

### 2.13.2 Polyklonale Mausantikörper

AK	Isotyp	Antigen	Spezifität	Referenz	Verdünnung
					IFT
anti-Arp2/3p41	IgG	Arp	humanes p41-Arc	LINDER et al. (2000a)	1:50
anti-CDC42Hs	IgG	CDC42Hs	humanes CDC42	AEPFELBACHER et al. (1994)	1:50
anti-Rac1/2	IgG	Rac1	humanes Rac1	-	1:50

### 2.13.3 Polyklonale Kaninchenseren

AK	Isotyp	Antigen	Spezifität	Bezugsquelle	Verdünnung	
					IFT	WB
K54a	IgG	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> Vollantigen	WILSKE et al. (1999)	1:200	1:200
anti-BSA	IgG	BSA	Rinderserumalbumin	Sigma	1:200	1:50
anti-Fibronektin	IgG	Fibronektin	Humanes Fibronektin	Sigma	1:200	1:50

### 2.13.4 Polyklonale Humanseren (Patientenseren)

AK	Bemerkung	Spezifität	Verdünnung
			IFT
HS93-19400	Standard-Kontrollserum	Borrelien Vollantigen	1:200
HS94-19736	Neuroborreliose Stadium II	Borrelien Vollantigen	1:200

### 2.13.5 Magnetbead-konjugierte monoklonale Mausantikörper

AK	Isotyp	Antigen	Spezifität	Bezugsquelle	Verdünnung
					IFT
anti-CD14	IgG	CD14	humanes CD14	Milteny Biotech	1:100

### 2.13.6 Fluorophor-konjugierte monoklonale Antikörper

Fluorophor	Donor	Spezifität	Isotyp	Antigen	Bezugsquelle	Verdünnung IFT
FITC	Ratte	anti-Maus	IgG <sub>2a</sub>	CD18	Serotec	1:100
FITC	Ratte	anti-Maus	IgG <sub>2a</sub>	Ovalbumin	Serotec	1:100

### 2.13.7 Fluorophor-konjugierte sekundäre Antikörper

Fluorophor	Donor	Spezifität	Isotyp	Bezugsquelle	Verdünnung IFT
Alexa Fluor <sup>®</sup> 568	Ziege	anti-Maus	IgG <sub>2a</sub>	Molecular Probes	1:100
Alexa Fluor <sup>®</sup> 488	Ziege	anti-Maus	IgG <sub>3</sub>	Molecular Probes	1:100
Cy <sub>3</sub> , Cyanine Dye	Ziege	anti-Maus	IgG <sub>1</sub>	Caltag	1:100
Cy <sub>3</sub> , Cyanine Dye	Ziege	anti-Maus	IgG <sub>2b</sub>	Caltag	1:100
Cy <sub>3</sub> , Cyanine Dye	Ziege	anti-Kaninchen	IgG (H+L)	Caltag	1:100
Cy <sub>5</sub> , Cyanine Dye	Ziege	anti-Maus	IgG <sub>1</sub>	Caltag	1:100
FITC	Ziege	anti-Maus	IgG <sub>1</sub>	Caltag	1:100
FITC	Ziege	anti-Maus	IgG <sub>2a</sub>	Caltag	1:100
FITC	Ziege	anti-Maus	IgG <sub>2b</sub>	Caltag	1:100
FITC	Ziege	anti-Maus	IgG (H+L)	Caltag	1:100
FITC	Ziege	anti-Ratte	IgG (H+L)	Caltag	1:100
R-Phycoerytherin	Ziege	anti-Maus	IgG <sub>1</sub>	Caltag	1:100
R-Phycoerytherin	Ziege	anti-Maus	IgG <sub>2a</sub>	Caltag	1:100
FITC	Kaninchen	anti-Maus	IgG	DAKO <sup>®</sup>	1:100
FITC	Schwein	anti-Kaninchen	IgG	DAKO <sup>®</sup>	1:100

### 2.13.8 Peroxidase-konjugierte sekundäre Antikörper

Fluorophor	Donor	Spezifität	Isotyp	Bezugsquelle	Verdünnung WB
Peroxidase	Kaninchen	anti-Human	IgG	DAKO <sup>®</sup>	1:1000
Peroxidase	Schwein	anti-Kaninchen	IgG	DAKO <sup>®</sup>	1:1000
Peroxidase	Kaninchen	anti-Maus	IgG	DAKO <sup>®</sup>	1:1000

## 2.14 Verbrauchsmaterialien

Centricon-Röhrchen	Amicon
Deckgläser, quadratisch (18 mm x 18 mm)	Langenbrinck
Deckgläser, rechteckig (18 mm x 36 mm)	Langenbrinck
Deckgläser, rechteckig (18 mm x 64 mm)	Langenbrinck
Eppendorf-Reaktionsgefäße, 1,8 ml, safe lock	Eppendorf
Femtotips	Eppendorf
Fluospheres <sup>®</sup> (Ø 2µm)	Molecular Probes
Isotone <sup>®</sup> II	Coulter
Multitest-Slides (12-Well)	ICN
Objektträger	Langenbrinck
PCR-Reaktionsgefäße, 0,2 ml	Perkin Elmer
Protan <sup>®</sup> Nitrocellulose Transfer Membrane (0,45 µm)	Schleicher & Schüll
Whatman Filterpapier Nr.1	Schleicher & Schüll
Sterilfilter (0,45 µm)	Schleicher & Schüll
Spritzen	Braun
Kanülen	Braun

## 2.15 Chromatographiesäulen und -matrices

Chelating Sepharose <sup>™</sup>	Amersham
Fractogel <sup>®</sup> EMD SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 650 (S)	Merck
Glutathion Sepharose <sup>®</sup> Beads	Amersham
HiTrap Affinity Column Chelating HP	Amersham
MonoQ Beads	Pharmacia
MonoQ HR5/5 Säule	Amersham
MonoS Säule	Amersham
Sephadex <sup>®</sup> G-25 superfine	Amersham
Benzamidin Sepharose <sup>®</sup> Beads	Amersham

## 2.16 Geräte

Certomat <sup>®</sup> BS-1	B. Braun Biotech Intern.
CO <sub>2</sub> -Inkubatoren	WTB-Binder
Colorimeter 254	Sherwood
Compic Inject Micromanipulator	Cell Biology Trading
DNA-Sequenzer 373A	Applied Biosystems
Durchflusszytometer EPICS <sup>®</sup> XL-MCL	Coulter
E.A.S.Y. RH Geldokumentation (Kamera E.A.S.Y. 429K)	Herolab
Eppendorf Zentrifuge 5417C	Eppendorf
FPLC-System (Dokumentation: Rec112)	Amersham
Fraction Collector Frac-100	Amersham

French Press	SLM-AMINCO
Gene Amp PCR System 2700	Applied Biosystems
GFL Horizontalschüttler 3015	GFL mbH
Gradient Programmer GP	Pharmacia
Heizblock	Liebisch
Horizontale Agarosegelelektrophoresekammer	peqlab
Mini Protean II™ Elektrophoresekammer	BioRad
<i>MiniMacs</i> Separationssäule	Miltenyi Biotech
Model 543 Gel Dryer	BioRad
Rotana/RP Zentrifuge	Hettich
Semi-Dry Trans Blot Transfer Cell	BioRad
Sonifier, Cell Disruptor B15	Branson (Heinemann)
Sorvall® Instruments Rotoren: SS34, GSA, GS-3	DuPonts Inst. (Kendro)
Sorvall® RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge	DuPonts Inst. (Kendro)
Spannungsgerät Power Pac 200	BioRad
Spectrophotometer Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech
Sterilbank	BDK
Transjektor 5246	Eppendorf
Wärmeschrank	Heraeus

## 2.17 Software

Adobe Photoshop™, Version 6
BLAST (NCBI-Datenbank; NIH, Washington)
Corel Draw, Version 8
Corel Photo Paint, Version 8
DNA-MAN, Version 4 (Lynnon BioSoft)
Epi Info, Version 6
GCG-Sequenzanalyse Softwarepaket (Version 6.1 und 7.0)
Imaging (Wang Corp.)
Microsoft Office 2000 (WORD, EXCEL, POWERPOINT)
Scion Image (NIH Software package)
Seq-Ed und Analysis (373A DNA-Sequenzer Software, Applied Biosystems)
Spot Programm (Visitron Systems)

## 2.18 Mikroskope

Modell	Anwendung	Okulare	Objektive	Hersteller
Dialux 22 Lichtmikroskop	Dunkelfeld Phasenkontrast	Perplan 12,5x	PL Fluotar 10x/0,3 PL Fluotar 40x/0,7	Leitz
DM IRB inverses Lichtmikroskop*	Phasenkontrast	L Plan 10x/20	N Plan 5x/0,12 PH 0 N Plan 10x/0,25 PH 1 N Plan L 20x/0,40 CORR PH 1 N Plan L 40x/0,55 CORR PH 2	Leica
DM IRB inverses Lichtmikroskop**	Phasenkontrast Immunfluoreszenz	L Plan 10x/25	PL APO 63x/1,32 oil PH3 PL APO 100 x/1,4 oil PH1 PL Floutar 10x/0,3 PH1 PL Floutar 20x/0,5 PH2 PL Floutar 40x/0,7 PH2 PL Floutar 40x/1,0-0,5 oil	Leica
DM IRB inverses Lichtmikroskop***	Immunfluoreszenz Konfokales Laser Scanning	L Plan 10x/25	PL Floutar 20x/0,5 oil PH2 PL Floutar 100x/1,3 oil PH3 N Plan N L40x/0,55 CORR PH2 HCX PL APO 63x/1,32 oil PH3	Leica

\* mit Digitalkamera CF 11 DSP (Kappa) und Video-Monitor (Sony)

\*\* mit Fluoreszenzeinrichtung (Quecksilberhochdruckdampfampe HBO100W;  
Filtereinsätze: UV G 365/395/397, Blau BP 485/450-490/546, Grün BP 546/580/590 und Rot-  
Grün BP 490/20-575/30  
mit digitaler Fotoeinheit Leitz DM RD und "Spot" Kamera (Leica) und konvent. Fotoapparatur  
(Kodak)

\*\*\* mit Fluoreszenzeinrichtung (Quecksilberhochdruckdampfampe HBO100W;  
Filtereinsätze: UV G 365/395/397, Blau BP 485/450-490/546, Grün BP 546/580/590 und Rot-  
Grün BP 490/20-575/30  
mit digitaler Lasereinheit Leica TCS NT und Ausstattung für konfokales Laser Scanning

### 3 Methoden

Alle mikrobiologischen und molekularbiologischen Protokolle werden, falls im Text nicht anders erläutert, nach AUSUBEL et al. (1993) und SAMBROOK et al. (1989) ausgeführt. Verwendete Medien, Pufferzusammensetzungen und Reaktionsansätze sind teilweise für diese Arbeit verändert worden. Die angegebenen Methoden erheben nicht den Anspruch allgemeiner Gültigkeit.

#### 3.1 Nährmedien

##### 3.1.1 MKP-Medium

Das MKP-Medium (**modifiziertes Kelly Medium nach PREAC-MURSIC**) wird zur Anzucht von *Borrelia burgdorferi* sensu lato-Stämmen aus Patienten- und Zeckenmaterial sowie zur weiteren Kultivierung der Spirochäten verwendet (PREAC-MURSIC et al. 1986). MKP ist ein Komplexmedium, bestehend aus Grundmedium und Anreicherungszusätzen.

Das Grundmedium setzt sich wie folgt zusammen:

---

CMRL-1066 (10x) ohne Glutamin	100 ml
Neopepton	5 g
Hepes	6 g
Natriumcitrat	0,7 g
Glucose	3 g
Natriumpyruvat	0,8 g
N-Acetylglucosamin	0,4 g
Natriumbicarbonat	2 g
Aq. dest.	ad 1000 ml

Der pH-Wert wird mit 5 M NaOH auf 7,6 eingestellt. Das Grundmedium wird sterilfiltriert (Filterporengröße 0,2 µm), in 400 ml Portionen aliquotiert und bis zu 3 Monaten bei -20 °C gelagert.

Zu 1600 ml Grundmedium wurden zur Anreicherung

---

Gelatine, 7 %ig	200 ml
Kaninchenserum	100 ml
Rinderserumalbumin, 35 %ig	100 ml

zugesetzt, wobei das zuvor Kaninchenserum sterilfiltriert (Filterporengröße 0,2 µm) und partiell hämolysiert wird (Inaktivierung bei 56 °C/30 min). Das Medium wird zu 6,5 ml

in 7 ml Glasröhrchen abgefüllt und luftdicht verschlossen. Das fertige Material ist bei 4 °C für ca. 3 Wochen haltbar.

Für die Lagerung von Borrelienstämmen bei -70 °C wird dem MKP-Medium Glycerin zugesetzt (10 % (v/v) Endkonzentration).

### 3.1.2 LB-Medium

Zur Anzucht der in dieser Arbeit verwendeten *Escherichia coli* Stämme wird das Vollmedium nach S. E. LURIA und G. BERTANI verwendet. Das unter dem Namen LB-Medium bekannte Flüssigmedium wird, soweit nicht anders angegeben, unter Zugabe von Tetracyclin (Endkonzentration 12,5 µg/ml) verwendet.

LB-Medium setzt sich wie folgt zusammen:

Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	10 g/l
NaCl	5 g/l

Der pH-Wert wird mit NaOH auf 7,2 eingestellt. Für die Herstellung von LB-Agar wird 13 g Agar/l Medium zugefügt (SAMBROOK et al., 1989). Das Vollmedium wird für 20 Minuten bei  $1,2 \times 10^5$  Pa Druck (121 °C) autoklaviert.

### 3.1.3 Zellkulturmedien

Kultur und Kryokonservierung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten primären Zellen und Zelllinien erfolgt unter Verwendung folgender Komplexmedien:

#### Astrozytomzell-Medium für 3121N1

DMEM	50 ml
L-Glutamin	2 mM
Fötale Kälberserum, hitzeinaktiviert	10 %

#### Endothelzell-Medium für ECV304

M 199	50 ml
L-Glutamin	2 mM
Fötale Kälberserum, hitzeinaktiviert	10 %

#### Komplexmedium für humane und murine Makrophagen-Präparationen

RPMI 1640	50 ml
L-Glutamin	2 mM
Fötale Kälberserum, hitzeinaktiviert	20 %

#### Komplexmedium für CRL-2480

F12K	50 ml
L-Glutamin	2 mM
NaHCO <sub>3</sub>	1,5 g/l
Heparin	0,1 mg/ml
ECGS	0,03 mg/ml
Fötale Kälberserum, hitzeinaktiviert	10 %

#### Komplexmedium für HUVEC-Präparationen

EGM	50 ml
ECGS/H2	0,4 %
Fötale Kälberserum, hitzeinaktiviert	10 %
EGF	0,1 ng/ml

### **DMSO-Einfriermedium**

---

DMEM, M 199 bzw. F12K	50 ml
L-Glutamin	2 mM
Fötale Kälberserum, hitzeinaktiviert	20 %
DMSO	10 %

#### **3.1.4 Kollagen- bzw. Gelatine-Beschichtung von Zellkulturgefäßen**

Deckgläschen und Zellkulturgefäße wurden für die Kultivierung der HUVEC-Präparationen mit Kollagen, bzw. für die Kultivierung der Zelllinie CRL-2480 mit Gelatine beschichtet. Der Boden der Zellkulturgefäße wurde mit der sterilen Kollagen G-Lösung (0,1-0,5 % (w/v) Kollagen G in Aq. dest.) bzw. der sterilen Gelatinelösung (0,1 % (w/v) Gelatine in Aq. dest.) benetzt und mindestens eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Nach Absaugen der Lösung wurden die Gefäße mit PBS gewaschen und bei 4 °C gelagert.

### **3.2 Borrelienkultur**

#### **3.2.1 Kultivierung**

Die aus der Stammsammlung des Max von Pettenkofer-Institutes für die Untersuchungen ausgewählten *Borrelia burgdorferi* sensu lato Stämme werden in MKP-Medium für 5-8 Tage bei 33 °C in 7 ml Glasröhrchen kultiviert (Preac-Mursic et al., 1986). Für die *in vitro*-Passagierung werden ca. 0,5 ml einer dicht bewachsenen Borrelienkultur in 6,5 ml MKP-Medium überimpft. Dies erfolgt mindestens alle 5-8 Tage, spätestens jedoch, wenn der im Medium befindliche Indikator durch einen Farbumschlag von rot nach gelb eine Ansäuerung des Mediums anzeigt. Die Kontrolle der Kulturen auf Verunreinigungen, Vitalität und Beweglichkeit der Spirochäten erfolgt mittels regelmäßiger Dunkelfeldmikroskopie. Für alle Versuche werden frühe bis mittlere Passagen der Borrelien (Passage 10 bis max. 25) verwendet. Um stets über ausreichende Mengen an Borrelien der gewünschten Passage zu verfügen, wird von allen verwendeten Stämmen eine entsprechende Anzahl Aliquots kryokonserviert (3.2.2).

### 3.2.2 Kryokonservierung

Für die Kryokonservierung wird ca. 1 ml einer dicht bewachsenen Borrelienkultur in 1 ml MKP-Medium mit Zusatz von Glycerin (finale Konzentration 10 % (v/v), vgl. 3.1.1) resuspendiert und in sterilen Glasröhrchen bei  $-70\text{ °C}$  gelagert.

### 3.2.3 Vitalfärbung

Zur exemplarischen Überprüfung der Vitalität einer Borrelienkultur in der exponentiellen Wachstumsphase wird in regelmäßigen Zeitintervallen der Live/Death Stain® *BacLight*<sup>™</sup> (Molecular Probes) für Bakterien verwendet. Hierbei wird nach dem Standardprotokoll des Herstellers vorgegangen.

### 3.2.4 Wachstumsmessungen (Wachstumskurve)

#### 3.2.4.1 Bestimmung der Keimzahl

Aufgrund der länglichen Morphologie der Borrelien und ihrer Neigung zu aggregieren wird von einer photometrischen Bestimmung der Keimzahlen von *B. burgdorferi* sensu lato-Kulturen abgesehen. Alternativ wird die Bestimmung der Borrelienzahlen nach der in unserem Labor etablierten MvP-Methode (Max von Pettenkofer-Methode) durchgeführt. Hierzu werden 13  $\mu\text{l}$  der zu bestimmenden Borreliensuspension auf einen Objektträger gegeben und mit einem genormten Deckglas (24 x 60 mm) luftblasenfrei abgedeckt. Im Dunkelfeld (Vergrößerung: 400 x) werden 50 Blickfelder ausgezählt und nach folgender Formel die Anzahl der Spirochäten pro Milliliter berechnet:

$$\frac{\text{Anzahl der gezählten Spirochaeten}}{\text{Anzahl der Blickfelder (50)}} \times \frac{2500}{3} \times 1000$$

(der Quotient  $\frac{2500}{3}$  repräsentiert die errechnete Anzahl der Blickfelder pro Milliliter Kultur; 1000 ist der Umrechnungsfaktor von  $\mu\text{l}$  zu ml)

Ein Vergleich der MvP-Methode mit der Petroff-Hauser Zählkammer (SCHLEGEL, 1985) ergibt für beide Methoden nahezu identische Ergebnisse.

### 3.2.4.2 Wachstumskurven

Zur Erstellung von Wachstumskurven wird eine definierte Menge *log*-Phase Borrelien in Kulturröhrchen angeimpft und nach der oben beschriebenen MvP-Methode die Keimzahl zum Zeitpunkt  $t_0$  bestimmt. Während der entsprechenden Versuchsdauer wird täglich die Keimzahl der Kulturen ermittelt. Um ein statistisch relevantes Mittel und die Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, wird für die entsprechenden Stämme bzw. Klone der Versuch dreimal in Doppelbestimmungen wiederholt. In der graphischen Darstellung der Ergebnisse wird die Keimzahl auf der logarithmisch skalierten Ordinate die Zeit linear auf der Abszisse aufgetragen.

### 3.2.4.3 Bestimmung der Wachstumsrate ( $\mu$ ) und Verdoppelungszeit ( $t_d$ )

Wachstumsrate ( $\mu$ ) und Verdoppelungszeit ( $t_d$ ) von verschiedenen *Borrelia burgdorferi* sensu lato Stämmen und Klonen werden rechnerisch aus den Ergebnissen der Wachstumskurven abgeleitet.

Die Wachstumsrate ist ein Maß für die Geschwindigkeit des Zellwachstums (SCHLEGEL, 1985). Sie errechnet sich aus den zu den Zeiten  $t_0$  und  $t$  ermittelten Keimzahlen  $x_0$  und  $x_t$  nach

$$\mu = \frac{\ln x_t - \ln x_0}{(t - t_0)},$$

die Verdoppelungszeit ( $t_d$ ) errechnet sich nach

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

## 3.3 Zellkultur

### 3.3.1 Isolierung und Weiterkultivierung primärer humaner Monozyten

Primäre humane Monozyten werden aus peripherem Blut mittels "magnetic activated cell sorting" (MACS) isoliert. Hierzu werden 50 ml heparinisiertes Blut nach der Methode von EIERMANN et al., (1989) in Ficoll<sup>®</sup> zentrifugiert (30 min, 460 x g, RT) und die mononukleären Zellen isoliert. Die mononukleären Zellen werden anschließend in 400  $\mu$ l Monopuffer resuspendiert, mit 100  $\mu$ l magnetischen anti-human CD14-Antikörper-Beads gemischt und 15 min auf Eis inkubiert und auf eine mit Monopuffer äquilibrierte magnetische MiniMACS-Säule (Miltenyi Biotech), die mit einem

Permanentmagneten verbunden ist, aufgesetzt. Die Antikörper-markierten, CD14-positiven Monozyten werden hierbei durch den Permanentmagneten zurückgehalten. Nach Entfernen des Magneten werden die CD14-markierten Zellen umgehend mit 1 ml Monopuffer eluiert. Die eluierten Zellen werden abzentrifugiert (10 min, 460 x g, 4 °C), in 0,5-2 ml RPMI 1640 mit 100µg/µl Penicillin/Streptavidin (=RPMI\*) resuspendiert und die Zellzahl der Suspension in einer Neubauer Zählkammer ermittelt. Die Zellen werden anschließend mit einer Zelldichte von  $5 \times 10^4$  Zellen /Deckglas in 8-well Kulturplatten auf Cellocate Coverslips (Eppendorf) ausgesät und bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach 1,5-2 h werden je 1,5 ml Kulturmedium (RPMI\* mit 20 % autologem Serum) hinzugefügt. Mediumwechsel erfolgt nach jeweils 3-4 Tagen Kultur. Nach 7-11 tägiger Reifezeit sind die Monozyten zu Makrophagen ausdifferenziert.

#### Monopuffer

---

PBS, pH 7,4	50 ml
EDTA	5 mM
humanes Serumalbumin	0,2-0,5 %

#### 3.3.2 Isolierung und Kultur muriner Peritonealmakrophagen

26 Wochen alten Mäuse (CD18<sup>-/-</sup> C57 BL/6 und Wildtyp C57 BL/6) werden durch Begasung mit CO<sub>2</sub> (100 %) in einem geschlossenen Gefäß getötet. Dieses Vorgehen steht im Einklang mit den Richtlinien der *Society of Laboratory Animal Science* (GV-SOLAS). Die Tiere werden in 70 %igem Isopropanol desinfiziert und die Haut am Bauchraum entlang der *Linea alba* vom Sternum bis zur Symphyse durch einen kurzen Ruck abgelöst. Anschließend werden 5-8 ml eisgekühlte Hanks balanced Saline-Lösung in den Bauchraum injiziert. Durch eine Peritoneal-Lavage werden die residenten Makrophagen aus dem Bauchfell gelöst (ca.  $3-5 \times 10^5$  pro Maus). Die so gewonnene Zellsuspension wird für 60 min bei 100 x g und 4 °C abzentrifugiert, in RPMI 1640 resuspendiert und die Zellzahl in einer Neubauer Zählkammer ermittelt. Die Zellen werden wahlweise mit einer Dichte von  $5 \times 10^4$  Zellen /Deckglas auf Deckgläschen ausgesät und bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit max. 2 d kultiviert oder umgehend Koinkubationsversuchen zugeführt (3.4.3). Zur Spezifizierung der Makrophagen wird das Membranprotein CD18 mit einem entsprechenden Fluorochrom-konjugierten anti-CD18-Antikörper (2.13.6) markiert und im Durchflusszytometer

gemessen. Für die Kontrollmessungen (Hintergrund) wird ein adäquat konjugierter Antikörper gegen Ovalbumin benutzt.

### **3.3.3 Isolierung und Kultur humaner Nabelschnurzellen (HUVECs)**

Endothelzellen werden durch enzymatische Disaggregation in Anlehnung an die von JAFFE et al. (1973) beschriebene Methode aus Nabelschnüren gewonnen. Hierzu werden, um Asepsis zu gewährleisten, die Nabelschnurstücke zunächst 30 s in 70 %igen Ethanol gelegt. Anschließend werden mit Klemmen abgeschlossene Segmente von Nabelschnurvenen mit einer Nadel kanalisiert und für 30 min mit einer  $\alpha$ -Chymotrypsin-Lösung inkubiert. Die Lösung wird abgesaugt und die darin enthaltenen Zellen auf Kollagen G beschichteten Kulturgefäßen ausgesät (vgl. 3.1.4). Die Endothelzellen werden in supplementiertem EGM-Medium bei 37 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt über 10 d kultiviert, wobei alle 2 bis 3 Tage ein Mediumwechsel durchgeführt wird.

### **3.3.4 Kultur adhärent wachsender Zelllinien**

Die adhärent wachsenden Zelllinien 3121N1, ECV304 und CRL-2480 werden in Kulturflaschen oder auf Deckgläschen in Multiwell-Gewebekulturplatten bei 37 °C in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre bei 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt im Brutschrank kultiviert, wobei die Zellkulturgefäße für die Kultivierung der Zelllinie CRL-2480 mit Gelatine beschichtet werden (vgl. 3.1.4). Die jeweiligen Medien sind unter 3.1.3 beschrieben. Für die Zellkultur werden keine antibiotischen Zusätze verwendet. Mediumwechsel erfolgt nach jeweils 3-4 Tagen.

### **3.3.5 Aufteilung adhärent wachsender Zelllinien**

1321N1-, ECV304- und CRL-2480-Zellen werden in 48- bis 72-stündigen Abständen (80-90 % Konfluenz) aufgeteilt ("gesplittet"). Die Zellen werden hierfür zur Entfernung von Serumrückständen mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend 3 min mit 2-5 ml Trypsin-EDTA bei 37 °C inkubiert. Nach Betrachtung der Zellen unter dem Mikroskop wird die enzymatische Wirkung des Trypsins durch Zugabe von Medium inhibiert. Ein Teil des Volumens wird weiterkultiviert (1/20-1/25), der Zellüberschuss für Versuche eingesetzt. Hierzu werden die Zellen in frisches Kulturmedium aufgenommen, mit Hilfe der Neubauer Zählkammer die Zellzahl bestimmt und anschließend mit einer Zelldichte von  $1-2 \times 10^4$ /ml wieder ausgesät oder kryokonserviert. Um standardisierte

Bedingungen und eine optimale Vitalität und genetische Ausstattung der immortalisierten Zellen zu gewährleisten, werden ausschließlich Kulturen der zweiten bis maximal fünften Passage für Versuche eingesetzt.

### **3.3.6 Einfrieren und Auftauen von eukaryoten Zellen**

Von allen Zelllinien werden Dauerkulturen angelegt, die bei Bedarf wieder kultiviert werden können. Zum Einfrieren werden die Zellen nach dem Ablösen zentrifugiert und  $1-2 \times 10^5$ /ml Zellen in DMSO-Einfriermedium resuspendiert (vgl. 3.1.3). Jeweils 1 ml der Suspension wird in Kryoröhrchen überführt und in einem Gefriercontainer (Kühlmittel: Isopropanol) definiert in 1 °C/min Schritten auf die Lagertemperatur von –70 °C gekühlt. Nach 24 h können sie zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff (–196 °C) umgesetzt werden.

Das Auftauen erfolgt im 37 °C Wasserbad. Das Volumen der Kryoröhrchen wird anschließend in 50 ml Falcons mit 5 ml des entsprechenden Zellkulturmediums (vgl. 3.1.3) überführt und 10 min bei 800 x g und RT zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, die Zellen in 5 ml Medium resuspendiert und in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen ausgesät.

### **3.3.7 Mycoplasmen-Test**

Um eine Kontamination der verwendeten Säugerzellen mit den am meisten in der Zellkultur verbreiteten Mycoplasmen/Acholeplasmen-Spezies (*M. arginini*, *M. hyorhina*, *M. laidlawii*, *M. orale*) auszuschließen, werden im Zeitabstand von 6 Wochen entsprechende Kontrollen durchgeführt. Das Testprinzip basiert auf dem Nachweis DNA-haltiger, extranukleärer, körniger Strukturen durch eine DAPI-Direktfärbung (3.7.2). Für alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche werden ausschließlich Mycoplasmenfreie Kulturen eingesetzt.

## **3.4 Koinkubation von *B. burgdorferi* sensu lato mit verschiedenen Säugerzellen**

### **3.4.1 Vorbehandlung der Borrelien (Opsonierung)**

Vor den Koinkubationsexperimenten mit primären Zellen und immortalisierten Zellen werden die Borrelien zweimal mit den korrespondierenden Zellkulturmedien ohne Humanserum-Supplement (DMEM, M199, RPMI 1640 oder F12K) gewaschen. Gemäß der jeweiligen Fragestellung werden die Zellen anschließend für 45 min wahlweise mit den oben genannten Medien ohne Humanserum-Supplement (nicht-opsonierende

Bedingungen), mit autologem Humanserum-Supplement (Serumopsonisation; Endkonzentration 20 %) oder mit Antikörper-Zusatz (Antikörperopsonisation) inkubiert. Um Kreuzreaktivitäten mit *B. burgdorferi* s. l. auszuschließen, wird das zur Serumopsonisation benutzte Humanserum im Serologie-Hauptlabor des Max von Pettenkofer-Institutes für Hygiene und Mikrobiologie in München, Abt. Lyme einer vollständigen Lyme-Serologie ["enzyme linked immunoadsorbent assay" (ELISA), Immunfluoreszenztest (IFT) und Rekomb-Blot; Testantigen: *B. afzelii* PKo] unterzogen. Für die Antikörperopsonisation werden monoklonale Antikörper gegen OspA (L32 1F11) und OspC (L22 1F8) in den üblichen Verdünnungen eingesetzt (vgl. 2.13.1). Die Antikörpersuspensionen werden hierzu mit dem jeweiligen Zellkulturmedium ohne Humanserumsupplement verdünnt. Nach der Opsonierung, wahlweise mit Humanserum oder mit Borrelien-spezifischen monoklonalen Antikörpern, werden die Bakterienkulturen dreimal mit dem jeweiligen Zellkulturmedium ohne supplementierende Zusätze gewaschen. Im Anschluss wird die exakte Keimzahl der Bakteriensuspension nach der unter 3.2.4.1 beschriebenen Methode ermittelt und das gewünschte Inokulum für die Koinkubationsversuche berechnet.

#### **3.4.2 Vorbehandlung der Zellen und Zelllinien**

Die primären Säugerzellen (primäre humane Makrophagen und HUVECs) werden einige Tage vor den Koinkubationsexperimenten aus humanen Materialien (Spenderblut oder Nabelschnur) präpariert bzw. die immortalisierten Zelllinien geerntet, in definierter Zellzahl auf Deckgläsern ausgesät und unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Unmittelbar vor der Koinkubation mit Borrelien werden die verschiedenen Säuger-Zelltypen zweimal mit dem korrespondierenden Zellkulturmedium ohne Humanserum-Supplement gewaschen, um Antibiotika- und Mediumrückstände und Debris zu entfernen. Entsprechend der jeweiligen Fragestellung werden die Zellen anschließend für 45 min mit antibiotikafreiem Zellkulturmedium ohne Humanserum-Supplement (nicht opsonierende Bedingungen) oder mit Humanserum-Supplement (autologes Serum mit negativer Lyme-Serologie) bei 37 °C in Feuchtigkeits-gesättigter Atmosphäre mit 5 %igem CO<sub>2</sub>-Gehalt inkubiert.

### **3.4.3 Koinkubation von Borrelien mit verschiedenen Säugerzellen**

Grundlegende Voraussetzung aller im Rahmen dieser Untersuchungen durchgeführten Koinkubationsexperimente ist das Arbeiten unter antibiotikafreien Bedingungen. Für die Koinkubationsexperimente werden die Säugerzellen wahlweise auf Deckgläschen adhärierend oder als Zellsuspension mit Spirochäten koinkubiert.

#### **3.4.3.1 Koinkubationsversuche mit adhärenen Zellen**

Alle verwendeten primären Zellen und immortalisierten Zelllinien werden mit einer Zellzahl von durchschnittlich  $5 \times 10^5$  pro Deckgläschen in den Koinkubationsexperimenten eingesetzt. Das Borrelieninokulum wird entweder zentral über die Deckgläschen in das Kulturmedium pipettiert oder im Zellkulturmedium resuspendiert. Diese Art der Borrelien-Applikation führt zu einem nicht-synchronisierten Absinken der Bakterien auf die Deckgläschen. Die Deckgläschen werden unter Standardbedingungen (37 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt) für die jeweilige Versuchsdauer inkubiert. Nach Ablauf des gewählten Koinkubationszeitraumes werden nicht-adhärenen Borrelien entfernt und die Proben umgehend in 3,7 %iger Formaldehydlösung fixiert. Hierzu werden die Deckgläschen 5-mal in frisches, auf 37 °C erwärmtes Zellkulturmedium getaucht und anschließend für 10 min mit 3,7 %iger Formaldehydlösung überschichtet. Die Deckgläschen werden nach der Fixation mit PBS gewaschen und bei 4 °C in PBS gelagert.

Für die Untersuchung der nicht-zellassozierten Borrelien werden diese nach Ablauf des Koinkubationszeitraumes abpipettiert, die Präparate 3-mal mit 37 °C warmem Zellkulturmedium gespült und die Überstände vereinigt. Die nicht-adhärenen Borrelien werden durch Zentrifugieren der Überstände bei 1000 x g pelletiert und zur weiteren Analyse auf Multitestslides aufgetropft (vgl. 3.7.2).

#### **3.4.3.2 Koinkubationsversuche mit Zellsuspensionen**

Die frisch präparierten bzw. abtrypsinierten Säugerzellen (vgl. 3.3.2, 3.3.5) werden im entsprechenden Zellkulturmedium resuspendiert, mit dem Borrelieninokulum gemischt und die Zellsuspension im Eppendorf Reaktionsgefäß (ERG) bei 37 °C inkubiert. Die ERGs werden hierbei nur bis max.  $\frac{3}{4}$  des Maximalvolumens befüllt, um einen ausreichenden Gasaustausch der Suspension zu gewährleisten. Nach jeweils 10 min wird die Säugerzell/Borrelien-Suspension durch Kippen des ERG vorsichtig gemischt. Nach Ablauf des gewählten Koinkubationszeitraumes werden die Borrelien/Zell-

Suspensionen 3-mal mit 37 °C warmen Zellkulturmedium gewaschen, das Sediment vorsichtig in 3,7 %iger Formaldehydlösung resuspendiert und bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. Die Zellsuspension wird nach der Fixation mit PBS gewaschen und bei 4 °C in PBS gelagert. Für die Untersuchung der nicht-zellassozierten Borrelien werden nach Ablauf der Versuchsdauer die Überstände aus den Waschschrritten mit der gewünschten Borrelienfraktion vereinigt, die Bakterien durch Zentrifugieren bei 1000 x g pelletiert und zur weiteren Analyse auf Multitestslides aufgetropft (vgl. 3.7.2).

### **3.5 Koinkubation verschiedener Zellen und Zelllinien mit Mikrosphären**

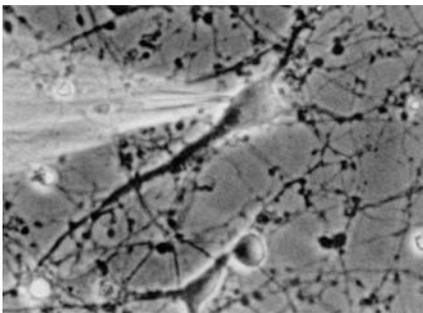
Die Koinkubation von Säugerzellen mit Mikrosphären (=Polystyrol-Beads) erfolgt nach dem bereits unter 3.4.3.1 beschriebenen adhärennten Bedingungen. Die Mikrosphären werden entweder zentral über die Deckgläschen in das Kulturmedium pipettiert oder im Zellkulturmedium resuspendiert. Diese Art der Applikation erlaubt ein nicht-synchronisiertes Absenken der Beads auf die Deckgläschen. Die Mikrosphären werden analog der Methode zur Ermittlung der Borrelienkeimzahl (MvP-Methode, vgl. 3.2.4.1) ausgezählt und durch ggf. Verdünnung mit PBS auf die gewünschte Konzentrationen gebracht. Um den statistischen Fehler beim Einstellen der Mikrosphärenkonzentrationen möglichst gering zu halten, werden die Konzentrationsbestimmungen in 3 Wiederholungen durchgeführt. Die Säugerzellen werden mit der jeweiligen Mikrosphären/Zell-Ratio "infiziert" und bei 37 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt für Versuchsdauern von 15 min bis 18 h (üN) inkubiert. Nach Ablauf des gewählten Koinkubationszeitraumes werden nicht-adhärennte Mikrosphären durch dreimaliges Waschen mit 37 °C warmem Zellkulturmedium entfernt und die Proben umgehend für 10 min in 3,7 %iger Formaldehydlösung fixiert. Die Deckgläschen werden nach der Fixation mit PBS gewaschen und bei 4 °C in PBS gelagert.

### **3.6 Mikroinjektion eukaryoter Zellen**

Die nach 5-7 Tagen Kultur zu Makrophagen gereiften Monozyten werden auf Cellocat Deckgläser (Eppendorf) ausgesät und unter Anwendung eines Transjektors (Eppendorf) und eines computergesteuerten Mikromanipulators (Cell Biology Trading) mikroinjiziert. Die gegen Mikroinjektionspuffer dialysierten Proteine (vgl. 3.10.4) werden unter Verwendung von Femtotips (=Kapillaren mit einer Öffnung von 10<sup>-15</sup> m) in das Zytoplasma der Zelle injiziert. Die Proteinlösungen sollten hierbei eine Maximalkonzentration von 10 µg/µl nicht überschreiten, da die Lösung sonst zu viskös

und die Kanülen verstopft würden. Zur Identifikation injizierter Zellen wird 1/10 Vol. inertes IgG aus Ratte (5 mg/ml) koinjiziert, welches im anschließenden Immunfluoreszenztest mit spezifischen anti-IgG-Fluoreszenzkonjugaten nachgewiesen wird.

Die Zellen werden nach der Injektion 45 min bei Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit) zur phänotypischen Manifestation der mikroinjektionsbedingten Effekte inkubiert und anschließend in Koinkubationsexperimenten mit Borrelien infiziert (3.4.3.1). Abbildung 3.1 illustriert den Vorgang der Mikroinjektion am Beispiel neuronaler Zellen.



**Abbildung 3.1:** Mikroinjektion neuronaler Zellen (Bildquelle: Fa. Eppendorf)

### 3.7 Immunfluoreszenztest (IFT)

Der Immunfluoreszenztest (IFT) ermöglicht den lichtmikroskopischen Nachweis der Expression eines bestimmten Proteins für einzelne Borrelien-Zellen. Die Durchführung des Immunfluoreszenztests erfolgt nach dem in unserem Labor etablierten Standardprotokoll. Für die Anwendung in den Koinkubationsexperimenten von Borrelien mit Säugerzellen (3.4.3) wurde das Protokoll nur in einem Punkt, den Blockingpuffer betreffend, modifiziert: um die unspezifischen Hintergrundreaktivitäten der verwendeten Antiseren (vgl. 2.13.1-2.13.4) mit Säugerzellantigenen zu reduzieren, wird dem Blockingreagenz zusätzlich zu BSA, Humanserum und Ziegen Serum (NGS) zugesetzt. Die primären Antikörperlösungen (monoklonale wie polyklonale) werden jeweils in Verdünnungspuffer angesetzt, die Fluorophor-konjugierten sekundären Antikörper in Konjugatpuffer. Die entsprechenden Verdünnungen sind unter 2.13 angegeben. Um unerwünschte Kreuzreaktionen der Fluorochrom-konjugierten sekundären Antikörper zu vermeiden, setzt die Kombination mehrerer verschiedener primärer Antikörper identischer Herkunft (z.B. Maus) eine gezielte Auswahl der sekundären Antikörper voraus.

Alle Inkubationsschritte mit primären bzw. sekundären Antiseren werden in einer abgedunkelten feuchten Kammer, bzw. in einem ERG durchgeführt. Der schematische Ablauf eines Immunfluoreszenztests lässt sich wie folgt skizzieren:

<b>Inkubation mit</b>	<b>Dauer</b>	<b>Temp.</b>	<b>Wiederholungen</b>
Blocking-Reagenz	15 min	37 °C	1
Verdünnungspuffer	10 min	RT	3
primäre Antikörperlösung	45 min	37 °C	1
Verdünnungspuffer	10 min	RT	3
sekundäre Antikörperlösung	45 min	37 °C	1
IFT-Puffer	10 min	RT	3

Das Protokoll erlaubt neben der spezifischen Markierung von Antigenstrukturen an Luft-, Formalin-, Methanol- und Aceton-fixierten Präparaten auch die Immunfluoreszenzmarkierung lebender, unfixierter Zellen und/oder Borrelien. Entsprechend der Fragestellung werden in dieser Arbeit beide Methoden (IFT an fixierten bzw. nicht-fixierten Präparaten) getrennt oder in Kombination angewandt. Hierbei gilt es vor allem, die Lokalisation der nachzuweisenden Antigenstruktur auf der Zelloberfläche oder im Zellinneren (gilt für Säugerzellen ebenso wie für Borrelien) zu beachten. Entsprechend der Fragestellung wurden nicht-permeabilisierende (Formalin und Luft) und permeabilisierende (Aceton und Methanol) Fixationsmethoden gewählt. Im Folgenden sind die Zusammensetzungen der wichtigsten Puffer und Lösungen für einen Standard-IFT aufgeführt:

	<b>IFT-Puffer</b>	<b>Verdünnungs-puffer</b>	<b>Konjugat-puffer</b>	<b>Blocking-Reagenz</b>	<b>Eindeck-medium</b>
NaCl	300 mM	300 mM	300 mM	300 mM	300 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	-	20 mM	-	-
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	30 mM	30 mM	-	30 mM	30 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 mM	5 mM	10 mM	5 mM	5 mM
BSA	-	0,1 %	-	0,1 %	-
HS	-	-	-	5 %	-
NGS	-	-	-	5 %	-
Glycerin	-	-	-	-	90 % (v/v)
Dabco	-	-	-	-	100 mM

### 3.7.1 IFT an lebenden Borrelien

Die Borrelien werden aus *log*-Phase Kulturen abzentrifugiert (20 min bei 1000 x *g*) und mit den entsprechenden IFT-Komponenten inkubiert (vgl. 3.7). Alle Inkubations- und Waschschriffe erfolgen in Eppendorf-Reaktionsgefäßen (ERG). Anschließend wird die fluoreszenzmarkierte Borreliensuspension auf Objektträger (z.B. Multitest-Slides; 13 µl pro Well) pipettiert. Die Präparate werden wahlweise sofort mit einem Deckglas bedeckt und analysiert oder für eine dauerhafte Konservierung über Nacht im Dunkeln getrocknet, mit Eindeckmedium und einem Deckglas bedeckt und mit Nagellack versiegelt. Die Präparate werden bei 4 °C gelagert und bei einer Anregungswellenlänge, dem jeweiligen Fluoreszenzkonjugat entsprechend (siehe 3.7.6), im konventionellen bzw. konfokalen Laser Scanning Fluoreszenzmikroskop analysiert.

### 3.7.2 IFT an Luft- bzw. Methanol-fixierten Borrelien

*Log*-Phase Borrelien werden abzentrifugiert (20 min bei 1000 x *g*) und 3-mal mit Waschpuffer gewaschen.

#### Waschpuffer für Borrelienkulturen

NaCl	300 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	30 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM

Die Pufferzusammensetzung (pH 7,4) gewährleistet die Permeabilisierung der schleimartigen Schutzhülle, die den Protoplasmazyylinder der Borrelie umgibt. Somit werden oberflächenexponierte Strukturen dem spezifischen Antiserum zugänglich.

Im Anschluss an die Waschschriffe wird die Bakteriensuspension auf Objektträger (Multitest-Slides) pipettiert und über Nacht getrocknet. Die Objektträger werden für 15 min bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  in Methanol fixiert, getrocknet und anschließend nach dem unter 3.7 beschriebenen Inkubationsschema fluoreszenzmarkiert. Dem vorletzten Waschschriff wird 1/5000 Vol. DAPI (4', 6-Diamidino-2-phenylindol; Stocklösung 1 mg/ml, gelöst in Aq. dest. mit einigen Tropfen Methanol), ein DNA-interkalierender, bei entsprechender Anregungswellenlänge (340 nm) blau fluoreszierender Farbstoff, zugesetzt. Auf diese Weise können auch diejenigen Spirochäten quantitativ erfasst werden, die mit keinem der verwendeten Antiseren darstellbar sind. Abschließend werden die Präparate mit Eindeckmedium und einem Deckglas bedeckt und mit Nagellack versiegelt. Die Präparate werden bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Analyse der Präparate erfolgt bei einer Anregungswellenlänge dem jeweiligen Fluoreszenzkonjugat entsprechend (siehe 3.7.6) im konventionellen bzw. konfokalen Laser Scanning Fluoreszenzmikroskop.

### **3.7.3 IFT an fixierten Koninkubationspräparaten mit Borrelien**

Nach Fixation der Koninkubationspräparate (Borrelien/Säugerzell-Suspensionen bzw. adhärenfe Ansätze auf Deckgläschen) mit 3,7 %iger Formaldehydlösung werden die Präparate für 15 min mit Aceton bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Aceton gewährleistet eine vollständige, durch die Anwendung auf Eis zusätzlich schonende, Permeabilisierung der Zellwände und macht intrazelluläre Strukturen dem spezifischen Antiserum zugänglich. Dies kann alternativ mit Methanol erzielt werden. Umfasst der Immunfluoreszenztest jedoch zusätzlich eine Markierung von F-Aktin mit Fluorochrom-konjugiertem Phalloidin, ist die Anwendung von Aceton der von Methanol vorzuziehen. Methanol baut polymere Aktinstrukturen, bezeichnet als F-Aktinfasern, zu G-Aktin Monomeren ab, wodurch das Interkalieren des Pilzgiftes Phalloidin nicht mehr möglich ist und somit das Aktinzytoskelett der Säugerzelle nicht mehr dargestellt werden kann. Unter Anwendung des unter 3.7 beschriebenen IFT-Protokolls werden gemäß der jeweiligen Fragestellung im IFT verschiedenste primäre und sekundäre Antikörper miteinander kombiniert. Um nach Abschluss der Fluoreszenzmarkierung das Ausbleichen des Fluorochroms zu reduzieren, werden die Deckglaskulturen schließlich mit einem Tropfen Eindeckmedium auf einen Objektträger montiert und mit Nagellack versiegelt.

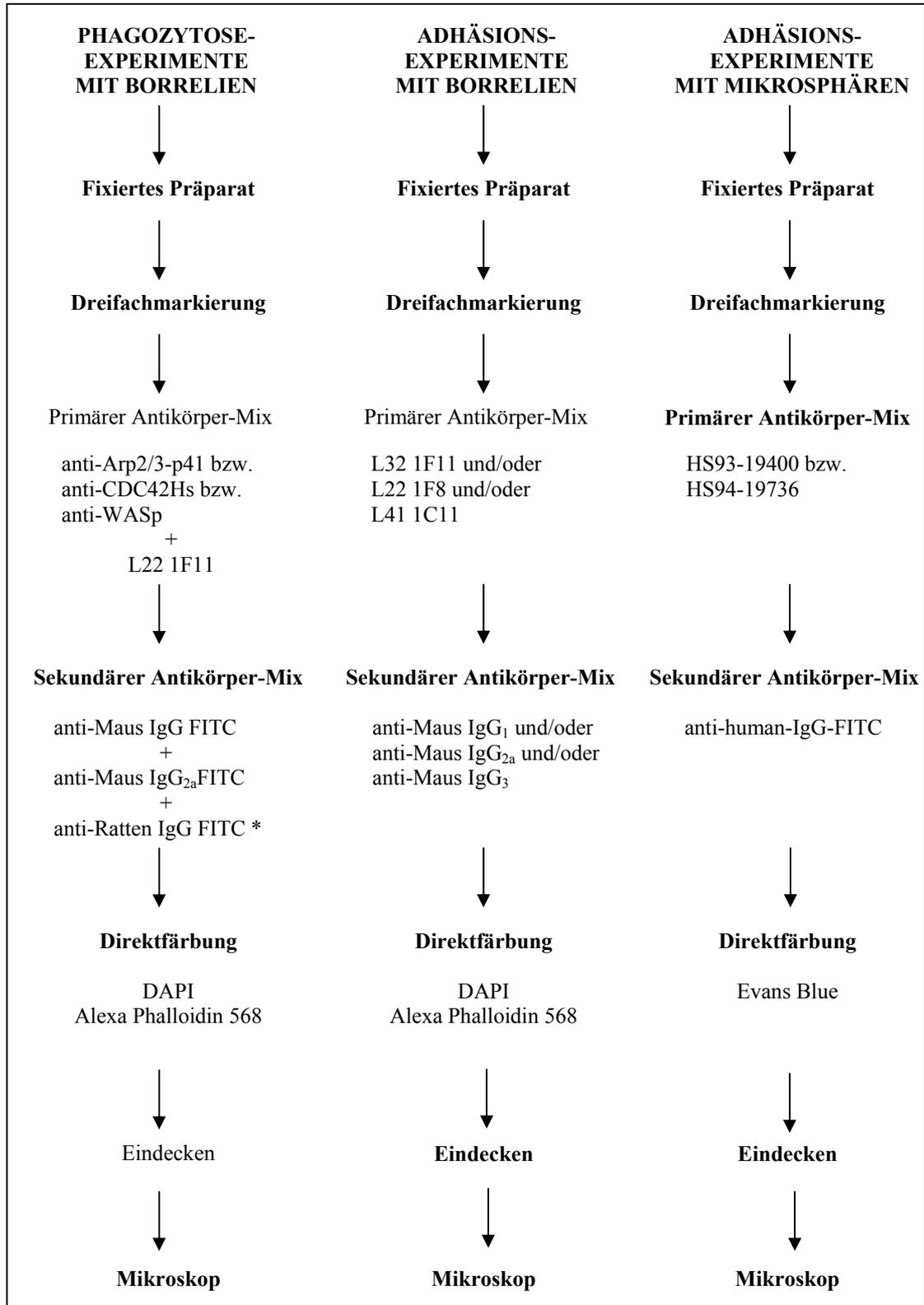
Die Präparate werden bei 4 °C gelagert. Die Analyse der Präparate erfolgt bei einer Anregungswellenlänge dem jeweiligen Fluoreszenzkonjugat entsprechend (siehe 3.7.6) im konventionellen bzw. konfokalen Laser Scanning Fluoreszenzmikroskop.

#### **3.7.4 IFT an fixierten Koinkubationspräparaten mit Mikrosphären**

Mikrosphären/Säugerzellen-Koinkubationspräparate (vgl. 3.5) werden nicht mit permeabilisierenden Substanzen wie Aceton oder Methanol fixiert, da beide Reagenzien die Autofluoreszenz der Beads sehr stark mindern. Für die Darstellung borrelienspezifischer Antigene, die an die Mikrosphären konjugiert wurden (vgl. 3.10.11), werden die Präparate nach dem Standard-IFT-Schema (vgl. 3.7) mit zuvor anhand von Western Blot Analysen ausgewählten Humanseren (vgl. 2.13.4) und dem korrespondierenden anti-human-IgG-Konjugat markiert. Wird hingegen die Anzahl der Mikrosphären auf dem Koinkubationspräparat relativ zur Säugerzellzahl bestimmt, werden keinerlei spezifische Antikörpermarkierungen vorgenommen. Die Quantifizierung der Mikrosphären erfolgt in diesem Fall über deren Autofluoreszenz. Alternativ zur F-Aktinfärbung mit Fluorochrom-konjugiertem Phalloidin werden bei allen Präparaten die Säugerzellen mit 1/5000 Vol. des Diazofarbstoffes Evans Blue (Stocklösung 0,5 % in Aq. dest.) visualisiert. Die Präparate werden abschließend zum Schutz vor Ausbleichen mit einem Tropfen Eindeckmedium auf einen Objektträger montiert, mit Nagellack versiegelt und bei einer Anregungswellenlänge dem jeweiligen Fluoreszenzkonjugat entsprechend im konventionellen oder konfokalen Laser Scanning Fluoreszenzmikroskop analysiert.

### 3.7.5 Überblick über die angewandten Mehrfachimmunfluoreszenzmarkierungen

Die im Rahmen dieser Arbeit angewandten Versuchsanordnungen, deren chronologischer Ablauf und die verwendeten IFT-Komponenten sind im folgenden schematisch skizziert.



\* Der primäre Antikörper wurde als Kontrollagens mikroinjiziert, siehe 3.6

### 3.7.6 Analyse von Immunfluoreszenzpräparaten

Qualitative Analysen von Deckglaskulturen, koinkubiert mit Borrelien oder Mikrosphären, erfolgt hauptsächlich unter Anwendung konfokaler Laser Scanning Mikroskopie (Leica DM IRB Konfokalmikroskop) bei 630-facher Vergrößerung. In Tabelle 3.2 sind die Anregungswellenlängen der verwendeten Fluorophore aufgeführt.

**Tabelle 3.2:** Übersicht über die verwendeten Fluorophore und die entsprechenden Anregungswellenlängen

Fluorophor	Anregungswellenlänge
FluoSpheres®	340 nm
DAPI	340 nm
FITC	490 nm
R-Phycoerytherin	545 nm
Cy3	546 nm
Alexa Phalloidin 568	578 nm

Quantitative Untersuchungen werden ausschließlich mit dem konventionellen Immunfluoreszenzmikroskop (Leica DM IRB) unter standardisierten Bedingungen (bezogen auf Mikroskop, Objektive, Okulare und Fluoreszenzfilter) durchgeführt. Hierzu werden alle Zellen und Borrelien bzw. Mikrosphären in einem Objektfeld bei Fluoreszenzanregung ausgezählt und gemäß der jeweiligen Fragestellung verschiedene Relationen, wie z.B.

- Anzahl F-Aktin-reicher Strukturen pro mikroinjizierter Zelle
- Anzahl adhärenter Borrelien pro Zelle
- Verhältnis der Anzahl markierter Borrelien zur Anzahl unmarkierter Borrelien

bestimmt.

In den Koinkubationsexperimenten wurden pro Versuchsansatz eine fixe Anzahl an Objektfeldern oder an Zellen ausgezählt. Mindestens wurden jedoch 100 Zellen pro Versuchsansatz analysiert. Um einheitliches Untersuchungsmaterial zu gewährleisten, wurden Zellkulturen aus bestimmten Passagennummer ausgewählt (2-5). Im Falle der Mikroinjektionsexperimente stammten die primären Makrophagen von mindestens drei verschiedenen Blutspendern, während bei den Adhäsionsexperimenten mit HUVECs

mindestens 6 verschiedene Nabelschnurpräparationen verwendet wurden. Bei den Untersuchungen an Peritonealmakrophagen der Maus stammten alle Tiere aus einer Zucht. Jeder Versuch wurde in Doppel-, meist in Tripelansätzen, ausgeführt und mindestens 3-mal wiederholt, um die Reproduzierbarkeit sicherzustellen. Zu Dokumentationszwecken werden aus allen experimentellen Ansätzen Bildausschnitte mit den entsprechenden digitalen Medien (vgl. 2.17 und 2.18) aufgenommen und als Datei im JPG- oder TIF-Format im Computer gespeichert.

### 3.7.7 Digitale Bearbeitung von Immunfluoreszenzaufnahmen

Die aufgenommenen Fluoreszenzbilder (vgl. 3.7.6) werden zur Dokumentation mit verschiedenen Bildverarbeitungsprogrammen (Adobe Photoshop 6,0; Corel Photo Paint 8,0 und Imaging Program) aufbereitet. Unter Anwendung des bildverarbeitenden Computerprogramms Scion Image (NIH Software Paket) werden die horizontalen Schnittbildserien, die bei der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie generiert werden, arrangiert und anschließend virtuelle "z"-Schnitte durch digitale Bearbeitung von "xy"-Bildstapeln erzeugt.

Mittels entsprechender Software werden hierbei die Bildstapel senkrecht zur Scann-Ebene (x- und y-Achse) entlang der z-Achse geschnitten (vgl. Abbildung 3.2).

Virtuelle erzeugte Längs- und Transversalschnitte senkrecht durch die horizontalen Bildstapel ermöglichen eine optimale optische Auflösung der dargestellten Strukturen. Diese Technik ermöglicht Seitenansichten der aufgenommenen Strukturen und vermittelt somit eine plastische Vorstellung der räumlichen Verhältnisse innerhalb des Präparates.



**Abbildung 3.2:** Schematische Darstellung zum Verlauf der verschiedenen Schnittebenen durch die Fluoreszenzpräparate.

### 3.7.8 Statistische Auswertung

Alle Koinkubationsexperimente werden in Doppel-, meist in Tripelansätzen ausgeführt und mindestens 3-mal wiederholt, um die Reproduzierbarkeit der Versuche sicherzustellen. Die statistische Auswertung der Daten erfolgt mit dem Tabellenkalkulations-Programm EXCEL und dem Statistikprogramm Epi Info, Version 6 (DEAN et al., 1995). Die Daten werden als arithmetische Mittelwerte mit der Standardabweichung (SD) des Mittelwertes dargestellt. Signifikanzen werden, wie angegeben, gemäß der jeweiligen Fragestellung unter Anwendung des zweiseitigen Student's t-, Fisher's Exakt- bzw. des  $\chi^2$ -Tests berechnet. Die Nullhypothese wird jeweils auf dem 5 % - Niveau ( $p < 0,05$ ) abgelehnt. Im Falle der Mikroinjektionsexperimente wird das arithmetische Mittel und die Standardabweichung in Relation zur GST Kontrolle berechnet.

## 3.8 Durchflusszytometrie

### 3.8.1 Grundlagen

Die Durchflusszytometrie ist eine Technik, bei der zahlreiche Partikel, hauptsächlich Zellen, innerhalb kurzer Zeit im Durchflussverfahren multiparametrisch gemessen und anschließend analysiert werden können. Kernstück dieser Technik ist das Durchflusszytometer, das durch mechanische, optische und elektronische Komponenten Mikroflow- und -meßtechnik in sich vereinigt. Insgesamt können 5 verschiedene Parameter detektiert werden: Vorwärtsstreulicht (*forward light scatter*, FSC) als Maß für die Größe des Partikels, Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) als Maß für die Granularität, sowie bis zu 3 verschiedene Fluoreszenzbereiche (FL1-FL3) als Maß für die markierten Eigenschaften.

Werden gleichzeitig 2 bzw. 3 Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt und gemessen, muss berücksichtigt werden, dass sich die Emissionsspektren der Fluorochrome teilweise überlappen, d.h. dass z.B. der Farbstoff FITC, der im Bereich für Fluoreszenz 1 gemessen wird, auch in den Nachbarmessbereich für Fluoreszenz 2 hineinstrahlt und dort das Messsignal beeinträchtigt. Dies muss bei der Mehrfarbenmessung elektronisch "kompensiert" werden, d.h. bei jedem Messsignal wird der Intensitätsanteil aus den Nachbarkanälen abgezogen.

Die Größe durchflusszytometrisch messbarer Partikel reicht von  $0,5\mu\text{m}$  (z.B. Bakterien) bis ca.  $100\mu\text{m}$  (große eukaryotische Zellen). Grundvoraussetzung für die

Durchflusszytometrie ist, dass die zu analysierenden Partikel bzw. Zellen als Einzelpartikelsuspension vorliegen.

### 3.8.2 Durchführung

Im Rahmen dieser Arbeit wird die Durchflusszytometrie zur Spezifizierung muriner Peritonealmakrophagen und als mögliche Methode zur Quantifizierung adhärierender Borrelien an Säugerzellen verwendet. Zur Spezifizierung der murinen Peritonealmakrophagen wird das Membranprotein CD18 mit einem entsprechenden Fluorochrom-konjugierten anti-CD18-Antikörper (2.13.6) markiert und der prozentuale Anteil CD18-positiver Makrophagen im Durchflusszytometer ermittelt. Für die Kontrollmessungen (Hintergrund) wird ein adäquat konjugierter Antikörper gegen Ovalbumin benutzt. Die Markierung der Makrophagen erfolgt wie unter 3.7.3 beschrieben. Für die Quantifizierung adhärierender Borrelien an die Peritonealmakrophagen werden, wie unter 3.4.3 beschrieben, Koinkubationsexperimente mit anschließender indirekter Immunfluoreszenz-Markierung im suspensorischen Ansatz durchgeführt. Hierbei wird ein entsprechender FITC konjugierter anti-IgG-Antikörper verwendet. Die durchflusszytometrischen Messungen werden mit dem Gerät EPICS<sup>®</sup> XL-MCL der Firma Coulter durchgeführt. Die gewählte Anregungswellenlänge für das Fluorochrom FITC beträgt 490 nm.

## 3.9 Molekularbiologische Methoden

### 3.9.1 Horizontale Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

Die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgt durch Agarosegel-Elektrophorese unter Anwendung des Standardprotokolls nach SAMBROOK et al. (1989). Die verwendeten Puffer setzen sich wie folgt zusammen:

#### TAE-Elektrophoresepuffer

---

Tris-OH/HCl pH 8,0	40 mM
EDTA	1 mM

**Probenauftragspuffer**

---

Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
Xylencyanol FF	0,25 % (w/v)
Glycerin	30 % (w/v)
Na <sub>2</sub> EDTA	20 mM

Entsprechend der jeweiligen Geräteapplikation werden die DNA-Fragmente bei 60 bis max. 200 Volt ca. 1 h aufgetrennt, das Gel in einem Ethidiumbromid-Bad (Endkonzentration 0,5-10 µg/ml) angefärbt, kurz mit Wasser gespült und unter UV-Licht (354 nm) photographiert. Die Längen der DNA-Fragmente werden im Vergleich zu DNA-Längenstandards bestimmt.

**3.9.2 Isolierung von DNA aus Agarosegelen**

Entsprechende DNA-Banden werden unter UV-Kontrolle (354 nm) mit Hilfe eines Skalpells aus dem Gel ausgeschnitten und in ein ERG überführt. Die Agarose-Stücke werden in Puffer aufgenommen, bei 50 °C aufgeschmolzen und mit PCR-Purification Kit (Roche) nach Angaben des Herstellers isoliert.

**3.9.3 Reinigung und Konzentration von DNA**

Reinigung bzw. Konzentration von DNA erfolgt mittels Ethanolfällung in ERGs. Die DNA-Suspension wird mit 1/10 Vol. 3 M NaAc (pH 5,2) gemischt, anschließend 2,5 Vol. EtOH (96 %) oder wahlweise 0,7 Vol. Isopropylalkohol (96 %) zugegeben und 20 min bei 10000 x g zentrifugiert. Das Pellet wird mit 70 %igem EtOH gewaschen und im Heizblock bei 50 °C getrocknet. Die gereinigte DNA wird in einem geeigneten Volumen Aq. dest. resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

**3.9.4 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA**

Die zu untersuchende Probe wird 1:100 mit Aq. dest. verdünnt und in Quarzküvetten im Spektralphotometer gemessen bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260$  nm. Die Konzentration der Nukleinsäuren wird unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors wie folgt berechnet: bei doppelsträngiger DNA entspricht 1 OD<sub>260nm</sub> 50 µg/ml, bei RNA 40 µg/ml und bei Oligonukleotiden 33 µg/ml. Durch Messung der Absorption bei 280 nm wird die Reinheit der Probe kontrolliert. Ein Quotient von 1,8-2,0 aus OD<sub>260nm</sub>/OD<sub>280nm</sub> entspricht einer weitgehend proteinfreien DNA-Suspension.

### 3.9.5 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Alle analytischen und präparativen Spaltungen von DNA durch Restriktionsendonukleasen werden nach den vom Hersteller empfohlenen Vorschriften und unter Verwendung der mitgelieferten Puffersysteme durchgeführt. Es werden vorwiegend die Restriktionsendonukleasen *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, *PstI* verwendet. Die Zusammensetzung der Puffer und die Spaltungsspezifitäten der Enzyme ist den jeweiligen Produktbeschreibungen zu entnehmen.

Eine Restriktionsanalyse setzte sich wie folgt zusammen:

	analytisch	präparativ
DNA	0,5-2 µg	5-30 µg
10 x Reaktionspuffer	2 µl	5 µl
Restriktionsenzym	1-5 U	3-10 U
RNase A	1 U	1 U
Aq. dest.	ad 20 µl	ad 50 µl

Die Restriktionsansätze werden im analytischen Maßstab für 2 h, im präparativen für 15 h beim jeweiligen Temperaturoptimum (meist 37 °C) inkubiert. Eine Kontrolle auf vollständige Spaltung erfolgt durch Agarosegel-Elektrophorese (3.9.1).

### 3.9.6 Präparation und Reinigung von chromosomaler DNA aus Borrelien

Die Präparation von genomischer *B. burgdorferi* sensu lato DNA, z.B. für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), wird unter Verwendung des High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die in Aq. dest. gelösten Proben werden bei -20 °C gelagert. Für die PCR werden jeweils 5 µl eingesetzt.

### 3.9.7 Analytische Plasmidisolierung aus *E. coli*

Die Schnellpräparation von Plasmid-DNA wird nach DEL SAL et al. (1988) modifiziert durchgeführt. Hierzu werden 2 ml einer Übernachtskultur von transformierten *E. coli* Zellen (vgl. 3.9.11.3) bei 10000 x g in einem ERG pelletiert und in 500 µl STET-Puffer resuspendiert.

**STET-Puffer**

---

Saccharose	8	% (w/v)
Triton X-100	0,1	% (w/v)
Na <sub>2</sub> EDTA	50	mM
Tris-OH/HCl, pH 8,0	50	mM

Nach Zugabe von 10 µl Lysozym (Stocklösung 20 mg/ml in Tris-OH/HCl, pH 8,0) wird die Suspension 5 min bei RT inkubiert, anschließend für 80 s auf 100 °C erhitzt und bei 10000 x g für 10 min abzentrifugiert. Der gallertartige Pfropfen aus chromosomaler DNA und bakteriellen Zelltrümmern wird entfernt, die Plasmid-DNA mit Isopropylalkohol gefällt und anschließend mit 70 %igem EtOH gewaschen. Das Pellet wird im Heizblock bei 50 °C getrocknet, in 50 µl Aq. dest. gelöst. Für eine Restriktionsanalyse werden 20 µl eingesetzt.

**3.9.8 Präparative Plasmidisolierung aus *E. coli***

Bei der alkalischen Lysemethode nach BIRNBOIM UND DOLY (1979) liegt die chromosomale DNA unter alkalischen Bedingungen denaturiert vor, während die Plasmid-DNA stabil bleibt.

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgt mit Hilfe des Plasmid Mini- (5 ml Kultur) bzw. Midi-Kits (25 ml Kultur) nach Angaben des Herstellers (Qiagen).

**3.9.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist die selektive *in vitro*-Amplifikation einer DNA-Sequenz zwischen zwei bekannten Primersequenzen in einem zyklischen Reaktionsablauf. Die gewünschte Sequenz wird dabei exponentiell vervielfacht. Das Prinzip besteht in der Wiederholung eines zyklischen Reaktionsablaufs, dessen einzelne Reaktionsschritte bei genau definierten Temperaturen durchgeführt werden. Diese Methode wurde von MULLIS (1986) erstmals beschrieben und von SAIKI (1988) weiterentwickelt. Die DNA-Amplifikation gliedert sich in drei Phasen: Zuerst wird die zu amplifizierende doppelsträngige DNA denaturiert. An die nun vorliegende Einzelstrang-DNA lagern sich unter bestimmten Reaktionsbedingungen die die Zielsequenz am 5'- und am 3'-Ende flankierenden, spezifischen Oligonukleotidsonden (Primer), an (Annealing). Im nächsten Reaktionsschritt werden die Primer an ihren 3'-Enden von einer thermostabilen Polymerase komplementär zur Matrix verlängert

(Elongation). Die Verwendung der hitzestabilen DNA Polymerase (z.B. *Taq*: isoliert aus *Thermophilus aquaticus*, einem thermophilen Archaeobakterium) erlaubt eine Automation dieses zyklischen Prozesses. Die Reaktionsschritte Denaturierung, Annealing und Elongation werden nun ca. 30-mal wiederholt. Die jeweilige Nukleinsäuresequenz wird dabei exponentiell vervielfältigt, da jeder von der Polymerase neu synthetisierte Nukleinsäurestrang in der folgenden Reaktion als Matrix dient. Durch entsprechendes Primerdesign ist die Integration von Restriktionsschnittstellen in das zu amplifizierende Fragment möglich. Bei der Auswahl der Oligonukleotid-Primer ist zu beachten, dass diese möglichst 50 % GC enthalten und nicht durch längere komplementäre Abschnitte miteinander hybridisieren können.

### 3.9.9.1 Amplifikationsreaktion

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind unter 2.10 aufgeführt.

Ein Amplifikationsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

DNA-Matrize	2-10 ng
dNTP-Mix	250 $\mu$ M
forward-Primer	1 $\mu$ M
reverse-Primer	1 $\mu$ M
10x <i>Taq</i> -Puffer	10 % (v/v)
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	0,5-2,5 U
Aq. dest.	ad 20-100 $\mu$ l

Die Negativkontrollen werden mit Aq. dest. anstelle von DNA-Matrize pipettiert. Die Amplifikation wird in einem Thermocycler (Applied Biosystems) mit 30-40 Zyklen durchgeführt. Der schematische Aufbau des verwendeten PCR-Programms lautet wie folgt:

Reaktion	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	94 °C	5 min	1
Denaturierung	95 °C	60 s	} 25-30
Annealing	T <sub>m</sub>	45 s	
Elongation	72 °C	60-90 s	
Auffüllen	72 °C	7 min	1
Lagerung	4 °C	∞	

Die gewählten Annealing-Temperaturen werden von den Schmelztemperaturen T<sub>m</sub> der verwendeten Primer abgeleitet. Die Dauer der Elongation ist abhängig von der Größe der zu amplifizierende Fragmente (Regel: 1 kb ≈ 60 s). Zur vollständigen Polymerisation aller Amplifikate wird der Reaktionsansatz nach Ablauf der Zyklenzahl für 7 min bei 72 °C inkubiert und anschließend auf 4 °C abgekühlt. 5-10 µl Aliquots der PCR-Ansätze werden auf ein Agarosegel (3.9.1) aufgetragen und auf spezifische Amplifikate hin analysiert.

### 3.9.9.2 Kontaminationskontrolle

Da es sich bei der PCR um eine sehr sensitive Methode handelt und die Minimierung der Kontaminationsgefahr ein wichtiges Kriterium darstellt, werden die Sicherheitsaspekte nach KWOK und HIGUCHI (1989) beachtet:

DNA-Präparation und PCR-Ansatz werden unter strikter räumlicher Trennung ausgeführt, d.h. der Amplifikationsansatz wird in einem gesonderten Raum mit stationären Pipetten pipettiert. Es werden ausschließlich sterile gestopfte Pipettenspitzen verwendet. Einmalhandschuhe werden stets zwischen Präparation und Amplifikation gewechselt. Nach Beendigung der Arbeiten mit DNA-Suspensionen werden die Arbeitsplätze für einige Stunden unter UV-Licht-Bestrahlung dekontaminiert.

### 3.9.10 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgt nach der Kettenabbruchmethode (SANGER et al., 1977) unter Verwendung des BigDye-Terminationsmixes (Perkin Elmer). Mit dieser Methode ist mit geringen DNA-Mengen (1 µg ds DNA) und jedem unmarkierten Primer im Thermocycler eine Sequenzierung durchführbar. Die DNA-Fragmente werden hierbei

durch fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide (Dye-Terminatoren) markiert. Die Auftrennung und Auswertung der Sequenzierreaktionen erfolgt mit einem DNA-Sequenzer (Applied Biosystems). Die zur Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide sind unter 2.10 aufgeführt.

Eine Sequenzierreaktion setzt sich wie folgt zusammen:

	<b>PCR-Produkt</b>	<b>Plasmid-DNA</b>
DNA	100 ng	200-500 ng
Dye-Terminatoren-Mix	50 $\mu$ M	50 $\mu$ M
Primer	250 nM	250 nM
Aq. dest.	ad 20 $\mu$ l	ad 20 $\mu$ l

In einem Thermocycler (Applied Biosystems) werden die Proben wie folgt amplifiziert:

<b>Reaktion</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>	<b>Zyklen</b>
Denaturierung	94 °C	5 min	1
Denaturierung	96 °C	10 s	} 25
Annealing	T <sub>m</sub>	45 s	
Elongation	60 °C	4 min	
Lagerung	4 °C	$\infty$	

Nach 25 Zyklen werden die Proben auf 4 °C abgekühlt. Die Sequenzierreaktionen werden durch eine EtOH-Fällung gereinigt (3.9.3). Die weitere Aufbereitung der Proben für die Auftrennung der fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente im DNA-Sequenzer erfolgt nach dem Standardprotokoll des Herstellers (Applied Biosystems). Die Auswertung der DNA-Sequenzen wird mit den Seq-Ed und Analysis Programmen (373A DNA-Sequenzer Software), sowie dem GCG-Sequenzanalyse Softwarepaket (Version 6.1 und 7.0) (DEVEREUX et al., 1984) und dem DNA-Man Softwarepaket durchgeführt. Um Sequenzierfehler auszuschließen, werden die Analysen ein- bis zweimal wiederholt.

Die Nukleotid- und Proteinvergleiche erfolgen in den BLAST-Datensuchprogramm (ALTSCHUL et al., 1990) innerhalb der NCBI-Datenbank (BLAST und EMBL).

Engpässe in der hauseigenen Sequenzierabteilung werden durch Auftragssequenzierung durch die Firma AGOWA in Berlin kompensiert.

### **3.9.11 Methoden der DNA-Klonierung**

#### **3.9.11.1 Dephosphorylierung von linearisierter Vektor-DNA**

Um bei der DNA-Ligation die Religation von geschnittenen Vektorfragmenten (vgl. 3.9.5) zu vermeiden, werden mit Hilfe alkalischer Phosphatase ("calf intestine phosphatase"; CIP) nach dem Standardprotokoll des Herstellers die 5'-Phosphatgruppen der linearisierten Vektor-DNA entfernt. Hierzu werden 5-10 pmol linearisierte Vektor-DNA mit 1 U Enzym bei 37 °C für 15 min inkubiert. Die dephosphorylierte und linearisierte Vektor-DNA wird anschließend über ein Agarosegel gereinigt und die DNA-Konzentration bestimmt (vgl. 3.9.2, 3.9.4).

#### **3.9.11.2 Ligation**

Die Ligation wird durch die T4-Ligase katalysiert, die unter ATP-Verbrauch die 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppen der kompatiblen Enden von Vektor und Insert zu einer Phosphodiesterbindung verknüpft.

##### **3.9.11.2.1 Klonierung von PCR-Amplifikaten in den Vektor pCRII<sup>®</sup>**

PCR-Produkte können direkt nach der Amplifikationsreaktion mit Vektoren des TA-Cloning<sup>®</sup> Kits (z.B. pCRII<sup>®</sup>) ligiert werden. Die überhängenden Enden der bereits linearisiert vorliegenden Vektoren dieses Klonierungssystems zeichnen sich durch sogenannte 3'-T-Überhänge aus. Diese T-Überhänge sind kompatibel mit den 3'-A-überhängenden Enden der PCR-Produkte, die bei Amplifikation mit *Taq*-Polymerase entstehen, wobei Template-unabhängig Deoxyadenosine (A) an die 3'-Enden der PCR-Produkte addiert werden. Es handelt sich bei pCRII<sup>®</sup> jedoch nicht um einen Expressionsvektor. Die Synthese großer Mengen rekombinanten Proteins ist mit diesem System daher nicht möglich. Hauptsächlich wird der TA-Cloning<sup>®</sup> Kit zum Sequenzieren von PCR-Produkten und zum Umklonieren in Expressionsvektoren genutzt. Die Ligationen werden nach einem Standardprotokoll des Herstellers (Invitrogen) durchgeführt.

### 3.9.11.2.2 Klonierung von PCR-Amplifikaten in den Vektor pQE-30

Die Klonierung der Fibronectin-bindenden Proteine (rBBK32) von *Borrelia burgdorferi* sensu lato erfolgt unter Anwendung des QIAexpress Expressionssystems (Qiagen). Die jeweiligen Expressionsvektoren kodieren für einen "6x His-affinity tag" (His<sub>6</sub>-tag), der während der Translation je nach Vektor an den N- bzw. C-Terminus des Zielproteins angehängt werden kann. Dieser "His-tag" hat eine besonders hohe Affinität zu Nickel, die wiederum für die Reinigung genutzt wird (vgl. 3.10.4.2). Die Produktspezifitäten des verwendeten Vektors pQE-30 sind den Angaben des Herstellers zu entnehmen. Die Verwendung des Vektors pQE-30 führt zu rekombinanten Proteinen mit N-terminalem His<sub>6</sub>-tag. Für die Ligation werden die entsprechend kompatiblen Vektor- und PCR-Fragmente (vgl. 3.9.5 und 3.9.11.1) in einem Mengenverhältnis von 1:1 eingesetzt, welche aus den jeweiligen molaren Massen errechnet werden.

Ein Ligationsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

---

linearisierte, dephosphorylierte Plasmid-DNA (ca. 3,5 kb)	200 ng
zu klonierendes Fragment DNA (ca. 1 kb)	700 ng
T4-Ligase	1 U
10 x T4-Ligase Puffer	2 µl
Aq. dest.	ad 20 µl

Die Ligationsansätze werden gemäß der Empfehlung des Ligase-Herstellers (Roche) über Nacht bei 10 °C inkubiert. 10 µl eines Ligationsansatzes werden für die nachfolgende Transformation eingesetzt, der Rest bei –20 °C gelagert.

### 3.9.11.3 Transformation von *E. coli* XL1-Blue und SURE<sup>®</sup>

Im Rahmen dieser Arbeit werden die beiden *E. coli* Stämme XL1-Blue und SURE<sup>®</sup> transformiert. Neben der Elektroporation wird die klassische CaCl<sub>2</sub>-Methode nach COHEN et al. (1972) und HANAHAN (1983) durchgeführt.

#### 3.9.11.3.1 Herstellung CaCl<sub>2</sub>-kompetenter *E. coli*-Zellen

2,5 ml einer *E. coli* üN-Kultur werden in 500 ml LB-Medium bei 37 °C mit 225 rpm geschüttelt bis eine OD<sub>578nm</sub> von ca. 0,6 erreicht war. Die Suspension wird bei 4000 x g (5 min, 4 °C) abzentrifugiert, in 50 ml 0,1 M MgCl<sub>2</sub> resuspendiert und 30-45 min auf Eis abgekühlt. Die Bakterien werden anschließend bei 4000 x g (5 min, 4 °C) pelletiert, in 50 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub> resuspendiert und 30-45 min auf Eis abgekühlt. Nach

nochmaligem Zentrifugieren bei 4000 x g (5 min; 4 °C) wird das Pellet in 5 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub> aufgenommen und mindestens 4 h auf Eis gekühlt (optimale Kompetenz nach 4-8 h). Die Zellen werden umgehend für die Transformation eingesetzt oder mit Glycerin (15 % (v/v) Endkonzentration) gemischt und zu je 50 µl bei -70 °C gelagert.

#### **3.9.11.3.2 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen**

Zur Herstellung elektrokompetenter Zellen werden 500 ml LB-Medium mit 2,5 ml einer *E. coli* XL1-Blue- bzw. SURE<sup>®</sup>-üN-Kultur beimpft und bei 37 °C mit 225 rpm geschüttelt bis eine OD<sub>578nm</sub> von ca. 0,6 erreicht war. Die Suspension wird für 10-15 min auf Eis abgekühlt und bei 4000 x g (10 min, 4 °C) abzentrifugiert. Die Zellen werden dreimal mit sterilem Aq. bidest. gewaschen und anschließend in 2 ml 10 % (v/v) Glycerin aufgenommen, zu je 50 µl aliquotiert und direkt zur Elektroporation verwendet beziehungsweise bei -70 °C gelagert.

#### **3.9.11.3.3 Transformation nach der CaCl<sub>2</sub>-Methode**

Im Anschluss an die Ligation werden die Plasmide zur Vermehrung in kompetente Bakterienzellen eingeschleust (Transformation). Die CaCl<sub>2</sub>-kompetenten Zellen werden hierzu mit 10 µl des Ligationsansatzes für 30 min unter gelegentlichem Schütteln auf Eis inkubiert, anschließend für 90 s auf 42 °C erhitzt und für 5 min auf Eis gestellt. Zur phänotypischen Expression werden die Bakterien in 3 ml LB-Medium aufgenommen und für 45 min bei 37 °C, 225 rpm geschüttelt. Die Proben werden anschließend bei 4000 x g abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml frischem LB-Medium resuspendiert. Jeweils 10-400 µl transformierter Zellen werden auf LB-Agar, supplementiert mit Ampicillin (Endkonzentration 200 µg/ml, Stocklösung 50 mg/ml in 70 % EtOH), ausplattiert und bei 37 °C üN inkubiert. Als Negativkontrollen werden kompetente Zellen ohne Vektor-DNA und als Positivkontrollen kompetente Zellen mit 0,1 ng pUC-18-Vektor-DNA transformiert. Die Transformationsrate wird pro µg Kontroll-DNA bestimmt. Zur Identifikation der einzelnen Klone werden Kolonien mit sterilen Zahnstochern auf frische LB<sub>Amp</sub>-Agarplatten (Ampicillin-Konzentration 200 µg/ml) übertragen, die Klone nummeriert und die Agarplatte bei 37 °C üN inkubiert.

#### **3.9.11.3.4 Transformation durch Elektroporation**

Bei der Transformation von *E. coli* durch Elektroporation ist die Effizienz ca. 10- bis 100-fach höher, gemessen an der klassischen  $\text{CaCl}_2$ -Methode. Die Zellmembran wird bei der Elektroporation durch einen elektrischen Impuls permeabilisiert, so dass Fremd-DNA aufgenommen werden kann. 50  $\mu\text{l}$  elektrokompetente Zellen werden hierzu mit 2  $\mu\text{l}$  Ligationsansatz in vorgekühlten Küvetten (2 mm Spaltbreite) gemischt. Die Elektroporation wird mit einem Gene Pulser (BioRad) nach Angaben des Herstellers mit einer Spannung von 2,5 kV, einer Kondensatorkapazität von 25  $\mu\text{F}$  und einem Parallelwiderstand von 200 Ohm durchgeführt. Die Zellen werden danach sofort mit LB-Medium gemischt und für die phänotypischen Expression wie unter 3.9.11.3.3 beschrieben behandelt.

#### **3.9.11.3.5 Transformationskontrolle**

Aufgrund einer Plasmid-kodierten Ampicillin-Resistenz vermehren sich auf Ampicillin-haltigem Nährboden nur transformierte, d.h. Plasmid-tragende Bakterien. Neben den erwünschten Kolonien mit korrekten Plasmiden können aber auch Klone wachsen, die selbstligierte Plasmide oder Plasmide mit falschen Inserts (z.B. Primer-Dimere) enthalten. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgt die Kontrolle der Transformation durch den Nachweis der Insertsequenz in den Transformanten. Hierzu werden nachfolgende Methoden miteinander kombiniert.

##### **3.9.11.3.5.1 "Blau-Weiß"-Selektion**

Die Identifizierung der Kolonien kann z.B. durch sog. "Blau-Weiß"-Selektion erfolgen. Die Integration von pCR<sup>®</sup>II-Vektormolekülen in *E. coli* XL1-Blue oder SURE<sup>®</sup> ermöglicht durch so genannten  $\alpha$ -Komplementation des *lac* Operons die Expression des Enzyms  $\beta$ -Galaktosidase. Die enzymatische Aktivität einer funktionellen  $\beta$ -Galaktosidase wird hierbei über eine Farbreaktion sichtbar gemacht: das chromogene Substrat X-Gal, ein Laktose Analogon, wird von der  $\beta$ -Galaktosidase verstoffwechselt und das Produkt unter Sauerstoff zu einem blauen Indigofarbstoff oxidiert. Die Insertion eines PCR-Produkts in den *lacZ* Genlokus des Vektors unterbricht jedoch die Synthese des Enzyms. Rekombinante (d.h. Insert-tragende) Bakterien sind durch das Fehlen des Enzyms nicht mehr in der Lage, das chromogene Substrat X-Gal zu verstoffwechseln.

Sie bilden daher weiße Kolonien im Gegensatz zu den Insert-losen Bakterien, die blaue Kolonien bilden.

Die transformierten Bakterien werden bei Anwendung der "Blau-Weiß"-Selektion auf LB<sub>Amp</sub>-Agarplatten (Endkonzentration Ampicillin 200 µg/ml), überschichtet mit 17 µl IPTG (Stocklösung 50 mg/ml in Aq. dest.) und 40 µl X-Gal (Stocklösung 20 mg/ml (w/v) in 100 % N, N-Dimethylformamid) ausplattiert und bei 37 °C üN inkubiert. Um die X-Gal-Substratreaktion zu beschleunigen, werden die Platten nach 18 h Kultur für 1 h bei 4 °C inkubiert.

#### **3.9.11.3.5.2 Kolonie-PCR**

Zum Nachweis der Insertsequenzen in den Transformanten werden pro Transformation bis zu 50 Bakterienklone getestet. Hierzu werden Transformanten mit einem sterilen Zahnstocher von der entsprechenden Kulturplatte in PCR-Reaktionsgefäße überführt. In den PCR-Reaktionsgefäßen ist der PCR-Reaktionsmix (vgl. 3.9.9.1; je 20 µl Gesamtvolumen), ausgenommen der *Taq*-Polymerase, bereits vorgelegt. Die Bakteriensuspension wird anschließend einer sog. "Hot-Start-PCR" unterzogen. Dem unter 3.9.9.1 beschriebenen Standard-PCR-Programm wird hierzu ein 10 minütiger 99 °C-Zyklus vorgeschaltet, der den Aufschluss der *E. coli* Zellen bewirkt. Nach dem "Hot-Start" wird die PCR unterbrochen, die *Taq*-Polymerase zu jedem Ansatz pipettiert und das Standard-PCR-Programm fortgesetzt. Um insbesondere bei Verwendung des Vektors pCR<sup>®</sup> II eine "falsche" Orientierung des inserierten DNA-Fragments innerhalb der MCS auszuschließen, werden für die Kolonie-PCR Insert-spezifische Primer mit Vektor-spezifischen kombiniert.

Die PCR-Produkte werden mittels DNA-Agarosegel-Elektrophorese (siehe 3.9.1) aufgetrennt und auf das Vorhandensein und die Fragmentlänge der Insertsequenz hin analysiert. Kolonie-PCR-positive Klone werden kultiviert, die Plasmide isoliert und eine Restriktionsanalyse zur Bestätigung der Resultate durchgeführt (vgl. 3.9.7 und 3.9.5).

#### **3.9.11.3.5.3 Plasmidisolierung und Restriktionsenzymanalyse**

Die Plasmide der ausgewählten Transformanten werden, wie unter 3.9.7 beschrieben, isoliert und zum Nachweis des Inserts einer Restriktionsenzymanalyse unterzogen (vgl. 3.9.5).

#### **3.9.11.3.5.4 Plasmidisolierung und Sequenzanalyse**

Letzte Sicherheit über eine korrekte Klonierung erlaubt nur die Sequenzanalyse der inserierten DNA-Fragmente. Hierzu werden die Plasmide der ausgewählten Transformanten isoliert (vgl. 3.9.7 bzw. 3.9.8) und wie unter 3.9.10 beschrieben einer Sequenzreaktion mit anschließender Auswertung der erhaltenen DNA-Sequenzen unterzogen.

### **3.10 Methoden der Proteinanalytik**

#### **3.10.1 Anzucht und Induktion von *E. coli*-Transformanten**

In den pGEX-2T (GST-*tag*)- und pQE-30- (His<sub>6</sub>-*tag*)-Vektorsystemen wird die Induktion der rekombinanten Gene durch Zugabe des nicht spaltbaren Galaktose-Analogons IPTG erreicht. Entscheidend für die Menge an exprimiertem Protein sind Parameter wie Induktionstemperatur, Induktionsdauer, IPTG-Konzentration und die Wachstumsphase der Bakterien zum Zeitpunkt der Induktion.

Eine üN-Kultur transformierter *E. coli*-Zellen wird 1/100 in LB-Medium, supplementiert mit 200 µg/ml Ampicillin, verdünnt und bei 37 °C mit 225 rpm geschüttelt, bis eine OD<sub>578nm</sub> von ca. 0,6 erreicht ist. Anschließend erfolgt die Induktion durch Zugabe von IPTG (0,2-1 mM Endkonzentration). Um die optimale Induktionstemperatur und -dauer zu bestimmen, wird bei 16 °C, 27 °C bzw. 37 °C für 2, 4, und 18 h (üN) induziert. Das Absenken der Temperatur soll hierbei den proteolytischen Abbau der exprimierten Fremdproteine durch periplasmatische *E. coli*-Proteasen möglichst gering halten. Nach der Induktion werden die Bakterienkulturen bei 10000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Die Überstände werden verworfen und die Sedimente bei -20 °C gelagert. Zur qualitativen Expressionsanalyse werden die Bakterien in kleinem Maßstab, d.h. von 1-10 ml Kulturvolumen (small-scale) kultiviert. Für die quantitativen Analysen sind größere Kulturvolumina zwischen 250 und 1000 ml notwendig. Die Analyse der rekombinanten *E. coli* Proteine erfolgt durch SDS-PAGE (vgl. 3.10.8) und Immunnachweisreaktionen (vgl. 3.10.10).

#### **3.10.2. Expressionsanalyse mit Gesamtproteinextrakten**

In transformierten Klonen sollen rekombinante Proteine, im Gegensatz zu zelleigenen Proteinen, im Überschuss erzeugt werden. Daher lässt sich die Expression anhand von Gesamtproteinextrakten feststellen. Die Auftrennung der Extrakte mittels SDS-PAGE gibt Aufschluss darüber, ob z.B. die Größe des rekombinanten Proteins im Bereich des

theoretisch zu erwartenden Molekulargewichts liegt. Von induzierten Kulturen wird je 1 ml Probe entnommen und in ein ERG überführt. Als Kontrolle wird eine nicht-induzierte Kultur mitgeführt. Die Proben werden bei 10000 x g für 30 sec zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Die Zellen werden in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert und mit 100 µl SDS-PAGE Puffer gemischt und für 5 min bei 100 °C aufgeköcht. Anschließend wurden sie in einer SDS-PAGE analysiert (vgl. 3.10.6) oder bei -20 °C gelagert.

### 3.10.3 Zellaufschluss im präparativen Maßstab

Für die präparative Reinigung der rekombinanten Proteine nach der Expression im *E. coli*-System müssen nach der Induktion die Bakterien aufgeschlossen werden, um das produzierte Protein freizusetzen. Hierzu wird 1 Liter induzierte *E. coli* Kultur durch 20 min Zentrifugation bei 12000 x g und 4 °C pelletiert. Für den Zellaufschluss wird das Bakteriensediment auf Eis in 25 ml des entsprechenden Lysepuffers unter Zusatz von 4 mM PMSF und 5-10 µl Benzonase resuspendiert. Die Suspension wird zwei- bis dreimal in der Durchfluss-French-Press bei 16000 psi aufgeschlossen, das Rohlysat 60 min bei 12000 x g und 4 °C zentrifugiert und anschließend das Zelldebris entfernt. Das bakterielle Lysat wird filtriert (0,45 µm), auf Eis gekühlt und umgehend dem Reinigungsprozess unterzogen.

	Lysepuffer His <sub>6</sub> -tag pH 7,0-7,5	Lysepuffer GST-tag pH 7,0-7,5
Na-Phosphat*	40 mM	-
Tris-OH/HCl	-	50 mM
NaCl	500 mM	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	-	5 mM
Urea	2 M	-
Glycerin	10 % (w/v)	-
Triton X-100	0,1 % (w/v)	-

\* Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

### 3.10.4 Methoden der Proteinreinigung

#### 3.10.4.1 Reinigung mit Glutathion Sepharose<sup>®</sup> Beads

Dem Ausgangsmaterial für die Reinigung der Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteine, filtriertes Zelllysate (vgl. 3.10.3), werden 5 ml äquilibrierte Glutathion Sepharose<sup>®</sup> Beads (60 min in Puffer A auf Eis) zugesetzt und für 60 min (wahlweise üN) auf Eis inkubiert (= Bindung der GST-Fusionsproteine an die Beads). Die Suspension wird für 10 min bei 800 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die pelletierten Beads zweimal mit Puffer A und einmal mit Puffer B und C gewaschen (800 x g, RT). Eine anschließende Thrombin-Spaltung, zur Eliminierung des GST-tags ist optional. Für die Spaltung werden die mit Protein beladenen Glutathion Sepharose<sup>®</sup> Beads in Puffer C üN bei 4 °C mit Thrombin (1000 U/1,25 l induzierter *E. coli* Kultur) inkubiert und der Überstand (= Fraktion mit Zielprotein) abpipettiert. Die Glutathion Sepharose<sup>®</sup> Beads werden anschließend dreimal mit Puffer A gewaschen (800 x g, RT). Die Zielprotein-haltigen Fraktionen werden vereinigt, das Thrombin mit Hilfe von Benzamidin Sepharose<sup>®</sup> Beads nach Angaben des Herstellers aus der Proteinlösung entfernt und diese bei 4 °C gelagert. Die Elution der Fusionsproteine bzw. der nach Thrombinspaltung verbleibenden GST-tags von den Glutathion Sepharose<sup>®</sup> Beads erfolgt durch Inkubation der Suspensionen in Puffer D üN bei 4 °C. Der Überstand wird abpipettiert und bei 4 °C gelagert bzw. verworfen. Anschließend werden die Glutathion Sepharose<sup>®</sup> Beads dreimal mit Puffer D gewaschen (800 x g, RT) und via Inkubation üN bei 4 °C in 5 M Guanidin (alternativ 6 M Urea) regeneriert.

	<b>Puffer A</b> pH 7,0-7,5	<b>Puffer B</b> pH 7,0-7,5	<b>Puffer C</b> pH 7,0-7,5	<b>Puffer D</b> pH 8-9
Tris-OH/HCl	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM
NaCl	100 mM	500 mM	100 mM	-
MgCl <sub>2</sub>	5 mM	5 mM	10 mM	-
KCl	-	-	60 mM	-
Glutathion, red.	-	-	-	30 mM

Die Proteinlösungen werden gegen Mikroinjektionspuffer dialysiert, in Centricon-Röhrchen aufkonzentriert, schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Reinheit der Proteine wird mit SDS-PAGE (3.10.6) und anschließender Coomassie-Färbung (3.10.7) überprüft.

### Mikroinjektionspuffer

---

Tris-OH/HCl, pH 7,4	50 mM
NaCl	150 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM

#### 3.10.4.2 Metallionen-Affinitätschromatographie

Die Reinigung rekombinanter His<sub>6</sub>-Fusionsproteine erfolgt mittels Metallionen-Affinitätschromatographie (**I**mmobilized **M**etal **I**on **A**ffinity **C**hromatography = IMAC) mit Nickelchelat-Agarose als Affinitätsmatrix nach HOCHULI et al. (1987). Die Imidazolringe der sechs benachbarten Histidinreste im His<sub>6</sub>-tag besitzen eine hohe Affinität zu Ni<sup>2+</sup> Ionen, die in der Matrix über 4 ihrer 6 Koordinationsstellen an die Nitrilotriacetat-Reste (NTA) der Chelat-Agarose gebunden sind. Die zwei verbleibenden freien Koordinationsstellen der Ni<sup>2+</sup>-Ionen können von den Imidazolringen der His<sub>6</sub>-Erweiterung des Fusionsproteins eingenommen werden. Derart über die Imidazol-NTA-Affinität an die Trägermatrix gebundene Proteine können durch kompetitive Verdrängung mit freiem Imidazol aus der Ni<sup>2+</sup>-Bindung befreit und wieder in Lösung gebracht werden. Dieses Prinzip wird bei der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säulenchromatographie zur Reinigung der His<sub>6</sub>-Fusionsproteine genutzt. Entsprechend der Kulturvolumina wurden verschiedene Reinigungsmethoden angewandt.

##### 3.10.4.2.1 Analytischer Maßstab

Die Reinigung kleinster Mengen Zielprotein erlaubt erste Aussagen, beispielsweise bzgl. der Löslichkeit des rekombinanten Proteins. 1-10 ml induzierte *E. coli* Kultur (vgl. 3.10.1) werden unter Verwendung des His Micro Spin Purification Module (Amersham) affinitätschromatographisch gereinigt. Lyse und Reinigung erfolgen gemäß dem Standardprotokoll des Herstellers. Die rekombinanten Proteine werden entsprechend der Vorgaben eluiert und bei -70 °C gelagert.

##### 3.10.4.2.2 Präparativer Maßstab

Für die Reinigung wird die Chromatographie-Säule (HiTrap affinity Column Chelating HP) mit Chelating Sepharose™ befüllt, mit einem Säulenvolumen 0,25 M NiSO<sub>4</sub>-Lösung beladen und anschließend durch Waschen mit drei Säulenvolumina Puffer A äquilibriert. Über die FPLC-Anlage wird die Säule an zwei peristaltische Pumpen mit Mischer zur Erzeugung eines Gradienten angeschlossen. Die Säule wird mit 30 ml

Zelllysate (vgl. 3.10.1, 3.10.3) bei einer Flussrate von 1 ml/min beladen und anschließend nicht gebundenes Protein mit 10 Säulenvolumina Puffer A bei gleicher Flussrate ausgewaschen. Eluiert wird mit einem Stufengradienten von 0-500 mM Imidazol (= 0-100 % Puffer B) über ein Gesamtvolumen von 60 ml mit einer Flussrate von 1 ml/min (Programm 5). Das Eluat wird in 3 ml Fraktionen aufgefangen und die einzelnen Fraktionen mittels SDS-PAGE auf ihren Proteingehalt untersucht. Die Fraktionen, die das gewünschte Fusionsprotein enthalten, werden vereinigt und über eine Desalting-Säule (Sephadex<sup>®</sup> G-25 superfine) entsalzt und umgepuffert. Die Proteinlösungen werden für kurzfristige Aufbewahrung bei 4 °C im Kühlschrank deponiert oder für langfristige Lagerung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -70 °C gelagert. Eine Aufkonzentrierung der Proteinpräparation mit Centricon-Röhrchen ist optional. Die IMAC-Säule wird mit 50 mM EDTA in 1 M NaCl-Lösung durch Komplexbildung des Metallions regeneriert. Alle Puffer werden vor Gebrauch sterilfiltriert (0,2 µm) und entgast.

	<b>Puffer A</b>	<b>Puffer B</b>	<b>Desalting-Puffer</b>
Na-Phosphat* pH 7,0-7,5	40 mM	40 mM	40 mM
NaCl	500 mM	500 mM	-
Urea	2 mM	2 mM	2 mM
Glycerin	10 % (v/v)	10 % (v/v)	10 % (v/v)
Triton X-100	0,1 % (v/v)	0,1 % (v/v)	0,1 % (v/v)
Imidazol	-	500 mM	-

\* Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

### 3.10.4.3 Ionen-Austauschchromatographie

Die Ionen-Austauschchromatographie ist eine alternative bzw. eine ergänzende Möglichkeit der Proteinreinigung. Das Prinzip dieser Methode beruht in der induzierten Ablösung unspezifisch gebundenen Zielproteins von einer Matrix. Dies wird durch Änderung der Ionenstärke des umgebenden Milieus erreicht, wobei sich das Zielprotein bei einer anderen Ionenstärke bzw. bei einer anderen Salzkonzentration von der Chromatographiematrix löst als alle übrigen Proteine, die im Auftrag als Verunreinigung vorhanden sind.

Ergänzend zur Metallionenaffinitätschromatographie werden die entsalzten Proteinproben nach dem IMAC-Lauf mit Ionen-Austauschchromatographie weiter

gereinigt. Es wird wahlweise eine Anionen-Austausch- bzw. ein Kationen-Austauschchromatographie durchgeführt. Die Anionen-Austauschchromatographie erfolgt unter Anwendung einer MonoQ-Säule [Chromatographiematrix: MonoQ Beads], die Kationen-Austauschchromatographie mit einer MonoS-Säule [Chromatographiematrix: Fractogel<sup>®</sup> EMDS SO3 650 (S)]. Der pH-Wert des jeweils verwendeten Bindungspuffers (Puffer A) wird anhand des rechnerisch ermittelten, theoretischen isoelektrischen Punktes (IEP) der rekombinanten Proteine mit 1-2 pH-Stufen Differenz zum IEP bestimmt. Analog zum IMAC-Lauf wird die jeweilige Säule über die FPLC-Anlage an zwei peristaltische Pumpen angeschlossen, durch Waschen mit drei Säulenvolumina Puffer A äquilibriert und mit 15-30 ml der affinitätschromatographisch gereinigten Proben (vgl. 3.10.4.2) bei einer Flussrate von 1 ml/min beladen. Nicht gebundenes Protein wird anschließend mit 10 Säulenvolumina Puffer A bei gleicher Flussrate ausgewaschen. Eluiert wird mit einem linearen Salzgradienten von 0-500 mM NaCl (= 0-100 % Puffer B) über ein Gesamtvolumen von 35 ml mit einer Flussrate von 1 ml/min (Programm 0). Es werden Fraktionen von je 2,5 ml gesammelt und deren Leitfähigkeit aufgezeichnet. Die entsprechenden Fraktionen werden gelelektrophoretisch auf ihren Proteingehalt kontrolliert, vereinigt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert. Auf diese Weise lässt sich das gewünschte Protein in seiner Menge relativ zu den Kontaminanten anreichern. Die Reinigung der Säule und Regeneration der Gelmatrix erfolgt mit mindestens 2 Säulenvolumen Hochsalzlösung (2M NaCl); das anschließende Äquilibrieren mit Puffer A wurde mit 10 Säulenvolumen, mindestens jedoch bis zur Leitfähigkeitskonstanz, durchgeführt. Alle Puffer werden vor Gebrauch sterilfiltriert (0,2 µm) und entgast.

	<b>Puffer A</b>	<b>Puffer B</b>
Na-Phosphat*	40 mM	40 mM
NaCl	-	500 mM
Urea	2 mM	2 mM
Glycerin	10 % (v/v)	10 % (v/v)
Triton X-100	0,1 % (v/v)	0,1 % (v/v)

\* Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

### 3.10.5 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die zu bestimmenden Proben werden bei  $OD_{280nm}$  gemessen. Die Proteinkonzentration kann gemäß der Annahme  $1 OD_{280nm} = 1 \text{ mg/ml}$  abgeschätzt werden. Weitaus exaktere Konzentrationsbestimmungen werden anhand der Methode nach BRADFORD mit dem Proteinbestimmungs-Kit der Firma BioRad erzielt (BRADFORD, 1976). Als Eichsubstanz dient Rinderserumalbumin.

### 3.10.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine wird mittels diskontinuierlicher Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) nach LAEMMLI (1970) mit einer BioRad-Apparatur (Protean<sup>®</sup> II) durchgeführt. Proteine werden in einem Sammelgel auf eine einheitliche Lauffront fokussiert und in einem anschließenden Trenngel ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Es werden 12,5 %ige homogene Polyacrylamid (PAA) Gele mit einem Acrylamid/Bisacrylamid-Mischungsverhältnis von 37,5:1 verwendet. In Abhängigkeit vom Verwendungszweck werden für Standardzwecke Gele von 100 x 80 x 0,4 mm (Minigele, 10 ml) und für diagnostische Studien Gele von 260 x 160 x 0,75 mm (Maxigele, 24 ml) eingesetzt. Die jeweiligen Trenn- und Sammelgellösungen setzen sich wie folgt zusammen:

	Trenngel 12,5 %		Sammelgel 3,9 %
Aq. dest.	2,35 ml	5,63 ml	5,78 ml
1,5 mM Tris-OH/HCl pH 8,8	2,50 ml	6,00 ml	-
0,5 mM Tris-OH/HCl pH 6,8	-	-	2,50 ml
25 % Acrylamid/Bisacrylamid	5,00 ml	12,0 ml	1,56 ml
SDS, 10 %ig	100 µl	240 µl	100 µl
APS, 10 %ig	50 µl	120 µl	50 µl
TEMED	5 µl	12 µl	10 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>10 ml</b>	<b>24 ml</b>	<b>10 ml</b>

Die vollständig auspolymerisierten Gele werden in die entsprechende BioRad Apparatur eingespannt und mit Elektrophoresepuffer überschichtet.

Für analytische Minigele werden pro Spur ca. 3 µg Protein (Kamm mit 10 Spuren) und für Maxigele 12 µg Protein (Kamm mit 20 Spuren) eingesetzt. Für präparative Gele

wird jeweils das 15-fache (Minigel) bzw. 30-fache (Maxigel) einer Spur eingesetzt. Die Proben werden 1:1 mit 2x Auftragspuffer verdünnt, für 5 min bei 100 °C gekocht und anschließend aufgetragen. Die Laufzeit für Maxigele beträgt 16-20 h bei einer konstanten Stromstärke von 4-4,5 mA pro Gel oder 90 min bei Minigelen bei einer konstanten Stromstärke von 30-40 mA pro Gel. Als Längen-Standard wird der SDS-Molekulargewichtsstandard "Low" bzw. "High" (GibcoBRL) verwendet.

	Elektrophoresepuffer	2 x Auftragspuffer pH 6,8
Tris-OH	25 mM	0,25 mM
Glycin	192 mM	-
Glycerin	-	20 % (w/v)
SDS	0,1 % (w/v)	4 % (w/v)
Bromphenolblau	-	0,05 % (w/v)
DTT	-	10 % (w/v)

### 3.10.7 Coomassie-Brillant Blue-Färbung

Im Anschluss an die Elektrophorese werden die Protein-Gele 30 min in Fixierlösung gelegt und anschließend 30 min mit Coomassie-Blau gefärbt. Die Gele werden mit Entfärber unter mehrmaligem Wechseln der Lösung solange entfärbt bis sich die aufgetrennten Proteine als distinkte blaue Banden darstellen.

	Fixierlösung	Coomassie-Blau	Entfärberlösung
Ethanol	30 % (v/v)	-	-
Methanol	-	45 % (v/v)	25 % (v/v)
Eisessig	10 % (v/v)	10 % (v/v)	10 % (v/v)
Coomassie Blue <sup>®</sup> R250	-	0,5 % (w/v)	-

### 3.10.8 Western Blot

Der Proteintransfer aus SDS-Polyacrylamidgelen auf eine Nitrozellulosemembran erfolgt im elektrischen Feld nach dem Prinzip des "Semi-dry-blottings" nach KHYSE-ANDERSEN (1984) mit einem diskontinuierlichen Puffersystem. Von der Anode zur Kathode ergibt sich im Semidry Blotter (Trans-Blot<sup>®</sup> SD BioRad, München) folgender Schichtenaufbau: 6 Lagen Filterpapier (Whatman), getränkt mit Anodenpuffer I, drei

Lagen Filterpapier, getränkt mit Anodenpuffer II, Nitrozellulosemembran, getränkt mit Anodenpuffer II, das Polyacrylamidgel und anschließend 9 Lagen Filterpapier, getränkt mit Kathodenpuffer. Der Transfer erfolgt unmittelbar nach der SDS-PAGE bei einer Stromstärke von 100 mA für 45 min. Der Erfolg des Blotting Transfers wird mit einer Ponceau S-Färbung (0,2 % in 3 % Trichloressigsäure) überprüft (SALINOVICH und MONTALARO, 1986). Anschließend wird die Nitrozellulosemembran in Aq. dest. entfärbt.

	<b>Anodenpuffer I</b> pH 10,5	<b>Anodenpuffer II</b> pH 10,4	<b>Kathodenpuffer</b> pH 9,5
Tris-OH/HCl	300 mM	25 mM	25 mM
Methanol	20 % (v/v)	20 % (v/v)	20 % (v/v)
ε-Aminocapronsäure	-	-	40 mM

### 3.10.9 Dot Blot

Das Dot-Antigen wird in den gewünschten Verdünnungen (Verdünnung mit PBS) durch Tropfen auf eine Nitrozellulosemembran aufgebracht und durch Trocknen an der Luft bei Raumtemperatur fixiert.

### 3.10.10 Immunnachweis

Im Rahmen dieser Arbeit wird hauptsächlich der auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion basierende Immunnachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen angewandt. Hierbei folgt einer ersten Antigen-Antikörper (AK) Reaktion eine zweite AK-AK Reaktion, wobei der zweite Antikörper mit Peroxidase konjugiert ist. Die Methode wird modifiziert nach VOGEL und MÜLLER-ESTERL (1986) durchgeführt.

Nach dem Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran (3.10.8 oder 3.10.9) wird diese zur Absättigung unspezifischer Bindungen für 60 min bei 37 °C in Absättigungspuffer inkubiert.

Im Anschluss erfolgt die Inkubation der Nitrozellulosemembran mit den gewünschten Antikörpern (siehe 2.13) in entsprechenden Verdünnungen üN bei Raumtemperatur unter vorsichtigem Schütteln. Anschließend wird die Nitrozellulosemembran dreimal mit Waschpuffer gewaschen und 2 h mit dem entsprechenden Peroxidase-markierten Konjugat (siehe 2.13.8; Verdünnung 1/1000) inkubiert. Die Nitrozellulosemembran wird dreimal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend die immunreaktiven

Proteine durch die Peroxidase-Reaktion mit der Substratlösung sichtbar gemacht. Die Reaktion wird mit einer 1 N Schwefelsäure gestoppt.

Neben der klassischen Form des Western Blots werden zur Bestimmung der Proteinexpression im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich Ligand-Rezeptor Interaktionen untersucht. Hierzu wird für die funktionelle Analyse rekombinanter Fibronectin-bindender Proteine (rBBK32) der Western Blot vor der eigentlichen Antikörper-Detektion  $\bar{u}N$  mit einer Fibronectinlösung inkubiert. Anschließend erfolgen die Inkubation mit anti-Fibronectin-AK (2.13.3) und Peroxidase-markiertem anti-Kaninchen-IgG-Konjugat für jeweils 2 h und anschließend die Detektion.

	Absättigungs- puffer	Verdünnungspuffer für Seren und Konjugate	Wasch- puffer
	pH 7,4	pH 7,4	pH 7,4
NaCl	200 mM	200 mM	155 mM
Tris-OH/HCl	50 mM	50 mM	10 mM
Tween 20	0,1 % (v/v)	0,1 % (v/v)	0,2 % (v/v)
Magermilchpulver	5 %	1 %	-

Die Substratlösung für die enzymatische Farbreaktion setzt sich wie folgt zusammen:

Diaminobenzidin	50 mg
1 M Tris-OH/HCl, pH 7,4	5 ml
Aq. dest.	ad 100 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 30 %ig	50 $\mu$ l

### 3.10.11 Beschichtung von Mikrosphären

Rekombinante Proteine werden kovalent über eine Carboxylsäurematrix an die Oberfläche von Polystyrol-Mikrosphären (FluoSpheres<sup>®</sup>,  $\varnothing$  2  $\mu$ m) gebunden. Gemäß den Angaben des Herstellers werden die Carboxylgruppen mit wasserlöslichem Carbodiimid (EDAC) aktiviert, mit 2-5 mg gereinigtem Protein pro 1 ml Mikrosphärenlösung konjugiert und verbleibende freie aktivierte Carboxylgruppen mit BSA geblockt. Kontrollmikrosphären werden mit BSA und *E. coli*-Lysat beschichtet. Die Konjugation erfolgt in silanisierten ERGs, da die Mikrosphären nach der Aktivierung der Carboxylgruppen eine starke Affinität zur Oberfläche der Reaktionsgefäße aufweisen. Nach dem Blockieren der freien Gruppen mit BSA werden

die Mikrosphären in 1 % BSA/PBS resuspendiert und in unbehandelten ERGs bei 4 °C lichtgeschützt gelagert (max. 2 Monate). Die Beschichtung der Mikrosphären wird im Western Blot mittels eines indirekten Immunnachweises getestet (vgl. 4.3.5.1), wobei die Verwendung eines reduzierenden Probenpuffers zusammen mit den denaturierenden SDS-PAGE-Bedingungen ein Ablösen der Antigene von den Mikrosphären bewirkt und die Antigene somit gemäß ihres spezifischen Molekulargewichts aufgetrennt werden. Lt. Hersteller neigen Carboxyl-modifizierte Mikrosphären während der Lagerung zur Aggregatbildung. Daher werden die Mikrosphären-Suspensionen unmittelbar vor der Verwendung 2-5 mal, je 2 min mit Ultraschall behandelt (Branson Cell Disruptor B15, Leistungsstärke 4, Beschallungsintervall 30 %). Die Sonifizierung wird stets im Dunkelfeldmikroskop überprüft und die Beschallung ggf. wiederholt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Bindungsfähigkeit von *B. burgdorferi* sensu lato an Säugerzellen

Ziel dieses Themenkomplexes war die Untersuchung der Bindungsfähigkeit von *B. burgdorferi* s.l. an primäre und immortalisierte Säugerzellen. Hierzu wurden das *B. afzelii* Patientenisolat PKo, die Klone PKo97 K37 und PKo345 II-2-3, und das *B. garinii* Patientenisolat PBi, zusammen mit immortalisierten neuronalen Zellen (1321N1), den endothelialen Zelllinien ECV304 und CRL-2480, sowie primären HUVEC-Präparationen koinkubiert (vgl. 2.1.1, 2.2 und 3.1 – 3.4). Die verwendeten *B. burgdorferi* Stämme und -klone variieren im *osp*-Expressionsmuster (OspA und OspC) bzw. weisen unterschiedliche Osp-Serotypen auf (vgl. Tabelle 4.1.1).

**Tabelle 4.1.1:** Übersicht über die verwendeten *B. burgdorferi* Stämme und Klone

Bezeichnung	Spezies	Stamm/ Klon	OspA- Serotyp	OspA- Expression*	OspC- Expression*
PKo	<i>B. afzelii</i>	Stamm	2	++	+
PKo97 K37	<i>B. afzelii</i>	Klon	2	++	+++
PKo345 II-2-3	<i>B. afzelii</i>	Klon	2	++	-
PBi	<i>B. garinii</i>	Stamm	4	++	++

\* Die Quantifizierung der OspA- bzw. OspC-Expression erfolgte mittels IFT und Western Blot-Analysen; (-) = keine, (+) = wenig, (++) = moderat, (+++) = stark (vgl. FINGERLE et al., 2000; WILSKE et al., 1985; diese Studie, Daten nicht gezeigt)

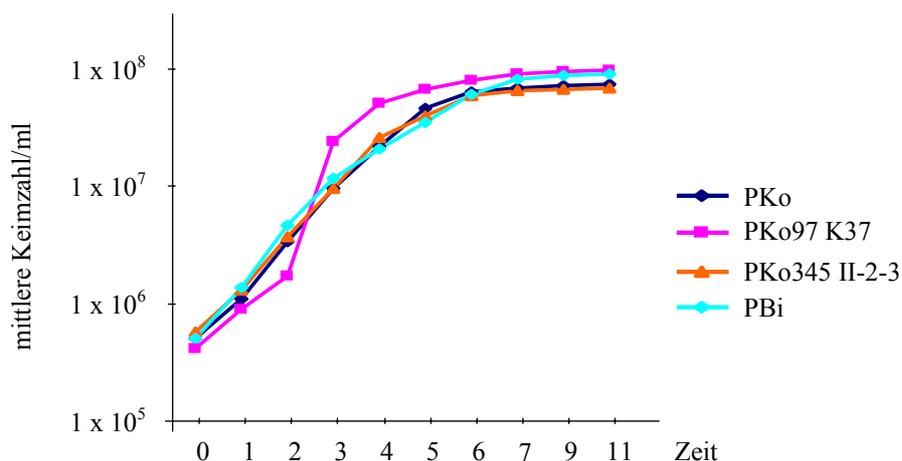
Die Quantifizierung der Bindungsfähigkeit erfolgte mittels konventioneller Immunfluoreszenzmikroskopie, die hierbei an die entsprechenden Fragestellungen adaptiert wurde. Die Nullhypothese der angegebenen Signifikanzen wurde jeweils auf dem 5 % - Niveau ( $p < 0,05$ ) abgelehnt. Um eine korrekte Interpretation der Adhärenzdaten zu gewährleisten, wurden zunächst Wachstumsanalysen der verwendeten *B. burgdorferi* Stämme und Klone erstellt. Anschließend erfolgte die Untersuchung einer möglichen Korrelation zwischen Bindungsfähigkeit und Variation im *osp*-Expressionsmuster (OspA und OspC) und/oder unterschiedlichen Osp-Serotypen. Zusätzlich sollten aus diesen Experimenten mögliche Organotropismen abgeleitet werden. In weiteren Untersuchungen sollte geklärt werden, ob monoklonale anti-Borrelien-Antikörper die Bindungsfähigkeit der getesteten Borrelienstämme und -klone beeinflussen.

#### 4.1.1 Wachstumsanalysen von *B. burgdorferi*

Für die korrekte Interpretation nachfolgender Koinkubationsexperimente mit verschiedenen Wirtszellen wurde das Wachstumsverhalten der im Rahmen dieser Versuchsreihe verwendeten *B. burgdorferi* Stämme und Klone in verschiedenen Kulturmedien dokumentiert. Hierbei wurden neben dem routinemäßig für die Borrelienkultur verwendeten MKP-Medium, die vollständig supplementierten Zellkulturmedien RPMI 1640, DMEM, M199 sowie F12K getestet.

##### 4.1.1.1 Wachstum von *B. burgdorferi* in MKP-Medium

Das Wachstum von *B. burgdorferi* in MKP-Medium wurde anhand von Wachstumskurven dokumentiert (vgl. 3.2.4). Hierzu wurden PKo-, PKo97 K37-, PKo345 II-2-3- und PBi-Testkulturen mit entsprechenden *log*-Phase Borrelien angeimpft und unter Standardkulturbedingungen (MKP-Medium, 34 °C, vgl. 3.2.1) über einen Zeitraum von 9 Tagen kultiviert. Die Keimzahl wurde täglich als Anzahl Borrelien/ml Kultur nach der MvP-Methode bestimmt (vgl. 3.2.4.1). Der Versuch wurde in 3 Wiederholungen jeweils mit Doppelbestimmungen für die angegebenen *B. burgdorferi* Stämme bzw. Klone durchgeführt. Die Werte der korrespondierenden Keimzahlbestimmungen wurden gemittelt und die Ergebnisse graphisch dargestellt (siehe Abbildung 4.1.1).



**Abbildung 4.1.1:** Das Wachstumsverhalten der *B. burgdorferi* Stämme bzw. Klone PKo, PKo97 K37, PKo345 II-2-3 und PBi in MKP-Medium. Die Ordinate repräsentiert in logarithmischer Skalierung die gemittelten absoluten Keimzahlen/ml Kultur (Doppelbestimmungen in 3 Wiederholungen), die Abszisse entsprechend die Versuchsdauer.

Alle getesteten *B. burgdorferi* Stämme bzw. Klone zeigen exponentielles Wachstum. Nach einer 1-2 tägigen *lag*-Phase gehen die Testkulturen in die exponentielle Wachstumsphase (*log*-Phase) über, um gegen Tag 9 in die stationäre Phase einzutreten. Aus den einzelnen Steigungen der verschiedenen Wachstumskurven wurde die Wachstumsrate ( $\mu$ ) und die Verdoppelungszeit ( $t_d$ ) der getesteten *B. burgdorferi* Stämme und Klone berechnet (vgl. Tabelle 4.1.2).

**Tabelle 4.1.2:** Wachstumsraten ( $\mu$ ) und Verdoppelungszeiten ( $t_d$ ) der angegebenen *B. burgdorferi* Stämme und Klone

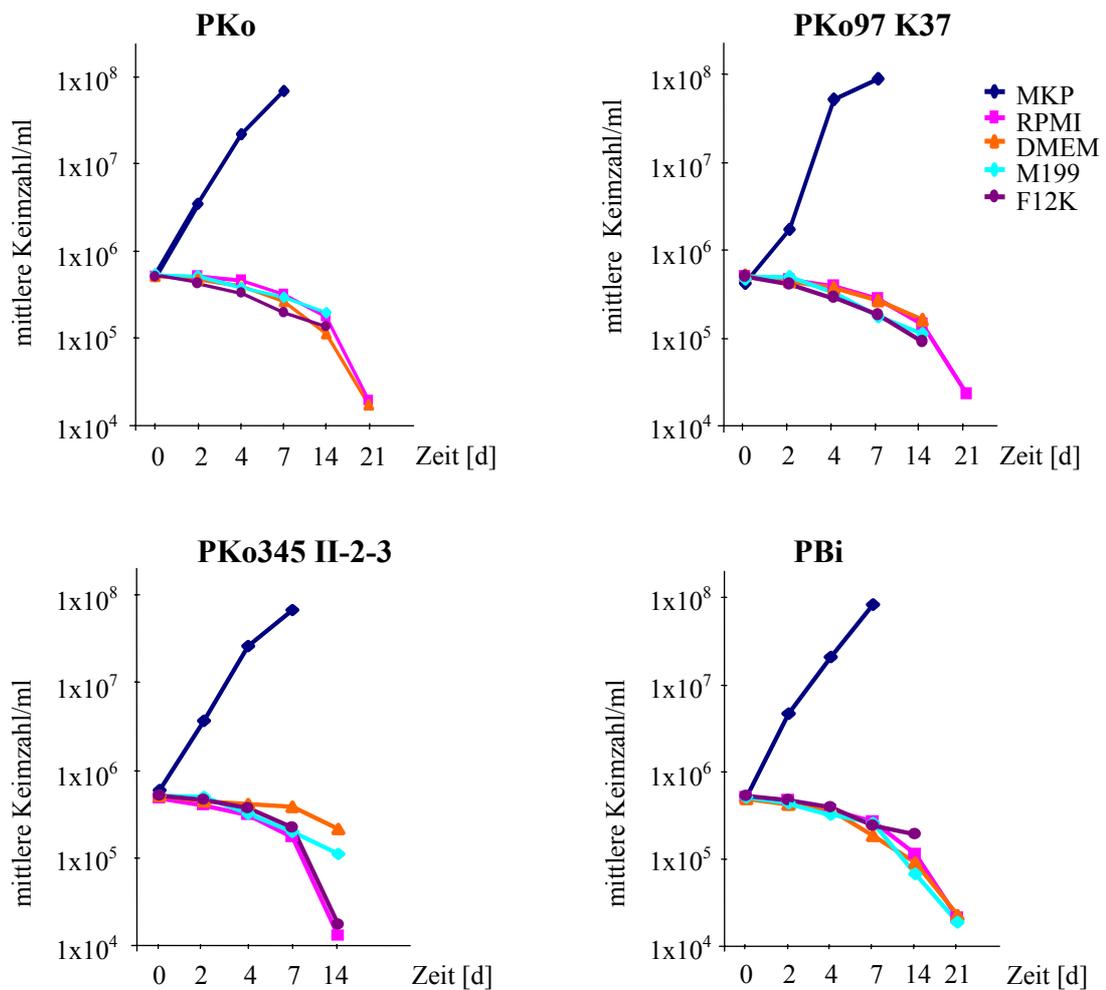
Borrelienstamm/-klon	$\mu$	$t_d$ [h]
PKo	0,040	17,33
PKo97 K37	0,050	13,86
PKo345 II-2-3	0,040	17,33
PBi	0,039	17,77

Insgesamt zeigen die Stämme PKo und PBi und der Klon PKo345 II-2-3 vergleichbare Wachstumsraten und Verdoppelungszeiten, während sich der Klon PKo97 K37 durch eine erhöhte Wachstumsrate und eine kürzere Generationszeit auszeichnet.

Parallel zur Bestimmung von Keimzahl, Wachstumsrate und Generationszeit wurden die Testkulturen im Dunkelfeldmikroskop bzgl. Morphologie und Motilität untersucht. Die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse waren für alle getesteten *B. burgdorferi* Stämme und Klone gleich: während sich Borrelien der frühen (2 d) und mittleren (4 d) *log*-Phase schraubenförmig gewunden und sehr stark beweglich darstellten, relaxierten sich die Spirochäten gegen Anfang der späten *log*-Phase (7 d), d.h. der Schraubendurchmesser nahm ab. Parallel verminderte sich mit zunehmender Kulturdauer die Motilität. Borrelien der stationären Phase (9 d) zeigten nahezu keine Drehbewegungen mehr. Der Motilitätsverlust geht allerdings nicht mit dem Verlust der Teilungsfähigkeit einher. Nach dem Überimpfen von Borrelien der stationären Phase in frisches Kulturmedium teilten sich diese nach einer verlängerten *lag*-Phase (2-3 d) mit den oben angegebenen Teilungsraten und erlangten ihre charakteristische schraubenförmige Gestalt und die Fähigkeit zu korkenzieherartigen Drehbewegungen zurück.

#### 4.1.1.2 Wachstum von *B. burgdorferi* in Zellkulturmedien ohne Säugerzellen

Zusätzlich wurde das Verhalten von Borrelienkulturen in den vollständig supplementierten Zellkulturmedien RPMI 1640, DMEM, M199 sowie F12K (vgl. 3.1.3) untersucht. Hierzu wurden entsprechende PKo-, PKo97 K37-, PKo345 II-2-3- und PBI-Testkulturen mit *log*-Phase Borrelien angeimpft und über einen Zeitraum von 5 Wochen (35 d) unter anaeroben Bedingungen bei 34 °C kultiviert. Die Keimzahl wurde am Tag 0, 2, 4, 6, 14, 21 und 35 als Anzahl Borrelien/ml Kultur nach der MvP-Methode bestimmt (vgl. 3.2.4.1). Der Versuch wurde in 2 Wiederholungen jeweils mit Doppelbestimmungen für die angegebenen *B. burgdorferi* Stämme bzw. Klone und Zellkulturmedien durchgeführt. Die Werte der korrespondierenden Keimzahlbestimmungen wurden gemittelt und die Ergebnisse graphisch dargestellt (Abbildung 4.1.2).



**Abbildung 4.1.2:** Wachstumsverhalten der *B. burgdorferi* Stämme bzw. Klone PKo, PKo97 K37, PKo345 II-2-3 und PBI in verschiedenen Kulturmedien. Die Ordinate repräsentiert in logarithmischer Skalierung die gemittelten Keimzahlen/ml Kultur (Doppelbestimmungen in 2 Wiederholungen), die Abszisse entsprechend die Versuchsdauer.

Der Vergleich der Wachstumskurven in Abbildung 4.1.2 zeigte, dass die getesteten *B. burgdorferi* Stämme und Klone in MKP-Medium gut angezüchtet werden konnten. In den verwendeten Zellkulturmedien konnten die Spirochäten hingegen nicht kultiviert werden. Bereits bei der ersten lichtmikroskopischen Kontrolle, 6 h nach Überimpfen der Borrelien in die verschiedenen Zellkulturmedien, erschienen die Bakterien unbeweglich und relaxiert. Im Verlauf der 5-wöchigen Versuchsdauer verminderte sich die Anzahl morphologisch erfassbarer Bakterienzellen kontinuierlich, während sich der Anteil degenerierten Borrelienmaterials proportional erhöhte. Nach 21 bzw. 28 Tagen waren mittels Dunkelfeldmikroskopie in keiner Testkultur mehr spirochätenähnliche Strukturen sichtbar. In der graphischen Darstellung endet die Dokumentation der Kulturverläufe bereits an Tag 14 bzw. 21, da Nullwerte in logarithmisch skalierten Diagrammen nicht korrekt dargestellt werden können.

Um einen z.B. durch aerobe Bedingungen hervorgerufenen Wachstumsvorteil der Borrelien in den getesteten Zellkulturmedien auszuschließen, wurde der Versuch zusätzlich unter standardisierten Zellkulturbedingungen (24-Well-Zellkulturplatten, 90 % Humidität, 37 °C) durchgeführt. Die Testkulturen wurden hierbei lichtmikroskopisch analysiert. Insgesamt konnten die getesteten *B. burgdorferi* Stämme und Klone auch unter Zellkulturbedingungen weder in RPMI 1640, DMEM, M199, noch in F12K angezüchtet werden. Alle untersuchten Testkulturen zeigten keinerlei Spirochätenwachstum.

#### **4.1.1.3 Wachstum von *B. burgdorferi* in Zellkulturmedien mit Säugerzellen**

Um eine Stimulation des bakteriellen Wachstums während des Koinkubationsversuchs mit den verschiedenen Säugerzellen, beispielsweise durch zelluläre Faktoren, auszuschließen, wurde folgender Versuch durchgeführt:

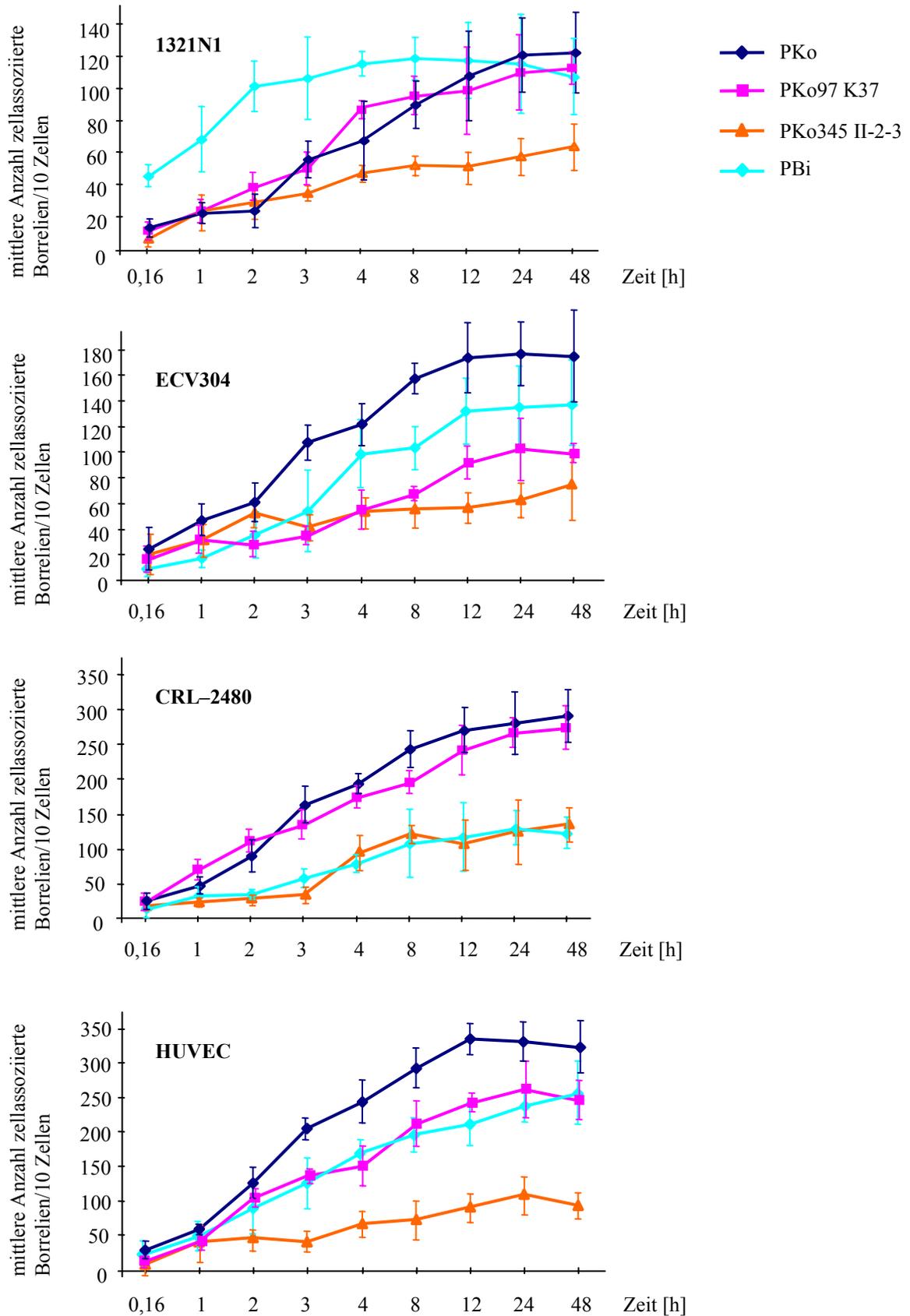
Borrelien (PKo, PKo97 K37, PKo345 II-2-3 und PBi) wurden in 2 Parallelen (jeweils mit Doppelproben) mit einer Borrelien/Zell-Ratio von 100:1 mit 1321N1- bzw. ECV304-Zellen auf Deckgläschen unter standardisierten Zellkulturbedingungen (24-well-Zellkulturplatten, 90 % Humidität, 37 °C) koinkubiert (vgl. 3.4.3.1). Nach 18-stündiger Koinkubation wurde je Parallele ein Koinkubationspräparat fixiert und mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie die Anzahl zellassoziierter Borrelien ermittelt (vgl. 3.7.3, 3.7.6 und 3.7.8). Anschließend wurde in einer Versuchsparallele das gesamte Medium durch Zellkulturmedium ohne Borrelienzusatz ersetzt. Beide Parallelen (mit bzw. ohne Mediumwechsel) wurden für weitere 18 h (insgesamt 36 h)

koinkubiert und wiederum die Anzahl zellassoziierter Borrelien bestimmt (Ergebnisse nicht dargestellt). Der Vergleich der Ergebnisse ergab für die Koinkubationspräparate ohne Mediumwechsel eine steigende Anzahl adhärenter Borrelien relativ zur Wirtszellzahl. Die Anzahl der zellassozierten Borrelien in den Präparaten mit Mediumwechsel stagnierte hingegen. Zusätzlich wurden die Anzahl der Borrelien in den Zellkulturüberständen aus dem Ansatz ohne Mediumwechsel mittels Dunkelfeldmikroskopie ermittelt (vgl. 3.2.4). Hierbei verringerte sich die mittlere Anzahl der Spirochäten im Überstand relativ zur Koinkubationsdauer. In einer Wiederholung des Experiments konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Ein Wirtszell-stimuliertes Wachstum der Spirochäten kann folglich ausgeschlossen werden.

#### 4.1.2 Bindungsfähigkeit von *B. burgdorferi* an Säugerzellen

In Koinkubationsversuchen mit Säugerzellen wurde untersucht, inwieweit die Zellbindungsaffinität von *B. burgdorferi* s.l. mit dem OspA-Serotyp der getesteten Borrelienstämme und -klone und deren Variation im Osp-Expressionsmuster (OspA und OspC) korreliert.

Hierzu wurden der Stamm PKo (*B. afzelii*), dessen Klone PKo97 K37 und PKo345 II-2-3, und der Stamm PBi (*B. garinii*) zusammen mit immortalisierten neuronalen Zellen (1321N1), den endothelialen Zelllinien ECV304 und CRL-2480, sowie primären HUVEC-Präparationen unter serumfreien Bedingungen koinkubiert und die Präparate nach 10 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h und 48 h fixiert (vgl. 3.4.3). Die Borrelien/Säugerzell-Ratio betrug hierbei 50:1. Die Quantifizierung der Bindungsfähigkeit erfolgte mittels konventioneller Immunfluoreszenzmikroskopie. Die Borrelien wurden hierzu mit dem monoklonalen anti-Flagellin Antikörper L41 1C11 markiert und das Zielprotein mit einem kompatiblen anti-IgG<sub>2b</sub>-FITC-Fluoreszenzkonjugat visualisiert (vgl. 3.7.3). Da Flagellin von allen untersuchten Stämmen und Klonen konstitutiv exprimiert wird, ist somit die Detektion aller auf dem Präparat vorhandener Borrelien gewährleistet (vgl. Abbildung 4.1.4). Die Säugerzellen wurden mittels Alexa Phalloidin 568 markiert. Die Anzahl zellassoziierter Borrelien wurde für jeden Borrelienstamm bzw. -klon und jeden Säugerzelltyp in Doppelproben relativ zur Säugerzellzahl ermittelt. Insgesamt wurden pro Präparat 50 Gesichtsfelder ausgezählt, die Ergebnisse aus drei Wiederholungen gemittelt und graphisch dargestellt (Abbildung 4.1.3). Die absoluten Zahlenwerte der Einzelbestimmungen sind mit Standardabweichungen im Anhang aufgeführt (Tabelle 8.1, siehe Anhang).



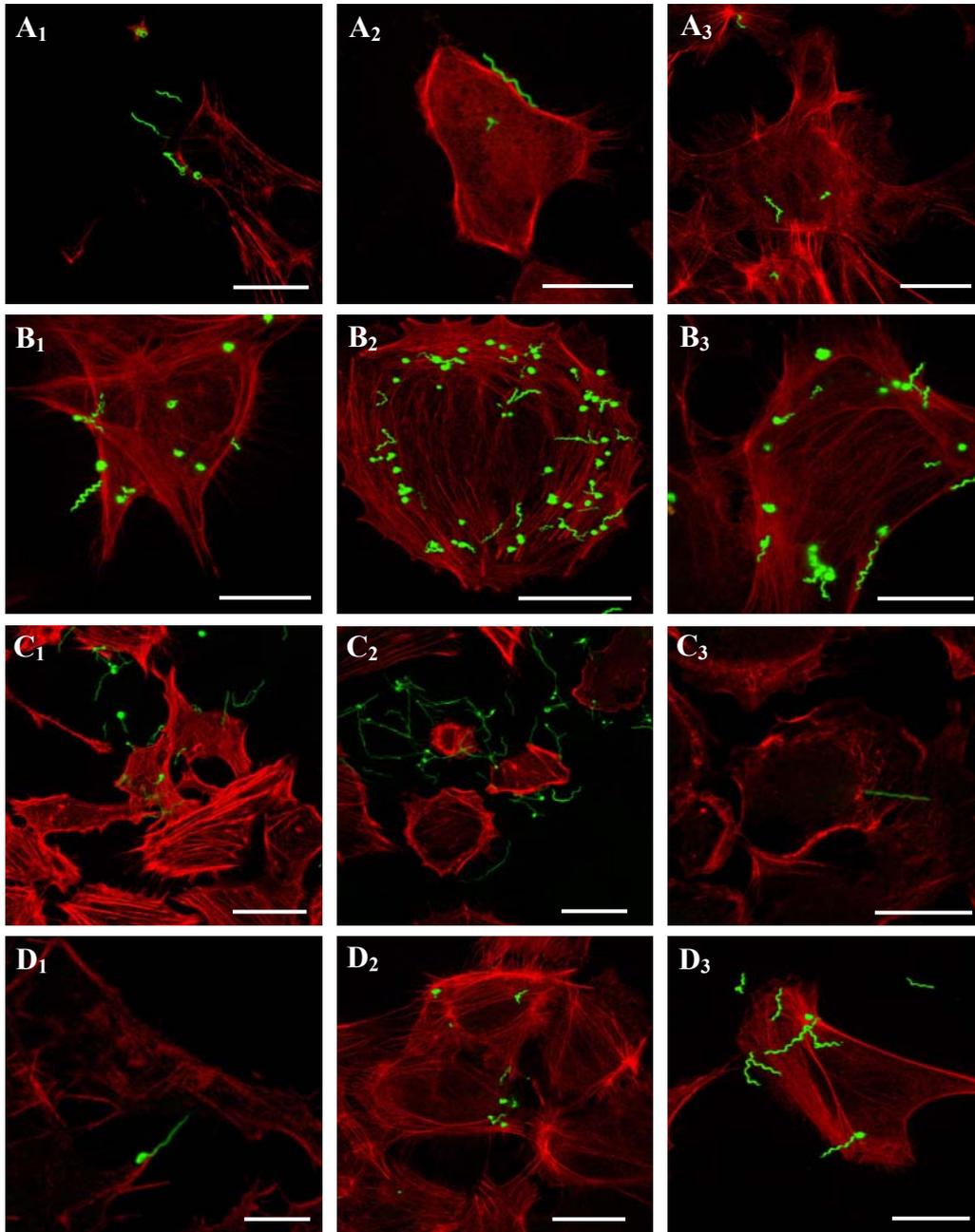
**Abbildung 4.1.3:** Bindungsaffinität der *B. burgdorferi* Stämme bzw. Klone PKo, PKo97 K37, PKo345 II-2-3 und PBi an die Säugerzellen 1321N1, ECV304, CRL-2480 und HUVEC. Die Ordinate repräsentiert in linearer Skalierung die gemittelten absoluten Zahlen zellassoziierter Borrelien/10 Säugerzellen (Doppelbestimmungen in 3 Wiederholungen), die Abszisse die ausgewerteten Inkubationszeiträume.

Die lichtmikroskopische Analyse der Koinkubationspräparate mit dem neuronalen Zelltyp 1321N1 zeigte nach 10 min Koinkubationsdauer für den Stamm PKo und dessen Klone PKo97 K37 und PKo345 II-2-3 durchschnittlich 10 adhärenente Borrelien pro 10 Astrozyten (vgl. Abbildung 4.1.3), während der *B. garinii* Stamm PBi mit 45 interagierenden Bakterienzellen eine deutlich stärkere Zellaffinität aufwies. Mit zunehmender Koinkubationszeit stieg die Anzahl zellassoziierter Borrelien bei allen Borrelienstämmen und -klonen und jedem getesteten Säugerzelltyp kontinuierlich. Der Stamm PBi wies gegenüber PKo und dessen Klonen bis zu einer Versuchsdauer von >12 h eine signifikant erhöhte Zellbindungsaffinität auf. Nach einheitlich 24 h Versuchsdauer erreichte jeder Stamm bzw. Klon einen Sättigungswert.

Nach 24 h bzw. 48 h näherte sich die mittlere Anzahl adhärenenter Borrelien des *B. afzelii* Isolates PKo den Werten des *B. garinii* Stammes PBi an. Die lichtmikroskopische Analyse der Präparate zeigte bei Koinkubationen der neuronalen Zellen mit den Borrelien für Stamm PKo die erwartete helikale Morphologie, während sich die PBi-Zellen punktförmig kondensiert darstellten. Die lichtmikroskopische Differenzierung zwischen intra- und extrazellulären Borrelien ergab hierbei für PBi eine deutlich erhöhte Anzahl intrazellulärer Bakterienzellen verglichen mit dem Stamm PKo. Durchschnittlich waren nach 24 h etwa 50 Borrelien intrazellulär lokalisiert bei insgesamt  $115 \pm 32$  extrazellulären, zellassozierten PBi (entspricht 58 % der extrazellulären, zellassozierten Borrelien), im Falle von Stamm PKo hingegen nur etwa 15 von  $121 \pm 22$  Borrelien (entspricht 18 %). Die Klone PKo97 K37 und PKo345 II-2-3 waren mit 15 bei insgesamt  $109 \pm 23$  extrazellulären, zellassozierten PKo97 K37 (entspricht 16 %) und 5 bei  $57 \pm 12$  extrazellulären, zellassozierten PKo345 II-2-3 (entspricht 9 %) gegenüber *B. afzelii* Stamm PKo in vergleichbarer Rate intrazellulär lokalisiert. Insgesamt war nach Koinkubationszeiträumen von >4 h jeder der getesteten Borrelienstämmen und -klone intrazellulär nachweisbar.

Im Falle der getesteten endothelialen Zellen adhäreren nach 10 min durchschnittlich 10 bis maximal 30 Borrelien aller getesteten Borrelienstämmen und -klone, wobei der *B. afzelii* Stamm PKo gegenüber dem *B. garinii* Stamm PBi eine signifikant höhere Zellbindungsaffinität aufwies. Diese Tendenz setzte sich über die gesamte Versuchsdauer fort, wobei jeweils jeder getestete Stamm bzw. Klon nach rund 24 h Koinkubation einen Sättigungswert erreichte. Die Klone des *B. afzelii* Stammes PKo, PKo97 K37 und PKo345 II-2-3, wiesen insgesamt gegenüber dem Wildtyp PKo eine deutlich verringerte Bindungsaffinität auf, wobei für PKo97 K37 verglichen mit

PKo345 II-2-3 eine stärkere Adhärenz gezeigt werden konnte. Abbildung 4.1.4 zeigt anhand von konfokalen Laser Scanning Immunfluoreszenzaufnahmen die Adhärenz von *B. burgdorferi* an verschiedene Säugerzelltypen.



**Abbildung 4.1.4:** Adhärenz von *B. burgdorferi* an verschiedene Säugerzellen. Die Säugerzellen wurden mittels Alexa Phalloidin 568 gegen F-Aktin und die Borrelien mit dem monoklonalen anti-Flagellin Antikörper L41 1C11 und dem entsprechenden anti-IgG-FITC visualisiert. Dargestellt sind Overlays aus je 4-8 laser scanning Bilddateien. Die weißen Balken repräsentieren je 10 µm, t = Koinkubationsdauer.

**A<sub>1</sub>-A<sub>3</sub>:** *B. afzelii* Stamm PKo, adhätierend an 1321N1-Zellen (**A<sub>1</sub>**, MOI 10:1, t = 60 min), ECV304-Zellen (**A<sub>2</sub>**, MOI 10:1, t = 60 min) und HUVEC (**A<sub>3</sub>**, MOI 10:1, t = 60 min).

**B<sub>1</sub>-B<sub>3</sub>:** *B. afzelii* Klon PKo97 K37, adhätierend an ECV304-Zellen (**B<sub>1</sub>**, MOI 50:1, t = 10 min), HUVEC (**B<sub>2</sub>**, MOI 50:1, t = 60 min) und CRL-2480-Zellen (**B<sub>3</sub>**, MOI 10:1, t = 10 min).

**C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>:** *B. afzelii* Klon PKo345 II-2-3, adhätierend an ECV304-Zellen (**C<sub>1</sub>**, MOI 50:1, t = 10 min), HUVEC (**C<sub>2</sub>**, MOI 50:1, t = 60 min) und CRL-2480-Zellen (**C<sub>3</sub>**, MOI 10:1, t = 10 min).

**D<sub>1</sub>-D<sub>3</sub>:** *B. garinii* Stamm PBi, adhätierend an 1321N1-Zellen (**D<sub>1</sub>**, MOI 10:1, t = 10 min), CRL-2480 (**D<sub>2</sub>**, MOI 10:1, t = 60 min) und HUVEC (**D<sub>3</sub>**, MOI 50:1, t = 60 min).

Insgesamt war die Bindungsaffinität aller getesteten Borrelien bei primär isolierten HUVEC-Zellen gegenüber den immortalisierten Zelllinien ECV304 und CRL-2480 stärker. Der Unterschied war hierbei für jeden getesteten Stamm bzw. Klon zu jedem einzelnen Zeitpunkt signifikant.

Die Dokumentation der Koinkubationsexperimente mittels videounterstützter Lichtmikroskopie zeigte über einen Zeitraum von >12 h ein ständiges Alternieren von Adhäsion und dem Ablösen einzelner Spirochäten, wobei die Frequenz aufgrund der sinkenden Motilität der Bakterien proportional zur Koinkubationsdauer abnahm. Vereinzelt waren jedoch auch nach 48 stündiger Versuchsdauer bewegliche Borrelien detektierbar. Das Maximum an Zelladhärenz wurde somit infolge zunehmender Trägheit der Bakterien und echter Sättigung erreicht.

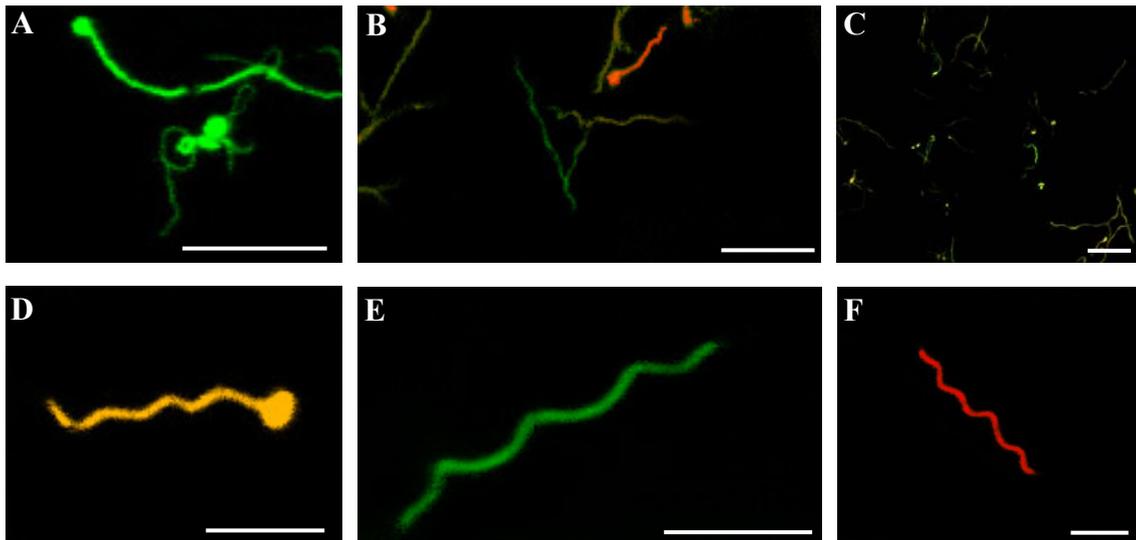
Insgesamt adhärten alle untersuchten Borreliensämme und -klone an jeden getesteten Zelltyp. Die mittlere Anzahl assoziierter Borrelien an die Säugerzellen war hierbei zeitabhängig und erreichte in jedem Versuchsansatz nach rund 24 h einen individuellen Sättigungswert.

Die Ergebnisse zeigen zudem, dass der untersuchte *B. afzelii* Stamm und dessen Klone PKo97 K37 und PKo345 II-2-3 als Vertreter des OspA-Serotyps 2, bevorzugt an die endothelialen Zelllinien ECV304 und CRL-2480 bzw. an HUVEC-Zellen adhärte, wobei die Bindungsaffinität des Wildtypstammes gegenüber den Klonen deutlich ausgeprägter war. Der *B. garinii* Stamm PBi (OspA-Serotyp 4) wies hingegen eine erhöhte Affinität zur neuronalen Zelllinie 1321N1 auf. Zusätzlich zeigt die Bindungsstudie, dass OspC-überexprimierende Borrelien (PKo97 K37) gegenüber OspC-negativen Borrelien (PKo345 II-2-3) eine signifikant erhöhte Zellbindungsaffinität aufwiesen, wobei zwischen den getesteten Zelltypen kein Unterschied bestand. Insgesamt konnte für den Wildtypstamm PKo, verglichen mit beiden Klonen, unabhängig vom getesteten Säugerzelltyp eine erhöhte Bindungsfähigkeit gezeigt werden.

#### **4.1.3 Vergleich des OspA- und OspC-Expressionsmusters bei zellassozierten und nicht-zellassozierten Borrelien**

Ziel dieser Studie war die nähere Untersuchung einer möglichen Korrelation zwischen der Bindungsfähigkeit von *B. burgdorferi* s.l. an Säugerzellen und dem *osp*-Expressionsmuster einzelner Borrelien. Die Versuchsreihe wurde analog dem unter 4.1.2 beschriebenen Schema durchgeführt, wobei sowohl zellassozierte, als auch nicht-

zellosoziierte Bakterienzellen bezüglich ihres OspA- und OspC-Expressionsmusters analysiert wurden. Hierzu wurden einzelne Borrelien aufgrund einer OspA- und OspC-Doppelfärbung in ausschließlich OspA-exprimierende, ausschließlich OspC-exprimierende und sowohl OspA-, als auch OspC-exprimierende (im Folgenden als koexprimierend bezeichnet) differenziert. Die Detektion von OspA erfolgte unter Verwendung des monoklonalen anti-OspA Antikörpers L32 1F11, während OspC mittels der monoklonalen anti-OspC Antikörper L22 1F8 und L22 6C4 markiert wurde. Das jeweilige Zielprotein wurde mit einem Fluorochrom-konjugierten anti-IgG-Konjugat (anti-IgG<sub>2a</sub>-FITC für OspA und anti-IgG<sub>1</sub>-Cy<sub>3</sub> für OspC) visualisiert (vgl. 3.7.3). Die Säugerzellen wurden mittels Alexa Phalloidin 568 markiert. Für jeden Borreliens Stamm bzw. -klon wurden pro Koinkubationspräparat (1321N1, ECV304, CRL-2480 und HUVEC) jeweils 100 Bakterienzellen analysiert. Die Osp-Verteilung von zellosoziierten und nicht-zellosoziierten Borrelien wurde entsprechend dem verwendeten Säugerzelltypus einander gegenüber gestellt (vgl. Abbildung 4.1.7 und 4.1.8). Die Gewinnung nicht-zellosoziierter Borrelien erfolgte hierbei aus den Überständen der jeweiligen Koinkubationsansätze, wobei die Überstände aus den Doppelproben vereinigt, die Borrelien durch Zentrifugation pelletiert und anschließend wie unter 3.7.2 beschrieben analysiert wurden. Die Auswertung der zellosoziierten Borrelien erfolgte in Doppelproben, deren Ergebnisse gemittelt wurden. Untersucht wurde zu den Zeitpunkten 1 h, 4 h und 24 h nach Infektion, der Referenzwert zum Zeitpunkt  $t_0$  wurde aus der entsprechenden Borrelienkultur (34 °C) ermittelt. Der Versuch wurde in drei unabhängigen Wiederholungen durchgeführt. Die Abbildungen 4.1.7 und 4.1.8 zeigen die graphische Darstellung der Ergebnisse. Die absoluten Zahlenwerte der Einzelbestimmungen sind im Anhang aufgeführt (Tabelle 8.2 und Tabelle 8.3, siehe Anhang). Abbildung 4.1.5 illustriert die unterschiedlichen OspA- und OspC-Expressionsmuster verschiedener Borrelienpräparate.



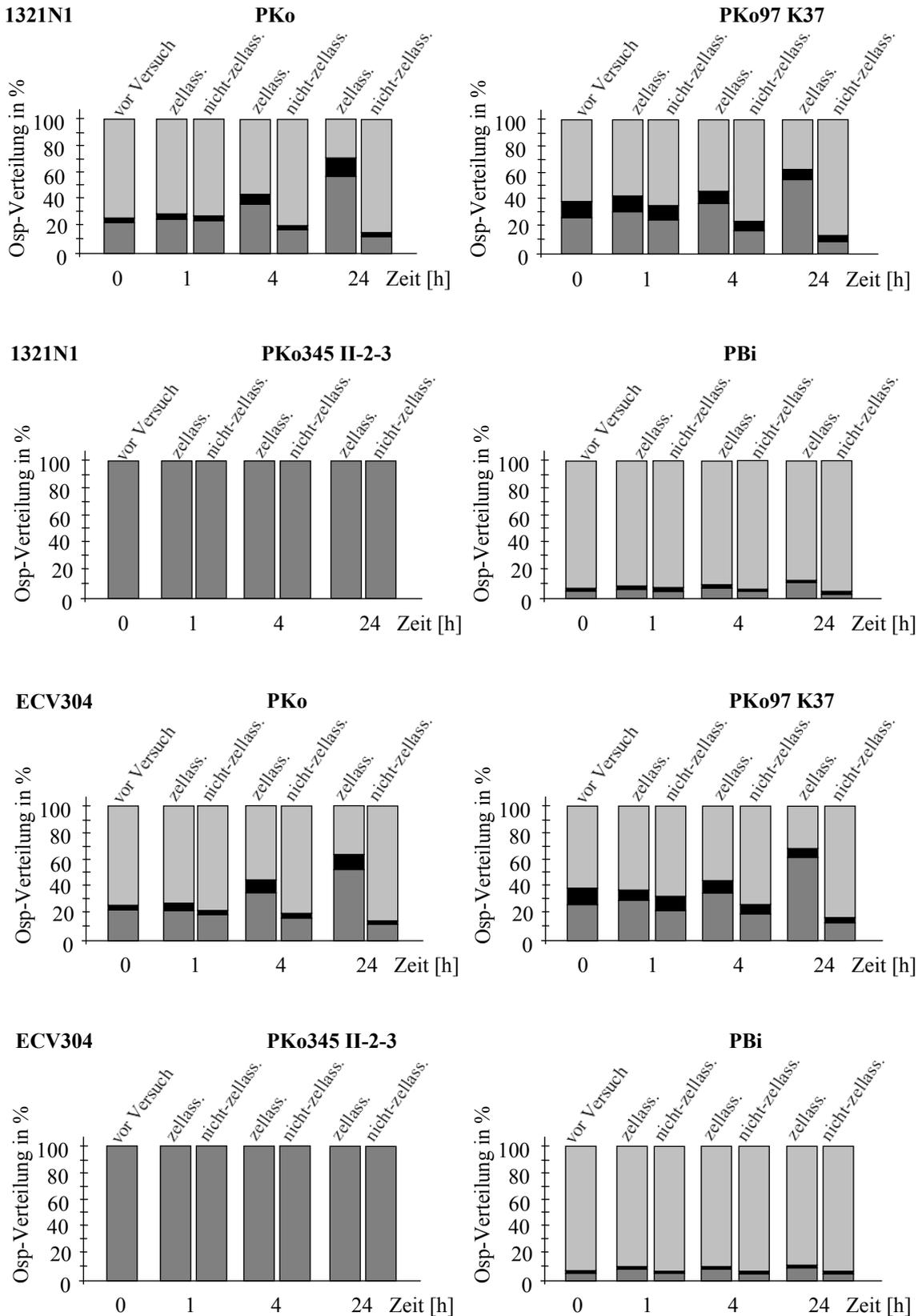
**Abbildung 4.1.5:** OspA- und OspC-Expression von *B. burgdorferi* nach Koinkubation mit verschiedenen Säugerzellen. Dargestellt sind nicht-zellassoziierte Borrelien. Die Borrelien wurden in einer Doppelimmunfluoreszenzmarkierung mit den monoklonalen Antikörpern L32 1F11 (anti-OspA) und L22 1F8 und L22 6C4 (jeweils anti-OspC) und dem entsprechenden anti-IgG-FITC- bzw. anti-IgG-Cy3 Konjugat visualisiert. Dargestellt sind Overlays aus jeweils 4-6 laser scanning Bilddateien. Die weißen Balken repräsentieren jeweils 10 µm.

- A:** *B. garinii* Stamm PBi, OspA-exprimierende Borrelienpopulation  
**B:** *B. afzelii* Stamm PKo, OspA- und OspC-koexprimierende Borrelienpopulation  
**C:** *B. afzelii* Klon PKo97 K37, OspA- und OspC-koexprimierende Borrelienpopulation  
**D:** *B. afzelii* Klon PKo97 K37, OspA- und OspC-koexprimierende Einzelborrelie  
**E:** *B. afzelii* Klon PKo345 II-2-3, nur OspA-exprimierende Einzelborrelie  
**F:** *B. afzelii* Stamm PKo, OspC-exprimierende Einzelborrelie

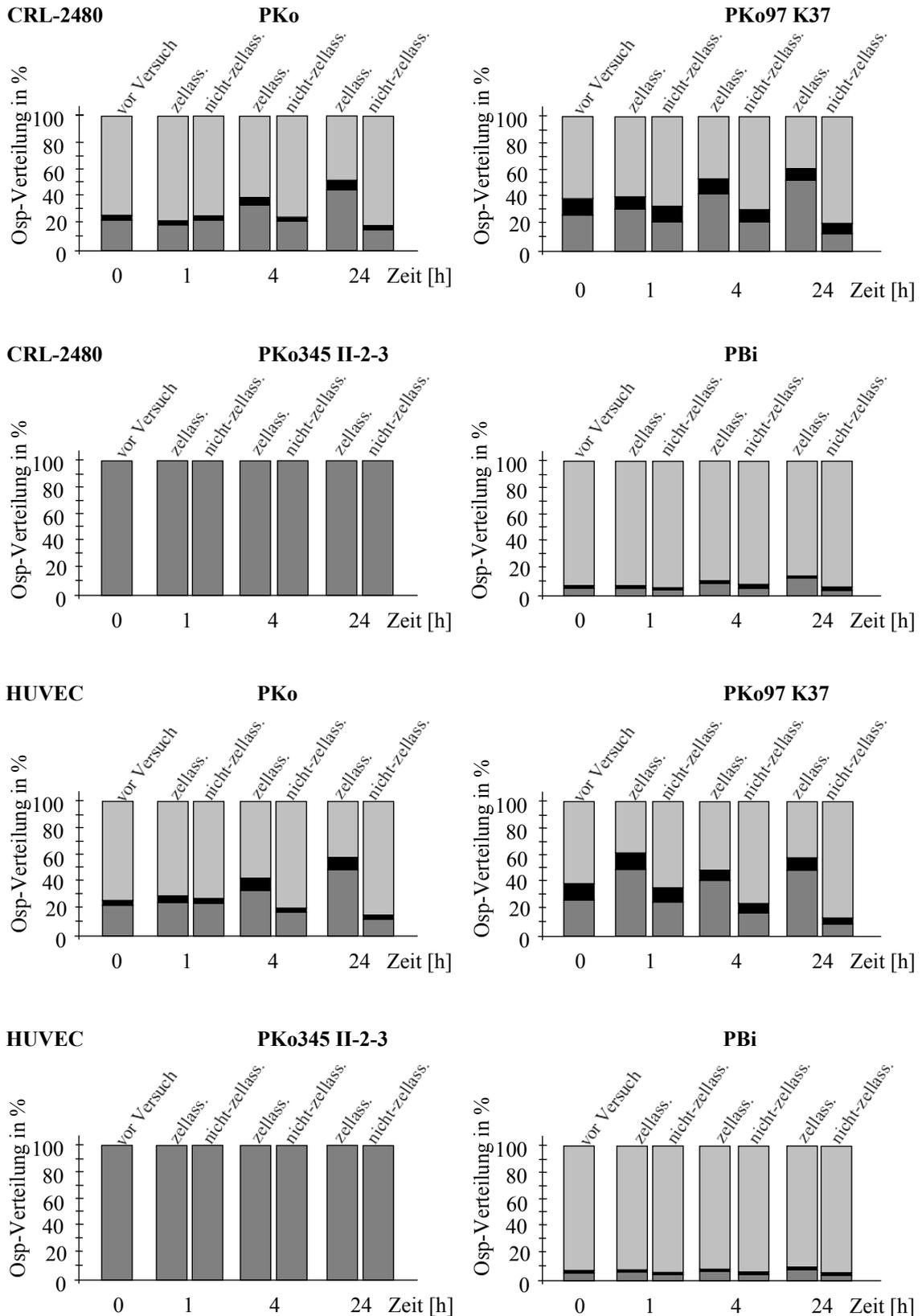
Abbildung 4.1.6 veranschaulicht schematisch die Differenzierungsmethode zwischen den unterschiedlichen Osp-Expressionsmustern der Einzelborrelie. Anhand dieses Farbschemas (vergleiche auch FINGERLE et al., 2000) wurde der Anteil von OspA- und OspC-exprimierenden Borrelien relativ zur Gesamtborrelienpopulation eines Koinkubationspräparates bestimmt.



**Abbildung 4.1.6:** Schematische Übersicht über die farbliche Darstellung der OspA- und OspC-Expression auf der Einzelborrelie in Immunfluoreszenzdarstellungen.



**Abbildung 4.1.7:** Gegenüberstellung der Osp-Verteilung innerhalb einzelner zellassoziierter und nicht-zellassoziierter Borrelienpopulationen nach Koinkubation mit neuronalen Säugerzellen (1321N1) und endothelialen Säugerzellen (ECV304). PKo, PKo97 K37, PKo345 II-2-3 und PBi wurden hierzu mit den Säugerzellen 1321N1 und ECV304 koinkubiert. Die Ordinate repräsentiert die prozentuale Verteilung der Osp-Typen innerhalb der jeweiligen Borrelienpopulation (Doppelbestimmungen in 3 unabhängigen Wiederholungen), die Abszisse die ausgewerteten Koinkubationszeiträume. Expression von nur OspA (■), nur OspC (■) und OspA und OspC (□).



**Abbildung 4.1.8:** Gegenüberstellung der Osp-Verteilung innerhalb einzelner zellassoziierter und nicht-zellassoziierter Borrelienpopulationen nach Koinkubation mit endothelialen Säugerzellen (CRL-2480 und HUVEC). PKo, PKo97 K37, PKo345 II-2-3 und PBi wurden hierzu mit den Säugerzellen CRL-2480 und HUVEC koinkubiert. Die Ordinate repräsentiert die prozentuale Verteilung der Osp-Typen innerhalb der jeweiligen Borrelienpopulation (Doppelbestimmungen in 3 unabhängigen Wiederholungen), die Abszisse die ausgewerteten Koinkubationszeiträume. Expression von nur OspA (□), nur OspC (■) und OspA und OspC (▒).

Im Vergleich von zellassozierten Borrelien und nicht-zellassozierten Borrelien (Abbildung 4.1.7 und 4.1.8) sind die Osp-Proteine bei PKo und PKo97 K37 heterogen verteilt. Diese Verteilung fand sich in gleicher Weise (gleiche OspA/OspC Verteilung) bei allen 4 Säugetierzelltypen.

Die Borrelien der Ausgangskulturen von PKo und PKo97 K37 waren ganz überwiegend koexprimierend oder ausschließlich OspA-positiv. Nur ein sehr geringer Anteil war ausschließlich OspC-positiv. Bei den adhärenen Borrelien stieg im Verlauf der Koinkubation der Prozentsatz an ausschließlich OspA-positiven Bakterien proportional zur Inkubationsdauer an, bei den nicht adhärenen Borrelien nahm er hingegen ab.

Bei den adhärenen Borrelien des Stammes PKo kam es parallel mit der Zunahme an ausschließlich OspA-positiven zur wenn auch nur geringen Zunahme von ausschließlich OspC-positiven Borrelien, während der Anteil von ausschließlich OspC-positiven bei den nicht adhärenen Borrelien unverändert blieb.

Bei den adhärenen Borrelien des Klonen PKo97 K37 blieb der Anteil ausschließlich OspC-exprimierender Borrelien in etwa konstant bei gering rückläufiger Tendenz bei den nicht adhärenen Borrelien. Koexprimierende Borrelien nahmen bei den adhärenen ab, bei den nicht adhärenen dagegen zu. Obwohl der Anteil der koexprimierenden Borrelien bei den adhärenen Borrelien abnahm, nahm die Intensität der OspC-Expression bei den einzelnen Borrelien des Klonen PKo97 K37 zu.

Im Falle des OspC-negativen Klonen PKo345 II-2-3 war über den gesamten Koinkubationszeitraum hinweg keinerlei Variation in der Menge exprimierten OspAs zu verzeichnen. Wie erwartet kam es zu keiner OspC-Expression.

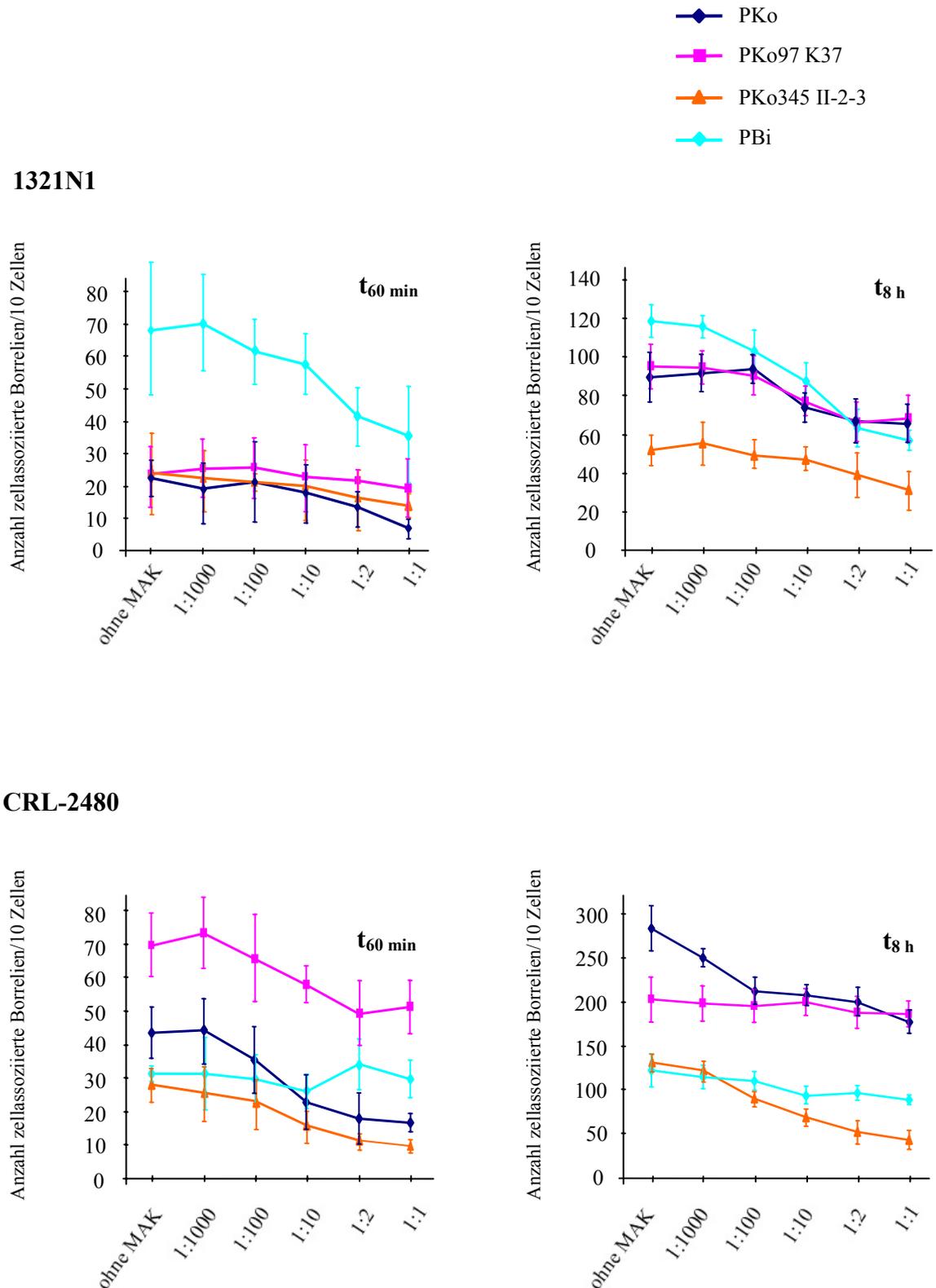
Die OspA/OspC-Verteilung in den Koinkubationspräparaten mit dem *B. garinii* Stamm PBi war unabhängig vom Säugerzelltyp sowohl für zellassozierte als auch für nicht-zellassozierte Borrelien über die gesamte Versuchsdauer hinweg konstant.

Insgesamt konnten für PKo sowie PKo97 K37 Unterschiede in der OspA/OspC Expression bei zellassozierten Borrelien und nicht-zellassozierten Borrelien gezeigt werden, nicht jedoch für den *B. garinii*-Stamm PBi. Der jeweils verwendete Säugerzelltyp beeinflusste das Ergebnis nicht.

#### **4.1.4 Einfluss von monoklonalen anti-Borrelien-Antikörpern auf die Adhärenz von *B. burgdorferi* sensu lato an Säugerzellen**

In weiteren Untersuchungen sollte geklärt werden, ob und inwieweit monoklonale anti-OspA- und OspC-Antikörper die Bindungsfähigkeit der getesteten Borrelienstämme und -klone beeinflussen. Inhibitionsversuche sollten die Rolle von OspA und OspC als Adhäsine für neuronale und endotheliale Zellen näher charakterisieren.

Die Bindungsstudien wurden wie unter 4.1.2 durchgeführt, wobei die Borrelien vor der Infektion jeweils mit einer 1:1, 1:2, 1:10, 1:100 oder 1:1000 Verdünnung von L32 1F11 (anti-OspA) bzw. L22 1F8 (anti-OspC) inkubiert wurden. Verglichen wurden die Zellbindungsaffinitäten für die neuronale Zelllinie 1321N1 und die Endothelzelllinie CRL-2480. Die Säugerzellen wurden mit einer Borrelien/Zell-Ratio von 50:1 infiziert. Im Rahmen dieses Versuches wurde ausschließlich der Einfluss vollständiger Immunglobulinmoleküle auf die Bindungsaffinität von *B. burgdorferi* s.l. getestet. Die Auswertung beschränkt sich auf die anti-OspA-Antikörper Ergebnisse, da der Einsatz des anti-OspC-Antikörpers in jeder Verdünnung zu massiver Aggregation der Borrelien, wodurch eine Evaluierung zellassoziierter Borrelien unter diesen Umständen nicht möglich war. Die Ermittlung der mittleren Anzahl zellassoziierter, anti-OspA-Antikörper behandelter Borrelien relativ zur mittleren Anzahl zellassoziierter, nicht-Antikörper markierter Borrelien erfolgte mittels indirekter Immunfluoreszenzmarkierung des konstitutiv exprimierten Borrelienproteins Flagellin durch den monoklonalen anti-IgG<sub>2b</sub>-Flagellin-Antikörper L41 1C11 gemäß 4.1.2. Die Auswertung erfolgte in Doppelproben, wobei die Ergebnisse nach 60 min und 8 h Koinkubation einander gegenübergestellt wurden. Der Versuch wurde in drei unabhängigen Wiederholungen durchgeführt. Abbildung 4.1.9 zeigt die graphische Darstellung der Ergebnisse. Die absoluten Zahlenwerte der Einzelbestimmungen sind im Anhang aufgeführt (Tabelle 8.4, siehe Anhang).



**Abbildung 4.1.9:** Anti-OspA Antikörper-vermittelte Inhibition der Bindungsaffinität der *B. burgdorferi* Stämme bzw. Klone PKo, PKo97 K37, PKo345 II-2-3 und PBi an die Säugerzelllinien 1321N1 und CRL-2480. Die Ordinate repräsentiert in linearer Skalierung die gemittelten absoluten Zahlen zellassoziierter Borrelien/10 Säugerzellen  $\pm$  Standardabweichung (Doppelbestimmungen in 3 unabhängigen Wiederholungen), die Abszisse die getesteten Verdünnungen des monoklonalen anti-OspA Antikörpers L32 1F11 (1:1000, 1:100, 1:10, 1:2 und 1:1) sowie den entsprechenden Kontrollwert ohne MAK.

Für den *B. afzelii* Stamm PKo konnte gezeigt werden, dass der anti-OspA Antikörper L32 1F11 in den Verdünnungen 1:1, 1:2 und 1:10 die Adhärenz der Borrelien, sowohl an die neuronale Zelllinie 1321N1, als auch an die endotheliale Zelllinie CRL-2480 proportional zur Antikörperkonzentration inhibierte. Der für jeden untersuchten Zeitwert gegenüber nicht-Antikörper behandelten Borrelien signifikante Inhibitionseffekt war hierbei beim Zeitwert  $t_{60\text{min}}$  verglichen mit dem Zeitwert  $t_{8\text{h}}$  signifikant stärker. Die Zellbindungsaffinität des Klonen PKo97 K37 konnte bei Koinkubation mit 1321N1 für die Zeitwerte  $t_{60\text{min}}$  und  $t_{8\text{h}}$  und bei Koinkubation mit CRL-2480 für den Zeitwert  $t_{60\text{min}}$  ebenfalls durch den anti-OspA-Antikörper L32 1F11 signifikant reduziert werden; der Effekt gegenüber dem Stamm PKo war dagegen wesentlich schwächer ausgeprägt. Bei Präparaten mit der Zelllinie CRL-2480 wurde 8 h nach Koinkubation keine Reduktion der Zellbindungsaffinität festgestellt. Für den Klon PKo345 II-2-3 konnte gezeigt werden, dass der anti-OspA-Antikörper L32 1F11 zu jedem Zeitwert die Adhärenz der Borrelien an beide untersuchten Zelllinien signifikant inhibierte. In besonders hohem Maße wurde die endotheliale Zelllinie CRL-2480 gehemmt. Die Zellbindungsaffinität des *B. garinii* Stammes PBi an die neuronale Zelllinie wurde durch den anti-OspA Antikörper L32 1F11 zu jedem getesteten Zeitwert signifikant reduziert, während für die Koinkubationen mit endotheliale Gewebe keinerlei Inhibitionseffekt gezeigt werden konnte. Aus dem Vergleich von zellassozierten und nicht-zellassozierten Borrelien resultierte, dass neben OspC-positiven und OspA/C-koexprimierenden auch ausschließlich OspA-exprimierende Borrelien an die getesteten Säugerzellen adhärten. Die Ergebnisse der 1:100 und 1:1000 Verdünnungen spiegeln im Verlauf des gesamten Versuchs jeweils exakt die Werte der Studie aus 4.1.2 wider, d.h. der Inhibitionseffekt beschränkt sich auf die getesteten 1:1, 1:2 und 1:10 Verdünnungen von L32 1F11. In der nachfolgenden Tabelle (Tabelle 4.1.3) wurde der maximale inhibitorische Effekt von L32 1F11 (1:1 Verdünnung) prozentual berechnet.

**Tabelle 4.1.3:** Der inhibitorische Effekt des monoklonalen anti-OspA-Antikörpers L32 1F11\* auf die Adhärenz von verschiedenen *B. burgdorferi* Stämmen und Klonen an die Zelllinien 1321N1 und CRL-2480.

Borrelienstamm/-klon	Zelltyp	t <sub>60 min</sub>	t <sub>8 h</sub>
PKo	1321N1	68 %	27 %
PKo97 K37		17 %	28 %
PKo345 II-2-3		44 %	40 %
PBi		48 %	52 %
PKo	CRL-2480	61 %	37 %
PKo97 K37		26 %	8 %
PKo345 II-2-3		64 %	68 %
PBi		3 %	28 %

\* Die Berechnung basierte auf den Adhärenzdaten die unter Verwendung der 1:1 Verdünnung von L32 1F11 ermittelt wurden. Angegeben ist die Antikörpervermittelte Reduktion der mittleren Anzahl zellassoziierter Borrelien in %; 100 % entspricht maximaler Inhibition der Adhäsion)

## 4.2 Ist die Bindung von *B. burgdorferi* sensu lato an Säugerzellen $\beta_2$ -Integrin-vermittelt?

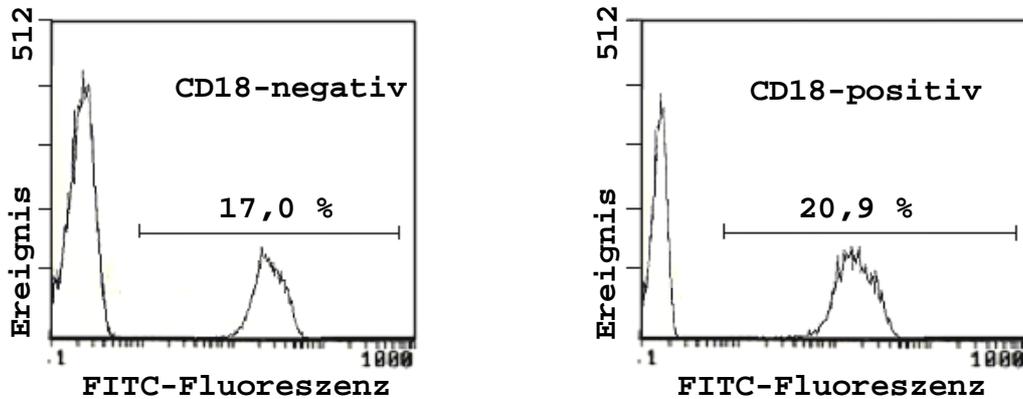
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Durchflusszytometrie zur Spezifizierung muriner Peritonealmakrophagen und als mögliche Methode zur Quantifizierung adhärerender Borrelien an Wirtszellen angewandt. Es sollte geklärt werden, ob  $\alpha_M\beta_2$ -Integrine bei der Bindung von *B. burgdorferi* s.l. an Wirtszellen eine Rolle spielen.

Der Rückschluss, ob die Bindung der Borrelien an Makrophagen  $\alpha_M\beta_2$ -Integrin-vermittelt ist, erfolgte hierbei aus dem Vergleich der Ergebnisse aus Bindungsstudien mit CD18-defizienten Makrophagen und den entsprechenden CD18 positiven Kontrollmakrophagen. Die Auswertung basierte auf Detektion und anschließender Relation der unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten der getesteten Kontroll- und Koinkubationsansätze. Diese ließen wiederum auf die Häufigkeitsrate zellassoziierter Borrelien rückschließen.

Zur Spezifizierung der murinen Peritonealmakrophagen wurde das Leukozytenadhäsionsmolekül CD18 mit einem entsprechenden Fluorochrom-konjugierten anti-CD18-Antikörper (2.13.6) markiert und der prozentuale Anteil CD18-positiver Makrophagen bei CD18<sup>-/-</sup> und Kontrollmäusen im Durchflusszytometer ermittelt. Für die Kontrollmessungen (Hintergrund) wird ein adäquat konjugierter Antikörper gegen Ovalbumin benutzt. Die Markierung der Makrophagen erfolgte wie unter 3.7.3 beschrieben. Die gemessene Expression des CD18-Moleküls betrug bei CD18<sup>-/-</sup>-Makrophagen maximal 20 %, bei den Kontrollmakrophagen durchschnittlich 98 %.

Um zu testen, ob *B. burgdorferi* in der Lage ist, an CD18-defiziente Makrophagen zu adhären, wurden entsprechende Mausmakrophagen (CD18<sup>-/-</sup> und CD18<sup>+/+</sup>-Kontrollmakrophagen) mit dem *B. afzelii* Patientenisolat PKo, dessen Klonen PKo97 K37 und PKo345 II-2-3, bzw. mit dem *B. garinii* Patientenisolat PBi koinkubiert. Getestet wurden Borrelien/Zell-Ratios von 10:1 und 20:1. Die Koinkubationsdauer betrug jeweils 45 min unter ausschließlich Serum-freien Bedingungen. In einer anschließenden indirekten Immunfluoreszenz-Markierung wurden zellassozierte Borrelien mit dem monoklonalen anti-Flagellin-Antikörper L41 1C11 und einem entsprechenden anti-IgG-FITC Konjugat visualisiert. Die Quantifizierung zellassoziierter Borrelien erfolgte anhand von Immunfluoreszenzmessung im Durchflusszytometer über die Messung "FITC-positiver" Makrophagen. Abbildung

4.2.1 zeigt exemplarisch am Beispiel von PKo345 II-2-3 die graphische Darstellung der Messergebnisse. Für die Auswertung wurden die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten gemittelt und in Tabelle 4.2.1 dargestellt.



**Abbildung 4.2.1:** Darstellung der durchflusszytometrischen Bestimmung FITC-positiver CD18-defizienter, bzw. CD18-positiver Makrophagen nach Koinkubation mit PKo345 II-2-3 (MOI 20:1, 45 min Koinkubationsdauer). Die Borrelien wurden mit dem monoklonalen anti-Flagellin Antikörper L41 1C11 markiert und mit dem entsprechenden anti-IgG-FITC visualisiert. Die Abszisse repräsentiert den Messparameter FITC-Fluoreszenz, die Ordinate die Häufigkeit der FITC-positiven Zellen.

**Tabelle 4.2.1:** Gegenüberstellung der mittleren Anzahl FITC-positiver Makrophagen nach Koinkubation mit Borrelien (MOI 10:1).

Borrelienstamm/-klon	Zelltyp	FITC [%]
PKo	CD18 <sup>-/-</sup>	14,3 ± 6,7
	CD18 <sup>+/+</sup>	12,2 ± 2,4
PKo97 K37	CD18 <sup>-/-</sup>	22,3 ± 10,8
	CD18 <sup>+/+</sup>	19,5 ± 7,9
PKo345 II-2-3	CD18 <sup>-/-</sup>	17,0 ± 3,6
	CD18 <sup>+/+</sup>	20,9 ± 8,7
PBi	CD18 <sup>-/-</sup>	12,9 ± 11,3
	CD18 <sup>+/+</sup>	11,8 ± 10,5

CD18<sup>-/-</sup> = CD18-defiziente Makrophagen

CD18<sup>+/+</sup> = CD18-positiv Kontrollmakrophagen

Die Studie zeigt, dass die mittlere Anzahl FITC-positiver Makrophagen für PKo, PKo97 K37, PKo345 II-2-3 und PBi unabhängig von getesteten Zelltyp jeweils identisch ist ( $\chi^2$ -Test,  $p < 0,05$ ). Entsprechend wurde für jeden Borrelienstamm oder -klon auf eine identische Anzahl zellassoziierter Borrelien geschlossen. Die *B. afzelii* Klone PKo97

K37 und PKo345 II-2-3 zeichnen sich gegenüber PKo und PBi im Gesamtvergleich durch eine erhöhte Bindungsaffinität an die verwendeten Peritonealmakrophagen aus. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass unter Serum-freien Bedingungen das Leukozytenadhäsionsmolekül CD18 keine Rolle bei der Bindung von *B. burgdorferi* an murine Makrophagen zu spielen scheint.

### **4.3 Untersuchungen zu Fibronectin-bindenden Proteinen verschiedener *B. burgdorferi* sensu lato Spezies**

Für die Untersuchung möglicher funktioneller und struktureller Unterschiede der Fibronectin-bindenden Proteine verschiedener *Borrelia burgdorferi* sensu lato Spezies, wurden Fibronectin-bindende Proteine der *B. burgdorferi* s.l. Isolate B31, PKa2, PHei und TN rekombinant hergestellt. Die klonierten Expressionseinheiten wurden auf cDNA- und Aminosäuresequenzebene analysiert und die Proteine anschließend proteinbiochemisch charakterisiert. Mittels Western Blot-Analysen wurde die diagnostische Relevanz der rekombinanten Proteine getestet und letztlich die Auswirkungen möglicher proteinbiochemischer Unterschiede auf die Zellbindungsaffinitäten in verschiedenen Säugerzell-Modellsystemen untersucht. In Anlehnung an die Veröffentlichung der genomischen DNA-Sequenz des *B. burgdorferi* s.s. Isolates B31 werden im Folgenden die Genloci der Fibronectin-bindenden Proteine mit *bbk32*, die rekombinanten Proteine entsprechend mit rBBK32 bezeichnet (FRASER et al., 1997). Die Differenzierung der verschiedenen *bbk32*- bzw. rBBK32-Varianten erfolgt in *bbk32*<sub>B31</sub>, *bbk32*<sub>PKa2</sub>, *bbk32*<sub>PHei</sub> und *bbk32*<sub>TN</sub> bzw. rBBK32<sub>B31</sub>, rBBK32<sub>PKa2</sub>, rBBK32<sub>PHei</sub> und rBBK32<sub>TN</sub>.

#### **4.3.1 Klonierung rekombinanter Fibronectin-bindender Proteine verschiedener *B. burgdorferi* sensu lato Spezies**

##### **4.3.1.1 Primer-Design für die Synthese von *bbk32*-Genfragmenten**

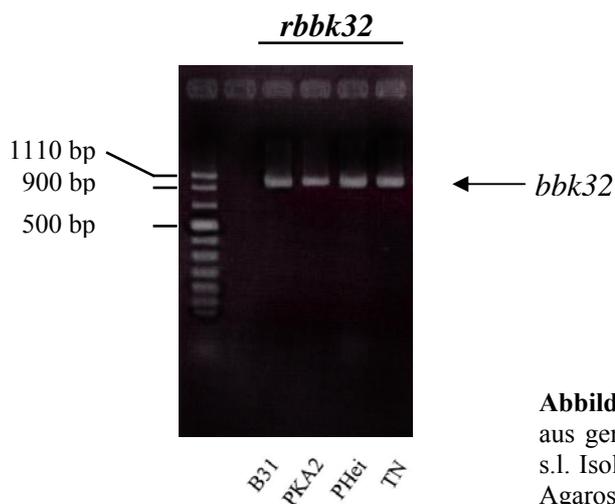
Voraussetzung für die Synthese rekombinanter Fibronectin-bindender Proteine verschiedener *B. burgdorferi* sensu lato Spezies war die Amplifikation eines definierten *bbk32*-cDNA-Fragments aus genomischer DNA der Isolate B31, PKa2, PHei und TN mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

Die PCR-Primer wurden in Anlehnung an bereits veröffentlichte Sequenzdaten gestaltet (vgl. 2.10; FRASER et al., 1997; PROBERT et al., 1998), wobei der für die spezifische Bindung an die Ziel-DNA verantwortliche 3'-OH-Bereich der Oligonukleotide über 24-28 Nukleotide komplementär zur Ziel-DNA ist. Die Bereiche am überhängenden 5'-Ende der Primer beinhalten die Translationssignale ("Start"- und "Stop"-Kodon), sowie Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme (*Bam*HI bzw. *Hind*III) und umfassen jeweils 9 Nukleotide. Mit EDV-Unterstützung (DNA-Man) wurden die Oligonukleotide auf störende intramolekulare Sekundärstrukturen untersucht. Eine entsprechende Optimierung der Sequenzen war nicht erforderlich. Die Bezeichnung der

Oligonukleotide erfolgte nach der Kurzform für das Zielprotein, der Orientierung auf dem Genlokus und der vorgesehenen Restriktionsenzymchnittstelle. Die optimalen Annealing-Temperaturen für die Amplifikationsreaktion wurden empirisch unter Berücksichtigung der Schmelztemperaturen ( $T_m$ ) der Oligonukleotide ermittelt und lagen bei 50°C.

#### 4.3.1.2 PCR-Amplifikation des *bbk32*-Genlokus verschiedener *B. burgdorferi* sensu lato Isolate

Durch Amplifikationsreaktionen der kodierenden Bereiche für Fibronectin-bindendes Protein wurden aus genomischen DNA-Präparationen der *B. burgdorferi* s.s. Isolate B31 und PKa2 (jeweils OspA-Serotyp 1) und der *B. garinii* Isolate PHei (OspA-Serotyp 5) und TN (OspA-Serotyp 6) linearisierte Expressionseinheiten des *bbk32*-Genlokus erzeugt (vgl. 3.9.6, 3.9.9). Zur Überprüfung der amplifizierten DNA wurden die cDNA-Fragmente elektrophoretisch auf Agarosegelen aufgetrennt (vgl. 3.9.1). Für die jeweiligen Amplifikationsreaktionen wurden  $\approx 1,0$  kb große PCR-Produkte bestätigt (vgl. Abbildung 4.3.1). Nach Spaltung der cDNA-Fragmente mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Hind*III (zur Genese Vektor-kompatibler Doppelstrangenden) und anschließender Reinigung mittels Agarosegel-Elektrophorese lagen alle Amplifikate in erwarteter Größe und ausreichender Menge (je ca. 2  $\mu$ g) vor (vgl. 3.9.5, 3.9.3, 3.9.4).



**Abbildung 4.3.1:** *bbk32*-PCR-Amplifikate aus genomischer DNA von 4 *B. burgdorferi* s.l. Isolaten (B31, PKa2, PHei und TN). 1 % Agarose, DNA-Molekulargewichtsstandard II

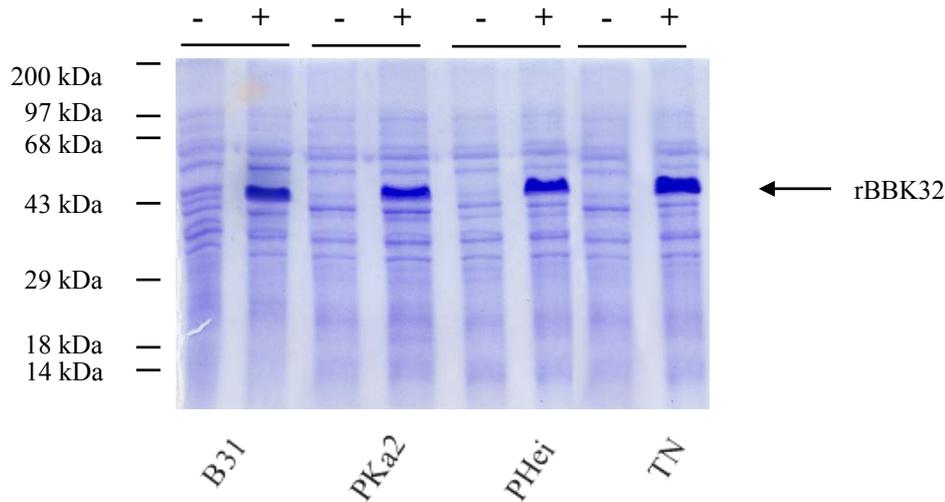
#### 4.3.1.3 Klonierung von *bbk32* in den Expressionsvektor pQE-30

Die cDNA-Fragmente wurden mit dem linearisierten (*Bam*HI und *Hind*III) und dephosphorylierten Expressionsvektor pQE-30 ligiert und in die *E. coli*-Stämme XL1-Blue und SURE<sup>®</sup> transformiert (vgl. 3.9.11). Insgesamt wurden mit der CaCl<sub>2</sub>-Methode durchschnittliche Transformationseffizienzen von 10<sup>7</sup> Transformanten pro µg eingesetzter Plasmid-DNA für *E. coli* XL1-Blue und 10<sup>3</sup> für SURE<sup>®</sup> erzielt. Die Transformationsrate konnte durch Anwendung der Elektroporation nicht gesteigert werden. Durch die molekulare Analyse der Transformanten (vgl. 3.9.11.3.5) wurden je 10 positive Klone für die Klonierung der rekombinanten *bbk32*-Expressionseinheiten der *B. burgdorferi*-Isolate B31, PKa2 und TN in pQE-30 identifiziert, jedoch keine für das PHei-Target.

Die Klonierung der rekombinanten *bbk32*-Expressionseinheit des *B. garinii* Isolates PHei gelang mittels TA-Cloning-Kit unter Verwendung des Vektors pCRII<sup>®</sup> (vgl. 3.9.11.2.1, 3.9.11.3). Da es sich hierbei jedoch nicht um einen Expressionsvektor handelt, wurden nach Transformation der *bbk32*<sub>PHei</sub>-pCRII<sup>®</sup>-Konstrukte, positiv getestete Transformanten in den Expressionsvektor pQE-30 umligiert. Hierzu wurde die *bbk32*<sub>PHei</sub>-Expressionseinheit über die Restriktionsenzymstellen *Bam*HI und *Hind*III mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen aus den *bbk32*<sub>PHei</sub>-pCRII<sup>®</sup>-Konstrukten isoliert, gelelektrophoretisch gereinigt und mit dem Expressionsvektor pQE-30 ligiert (3.9.5, 3.9.3, 3.9.11.2). Nach Transformation der *bbk32*<sub>PHei</sub>-pQE-30-Konstrukte in *E. coli* XL1-Blue wurden 20 positive Klone bestätigt (vgl. 3.9.11.3). Insgesamt konnten somit für alle 4 *bbk32*-Targets (B31, PKa2, PHei und TN) jeweils mindestens 10 *bbk32*-Expressionskonstrukte in XL1-Blue erzeugt werden.

#### 4.3.1.4 Induzierbarkeit der *bbk32*-Transformanten

Transformanten, in denen das erwartete Gen nachgewiesen worden war, wurden im analytischen Maßstab auf Expression untersucht. Die optimale Induktionsdauer und -temperatur wurden empirisch ermittelt. Die Transformanten wurden in Vortesten bei 16 °C, 27 °C bzw. 37 °C für 2, 4, und 18 h (üN) mit IPTG induziert und die Kulturen im SDS-PAGE auf Expression untersucht (vgl. 3.10.2, 3.10.6). Das Expressionsniveau erreichte bei einer Induktionstemperatur von 27 °C bereits 2 h nach Induktionsbeginn ein Maximum, das über die Dauer des Versuches konstant blieb. Abbildung 4.3.2 zeigt die SDS-PAGE Analyse induzierbarer *bbk32*-*E. coli*-Transformanten vor und nach IPTG-Zugabe.



**Abbildung 4.3.2:** SDS-PAGE Analyse induzierbarer *bbk32*-*E. coli*-Transformanten vor und nach IPTG-Induktion. (-) bezeichnet die nicht-induzierten Proben, (+) die induzierten Proben. (SDS-PAGE 12,5 %, Coomassie Brilliant Blue-gefärbt, Protein-Molekulargewichtsstandard (high))

Die Molekülmasse der BBK32-His<sub>6</sub>-Fusionsproteine entsprach unter Berücksichtigung des His<sub>6</sub>-tags, der für die Klonierung kodierenden Bereiche und der Laufeigenschaften von *E. coli*-Ganzzelllysate im SDS-PAGE dem erwarteten Wert von 43-45 kDa.

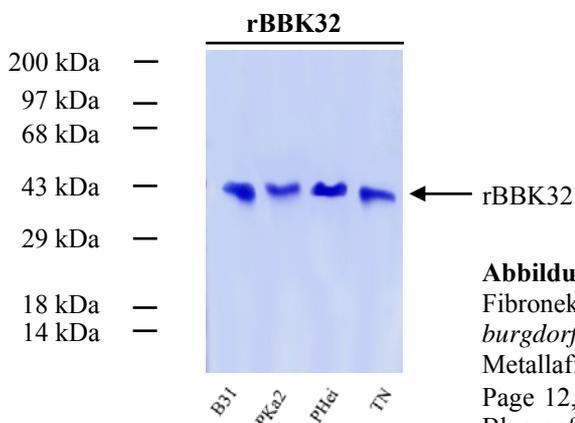
#### 4.3.1.5 Analytische Reinigung von rBBK32

Aus den vorselektionierten Transformanten wurde exemplarisch für die 4 verschiedenen *B. burgdorferi-bbk32* Varianten (B31, PKa2, PHei und TN) je eine induzierbare *E. coli*-Transformante ausgewählt. Für jeden dieser Klone wurde eine präparative Plasmid-Isolierung durchgeführt und das für die *bbk32*-Expressionseinheit kodierende Insert sequenziert (vgl. 3.9.8, 3.9.10). Anschließend wurden die 4 *bbk32*-Varianten nach Anzucht und Induktion (27 °C, 2 h) im analytischen Maßstab mit His Micro Spin Purification Module (Amersham) gereinigt, um den His<sub>6</sub>-tag zu überprüfen (vgl. 3.10.1, 3.10.4.2.1). Die Reinigung der Proteine wurde mittels SDS-PAGE überprüft (vgl. 3.10.6).

#### 4.3.1.6 Präparative Reinigung von rBBK32

Die unter 4.3.1.5 ausgewählten Transformanten wurden im präparativen Maßstab (1 l) kultiviert (Induktion mit IPTG für 2 h bei 27 °C) und unter Anwendung der Durchfluss-French Press die zytoplasmatische *E. coli*-Fraktion isoliert (vgl. 3.10.1, 3.10.3). Die Expression der *bbk32*-Gene wurde mittels SDS-PAGE überprüft (vgl. 3.10.6). Die rekombinanten His<sub>6</sub>-tag Fusionsproteine wurden aus dem Zelllysate über Metallionenaffinitätschromatographie (IMAC) gereinigt und mittels SDS-PAGE analysiert. Die einzelnen IMAC-Eluate wiesen jedoch nach der affinitätschromatographischen Reinigung noch Verunreinigungen durch *E. coli*-Proteine auf.

Im Anschluss an den IMAC-Lauf wurden die Protein-Präparationen wahlweise mittels Anionen- bzw. Kationenaustauscher nachgereinigt. Hierzu wurden die über eine Desalting-Säule entsalzten und umgepufferten IMAC-Eluate an eine Anionenaustauscher- (rBBK32<sub>PKa2</sub> und rBBK32<sub>TN</sub>) bzw. eine Kationenaustauschersäule (rBBK32<sub>B31</sub> und rBBK32<sub>PHei</sub>) gebunden und mit einem linearen Salzgradienten eluiert (vgl. 3.10.4.2.2, 3.10.4.3). Ein Aufkonzentrieren der einzelnen Proben war nicht notwendig, da die verwendeten Expressionsvektoren eine ausgesprochen starke His<sub>6</sub>-Proteinexpression induzierten und die Reinigung mit hoher Effizienz durchgeführt werden konnte. Die Reinheit der 4 verschiedenen Fibronectin-bindenden Proteine wurde durch SDS-PAGE kontrolliert (vgl. 3.10.6). Die SDS-PAGE-Analyse in Abbildung 4.3.3 zeigt die rBBK32-Proteinfraktionen nach affinitäts- und ionenaustauschchromatographischer Reinigung.



**Abbildung 4.3.3:** SDS-PAGE Analyse der rekombinanten Fibronectin-bindenden Proteine (rBBK32) der *B. burgdorferi* s.l. Isolate B31, PKa2, PHei und TN nach Metallaffinitäts- und Ionenaustauschchromatographie. SDS-Page 12,5 %, ca. 3 µg Protein je Spur, Coomassie-Brillant Blue-gefärbt, Protein-Molekulargewichtsstandard high).

Nach der Ionenaustauschchromatographie zeigten die 4 verschiedenen BBK32-Varianten in der Zielfraktion eine homogene Bande. Die Proteinkonzentrationen der Proteinfractionen wurden nach der BRADFORD-Methode bestimmt (vgl. Tabelle 4.3.1) und die Präparationen bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

**Tabelle 4.3.1:** Gegenüberstellung der Proteinkonzentrationen nach präparativer Reinigung der rekombinanten Fibronektin-bindenden Proteine (rBBK32), ermittelt nach der BRADFORD-Methode.

rBBK32	Proteinkonzentration [mg/ml]
B31	2,2
PKa2	2,0
PHei	1,9
TN	1,8

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass für alle 4 BBK32-Varianten die erwarteten Proteine im präparativen Maßstab gereinigt und nach SDS-PAGE nachgewiesen werden konnten.

#### 4.3.2 Sequenzanalysen der *bbk32*-Expressionseinheiten

Die *bbk32*-pQE-30-Konstrukte wurden unter Verwendung der unter 2.10 aufgeführten Sequenzierprimer sequenziert. Um mögliche Fehler der *Taq*-Polymerase auszuschließen, wurden die Sequenzreaktionen mindestens einmal wiederholt. Die Rekonstruktion des Leserahmens und die Übersetzung der Nukleotidsequenz in eine hypothetische Aminosäureabfolge erfolgte ebenso wie die Berechnung der theoretischen Werte für Molekulargewicht und Ladung der jeweiligen *bbk32*-Expressionseinheit (B31, PKa2, PHei bzw. TN) mit Hilfe des Computerprogramms DNA-Man.

Für alle 4 Konstrukte konnte auf vollständige und funktionelle rekombinante BBK32 Protein-Varianten geschlossen werden. Die Nukleinsäuresequenzen und die daraus resultierenden hypothetischen Aminosäureabfolgen sind im Anhang dargestellt (vgl. Abbildung 8.1, 8.2). Die DNA- und Aminosäure-Sequenzen der verschiedenen *bbk32*-Expressionseinheiten wurden mit Hilfe des BLAST-Datensuchprogramms (NIH, Washington) gegen die NCBI-DNA-Datenbank verglichen. Alle 4 *bbk32*-Konstrukte konnten aufgrund der Homologiedaten auf Nukleotid- und entsprechend auf

Aminosäureebene der in der Datenbank hinterlegten korrespondierenden Sequenz des Stammes B31 [Accession No. AE000788 (Nukleotidsequenz) und AAC66134 (AS-Sequenz)] zugeordnet werden. Das im Rahmen dieser Arbeit klonierte *bbk32*<sub>B31</sub>-Konstrukt wies im Datenbankvergleich eine 99,7 % Übereinstimmung mit der veröffentlichten Sequenz auf (vgl. Tabelle 4.3.3).

Der Vergleich der im Rahmen dieser Arbeit rekombinant erzeugten Proteine zeigte für die Isolate B31, PKa2 und TN jeweils eine 335 Aminosäure (AS) lange, bzw. für das Isolat PHei, eine 341 AS lange Aminosäuresequenz.

Die Anzahl der konsekutiven AS und die rechnerisch ermittelten theoretischen Molekulargewichte (MW), isoelektrischen Punkte (IEP) und Ladungen der hydrophilen His<sub>6</sub>-Fusionsproteine sind in Tabelle 4.3.2 aufgeführt. Die 20 AS umfassende Leadersequenz wurde hierbei nicht berücksichtigt.

**Tabelle 4.3.2:** Computerunterstützte Analysen verschiedener rekombinanter Fibronectin-bindender Proteine (rBBK32). Die Berechnungen wurden unter Anwendung des Computerprogramms DNA-Man erstellt.

rBBK32	Anzahl der kon. AS*	theoret. MW [kDa]*	theoret. IEP*	Ladung
B31	335	38,94	5,41	-7,4
PKa2	335	40,28	5,83	-5,22
PHei	341	40,72	5,91	-5,15
TN	335	39,23	5,41	-7,4

\* konsekutive Aminosäuren (kon. AS), theoretische relative Molekülmasse (theoret. MW), theoretischer isoelektrischer Punkt (theoret. IEP).

Die verlängerte AS-Sequenz von rBBK32<sub>PHei</sub>, resultiert aus einer Insertion von insgesamt 18 Nukleotiden. Diese Insertion orientiert sich, wie aus Abbildung 8.1 (siehe Anhang) hervorgeht, gegen das 3'-Ende der *bbk32*-cDNA-Sequenz und ist folglich "downstream" der die Fibronectinbindung vermittelnden Domäne lokalisiert. Der Vergleich der AS-Sequenzen der untersuchten rekombinanten *bbk32*-Expressionseinheiten zeigt vorwiegend für das rekombinante Fibronectin-bindende Protein des *B. garinii*-Isolates PHei zahlreiche Aminosäureaustausche (vgl. Abbildung 8.2, siehe Anhang). Insbesondere innerhalb der "minimal functional binding region", wurden 4 Aminosäureunterschiede, davon ein konservativer AS-Austausch, identifiziert.

In Abbildung 4.3.4 sind die einzelnen "minimal functional binding regions" der 4 rekombinanten BBK32-Proteine einander gegenübergestellt.

---

BBK32 von B31	QGSLNSLSGESGELEEEPIESNEIDLTIIDSLR
BBK32 von PKa2	-----
BBK32 von PHei	k-----k-t----- <u>i</u> -----
BBK32 von TN	-----

---

**Abbildung 4.3.4:** Gegenüberstellung der Aminosäuresequenzen der "minimal functional binding region" (AS 131-162) der rekombinanten rBBK32-Proteine nach PROBERT et al. (2001). Homologe AS sind mit "-", nicht konservative AS-Austausche mit "x" und konservative AS-Austausche mit "x" bezeichnet.

Insgesamt resultieren die Aminosäureaustausche und die variable Anzahl an Aminosäuren in Unterschieden des Molekulargewicht, des IEP und der Ladung der einzelnen His<sub>6</sub>-Fusionsproteine betreffend (vgl. Tabelle 4.3.2).

Tabelle 4.3.3 fasst die Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen der 4, im Rahmen dieser Arbeit rekombinant erzeugten, Fibronectin-bindenden Proteine zusammen.

**Tabelle 4.3.3:** Vergleich der Aminosäuresequenzen der rekombinanten Fibronectin-bindenden Proteine (rBBK32) von B31 (AS 21-355), PKa2 (AS 21-355), PHei (AS 21-361) und TN (AS 21-355).

rBBK32	% Identität*		
	PKa2	PHei	TN
B31	99,40	89,38	99,10
PKa2		89,71	99,70
PHei			89,41

\* Die Identitäten wurden aus den hypothetischen Translationsprodukten der klonierten cDNA-Sequenzen abgeleitet (DNA-Man).

Die Analyse der Sequenzdaten von 7 weiteren *B. burgdorferi* sensu lato-Isolaten aus der Literatur zeigte (Vergleichsdaten nicht dargestellt), dass weder die unterschiedliche

Länge der Genloci noch die Aminosäurevariationen mit der Speziesklassifizierung von *B. burgdorferi* sensu lato in *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* und *B. garinii* oder der OspA-Serotypisierung nach WILSKE et al. (1993a) zu korrelieren scheinen.

### **4.3.3 Proteinchemische Charakterisierung der rBBK32-Varianten**

#### **4.3.3.1 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese**

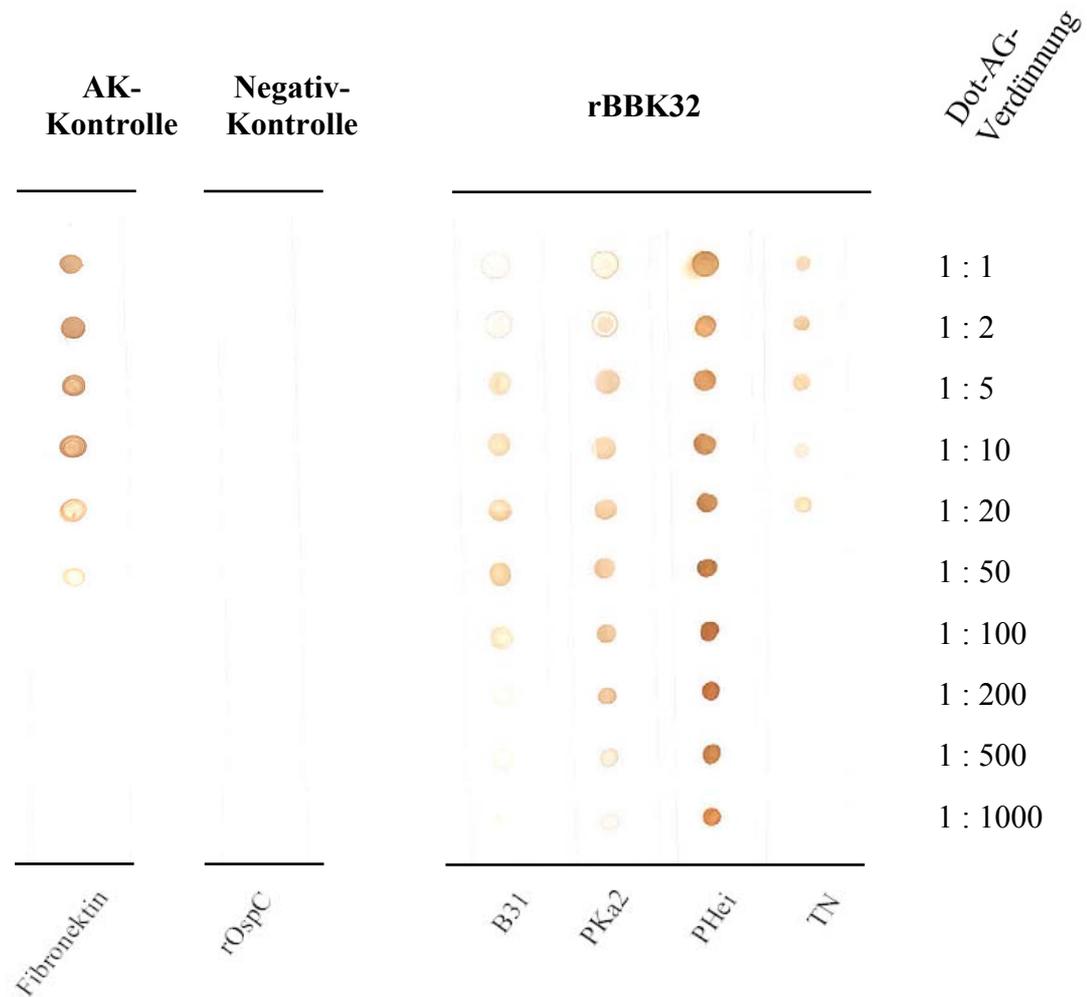
Das rekombinante BBK32-Material aller 4 *B. burgdorferi* s.l. Isolate zeigte in der SDS-Analyse nach der Reinigung mittels Ionenaustauschchromatographie eine homogene Bande bei ca. 40 kDa (vgl. Abbildung 4.3.3). Anzumerken ist, dass sich die Proteinpräparationen nach 2 wöchiger Lagerung bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  meist als zwei eng benachbarte Banden mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 39 und 43 kDa im SDS-PAGE darstellen. Möglicherweise handelt es sich bei der zweiten, kleineren Bande um ein durch Protease-Aktivität erzeugtes Degradationsprodukt des ursprünglichen rekombinanten Proteins.

#### **4.3.3.2 Fibronectin-Bindungsfähigkeit der rBBK32-Varianten**

Um die Fibronectin-Bindungsfähigkeit der gereinigten rekombinanten BBK32-Proteine zu testen, wurden die nativen Proteinpräparationen einheitlich auf eine Proteinkonzentration von 1,8 mg/ml eingestellt und zusammen mit den Kontrollantigenen via Dot-Blot-Technik auf Nitrozellulose aufgebracht (vgl. 3.10.9). Als Kontrollen wurden gereinigtes humanes Fibronectin und OspC, ein Borrelien-spezifisches Outer Surface Protein, ohne bisher beschriebene Fibronectin-Bindungsaktivität, gewählt. Der Dot-Blot wurde über Nacht (üN) mit humanem Fibronectin (finale Konzentration 10  $\mu\text{g/ml}$ ) inkubiert und anschließend, entsprechend dem Standardprotokoll eines Immunnachweises, gebundenes Fibronectin mit einem spezifischen anti-Human-Fibronectin-Antikörper detektiert (vgl. 3.10.10).

Aus Abbildung 4.3.5 geht deutlich hervor, dass alle 4 verschiedenen BBK32-Varianten spezifisch humanes Fibronectin binden. Die Spezifität der Bindung zwischen Dot-AG und Fibronectin wird ebenso, wie die spezifische Reaktivität des verwendeten anti-Fibronectin-Antikörpers, durch die Kontrollen bestätigt. Auffälligerweise weist BBK32 von PHei im Vergleich zum übrigen BBK32-Material eine besonders massive Reaktivität im Immunnachweis auf. Dies könnte ein möglicher Hinweis auf eine vermehrte Bindungsaffinität der verwendeten Dot-AG-Präparation zu humanem Fibronectin sein, die bis hin zur maximalen getesteten Verdünnung des Dot-Antigens

von 1:1000 nicht abnimmt. In wiederholten Analysen mit zwei verschiedenen Protein-Präparationen pro Dot-AG konnte die vermehrte Fibronectin-Bindungsaffinität für rekombinantes BBK32 von PHei bestätigt werden.



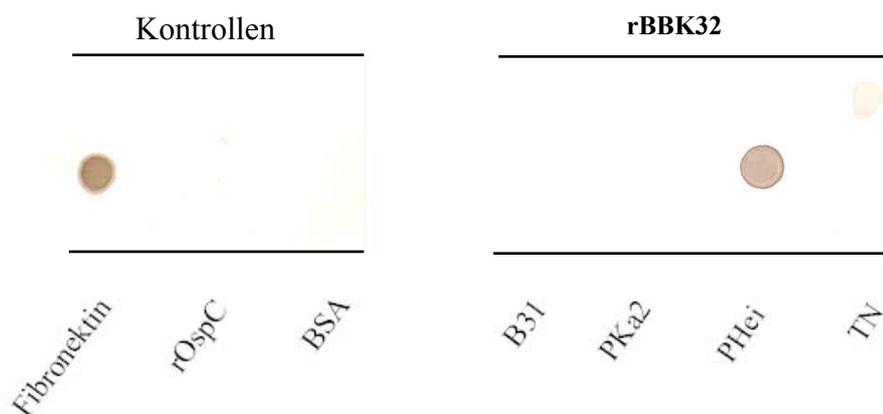
**Abbildung 4.3.5:** Immunoprintanalyse der Fibronectin-Bindungs-fähigkeit der BBK32-Präparationen der *B. burgdorferi s.l.* Isolate B31, PKa2, PHei und TN. Die Dot-AG, humanes Fibronectin, OspC und Fibronectin-bindende Proteine (rBBK32) der *B. burgdorferi s.l.* Isolate B31, PKa2, PHei und TN, wurden in den angegebenen Verdünnungsstufen (1:1=1,8 mg/ml) aufgebracht und die Immunoblots üN mit humanem Fibronectin (finale Konz. 10 µg/ml) inkubiert. Gebundenes Fibronectin wurde anschließend mit anti-Human-Fibronectin-AK und dem entsprechenden POD-Konjugat detektiert.

#### 4.3.3.3 Einfluss von Gelatine auf die Fibronectin-Bindungsfähigkeit der rBBK32-Varianten

PROBERT und JOHNSON (1998) zeigten für das *B. burgdorferi* sensu stricto Isolat B31 die Überschneidung der BBK32-Bindedomäne humanen Fibronectins mit dessen spezifischer Gelatine-Bindedomäne. Im Affinitätsblot war Fibronectin, vorinkubiert mit Gelatine, nurmehr in geringem Maße in der Lage, BBK32 zu binden.

Im Folgenden wurde der Einfluss von Gelatine auf die Fibronectin-Bindungsfähigkeit, der im Rahmen dieser Arbeit klonierten rBBK32-Proteine untersucht, um mögliche Unterschiede der BBK32-Varianten hinsichtlich ihrer Fibronectin-Bindedomänen zu testen.

Die rBBK32-Proteinpräparationen wurden zusammen mit den Kontrollantigenen mittels Dot-Blot-Technik auf Nitrozellulose aufgebracht (vgl. 3.10.9). Als Kontrollen wurden neben gereinigtem humanem Fibronectin, OspC und BSA, beide ohne beschriebene Fibronectin-Bindungsaktivität, gewählt (vgl. 4.3.3.2). Der Dot-Blot wurde über Nacht (üN) mit humanem Fibronectin (finale Konzentration 10 µg/ml) inkubiert, welches mit einer 0,1 %igen Gelatine-Lösung vorbehandelt wurde (45 min, 4 °C). Die Detektion des gebundenen Fibronectins erfolgte entsprechend dem Standardprotokoll eines Immunnachweises unter Verwendung eines spezifischen anti-Human-Fibronectin-Antikörpers (vgl. 3.10.10). In Abbildung 4.3.6 sind die Immunoprintanalysen zur Fibronectin-Bindungsfähigkeit aller getesteten Proben dargestellt.



**Abbildung 4.3.6:** Immunoprintanalyse des Einflusses von Gelatine auf die Fibronectin-Bindungsfähigkeit der rBBK32-Präparationen der *B. burgdorferi* s.l. Isolate B31, PKa2, PHei und TN. Die Dot-AG, humanes Fibronectin, OspC, BSA und Fibronectin-bindende Proteine (rBBK32) der *B. burgdorferi* s.l. Isolate B31, PKa2, PHei und TN wurden mit einer Proteinkonzentration von 1,8 mg/ml aufgebracht. Der Dot-Blot wurde nacheinander mit Gelatine-Lösung (0,1 %) und humanem Fibronectin (finale Konz. 10 µg/ml) jeweils üN inkubiert. Gebundenes Fibronectin wurde anschließend mit anti-Human-Fibronectin-AK und dem entsprechenden POD-Konjugat detektiert.

Abbildung 4.3.6 zeigt, verglichen mit Abbildung 4.3.5, eine deutliche Reduktion der Fibronectin-Bindungsfähigkeit unter dem Einfluss von Gelatine, insbesondere für die rBBK32-Präparationen von B31, PKa2 und TN. Hingegen scheint Gelatine die Bindung humanen Fibronectins an die Variante des *B. garinii* Isolates PHei kaum zu beeinflussen. Die Spezifität der Bindung zwischen Dot-AG und Fibronectin wird ebenso wie die spezifische Reaktivität des verwendeten anti-Fibronectin-Antikörpers durch die Kontrollen bestätigt. Gelatine hemmt somit im Falle von rBBK32<sub>B31</sub>, -PKa2 und -TN die Fibronectin-Bindung der rekombinanten Proteine kompetitiv, während es die Bindung von Fibronectin zu rBBK32<sub>PHei</sub> hingegen nicht inhibiert.

#### 4.3.4 Diagnostische Relevanz der rekombinanten Fibronectin-bindenden Proteine

In einer standardisierten Western Blot-Analyse (vgl. SCHULTE-SPECHTEL et al., 2003) wurden die klonierten rBBK32-Varianten rBBK32<sub>B31</sub>, rBBK32<sub>PKa2</sub>, rBBK32<sub>PHei</sub> und rBBK32<sub>TN</sub> serologisch getestet. Hierzu wurden die gereinigten rBBK32-Präparationen nach einem präparativen SDS-PAGE-Lauf auf Nitrozellulose transferiert und die Western Blots anschließend in 2 mm breite Streifen geschnitten (vgl. 3.10.6, 3.10.8). Jeweils ein Blot-Streifen wurde mit einem ausgewählten Immuserum inkubiert und immunreaktive spezifische anti-BBK32- (bzw. anti-*E. coli*-) Antikörper mit anti-Human-IgG-POD-Konjugat (bzw. anti-Kaninchen-IgG-POD-Konjugat) detektiert (vgl. 3.10.10). Insgesamt wurden in 3 unabhängigen Wiederholungen eine definierte Auswahl an Patienten- und Kontrollseren getestet, bestehend aus 40 Neuroborreliose Stadium II- (NBII-) Patientenseren, 40 Blutspenden, 10 Serumproben mit positivem Rheumafaktor und 9 Serumproben mit positiver Lues-Serologie und einem anti-*E. coli*-Kaninchenserum (vgl. SCHULTE-SPECHTEL et al., 2003). In Tabelle 4.3.4 sind die Ergebnisse der Western Blot-Analyse aufgeführt, die entsprechenden Immunoblots sind nebst semiquantitativer Auswertung im Anhang dargestellt (Abbildung 8.3 und Tabelle 8.10, siehe Anhang).

**Tabelle 4.3.4:** Ergebnisse der Western Blot-Studie mit rekombinanten Fibronectin-bindenden Proteinen der *B. burgdorferi* s.l. Isolate B31, PKa2, PHei und TN.

<b>Sensitivität und Spezifität rekombinanter Western Blots</b>				
<b>Antigen</b>	<b>Sensitivität</b>		<b>Spezifität</b>	
	n=40		n=59	
rBBK32 <sub>B31</sub>	22	55 %	57	97 %
rBBK32 <sub>PKa2</sub>	26	65 %	58	98 %
rBBK32 <sub>PHei</sub>	24	60 %	57	97 %
rBBK32 <sub>TN</sub>	22	55 %	57	97 %
<b>Gesamt</b>	<b>28</b>	<b>70 %</b>	<b>57</b>	<b>97 %</b>

Die Sensitivität der rBBK32-Varianten wurde unter Verwendung eines definierten Neuroborreliose II-Patientenserenpanels (n=40) (vgl. SCHULTE-SPECHTEL et al., 2003), die Spezifität anhand von 59 Kontrollseren, darunter 40 Blutspenden, 10 Serumproben mit positivem Rheumafaktor und 9 Serumproben mit positiver Lues-Serologie bestimmt. Die Gesamtsensitivität bzw. –spezifität resultiert aus dem Vergleich der Einzelsensitivitäten bzw. –spezifitäten. Hierfür wurde jedes Patientenserum bzw. Kontrollserum bestimmt, ob es im Western Blot mit mindestens einem der getesteten Antigene eine rBBK32-spezifische Antikörperreaktion zeigt (Sensitivität) bzw. diese nicht zeigt (Spezifität).

Die Western Blot-Analyse zeigte bei allen getesteten rBBK32-Varianten spezifische IgG-Serumreaktivitäten, wobei für die Proteinvariante rBBK32<sub>PKa2</sub> mit 65 % (26/40 NBII-Patientenseren) die höchste Sensitivität berechnet wurde. Die Proteinpräparation von rBBK32<sub>PHei</sub> wies mit 24 positiven von insgesamt 40 analysierten NBII-Patientenseren eine Sensitivität von 60 % auf, während für rBBK32<sub>B31</sub> und rBBK32<sub>TN</sub> mit 55 % (22/40 NBII-Patientenseren) die insgesamt niedrigste Sensitivität ermittelt wurde. Insgesamt zeigten 14 Seren bei allen 4 getesteten NBII-Patientenseren positive IgG-Serumreaktivitäten, 9 NBII-Seren reagierten mit 3, 4 NBII-Seren mit 2 und 1 NBII-Serum reagierte mit einer rBBK32-Variante. Die Spezifität der Western Blot-Analyse betrug 98 % für rBBK32<sub>PKa2</sub> und jeweils 97 % für die Proteinvarianten rBBK32<sub>B31</sub>, rBBK32<sub>PHei</sub> und rBBK32<sub>TN</sub>, woraus eine Gesamtspezifität von 97 % resultiert. Die Gesamtspezifität resultiert aus den unabhängig voneinander ermittelten Einzelspezifitäten, wobei in 57 der insgesamt 59 getesteten Kontrollseren keine spezifischen Antikörper gegen die rekombinanten BBK32-Varianten nachgewiesen wurden.

Aus den 4 unabhängig voneinander ermittelten Sensitivitätsraten errechnet sich wiederum eine Gesamtsensitivität von 70 %, d.h. in 28 der 40 getesteten NBII-Patientenseren konnten spezifische Antikörper gegen mindestens eine der rekombinanten BBK32-Varianten nachgewiesen werden.

Bewertet man die in Tabelle 4.3.4 aufgeführten Daten bezüglich ihrer statistischen Signifikanz, so ist der Sensitivitätsunterschied zwischen den Immunoblotergebnissen aller vier getesteter rBBK32-Proteinvarianten statistisch nicht signifikant ( $\chi^2$ -Test,  $p > 0,05$ ). Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die 4 rekombinanten Fibronektin-bindenden Proteine unter Berücksichtigung der entsprechenden Fragestellung durchaus zu diagnostischen Zwecken herangezogen werden können.

Die unter 4.3.3.1 beschriebene Degradierung der rBBK32-Präparationen beeinflusste das Ergebnis der serologischen Studie nicht. Sofern sich die Antigene im SDS-PAGE-Lauf in zwei Fraktionen mit unterschiedlichem Molekulargewicht trennten (Analyse mittels Coomassie-Kontrollfärbung), konnten sowohl der 39 kDa-, als auch der 43 kDa-Bande identische IgG-Serumreaktivitäten zugeordnet werden (vgl. Abbildung 8.3, siehe Anhang).

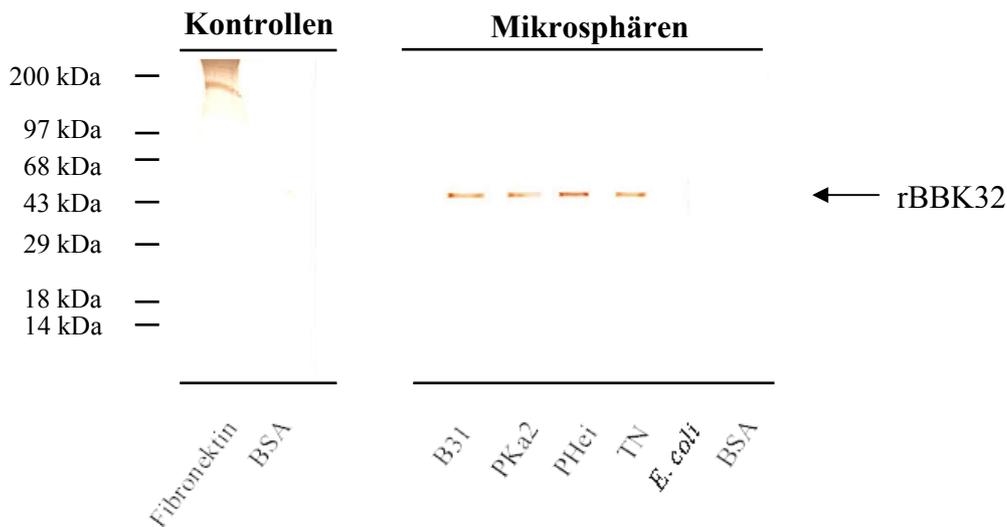
Die Inkubation der Immunoblotstreifen mit dem anti-*E. coli*-Kontrollserum weist in allen getesteten rBBK32-Präparationen auf Reste verunreinigender *E. coli* Proteine hin. Die spezifischen Reaktivitäten der Patientenseren mit den rekombinanten Fibronektin-bindenden Proteinen wurden dadurch jedoch nicht in Frage gestellt, da das anti-*E. coli*-Kontrollserum ausschließlich mit Proteinen reagierte, die aufgrund ihres Molekulargewichts nicht mit den jeweiligen getesteten rBBK32-Protein übereinstimmten.

#### 4.3.5 Zellbiologische Experimente

Die Analysen der AS-Sequenzen haben, wie bereits erläutert, Unterschiede zwischen den einzelnen, im Rahmen dieser Arbeit hergestellten rekombinanten Fibronektin-bindenden Proteinen, insbesondere innerhalb der "minimal functional binding region", aufgezeigt. Mit Hilfe geeigneter Mikrosphären, konjugiert mit dem gereinigten BBK32-Material, sollten nun in zellbiologischen Experimenten mit verschiedenen Säugerzell-Modellsystemen mögliche Auswirkungen dieser strukturellen Unterschiede auf die Zellbindungsaffinität der Protein-Varianten untersucht werden (vgl. 3.5). Die qualitative, wie quantitative Erfassung der einzelnen Bindungsaffinitäten erfolgte hierbei unter Anwendung von Immunfluoreszenztechniken (vgl. 3.7.4, 3.7.6, 3.7.8).

#### 4.3.5.1 Beschichtung der Mikrosphären

Die rekombinant hergestellten Fibronectin-bindenden Proteine wurden auf Mikrosphären mit einer speziellen Carboxyl-Oberflächenmodifizierung aufgebracht (vgl. 3.10.11). Die Beschichtung wurde mit einem Immunnachweis kontrolliert, wobei der Nachweis kovalent gebundenen rBBK32-Materials in Ermangelung eines spezifischen anti-BBK32-Antikörpers indirekt über die Bindung humanen Plasmafibronektins, erfolgte (vgl. 4.3.3.2). Hierzu wurden rBBK32-konjugierte Mikrosphären zusammen mit den Kontrollmikrosphären und den Kontrollantigenen Fibronectin und BSA im SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert (vgl. 3.10.11, 3.10.6, 3.10.8). Die Verwendung eines reduzierenden Probenpuffers bewirkte hierbei zusammen mit den denaturierenden SDS-PAGE-Bedingungen ein Ablösen der Antigene von den Mikrosphären und erlaubte somit die Auftrennung aller getesteten Antigene gemäß ihres spezifischen Molekulargewichts. Die Kontrollmikrosphären wurden mit BSA bzw. *E. coli*-Lysat konjugiert, um in den nachfolgenden Koinkubationsexperimenten mit Säugerzellen die Spezifität der Mikrosphären-vermittelten Zellbindungsaffinität bzw. den möglichen Einfluss verunreinigenden *E. coli*-Materials zu untersuchen. Der Western Blot wurde über Nacht (üN) mit humanem Fibronectin (finale Konzentration 10 µg/ml) inkubiert und anschließend gebundenes Fibronectin mit einem spezifischen anti-Human-Fibronectin-Antikörper detektiert (vgl. 3.10.10). Insgesamt ermöglicht der Western Blot neben dem indirekten Nachweis einer spezifischen rBBK32-Beschichtung der Mikrosphären zusätzlich den Nachweis einer spezifischen Bindung von Fibronectin an rBBK32 und bestätigt weiterhin die spezifische Reaktivität des verwendeten anti-Human-Fibronectin-Antikörpers. Die Ergebnisse der Immunoprintanalyse sind in Abbildung 4.3.7 dargestellt.



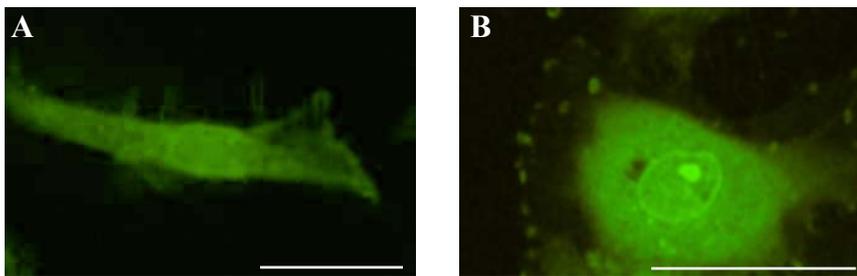
**Abbildung 4.3.7:** Immunnachweis der kovalenten Bindung rekombinanten BBK32-Materials an carboxylmodifizierte Mikrosphären. Die Mikrosphären wurden mit rBBK32<sub>B31</sub>, rBBK32<sub>PKa2</sub>, rBBK32<sub>PHei</sub> und rBBK32<sub>TN</sub> beschichtet und ebenso wie die *E. coli*-Lysat- bzw. BSA-konjugierten Kontrollmikrosphären und den Kontrollantigenen BSA und Fibronectin im SDS-PAGE 12,5 % (Molekulargewichtsstandard, high) aufgetrennt. Der Western Blot wurde nach Transfer der Antigene in mit humanem Plasmafibronektin (Endkonzentration 10 µg/ml) inkubiert und anschließend gebundenes Fibronectin mit anti-Human-Fibronektin-AK und dem entsprechenden POD-Konjugat detektiert.

Wie aus Abbildung 4.3.7 deutlich hervorgeht, zeigen ausschließlich diejenigen Mikrosphären, die mit den 4 verschiedenen BBK32-Varianten konjugiert wurden, eine spezifische anti-Human-Fibronektin-Antikörper vermittelte Substratreaktivität und bestätigen somit indirekt die Kopplung der rBBK32-Proteine an die Mikrosphären. Der unter 4.3.7 dargestellte Western Blot zeigt hierbei für das rBBK32<sub>PHei</sub>-Mikrosphärenkonjugat eine gegenüber den übrigen rBBK32-konjugierten Mikrosphären etwas stärkere Fibronektin-Bindungskapazität, die in einem Kontrollversuch (Daten nicht gezeigt) bestätigt wurde. Die *E. coli*-Lysat- und BSA-markierten Kontrollmikrosphären wiesen hingegen keinerlei anti-Human-Fibronektin-Antikörper vermittelte Immunreaktion auf. Die Kontrollmikrosphären konnten folglich kein humanes Plasmafibronektin binden. Die Konjugation der Kontrollmikrosphären mit *E. coli*-Lysat bzw. BSA wurde anhand eines indirekten Immunfluoreszenztests mit einem anti-*E. coli*-Kaninchenserum bzw. einem anti-BSA-Antiserum bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Die in Abbildung 4.3.7 gezeigten Kontrollen bestätigen neben der Spezifität der Bindung zwischen rBBK32 und Fibronektin, die spezifische Reaktivität des anti-Human-Fibronektin-Antikörpers.

#### 4.3.5.2 Nachweis von Fibronektin auf Säugerzellen

Mittels indirekter Immunfluoreszenz wurden die adhärent wachsenden Zellen auf vorhandenes Fibronektin untersucht. Eine Unterscheidung zwischen zelleigenem und möglicherweise durch das Kulturmedium (Fibronektin ist ein wichtiger Serumbestandteil) an die Zellen gebundenes Fibronektin war allerdings nicht möglich. Das Glykoprotein wurden mit einem spezifischen anti-Fibronektin-Antikörper und einem entsprechenden anti-IgG-FITC-Konjugat visualisiert und die Zellkulturpräparate mittels Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert (vgl. 3.7.3, 3.7.6, 3.7.8).

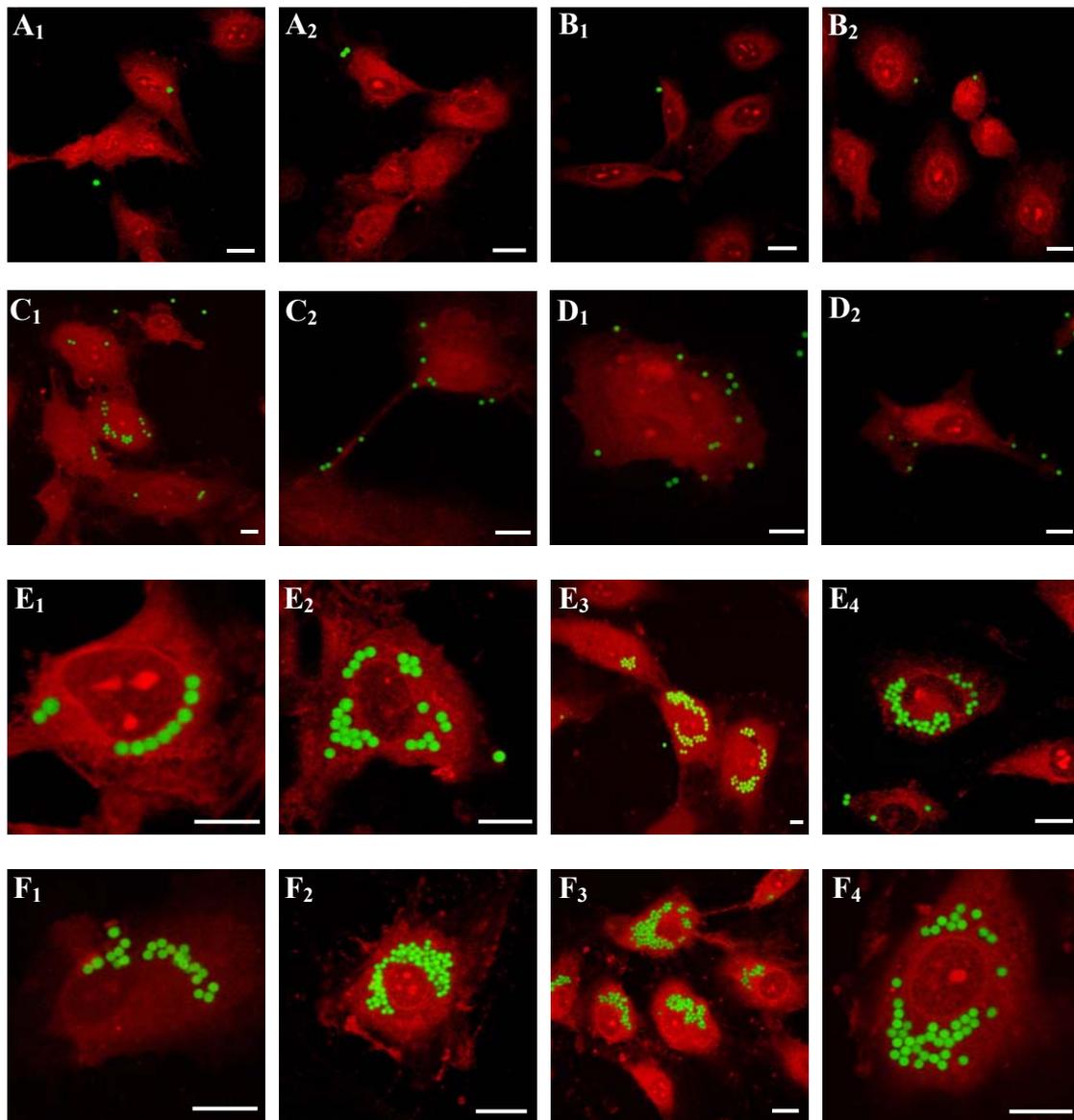


**Abbildung 4.3.8:** Immunfluoreszenzdarstellung von Fibronektin auf 1321N1 (A) und HUVEC (B). Markierung mittels eines spezifischen anti-Fibronektin-Antikörpers und dem entsprechenden anti-IgG-FITC-Konjugat. Der weiße Balken repräsentiert 5  $\mu\text{m}$ .

Die Fluoreszenzpräparate (vgl. Abbildung 4.3.8) zeigten spezifisch angefarbte Fibronektinfasern auf den Zellen, insbesondere an der Zellperipherie und an vorhandenen Ausläufern. Bevorzugt war kondensiertes Fibronektin in Arealen von Zell-Zell-Kontakten lokalisiert. Insgesamt scheinen immortalisierte neuronale Zellen im Gegensatz zu den getesteten endothelialen Zellen weniger intensive Fibronektin-vermittelte Immunfluoreszenzsignale aufzuweisen. Einen Rückschluss auf eine verminderte Expression zellulären Fibronektins der neuronalen Zellen im Vergleich den endothelialen Zellen erlaubt diese semiquantitative Versuchsanordnung allerdings nicht. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die verwendeten Zellkultursysteme für den Nachweise Fibronektin-vermittelter Bindungsaffinitäten in nachfolgenden Experimente geeignet sind, wenngleich jedoch nicht zwischen zelleigenem und zellfremden Fibronektin unterschieden werden konnte.

#### 4.3.5.3 Zellbindungsaffinitäten der rBBK32-Varianten

Die rBBK32-konjugierten Mikrosphären wurden mit verschiedenen, auf Deckgläschen kultivierten, adhärent wachsenden Zelltypen koinkubiert und die Anzahl gebundener Mikrosphären (= mittlere Anzahl gebundener Mikrosphären  $\pm$  Standardabweichung) durch das Auszählen der Präparate im konventionellen Fluoreszenzmikroskop ermittelt. Ein Haften der verschiedenen rBBK32-konjugierten Mikrosphären an der Oberfläche der unbehandelten Coverslips bzw. deren Gelatine- oder Kollagen-Beschichtung (wichtig bei Koinkubation mit CRL-2480-Zellen bzw. HUVEC) konnte in Vorversuchen ausgeschlossen werden. Hierzu wurden die entsprechend präparierten Deckgläschen mit den verschiedenen Mikrosphärenpräparationen für 90 min inkubiert (vgl. 3.5) und die Präparate im Immunfluoreszenzmikroskop analysiert (vgl. 3.7.4, 3.7.6, 3.7.8). Somit war die grundlegende Voraussetzung für die qualitative wie quantitative Analyse der Zellbindungsaffinität der BBK32-Varianten gewährleistet. Als Kontrollgruppen wurden, wie bereits beschrieben, *E. coli*-Lysat- bzw. BSA-konjugierte Mikrosphären verwendet. Abbildung 4.3.9 zeigt die Bindung der verschiedenen Mikrosphären an die getesteten Säugerzellen.



**Abbildung 4.3.9:** Bindung von *E. coli*-Lysat-, BSA- bzw. rBBK32-konjugierten Mikrosphären an verschiedene Säugerzellen. Die Koinkubationsdauer betrug 90 min, MOI 50:1). Die Säugerzellen wurden mittels Alexa Phalloidin 568 gegen F-Aktin und die Mikrosphären mittels anti-*E. coli*-Kaninchenserum (K54), anti-BSA-Kaninchenserum bzw. rBBK32-reaktiven Humansen (vgl. 3.7.4) und einem entsprechenden anti-IgG-FITC visualisiert. Dargestellt sind Overlays aus jeweils 4 laser scanning Bilddateien. Die weißen Balken repräsentieren jeweils 10µm.

**A<sub>1</sub>:** *E. coli*-markierte Mikrosphären, adhätierend an 1321N1-Zellen

**A<sub>2</sub>:** *E. coli*-markierte Mikrosphären, adhätierend an HUVEC

**B<sub>1</sub>:** BSA-markierte Mikrosphären, adhätierend an 1321N1-Zellen

**B<sub>2</sub>:** BSA-markierte Mikrosphären, adhätierend an HUVEC

**C<sub>1</sub>:** rBBK32\_B31-markierte Mikrosphären, adhätierend an HUVEC

**C<sub>2</sub>:** rBBK32\_B31-markierte Mikrosphären, adhätierend an 1321N1-Zellen

**D<sub>1</sub>:** rBBK32\_TN-markierte Mikrosphären, adhätierend an ECV304-Zellen

**D<sub>2</sub>:** rBBK32\_TN-markierte Mikrosphären, adhätierend an 1321N1-Zellen

**E<sub>1</sub>- E<sub>4</sub>:** rBBK32\_PKa2-markierte Mikrosphären, adhätierend an HUVEC (**E<sub>1</sub>**), ECV304-Zellen (**E<sub>2</sub>**), 1321N1-Zellen (**E<sub>3</sub>**) und CRL-2480 (**E<sub>4</sub>**)

**F<sub>1</sub>- F<sub>4</sub>:** rBBK32\_PHei-markierte Mikrosphären, adhätierend an HUVEC (**F<sub>1</sub>**), ECV304-Zellen (**F<sub>2</sub>**), 1321N1-Zellen (**F<sub>3</sub>**) und CRL-2480 (**F<sub>4</sub>**)

In ersten Untersuchungen wurden verschiedene Mikrosphärenkonzentrationen von 10:1, 20:1, 50:1, 100:1 und 500:1 Mikrosphären/Zelle getestet (vgl. 3.5, 3.7.4, 3.7.6, 3.7.8). In Anlehnung an die Phagozytoseexperimente mit Borrelien und um gleichzeitig die Auszählbarkeit der Präparate zu gewährleisten, wurde für die weiteren Versuche ein Inokulum von 10 Mikrosphären pro Zelle gewählt.

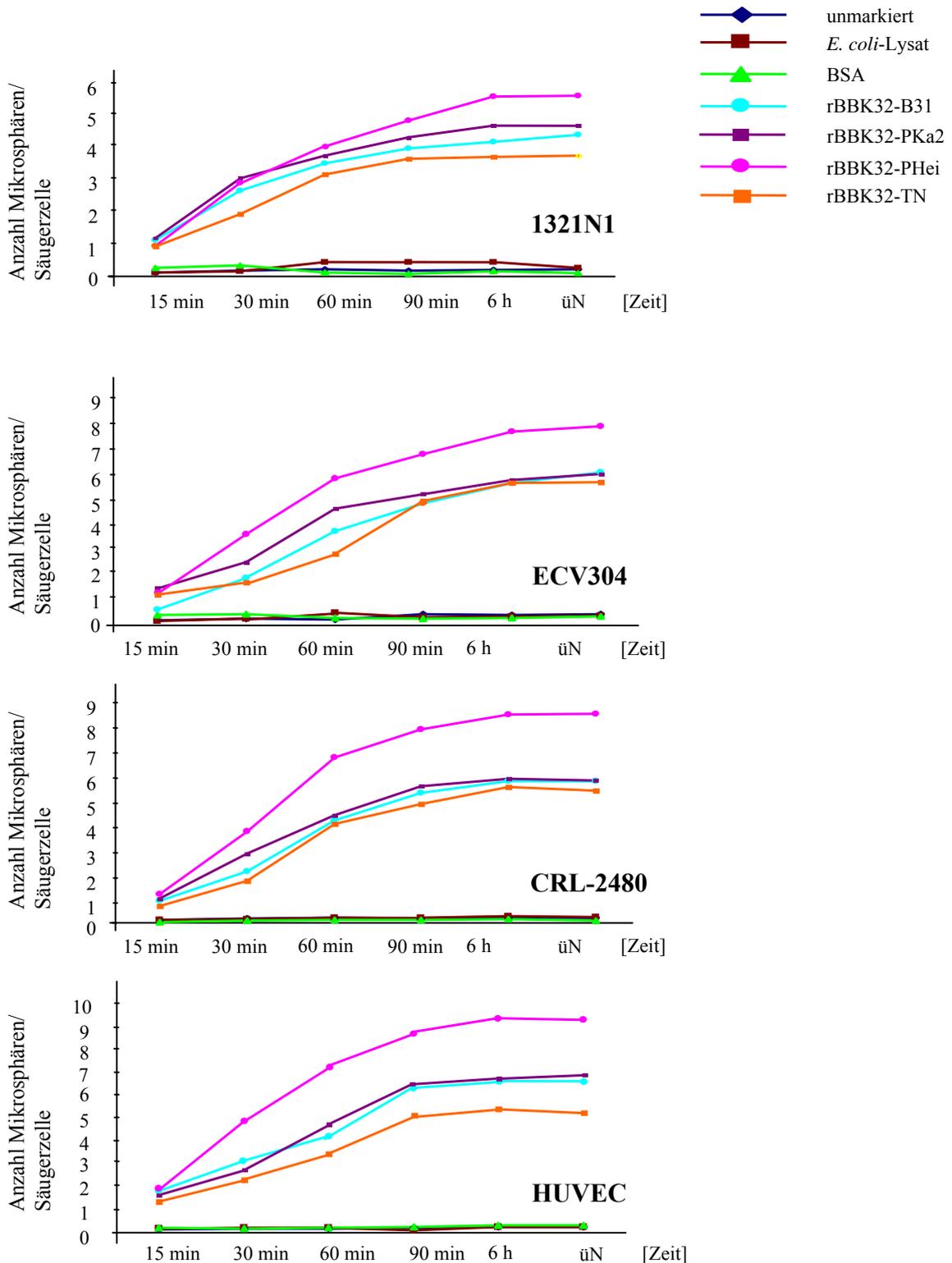
In einer Zeitreihe mit Koinkubationszeiträumen zwischen 15 Minuten und 18 Stunden wurden die spezifischen Zellbindungsaffinitäten der Fibronektin-bindenden Proteine der *B. burgdorferi* s.l.-Isolate B31, PKa2, PHei und TN indirekt, d.h. anhand der mittleren Anzahl gebundener Mikrosphären pro Zelle, für jeden getesteten Zelltyp ermittelt und graphisch dargestellt (vgl. Abbildung 4.3.10). Die Experimente wurden in 3 Wiederholungen in Doppel- bzw. Trippelansätzen pro Zelltyp durchgeführt. Gezählt wurden pro Präparat 30 Gesichtsfelder (GF). Die Gesamtzahl der gebundenen Mikrosphären eines GF wurde auf Mikrosphären pro Zelle berechnet, diese gemittelt und die jeweiligen Standardabweichungen ermittelt (vgl. 3.7.6, 3.7.8). Die einzelnen Zeitwerte sind in tabellarischer Form im Anhang dargestellt (vgl. Tabelle 8.5, siehe Anhang).

Abbildung 4.3.10 veranschaulicht mit mittleren Werten von 0,11-0,44 ( $\pm$  0,07-0,27) gebundenen Mikrosphären pro Zelle sehr deutlich die Vernachlässigbarkeit der Affinitäten der Kontrollmikrosphären zu den verschiedenen neuronalen und endothelialen Säugerzellen. Dadurch konnte für alle Koinkubationsexperimente und jeden Zeitwert die Spezifität der Bindung zwischen rBBK32-konjugierten Mikrosphären und dem jeweiligen getesteten Zelltyp bestätigt werden.

Im zeitlichen Verlauf zeigten alle getesteten rBBK32-Varianten einen linearen Anstieg der zellassoziierten Mikrosphären innerhalb des Zeitraumes von 15-60 bzw. 90 Minuten. Bei länger andauernden Koinkubationen (> 90 Minuten) wurde ein Sättigungswert mit stagnierender Anzahl gebundener Mikrosphären erreicht.

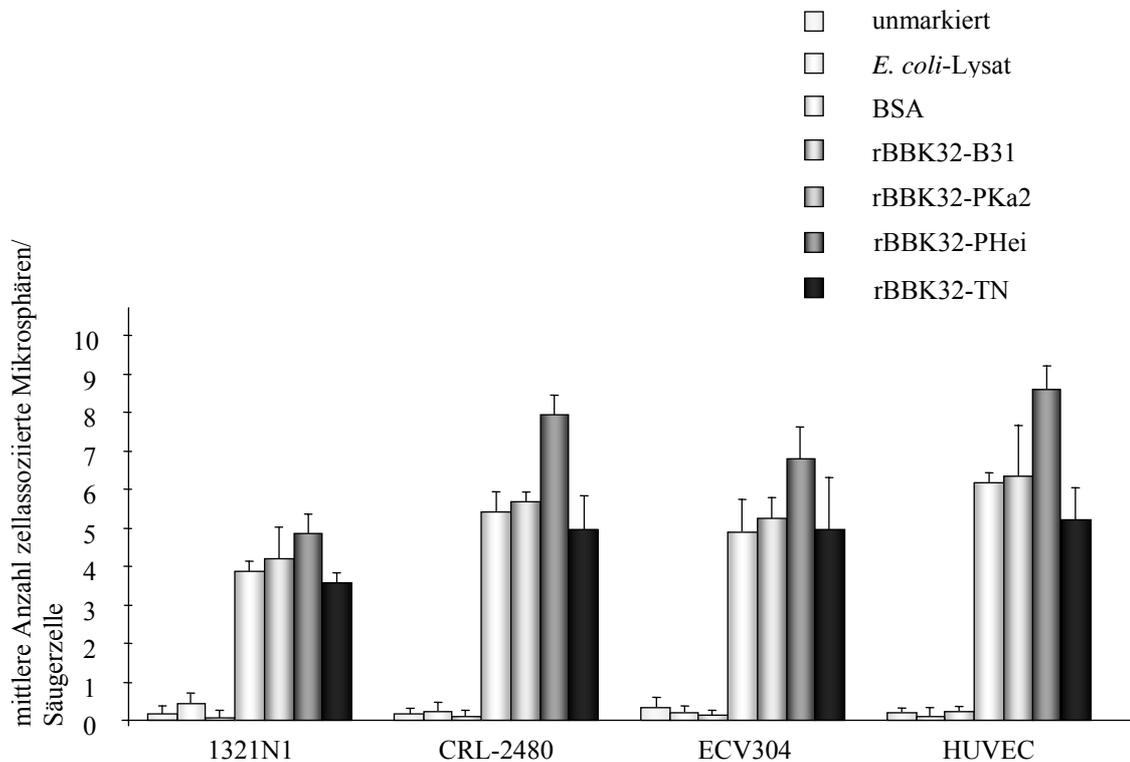
Insgesamt zeigte der Vergleich der Zellbindungsaffinitäten von rBBK32<sub>B31</sub>-, rBBK32<sub>PKa2</sub>- und rBBK32<sub>TN</sub>-gekoppelten Mikrosphären vergleichbare Ergebnisse für jeden beliebigen Zeitwert. Innerhalb dieser Gruppe wiesen die rBBK32<sub>TN</sub>-Mikrosphären die geringste Bindungsaffinität auf, wobei die Differenzen zu den rBBK32<sub>B31</sub>- und rBBK32<sub>PKa2</sub>-Mikrosphären jedoch nicht signifikant waren. Dies ist möglicherweise auf die vergleichsweise geringe Stabilität des gereinigten Proteins zurückzuführen: das getestete rBBK32-Material des *B. garinii*-Isolates TN neigte, gemessen an den übrigen Proteinpräparationen, am stärksten zur Bildung von Spaltprodukten. Die höchste

Affinität zu allen getesteten Zelltypen wiesen die rBBK32<sub>PHei</sub>-Mikrosphären auf. Insgesamt war deren erhöhte Affinität unter den getesteten endothelialen Zelltypen gegenüber allen anderen rBBK32-Varianten zu jedem Zeitwert signifikant ( $p < 0,05$ ). Im Falle der neuronalen Astrozytomzelllinie 1321N1 waren nur gegenüber den rBBK32<sub>TN</sub>-Mikrosphären signifikant mehr rBBK32<sub>PHei</sub>-Mikrosphären zellassoziiert. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Affinität der rBBK32<sub>PHei</sub>-Mikrosphären zu jedem Zeitwert höher gegenüber den übrigen rBBK32-konjugierten Mikrosphären war. Der Unterschied war statistisch stets signifikant (Fisher's Exakt Test,  $p < 0,05$ ).



**Abbildung 4.3.10:** Zeitreihe über die Zellbindungsaffinitäten der einzelnen rBBK32-konjugierten Mikrosphären unter Verwendung von 1321N1-, ECV304-, CRL-2480- Zellen und HUVEC. Getestet wurden wie angegeben nach 15, 30, 60, 90 min, 6 h und 18 h (üN), wobei die Abszisse den Zeitverlauf repräsentiert und die Ordinate die Anzahl der zellassoziierten Mikrosphären in absoluten Zahlen. Inokuliert wurden 10 Mikrosphären pro Zelle. Die Signifikanzen wurden unter Anwendung des Fisher's Exakt Tests ( $p$ -Wert  $< 0,05$ ) berechnet. Als Kontrollen wurden neben unmarkierten, *E. coli*-Lysat- und BSA-konjugierte Mikrosphären verwendet.

Abbildung 4.3.11 zeigt die aus Abbildung 4.3.10 extrahierten 90 Minuten-Werte in Form eines Säulendiagramms, um die Differenzen zwischen den unterschiedlich konjugierten Mikrosphären zu veranschaulichen. Die Ergebnisse wurden getrennt nach getestetem Zelltyp aufgeschlüsselt.

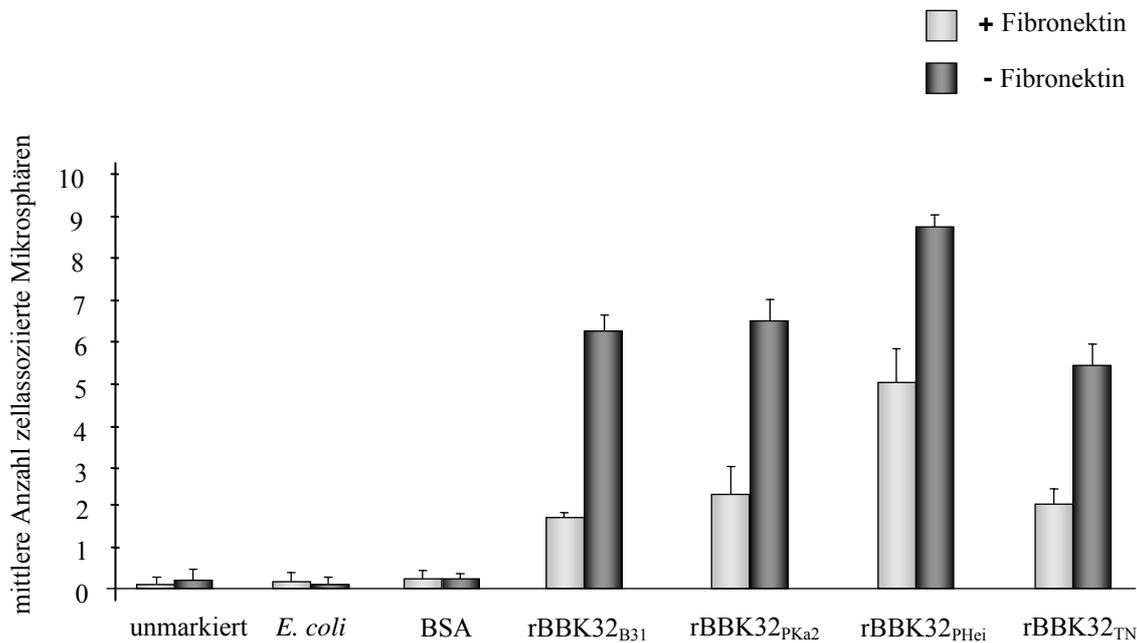


**Abbildung 4.3.11:** Zellbindungsaffinitäten der einzelnen rBBK32-konjugierten Mikrosphären unter Verwendung von 1321N1-, ECV304-, CRL-2480-Zellen und HUVEC. Die Abszisse repräsentiert die verschiedenen Zelltypen und die Ordinate die mittlere Anzahl der zellassozierten Mikrosphären in absoluten Zahlen nach 90 min Koinkubation (MOI 10:1). Als Kontrollen wurden neben unmarkierten, *E. coli*-Lysat- und BSA-konjugierte Mikrosphären verwendet.

Insgesamt zeichnet sich ein signifikanter Unterschied in der Zellbindungsaffinität des rekombinanten BBK32-Materials zwischen neuronalen und endothelialen Säugerzellmodellen ab, wobei die rBBK32 konjugierten Mikrosphären effektiver an endotheliales, als an neuronales Gewebe binden. Dies könnte möglicherweise auf das unter 4.3.5.2 (vgl. Abbildung 4.3.8) beschriebene verminderte Fibronectin-Vorkommen auf den getesteten neuronalen Zellen zurückzuführen sein. Weniger effizient ist im Falle der getesteten endothelialen Zellen die Bindung der Mikrosphären an immortalisierte Zellen im Vergleich zu primär isolierten Nabelschnurzellen, wobei die Differenzen statistisch nicht signifikant sind (Fisher's Exakt Test,  $p > 0,05$ ).

#### **4.3.5.4 Einfluss von humanem Plasmafibronektin auf die Zellbindungsaffinität der rBBK32-Varianten**

Basierend auf den Ergebnissen, den Einfluss von Fibronektin auf das Fibronektin-Bindungsverhalten von BBK32 des *B. burgdorferi* sensu stricto Isolates B31 betreffend (PROBERT und JOHNSON, 1998), wurden die Zellbindungsaffinität der verschiedenen rBBK32-Mikrosphären unter Einwirkung von humanem Plasmafibronektin exemplarisch an HUVEC untersucht. Hierzu wurden die rBBK32-konjugierten Mikrosphären, bzw. die Kontrollmikrosphären (unmarkiert, *E. coli*-Lysat- bzw. BSA-konjugiert) 45 min bei RT mit humanem Plasmafibronektin inkubiert (Konzentration 10 µg/ml, in Anlehnung an PROBERT und JOHNSON, 1998 ) und anschließend 3-mal mit PBS gewaschen. Die Mikrosphären wurden anschließend, wie bereits unter 4.3.5.3 beschrieben, mit einer Ratio von 10 Mikrosphären pro Zelle inokuliert und die Präparate nach 90 minütiger Koinkubation ausgewertet (vgl. 3.5, 3.7.4, 3.7.6, 3.7.8). Der Effekt humanen Fibronektins auf die Zellbindungsaffinitäten wurde indirekt über die Anzahl der gebundenen Mikrosphären pro Zelle quantifiziert und die Ergebnisse in Form eines Säulendiagramms graphisch dargestellt (vgl. Abbildung 4.3.12). Die Experimente wurden in 3 Wiederholungen in Doppel- bzw. Trippelansätzen pro Zelltyp durchgeführt. Gezählt wurden pro Präparat 30 Gesichtsfelder (GF). Die Gesamtzahl der gebundenen Mikrosphären eines GF wurde auf Mikrosphären pro Zelle berechnet, diese gemittelt und die jeweiligen Standardabweichungen ermittelt. Die einzelnen Zeitwerte sind in tabellarischer Form im Anhang dargestellt (vgl. Tabelle 8.6, siehe Anhang). Angegebene Signifikanzen wurden mit dem Fisher's Exakt Test ( $p < 0,05$ ) berechnet.



**Abbildung 4.3.12:** Einfluss von humanem Plasmafibronektin auf die Zellbindungsaffinitäten der einzelnen rBBK32-konjugierten Mikrosphären an HUVEC. Auf der Abszisse sind die verschiedenen Mikrosphären-Konjugate mit, bzw. ohne Plasmafibronektinbehandlung einander gegenübergestellt, während die Ordinate die mittlere Anzahl der zellassozierten Mikrosphären in absoluten Zahlen nach 90 min Koinkubation (MOI 10:1) repräsentiert. Als Kontrollen wurden neben unmarkierten, *E. coli*-Lysat- und BSA-konjugierte Mikrosphären verwendet.

Wie aus Abbildung 4.3.12 deutlich hervorgeht, übt Fibronectin keinerlei Einfluss auf die Zellbindungsaffinitäten der *E. coli*-Lysat- und BSA-markierten Kontrollmikrosphären an HUVEC aus.

Hingegen resultiert die Behandlung der einzelnen rBBK32-markierten Mikrosphären mit Plasmafibronektin in einer Reduktion der mittleren Anzahl zellassoziierter Mikrosphären um den Faktor 2-3. Hierbei ist der inhibitorische Effekt humanen Plasmafibronektins auf die Bindungsaffinität von rBBK32<sub>B31</sub>-, rBBK32<sub>PKa2</sub>- und rBBK32<sub>TN</sub>-markierten Mikrosphären am stärksten. Am geringsten wird die Zellbindungsaffinität der rBBK32<sub>PHei</sub>-konjugierten Mikrosphären durch humanes Plasmafibronektin inhibiert. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass humanes Plasmafibronektin die Zellbindungsaffinitäten aller getesteten rBBK32-Varianten auf statistisch signifikantem Niveau reduziert.

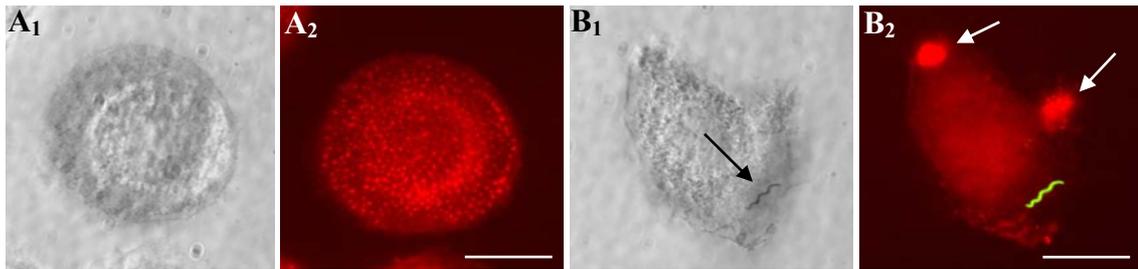
#### **4.4 Interaktion von *B. burgdorferi* sensu lato mit phagozytierenden Zellen**

In Experimenten mit primären humanen Makrophagen wurden Veränderungen des zellulären Zytoskeletts professioneller Phagozyten während der Internalisierung von *B. burgdorferi* s.l. durch primäre humane Makrophagen untersucht. Neben der morphologischen Charakterisierung der dabei beobachteten Phagozytosestrukturen, galt es deren Genese *in vitro* zu standardisieren, um anschließend die Regulation und die molekularen Zusammenhänge bei der Modulation des Zytoskeletts der Fresszellen qualitativ und quantitativ zu analysieren. Von besonderem Interesse war hierbei neben wichtigen zentralen Regulatoren des F-Aktins, WASp und Arp2/3 Komplex, die Rolle der Rho-Familie der GTPasen Rho, Rac und CDC42Hs bei der Aufnahme des Erregers der Lyme-Borreliose durch die Makrophagen.

##### **4.4.1 Morphologische Charakterisierung des Interaktionsprozesses**

In Untersuchungen zur Interaktion von *B. burgdorferi* sensu lato mit primären humanen Makrophagen wurden mögliche Veränderungen des zellulären Zytoskeletts der Fresszellen während der Internalisierung der Spirochäten untersucht.

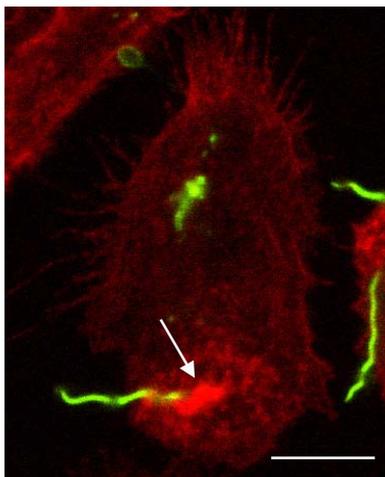
Primäre humane Makrophagen wurden mit *B. burgdorferi* s.s. Stamm N40 (*log*-Phase Borrelien, MOI 10:1) infiziert und die Interaktion der Spirochäten mit den professionellen Phagozyten mittels Phasenkontrastmikroskopie und Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht (vgl. 3.4.3.1, 3.7.3, 3.7.6). Das universelle Protokoll zur indirekten Immunfluoreszenzmarkierung Borrelien-spezifischer und intrazellulärer Makrophagen-Strukturen wurde dabei an die jeweilige Fragestellung angepasst. Die Bakterien wurden im indirekten IFT mit Antikörpern gegen das Oberflächenproteine OspA (L32 1F11) und dem entsprechenden Fluoreszenzkonjugat, die infizierten Makrophagen direkt mit Alexa Phalloidin 568 gegen F-Aktin dargestellt. Die Interaktion mit Spirochäten führt bei primären humanen Makrophagen zu extensiven Veränderungen von Zelloberfläche und -form (vgl. Abbildung 4.4.1). Nicht-infizierte Zellen sind durch eine kreisrunde Morphologie und zahlreiche homogen verteilte Podosomen (= punktförmige, F-Aktin-reiche, hoch-dynamische Adhäsionsstrukturen) charakterisiert (vgl. Abbildung 4.4.1, **A**). Infizierte Zellen sind demgegenüber meist stark kontrahiert und weisen sog. *ruffles* auf, während podosomale Anheftungspunkte fast vollständig dissoziieren (vgl. Abbildung 4.4.1, **B**<sub>2</sub>).



**Abbildung 4.4.1:** Darstellung primärer humaner Makrophagen vor und nach Infektion mit *B. burgdorferi sensu lato*. Die Präparate wurden vor (**A**) und 10 min nach (**B**) Infektion mit N40 fixiert und mit Alexa Phalloidin 568 (rot) gegen F-Aktin und mit FITC (grün) gegen L32 1F11 (anti-OspA) markiert. **A<sub>1</sub>** und **B<sub>1</sub>** zeigen Phasenkontrast-, **A<sub>2</sub>** und **B<sub>2</sub>** die korrespondierenden Fluoreszenzaufnahmen. Eine einzelne adhärenente Borrelie ist in **B<sub>1</sub>** mit einem schwarzen Pfeil, kontraktile F-Aktin Filamente sind in **B<sub>2</sub>** mit weißen Pfeilen gekennzeichnet. Die weißen Balken repräsentieren jeweils 10 µm.

*Ruffles* bezeichnen in diesem Zusammenhang Verdichtungen des Aktinzytoskeletts entlang der Plasmamembran oder deren Ausstülpungen.

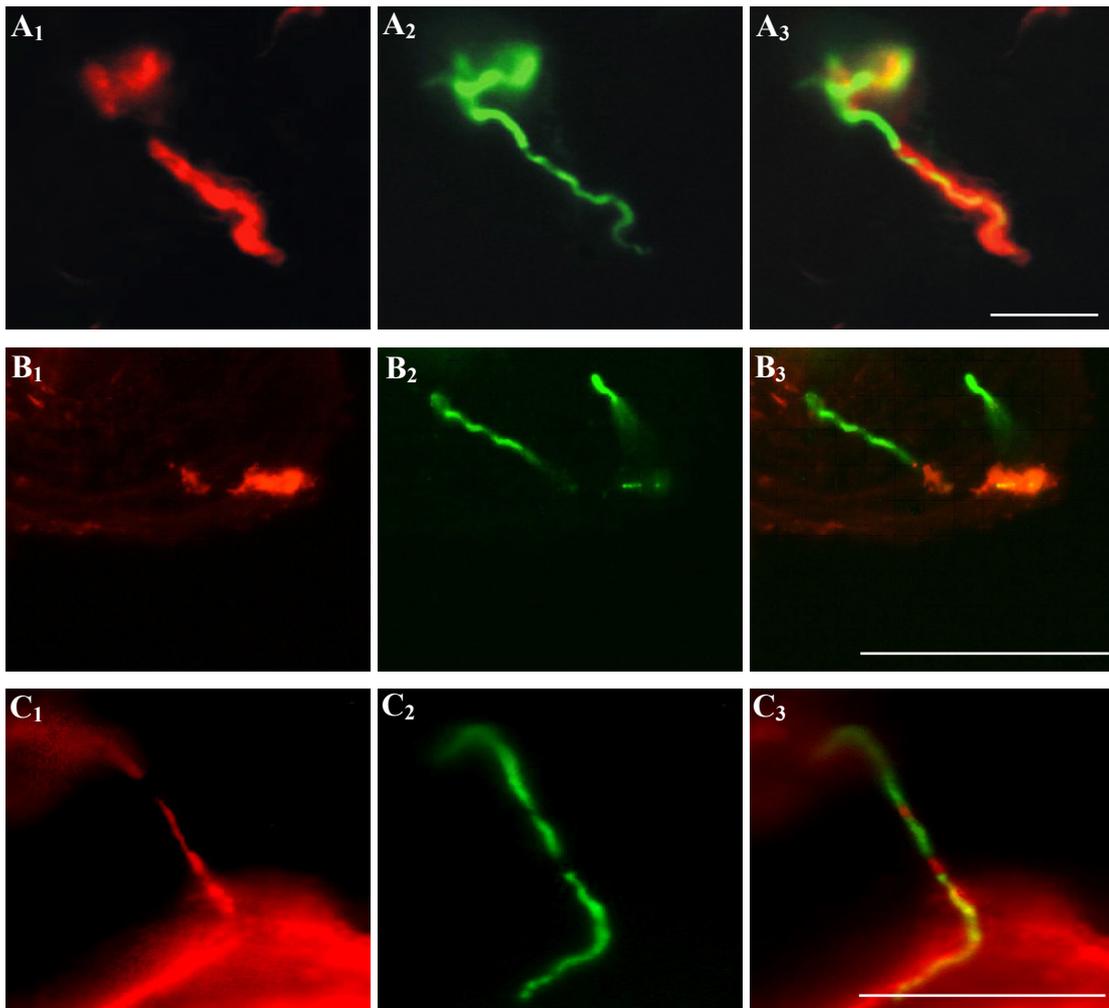
Die Spirochäten heften sich vorwiegend *end-on* an die Phagozyten (vgl. Abbildung 4.4.2). Die Bakterienzellen sind hierbei mit ihrer *proximalen* Spitze unmittelbar mit prominenten F-Aktin-Akkumulationen in Form unilateraler Pseudopodien assoziiert, wobei *proximal* das dem Makrophagen zugewandte, *distal* das vom Makrophagen abgewandte Ende der Spirochäte bezeichnet (vgl. Abbildung 4.4.2).



**Abbildung 4.4.2:** Apikale Ansicht eines Makrophagen mit adhärenenten Borrelien. Insgesamt wurden 16 horizontale Schnitte superpositioniert. Der Makrophage ist mit Alexa Phalloidin 568 gegen F-Aktin, die Borrelien (PKo97 K37) sind mit FITC gegen L32 1F11 (anti-OspA) markiert. Der weiße Pfeil kennzeichnet eine prominente F-Aktin-reiche Struktur. Der weiße Balken repräsentiert 10µm.

Die Mehrheit der untersuchten Makrophagen ( $66,1 \% \pm 17,7 \%$  bei  $n=100$ ), zeigten massive F-Aktin-Akkumulationen, die sich von der Oberfläche der Wirtszelle hin zur interagierenden Borrelie ausdehnten und deren proximalen Teil umhüllten.

Abbildung 4.4.3 zeigt in den Bildabfolgen A-C einzelne Bakterienzellen, assoziiert mit F-Aktin-reichen Strukturen, die im Folgenden auch als Coiling-Pseudopodien bezeichnet werden. Hierzu wurden primäre humane Makrophagen mit dem *B. burgdorferi* Stamm N40 infiziert, nach 45 min fixiert und mit Alexa Phalloidin 568 (**A**<sub>1</sub>, **B**<sub>1</sub> und **C**<sub>1</sub>) gegen F-Aktin und mit FITC (**A**<sub>2</sub>, **B**<sub>2</sub> und **C**<sub>2</sub>) gegen L32 1F11 (anti-OspA) fluoreszenzmarkiert.

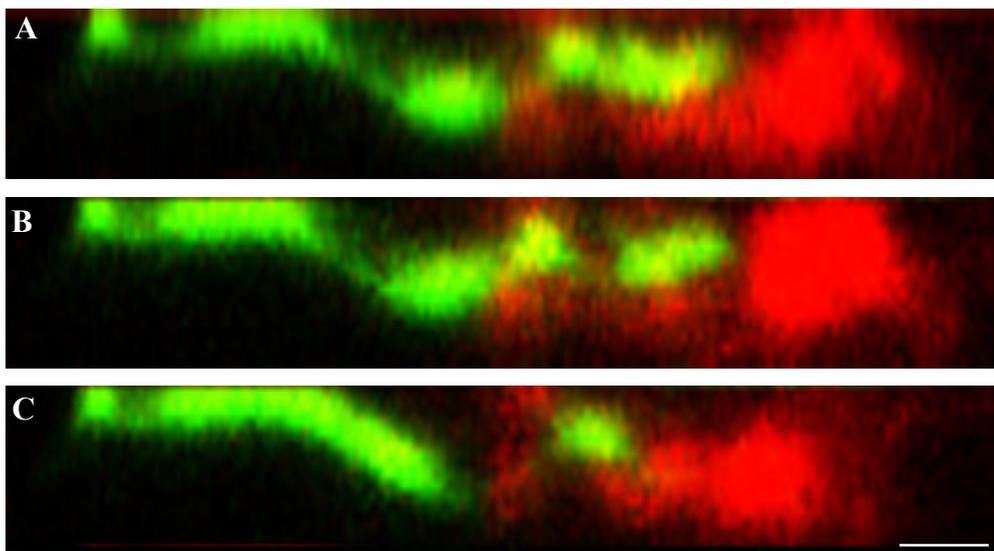


**Abbildung 4.4.3:** Darstellung Borrelien-induzierter Phagozytosestrukturen. Makrophagen wurden mit Alexa Phalloidin 568 (**A**<sub>1</sub>, **B**<sub>1</sub> und **C**<sub>1</sub>) und Borrelien (N40) mit FITC (**A**<sub>2</sub>, **B**<sub>2</sub> und **C**<sub>2</sub>) gegen L32 1F11 (anti-OspA) markiert. **A**<sub>3</sub>, **B**<sub>3</sub> und **C**<sub>3</sub> sind Superpositionen von **A**<sub>1</sub> und **A**<sub>2</sub> bzw. **B**<sub>1</sub> und **B**<sub>2</sub>, bzw. **C**<sub>1</sub> und **C**<sub>2</sub>. Die weißen Balken repräsentieren jeweils 10  $\mu$ m.

Die beschriebenen F-Aktin-Akkumulationen innerhalb der Borrelien-induzierten Phagozytosestrukturen kolokalisieren abschnittsweise mit den zellassozierten Borrelien (vgl. Abbildung 4.4.3, Overlay **A**<sub>3</sub>, **B**<sub>3</sub> und **C**<sub>3</sub>). Das Alternieren von Arealen intensiver F-Aktin Färbung (rot) mit Bereichen starker OspA-Fluoreszenz (grün) weist auf eine zelluläre Struktur hin, welche die einzelne, interagierende Borrelie zu umwickeln scheint.

Mit Hilfe digitaler Bildbearbeitung der konfokalen Laser-Scanning Fluoreszenzaufnahmen (vgl. 3.7.7) konnte die räumliche Verteilung der F-Aktin Akkumulation innerhalb eines Coiling-Pseudopodiums virtuell rekonstruiert werden.

Abbildung 4.4.4 zeigt virtuell erzeugten Transversalschnitte (Schnittfolge **A-C**) durch die in Abbildung 4.4.4 dargestellte Phagozytosestruktur als Superpositionen der F-Aktin- und OspA-Fluoreszenzaufnahmen. Die Koinkubationspräparate wurden hierzu 45 min nach Infektion mit PKo97 K37 fixiert und mit Alexa568-Phalloidin gegen F-Aktin und mit FITC gegen L32 1F11 (anti-OspA) markiert. Dargestellt ist ein unilaterales Pseudopodium, das typischerweise als F-Aktin-reiche Struktur aus dem Makrophagen hervorstößt und sich um die assoziierte Borrelie wickelt. Die F-Aktin-Akkumulation ist hierbei an der proximalen Spitze der Spirochäte, der initialen Kontaktstelle zwischen Bakterienzelle und Phagozyt, am massivsten und gleicht in diesem Bereich morphologisch einer Falte.



**Abbildung 4.4.4:** Darstellung massiver F-Aktin-Akkumulationen innerhalb eines Borrelien-induzierten Coiling-Pseudopodiums. Die Superpositionen **A**, **B** und **C** sind virtuell erzeugte Transversalschnitte aus jeweils insgesamt 16 horizontalen Schnitten und zeigen den Makrophagen und die Borrelie (N40) markiert mit Alexa Phalloidin 568 gegen F-Aktin bzw. FITC gegen L32 1F11 (anti-OspA). Der weiße Balken repräsentiert 1 µm.

Die wulstartige zelluläre Ausstülpung umschließt den proximalen Teil des interagierenden Bakteriums nur lose, während sie sich zur distalen Spitze der Spirochäte hin verjüngt und diese eng umfasst. Korrespondierend mit den alternierenden Fluoreszenzintensitäten von F-Aktin- (rot) und OspA-Färbung (grün) sind einzelne Windungen der phagozytierten Spirochäten entweder zutiefst in F-Aktin-Falten eingebettet (vgl. Abbildung 4.4.4, **B**), oder an der Oberfläche des Coiling-Pseudopodiums exponiert (vgl. Abbildung 4.4.4, **C**).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass primäre humane Makrophagen während der Phagozytose von *B. burgdorferi* s.l. unilaterale Pseudopodien ausbilden. Diese so genannten Coiling-Pseudopodien sind durch eine massive Kondensation von F-Aktin charakterisiert. Zellassozierte Borrelien werden von diesen F-Aktin-reichen zellulären Strukturen umwickelt, um schließlich von der phagozytierenden Zelle internalisiert zu werden.

#### **4.4.2 Standardisierung der Genese von Coiling-Pseudopodien**

Um molekulare Zusammenhänge der Aktin-Zytoskelett-Reorganisation während der Coiling-Phagozytose von *Borrelia burgdorferi* sensu lato qualitativ und quantitativ besser charakterisieren zu können, wurde die Genese der zu untersuchenden F-Aktin-reichen Strukturen standardisiert.

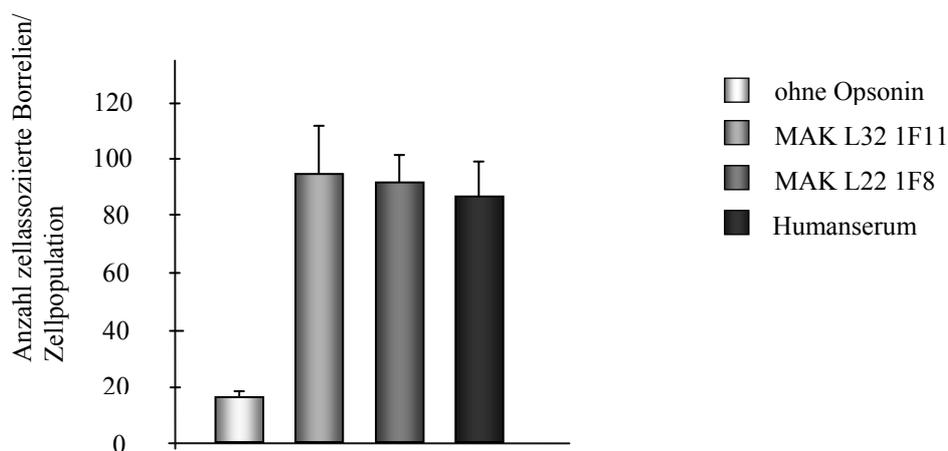
##### **4.4.2.1 Auswahl der Borrelienspezies**

In Vorversuchen wurden primäre humane Makrophagen mit den Borrelienspezies *B. burgdorferi* sensu lato Stamm N40, *B. afzelii* Stamm PKo, *B. afzelii* Klon PKo97 K37 und *B. garinii* Stamm PBi infiziert und die Präparate auf Formation von F-Aktin-reichen Strukturen hin analysiert. Die Ergebnisse waren hinsichtlich Morphologie und Genese der F-Aktin-reichen Aufnahmestrukturen identisch. Für die Durchführung aller nachfolgenden Experimente zur Interaktion von Borrelien mit primären humanen Makrophagen wurde der humanpathogenen *B. afzelii* Klon PKo97 K37 ausgewählt. Entscheidend war hierbei insbesondere die massive Expression der outer surface Proteine OspA und OspC, die für die Darstellung der Borrelien im IFT von Bedeutung waren (vgl. 4.1.1.1) sowie die gegenüber den anderen Vertretern der Gruppe *B. burgdorferi* sensu lato kürzere Generationszeit.

#### 4.4.2.2 Optimierung der Strukturgenese

Bei ersten Experimenten mit nicht-opsonierten Borrelien (MOI 10:1; Koinkubationsdauer 45 min) wurde eine mittlere Anzahl adhärenter Bakterien von 0-3 pro Makrophage ermittelt (vgl. Abbildung 4.4.5). Die daraus resultierende mittlere Anzahl an Coiling-Pseudopodien pro Makrophage betrug 0 bis maximal 2. Für statistische Auswertungen war dies ein zu geringer Wert.

Um die Anzahl der F-Aktin-reichen Phagozytosestrukturen zu erhöhen, wurden, wie unter 3.4.1 beschrieben, *log*-Phase Borrelien mit dem Borrelien-spezifischen monoklonalen Antikörper L32 1F11 (= anti-OspA) oder L22 1F8 (= anti-OspC) oder mit Komplement in Form von Humanserum opsoniert und anschließend mit primären humanen Makrophagen koinkubiert. Nach Immunfluoreszenzmarkierung der Präparate mit Alexa Phalloidin 568 und DAPI wurde im konventionellen Fluoreszenzmikroskop die Anzahl der F-Aktin-reichen Phagozytosestrukturen pro Zellpopulation (=30 Makrophagen) ermittelt (vgl. 3.7.3 und 3.7.6). Die Resultate wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben (vgl. 3.7.8). Für jeden Wert wurden insgesamt 90 Zellen (je 30 Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten) ausgewertet. Signifikanzen wurden im zweiseitigen Student's *t* Test mit  $p$ -Wert  $< 0,05$  berechnet. In Abbildung 4.4.5 sind die mittleren Zahlen zellassoziierter Borrelien unter Berücksichtigung der verschiedenen Opsonierungsformen graphisch dargestellt. Die einzelnen Werte sind in tabellarischer Form im Anhang dargestellt (vgl. Tabelle 8.7, siehe Anhang).



**Abbildung 4.4.5:** Darstellung der mittleren Anzahl zellassoziierter Borrelien unter Berücksichtigung verwendeter Opsonine. Die Balken repräsentieren die angegebenen Opsonine. Die Anzahl der F-Aktin-reichen Phagozytosestrukturen pro Zellpopulation (=30 Makrophagen) wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben.

Insgesamt konnte durch die Verwendung opsonierender Agenzien die Rate der zellassozierten Borrelien durchschnittlich um den Faktor 4-5 erhöht werden (vgl. Abbildung 4.4.5). Die Anzahl der F-Aktin-reichen Strukturen stieg entsprechend auf 1-4 pro Makrophage (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Rate Borrelien-induzierter F-Aktin-reicher Phagozytosestrukturen durch Verwendung opsonierender Agentien signifikant erhöht wurde. Beide Opsonierungsformen, Borrelien-spezifische IgGs und Komplement (humanes Serum), führten bezüglich Morphologie und Proteingehalt der F-Aktin-reichen Strukturen zu äquivalenten Ergebnissen. Da unspezifische Opsonierung mit Komplement mehr der *in vivo* Situation einer Erstinfektion mit *B. burgdorferi* entspricht, wurden alle Versuche zur Coiling-Phagozytose mit Serum-opsonierten Borrelien durchgeführt.

#### **4.4.2.3 Optimierung des Koinkubationszeitraumes**

Aufgrund der nicht-synchronisierten Versuchsanordnung (vgl. 3.4.3) wurde in einer Zeitreihe die Anzahl F-Aktin-reicher Strukturen in Abhängigkeit von der Koinkubationsdauer ermittelt. Erste F-Aktin-reiche Strukturen traten 10 Minuten nach Inokulation auf, ein Maximum an Coiling-Pseudopodien wurde bei einem Koinkubationszeitraum von 45 Minuten erreicht. Nach Koinkubationszeiträumen >45 Minuten waren erste Borrelien bereits vollständig durch die Phagozyten internalisiert. Koinkubationen zur Quantifizierung Borrelien-induzierter F-Aktin-reicher Strukturen wurden daher, sofern nicht anders angegeben, 45 Minuten nach Infektion fixiert.

#### **4.4.3 Molekulare Charakterisierung der Coiling-Pseudopodien**

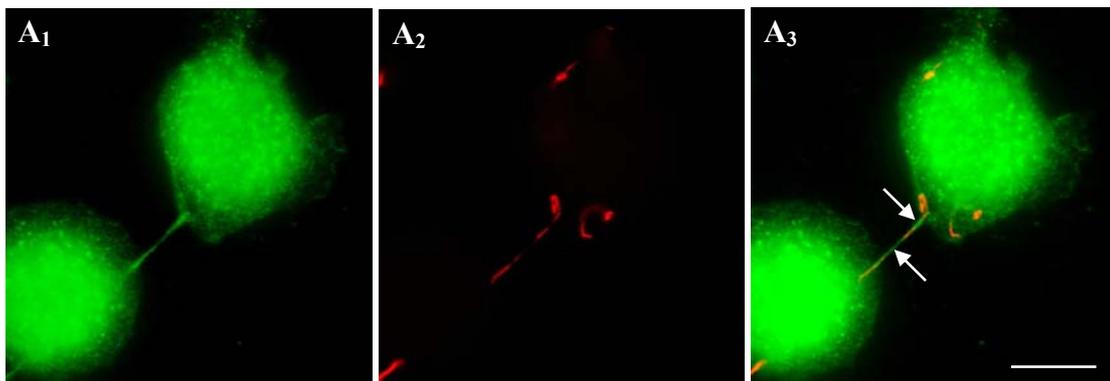
Die Ausbildung der Coiling-Pseudopodien während der Phagozytose von *B. burgdorferi* s. l. erfordert ein Rearrangement des Aktin-Zytoskeletts, welches mit F-Aktin-Polymerisations- und -Depolymerisationsprozessen einhergeht.

Um molekulare Zusammenhänge und mögliche Besonderheiten der F-Aktin-Regulation während des Prozesses der Coiling-Phagozytose zu untersuchen, sollte eine mögliche Beteiligung von WASp und Arp2/3 Komplex an der Entstehung der F-Aktin-reichen Strukturen, den Coiling-Pseudopodien, überprüft werden. Zudem wurde eine mögliche Rekrutierung der kleinen GTPase Rac in die Regionen der F-Aktin-Akkumulationen untersucht. Hierfür wurden Präparate Borrelien-infizierter primärer humaner

Makrophagen in Doppelfluoreszenzfärbungen gegen OspA und WASp bzw. p41-arc (= eine Untereinheit des Arp2/3 Komplexes) bzw. Rac gefärbt.

#### 4.4.3.1 Die Beteiligung von Rac1/2 an der Genese der Coiling-Pseudopodien

Bereits 10 Minuten nach Infektion resultierte die Koinkubation der primären Makrophagen mit PKo97 K37 in der Rekrutierung von Rac1/2 in die Borrelien-induzierten Aufnahmestrukturen. In allen untersuchten Präparaten kolokalisierte die kleine Rho-GTPase hierbei mit den Bakterien über den gesamten Bereich der zellulären Phagozytosestrukturen hinweg und war innerhalb des einzelnen Coiling-Pseudopodiums homogen verteilt. In Abbildung 4.4.6 ist eine einzelne Borrelien interagierend mit zwei Makrophagen dargestellt. Das Präparat wurde 45 min nach Inokulation von PKo97 K37 fixiert, mit FITC gegen anti-Rac1/2 (**A<sub>1</sub>**) und mit Phycoerytherin gegen L32 1F11 (anti-OspA) (**A<sub>2</sub>**) fluoreszenzmarkiert und im konventionellen Fluoreszenzmikroskop analysiert (vgl. 2.13, 3.7.3 und 3.7.6).

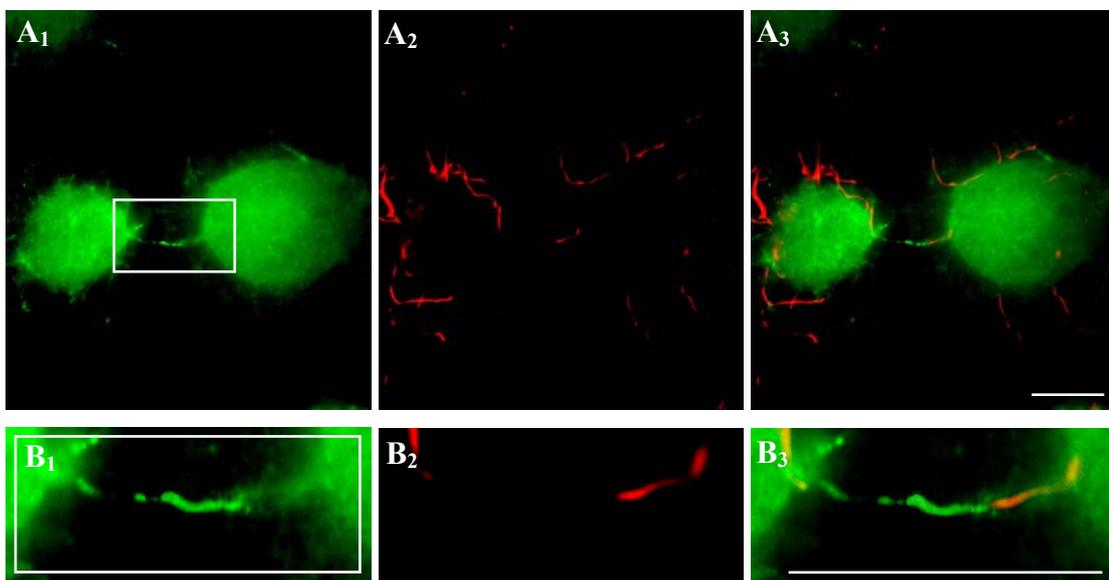


**Abbildung 4.4.6:** Rekrutierung der kleinen Rho-GTPase Rac1/2 in Coiling-Pseudopodien. Das Präparat wurden 45 min nach Inokulation von *B. burgdorferi* fixiert und mit FITC gegen anti-Rac1/2 (**A<sub>1</sub>**) und mit Phycoerytherin gegen L32 1F11 (anti-OspA) (**A<sub>2</sub>**) markiert. Im Overlay (**A<sub>3</sub>**) sind die alternierenden Fluoreszenzen von akkumuliertem Rac1/2, gekennzeichnet durch Pfeile sowie OspA dargestellt. Der weiße Balken repräsentiert 15 µm.

Neben der homogenen Kondensation der Rho GTPase Rac innerhalb der F-Aktinreichen Phagozytosestruktur fallen insbesondere in Darstellung **A<sub>3</sub>** (Abbildung 4.4.6) die wechselseitigen Fluoreszenzintensitäten von Borrelien und kolokalisierenden Rac1/2-Akkumulationen auf (vgl. Abbildung 4.4.6 **A<sub>3</sub>**, Pfeil). Dies stützt die plastische Vorstellung einer sich um die Borrelien schlingenden zellulären Phagozytosestruktur.

#### 4.4.3.2 Die Beteiligung von WASp an der Genese der Coiling-Pseudopodien

Für die Untersuchung einer möglichen Beteiligung des Effektorproteins WASp an der Genese der Coiling-Pseudopodien wurden die Makrophagenpräparate 45 min nach Infektion mit PKo97 K37 fixiert, mit FITC gegen anti-WASp und mit Phycoerytherin gegen L32 1F11 (anti-OspA) fluoreszenzmarkiert und im konfokalen Laser Scanning Fluoreszenzmikroskop analysiert (vgl. 2.13, 3.7.3 und 3.7.6). Insgesamt konnte in allen untersuchten Präparaten die Rekrutierung von WASp in die Borrelien-induzierten Aufnahmestrukturen optisch dargestellt werden (vgl. Abbildung 4.4.7).

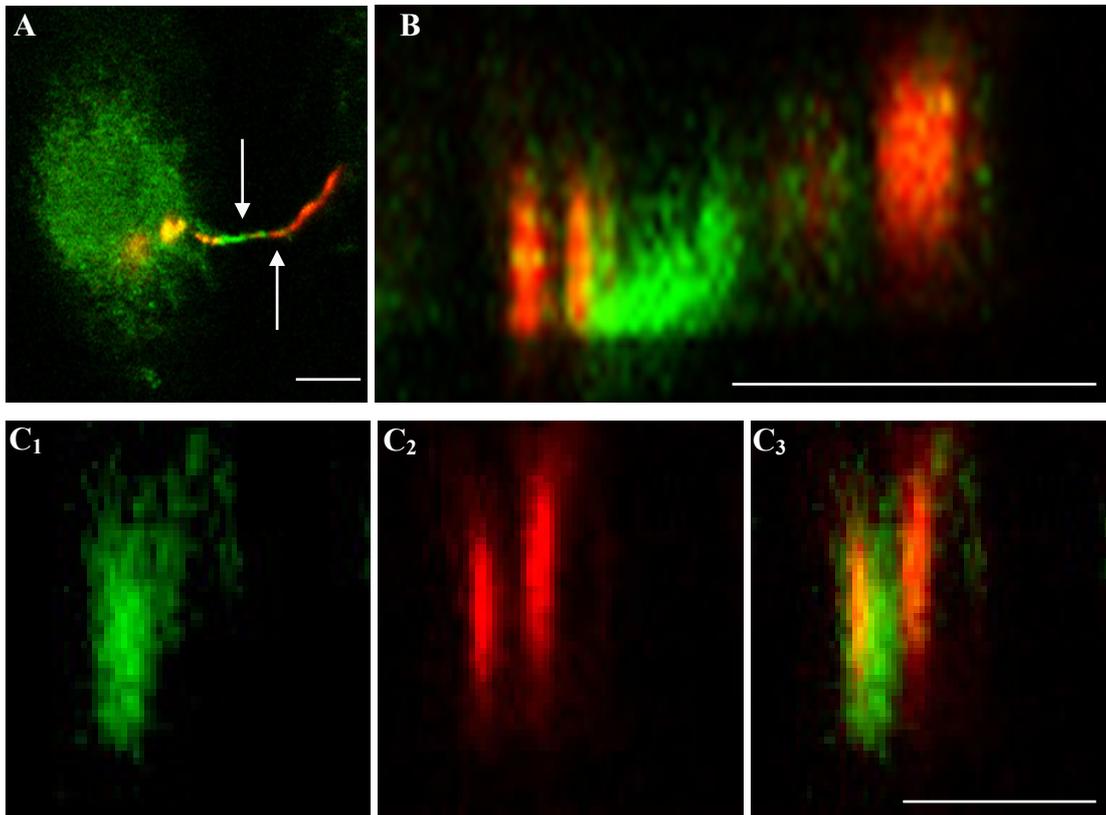


**Abbildung 4.4.7:** Darstellung der Rekrutierung von WASp in Coiling-Pseudopodien. Das Präparat zeigt eine einzelne Borrelie interagierend mit zwei Makrophagen. In **A<sub>1</sub>** und **B<sub>1</sub>** wurde mit FITC gegen WASp und in **A<sub>2</sub>** und **B<sub>2</sub>** mit Phycoerytherin gegen L32 1F11 (anti-OspA) markiert. **A<sub>3</sub>** und **B<sub>3</sub>** zeigen die Overlays von **A<sub>1</sub>** und **A<sub>2</sub>** bzw. **B<sub>1</sub>** und **B<sub>2</sub>**. Der weiße Balken repräsentiert jeweils 10 µm.

Das Protein akkumulierte bereits innerhalb der ersten Minuten nach Beginn der Ausbildung des Coiling-Pseudopodiums, d.h. es war folglich vorwiegend in "frühen" Pseudopodien, insbesondere in deren peripheren Abschnitten präsent (vgl. Abbildung 4.4.7, **A<sub>1</sub>**, **B<sub>1</sub>** und 4.4.8, **A**). Wie Abbildung 4.4.7 **B<sub>1</sub>** anschaulich illustriert, ist das Protein innerhalb der einzelnen Coiling-Pseudopodien homogen verteilt.

Virtuell erzeugte Längs- und Transversalschnitte durch Borrelien-induzierte Phagozytosestrukturen ermöglichen die detaillierte Auflösung der Strukturverhältnisse innerhalb eines Coiling-Pseudopodiums und bestätigen die homogene Verteilung des WASp-Proteins (vgl. Abbildung 4.4.8 **B**). Die Superpositionen in Abbildung 4.4.8, **A**

und **B** zeigen die alternierenden Fluoreszenzen von akkumuliertem WASp und OspA. WASp kolokalisiert folglich nur abschnittsweise mit der Borrelie. Dieses Ergebnis bestätigt wiederum, dass die Borrelien-induzierten Phagozytosestrukturen die zellassoziierten Borrelien umschlingen.

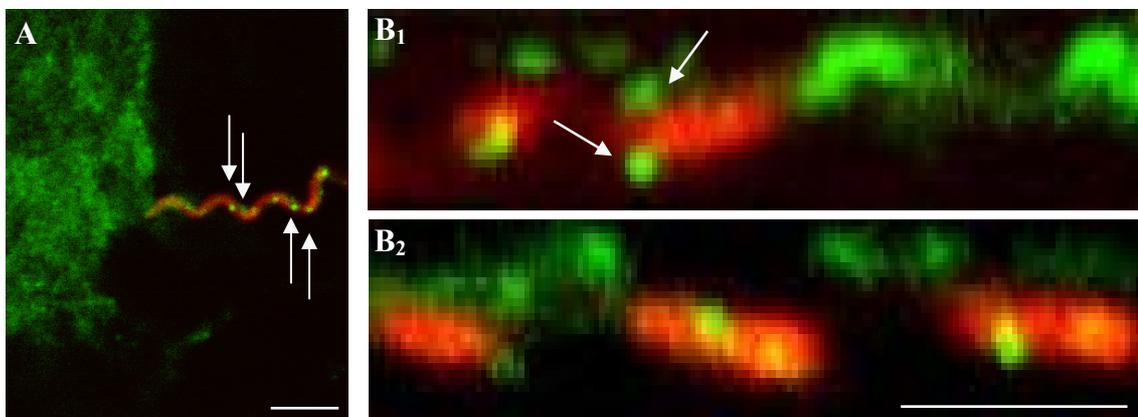


**Abbildung 4.4.8:** Darstellung der Akkumulation von WASp in Coiling-Pseudopodien. Die Abbildung zeigt ein Coiling-Pseudopodium in verschiedenen Perspektiven: apikale Ansicht (**A**), virtuell erzeugter Längs- (**B**) und Transversalschnitt (**C**) durch die Phagozytosestruktur. **A** und **B** sind Superpositionen der WASp- und OspA-Fluoreszenzen. In **C**<sub>1</sub> ist die WASp-, in **C**<sub>2</sub> die OspA-Markierung dargestellt. **C**<sub>3</sub> ist der Overlay aus **C**<sub>1</sub> und **C**<sub>2</sub>. Die Pfeile in **A** kennzeichnen die Akkumulation von WASp. Der weiße Balken repräsentiert 10µm (**A**), 5µm (**B**) bzw. 0,5µm (**C**).

#### 4.4.3.3 Die Beteiligung von Arp2/3-Komplex an der Genese der Coiling-Pseudopodien

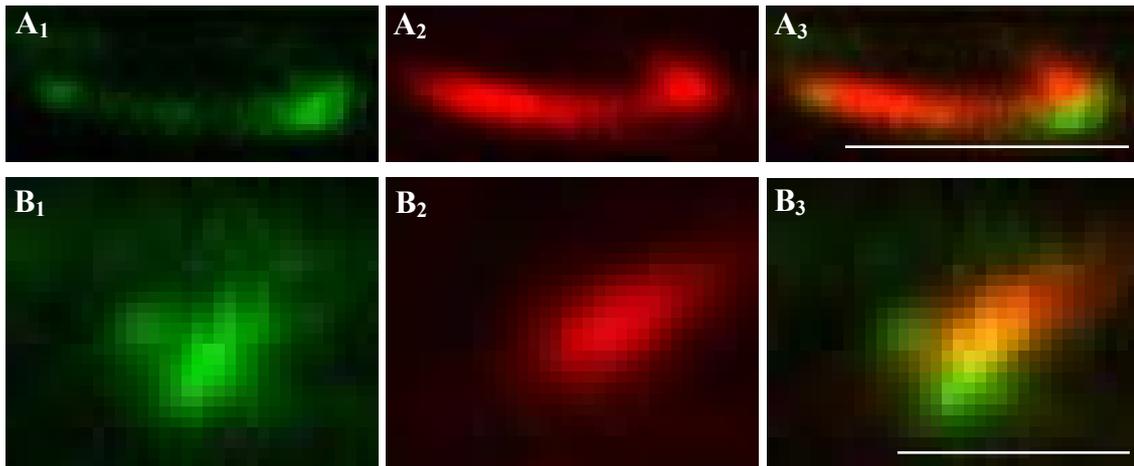
Im Folgenden wurde versucht, eine mögliche Beteiligung von Arp2/3 Komplex an der Genese der Borrelien-induzierten F-Aktin-reichen Aufnahmestrukturen optisch darzustellen. Die Koinkubationspräparate wurden hierzu 45 min nach Infektion mit PKo97 K37 fixiert und mit FITC gegen Arp2/3 Komplex und mit Phycoerytherin gegen L32 1F11 (anti-OspA) markiert.

Insgesamt konnte in zahlreichen Laser Scanning Immunfluoreszenzaufnahmen die Rekrutierung des Arp2/3 Komplexes in die Coiling-Pseudopodien gezeigt werden. Auffällig war die bevorzugt im Bereich der distalen Spitze des Pseudopodiums punktförmig fokussierte Anreicherung des Proteins (vgl. Abbildung 4.4.9, **A**). Mittels virtuell erzeugter Längsschnitte durch die Borrelien-induzierten Aufnahmestrukturen (vgl. Abbildung 4.4.9 **B**), durch welche die räumliche Verteilung von Arp2/3 Komplex innerhalb eines Coiling-Pseudopodiums rekonstruiert werden konnte, bestätigen die fokalen Arp2/3 Komplex-Kondensationscluster. Arp2/3 Komplex ist zudem in lose mit den interagierenden Borrelien assoziierten Falten präsent.



**Abbildung 4.4.9:** Darstellung der punktförmigen Kondensation von Arp2/3 Komplex innerhalb eines Coiling-Pseudopodiums. Markiert wurde mit FITC gegen Arp2/3 Komplex und mit Phycoerytherin gegen L32 1F11 (anti-OspA) (**A** und **B**). **A**, **B<sub>1</sub>** und **B<sub>2</sub>** sind Superpositionen der Arp2/3 Komplex- und OspA-Fluoreszenzen. **A** zeigt die apikale Ansicht auf einen Makrophagen mit interagierender Borrelie. Punktförmig fokussierte Akkumulationen von Arp2/3 Komplex sind durch Pfeile gekennzeichnet (**A** und **B<sub>1</sub>**). **B<sub>1</sub>** und **B<sub>2</sub>** zeigen je einen virtuell erzeugten Längsschnitt durch die Phagozytosestruktur. Die weißen Balken repräsentieren jeweils 5µm.

Die Anwendung digitaler Bildbearbeitungsverfahren ermöglichte die virtuelle Auflösung punktförmiger Arp2/3 Komplex-Cluster. In Abbildung 4.4.10 (**A** und **B**) sind zwei dieser digital bearbeiteten Cluster dargestellt. Die Arp2/3 Komplex-Foci wurden hierbei in unterschiedlicher Orientierung entlang der z-Achse der im konfokalen Laser Scanning Immunfluoreszenzmikroskop generierten Bildstapel geschnitten. **A** zeigt einen virtuellen Längs-, **B** einen Transversalschnitt durch einen Arp2/3 Komplex-Kondensationspunkt. Insbesondere in der Darstellung der Superpositionen **A<sub>3</sub>** und **B<sub>3</sub>** wird hierbei die sehr enge Assoziation des Komplexes mit den interagierenden Spirochäten deutlich.



**Abbildung 4.4.10:** Darstellung einzelner Arp2/3 Komplex-Cluster. Markiert wurde mit FITC gegen Arp2/3 Komplex und mit Phycoerytherin gegen L32 1F11 (anti-OspA) (**A** und **B**). **A** zeigt einen virtuellen Längs-, **B** einen Transversalschnitt durch ein Coiling-Pseudopodium. In **A<sub>1</sub>** und **B<sub>1</sub>** ist die Arp2/3 Komplex-, in **A<sub>2</sub>** und **B<sub>2</sub>** die OspA-Fluoreszenz dargestellt. **A<sub>3</sub>** und **B<sub>3</sub>** sind Superpositionen von **A<sub>1</sub>** und **A<sub>2</sub>** bzw. **B<sub>1</sub>** und **B<sub>2</sub>**. Die weißen Balken repräsentieren jeweils 1µm.

#### 4.4.4 Der Einfluss der Rho-GTPasen Rho, CDC42Hs und Rac auf die Genese Borrelien-induzierter Coiling-Pseudopodien

Die Rekrutierung von WASp und Arp2/3 Komplex an den Bereich der Interaktion von Borrelienzelle und Makrophage implizierte, dass diese Moleküle dort Aktin-Polymerisation regulieren. Daher wurde im Weiteren die Rolle von GTPasen der Rho-Familie als übergeordnete Regulatoren der Aktin-Polymerisation untersucht. Der Einfluss der einzelnen Rho-GTPasen auf die Genese Borrelien-induzierter Coiling-Pseudopodien wurde in Mikroinjektionsexperimenten anhand verschiedener GTPase-Mutanten analysiert.

Getestet wurden konstitutiv aktive GST-Fusionsproteine der funktionellen Domänen der kleinen Rho-GTPasen CDC42Hs und Rho (im weiteren bezeichnet als CDC42Hs<sup>V12</sup> und Rac<sup>V12</sup>) und deren konstitutiv inaktive Deletionsmutanten (im weiteren bezeichnet als CDC42Hs<sup>N17</sup> und Rac<sup>N17</sup>). Mikroinjiziertes, konstitutiv aktives bzw. inaktives CDC42Hs<sup>V12</sup>, Rac<sup>V12</sup>, CDC42Hs<sup>N17</sup> oder Rac<sup>N17</sup> konkurriert im Makrophagen mit zelleigenem CDC42Hs und Rac um deren Rezeptoren und kann somit bei zelleigenen Signaltransduktionsprozessen, wie beispielsweise der Aktin-Zytoskelett-Polymerisationskaskade, synergistisch, bzw. kompetitiv hemmend wirken. Die mögliche Beteiligung von Rho an der Formation von Coiling-Pseudopodien wurde mittels dessen spezifischen Inhibitors C3-Transferase analysiert. C3-Transferase ist ein Exoenzym, das von Bakterien der Gattung *Clostridium botulinum* produziert wird.

Dieses bakterielle Toxin induziert eine sterische Veränderung in der so genannten Effektorregion, in der Rho mit seinen Substraten in Wechselwirkung tritt, wodurch die Rho-Aktivität gehemmt wird (AKTORIES et al., 1989; SEKINE et al., 1989).

Die Rolle von CDC42Hs und Rac wurde folglich in einem indirekten Testsystem untersucht, während die Beteiligung der kleinen GTPase Rho durch die Injektion eines spezifischen Rho-Inhibitors hingegen direkt gemessen wurde.

#### 4.4.4.1 Reinigung der GTPase-Mutanten

In zellbiologischen Experimenten mit primären humanen Makrophagen wurde der Einfluss von Rho-GTPasen auf die Genese Borrelien-induzierter Coiling-Pseudopodien unter Verwendung verschiedener konstitutiv aktiver bzw. inaktiver GTPase-Mutanten untersucht. Die für die rekombinante Herstellung der zu testenden Proteine verwendeten DNA-Konstrukte wurden freundlicherweise von Alan Hall bzw. Stefan Linder in Form transformierter *E. coli* Zellen zur Verfügung gestellt (vgl. 2.11). Die Proteine wurden exprimiert und gereinigt. Für die Reinigung im präparativen Maßstab (1 l) wurden die Transformanten kultiviert, mit IPTG induziert (2 h bei 27 °C), die induzierten *E. coli* Zellen geerntet und unter Anwendung der Durchfluss-French Press die zytoplasmatische *E. coli*-Fraktion isoliert (vgl. 3.10.1, 3.10.3). Die Expression der Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteine wurde mittels SDS-PAGE und anschließende Coomassie-Färbung überprüft (vgl. 3.10.6, 3.10.7). Die GST-Mutanten wurden wie unter 3.10.4 beschrieben, unter Anwendung von Glutathion Sepharose<sup>®</sup> Beads, gereinigt. Die Proteinlösungen wurden gegen Mikroinjektionspuffer dialysiert, in Centricon-Röhrchen zu folgenden Endkonzentrationen angereichert: 2,7 mg/ml für GST-Kontrolle, CDC42Hs<sup>V12</sup>-, CDC42Hs<sup>N17</sup>-, Rac<sup>V12</sup>- und Rac<sup>N17</sup>-GST-Fusionsprotein und 7 ng/µl für C3-Transferase, bestimmt nach der BRADFORD-Methode (vgl. 3.10.5). Die Reinheit der Proteine wurde mit SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung (vgl. 3.10.6, 3.10.7) überprüft.

#### 4.4.4.2 Einfluss der kleinen Rho-GTPasen Rho, CDC42Hs und Rac auf die Formation der Borrelien-induzierten Coiling-Pseudopodien

Um die Rolle der kleinen Rho-GTPasen Rho, Rac und CDC42Hs während der Genese der Coiling-Pseudopodien zu untersuchen wurden primäre humane Makrophagen mit den gereinigten GTPase-Mutanten mikroinjiziert (vgl. 4.4.4.1, 3.6). Getestet wurden konstitutiv aktives CDC42Hs und Rac (CDC42Hs<sup>V12</sup> und Rac<sup>V12</sup>), korrespondierend

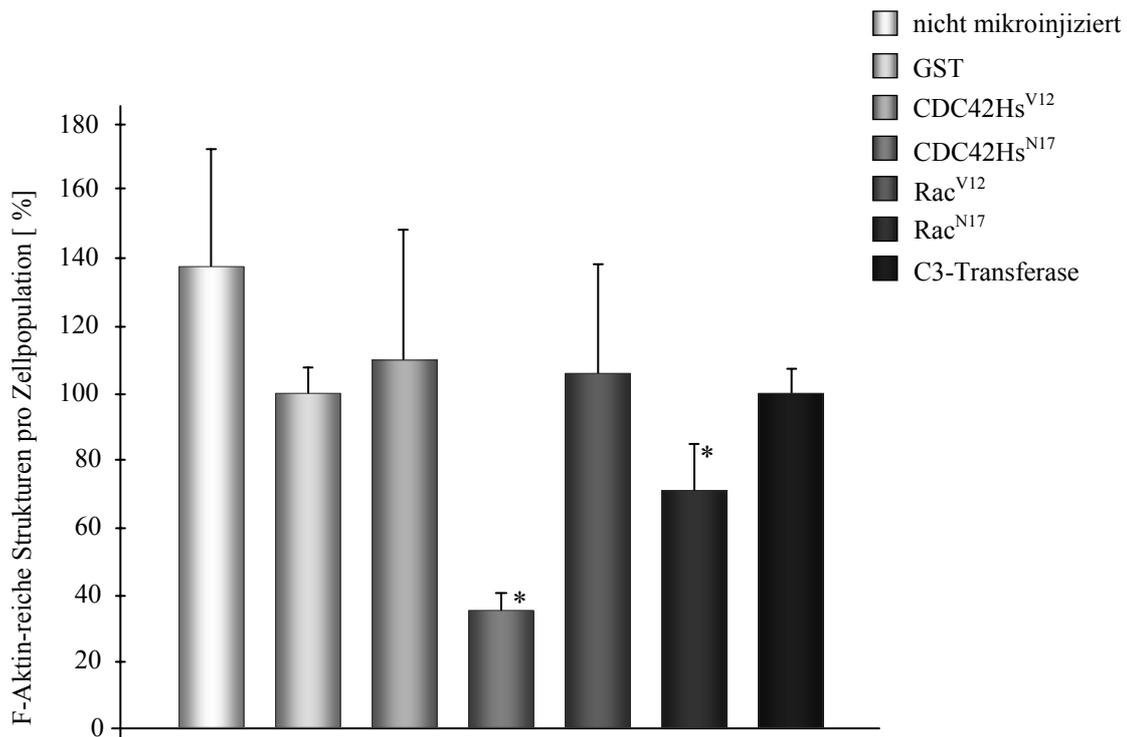
konstitutiv inaktives CDC42HS und Rac (CDC42HS<sup>N17</sup> und Rac<sup>N17</sup>) und der Rho-Inhibitor C3-Transferase. Auf die Mikroinjektion von konstitutiv aktivem Rho wurde verzichtet, da aus Vorversuchen bekannt war, dass dies zu starken Zellkontraktionen führen würde (persönliche Mitteilung von Dr. Stefan Linder) und die fluoreszenztechnische Darstellung F-Aktin-reicher Coiling-Pseudopodien folglich nicht möglich wäre. Die mögliche Beteiligung von Rho wurde alternativ durch die direkte Inhibition dieser GTPase untersucht, indem den primären humanen Makrophagen der spezifische Rho-Inhibitor C3-Transferase mikroinjiziert wurde. Da die GTPase Rho das "Makrophagen-Spreading" negativ reguliert (AEPFELBACHER et al., 1996), ist folglich die flächig ausgebreitete Morphologie entsprechend mikroinjizierter Phagozyten ein eindeutiger Hinweis auf die inhibierte Rho-Aktivität. Auf diese Weise kann während des Experiments die effiziente Blockade der kleinen Rho-GTPase Rho durch den injizierten Inhibitor C3-Transferase kontrolliert werden.

Im Anschluss an die Mikroinjektion wurden die Makrophagen mit Borrelien infiziert (MOI 10:1; Koinkubationzeit 45 min) und die Anzahl der F-Aktin-reichen Strukturen (= mittlere Anzahl der F-Aktin-reichen Strukturen  $\pm$  Standardabweichung) durch Auszählen der Präparate im konventionellen Fluoreszenzmikroskop ermittelt (vgl. 3.4.3.1, 3.7.3, 3.7.6), wobei für jedes Effektorprotein insgesamt 90 Zellen (je 30 Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten) ausgewertet wurden. Die Koinkubationspräparate wurden hierzu mit Alexa Phalloidin 568 gegen F-Aktin und DAPI markiert.

Insgesamt wurden zwei Kontrollgruppen gewählt: nicht injizierte Makrophagen und Makrophagen, mikroinjiziert mit dem inerten Kontrollagens Glutathion S-Transferase (GST).

Die Kontrollgruppe der GST-injizierten Makrophagen zeigte verglichen mit den nicht-injizierten Makrophagen eine signifikante Reduktion der F-Aktin-reichen Strukturen. Die Anzahl der Borrelien-induzierten Aufnahmestrukturen in GST-injizierten Makrophagen wurde deshalb als Richtwert mit 100 % ( $\pm$  6,2 %) festgesetzt. Die Mikroinjektion von CDC42HS<sup>V12</sup> übte keinerlei Effekt auf die Ausbildung der Borrelien-induzierten Phagozytosestrukturen aus. Diese traten mit einer zum GST-Kontrollwert vergleichbaren Häufigkeit von 109,5 %  $\pm$  38,1 % auf. Die Mikroinjektion von CDC42HS<sup>N17</sup> resultierte hingegen in einer signifikanten Reduktion der F-Aktin-reichen Strukturen. Insgesamt reduzierte sich die Anzahl der F-Aktin-reichen Strukturen um rund 2/3 auf einen Wert von 34,8 %  $\pm$  5,2 %. Ähnliche Ergebnisse wurden durch die Injektion von konstitutiv aktivem Rac<sup>V12</sup> bzw. inaktivem Rac<sup>N17</sup> erzielt. Während

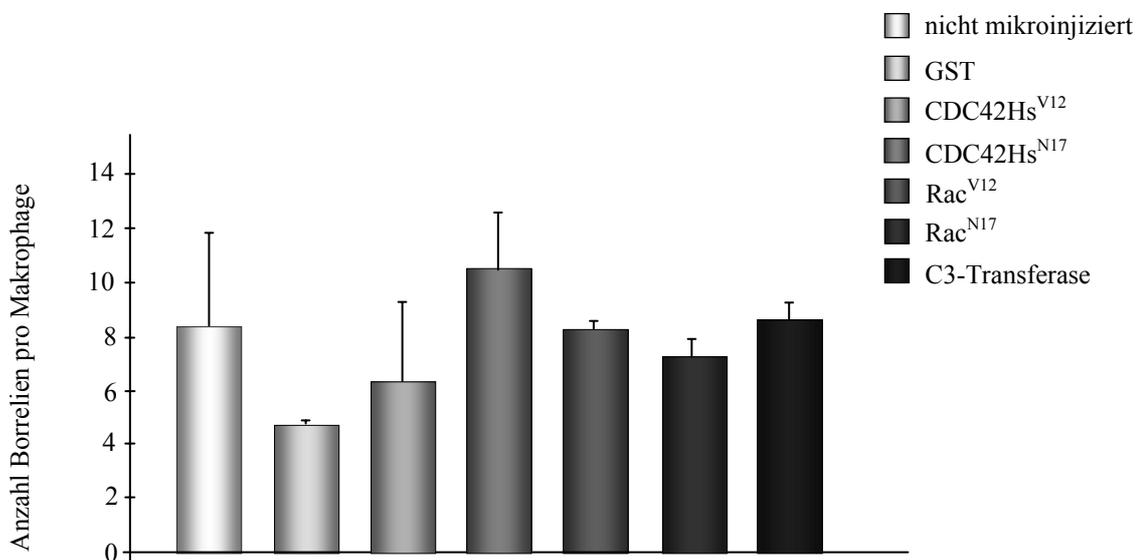
Rac<sup>V12</sup> gemessen an den GST-Kontrollwerten keinen Einfluss auf die Häufigkeit der Borrelien-induzierten F-Aktin-reichen Strukturen ausübte (106,2 % ± 30,5 %), vermittelte die Injektion von Rac<sup>N17</sup> eine signifikante Reduktion der Coiling-Pseudopodien in den untersuchten Makrophagenpopulationen auf 71,4 % ± 13,3 %. Die Mikroinjektion des Rho-Inhibitors C3-Transferase vermittelte keinerlei Effekt. Die untersuchten Makrophagen bildeten Coiling-Pseudopodien mit einer dem GST-Kontrollwert vergleichbaren Häufigkeit von 100 % ± 9,5 %. Indikator für eine uneingeschränkte C3-Transferase-Aktivität war hierbei die flächig ausgebreitete Morphologie der mikroinjizierten Makrophagen aufgrund des vollständigen Verlustes der Aktinstressfaserbildung (CHARDIN et al., 1989) sowie die Bildung fokaler Adhäsionsstellen (RIDLEY und HALL, 1992). Die statistisch ermittelten Daten zur Häufigkeit der F-Aktin-reichen Strukturen in Abhängigkeit vom mikroinjizierten Agens wurden in einem Säulendiagramm graphisch dargestellt (Abbildung 4.4.11). Die einzelnen Werte sind in tabellarischer Form im Anhang dargestellt (vgl. Tabelle 8.8, siehe Anhang).



**Abbildung 4.4.11:** Darstellung der mittleren Anzahl Borrelien-induzierter F-Aktin-reicher Phagozytosestrukturen unter Angabe der mikroinjizierten Effektorproteine. Die mittlere Anzahl der F-Aktin-reichen Phagozytosestrukturen ± Standardabweichung wurde als Prozentsätze ± Standardabweichung angegeben, wobei die gemittelte Anzahl der gezählten Strukturen nach GST-Injektion als 100 % gesetzt wurden. \* bezeichnet signifikante Abweichungen vom 100%-Wert (zweiseitiger p-Wert < 0,05 im Student's *t* Test).

Im Anschluss wurden die Daten zur Häufigkeit der Borrelien-induzierten F-Aktin-reichen Strukturen mit den entsprechenden Zahlen zell-assoziiierter Borrelien korreliert und in einem Säulendiagramm graphisch dargestellt (Abbildung 4.4.12). Die einzelnen Werte sind in tabellarischer Form im Anhang dargestellt (vgl. Tabelle 8.9, siehe Anhang).

Ausgehend von identischen Infektionsraten (MOI 10:1) wurde die zahlenmäßige Reduktion der Coiling-Pseudopodien, insbesondere im Falle des konstitutiv inaktiven Effektorproteins CDC42Hs<sup>N17</sup>, von einer größeren Anzahl adhärenter Borrelien pro einzelner Makrophagen begleitet. Im Vergleich der Werte für konstitutiv aktives Rac<sup>V12</sup> und konstitutiv inaktives Rac<sup>N17</sup> waren im Mittel gleich viele Borrelien zell-assoziiert. Die Reduktion der F-Aktin-reichen Phagozytosestrukturen ist daher nicht auf eine geringere Zahl zell-assoziiierter Borrelien zurückzuführen, sondern ein unmittelbarer Effekt auf die jeweils mikroinjizierte GTPase-Mutante.



**Abbildung 4.4.12:** Darstellung der mittleren Anzahl zell-assoziiierter Borrelien unter Angabe der mikroinjizierten Proteinkomponenten. Für jede mikroinjizierte Proteinkomponente wurde die mittlere Anzahl ( $\pm$  Standardabweichung) der adhärenter Borrelien pro einzelner Makrophagen ermittelt. Die Werte wurde in absoluten Zahlen angegeben.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass mikroinjiziertes, konstitutiv aktives CDC42H und Rac synergistisch die Bildung von Coiling-Pseudopodien beeinflusste, während die korrespondierenden inaktiven Mutanten kompetitiv hemmend wirkten. Keinerlei Einfluss auf die Genese der Phagozytosestrukturen übten hingegen die mikroinjizierten Mutanten der GTPase Rho aus.

Insgesamt wurde die Aufnahme von Borrelien durch Coiling-Pseudopodien von massiver Aktin-Polymerisation entlang den gebildeten Phagozytosestrukturen begleitet. Dieser Vorgang wird wahrscheinlich von WASp und Arp2/3 Komplex kontrolliert, die in diese Strukturen rekrutiert werden.

Gesteuert wird der gesamte Prozess schließlich von den GTPasen CDC42Hs und Rac1, nicht jedoch von Rho. Das Zusammenspiel aller dieser Moleküle ermöglicht demnach die Ausbildung der Aktin-reichen Pseudopodien und schlussendlich die Aufnahme von *B. burgdorferi*.

## 5 Diskussion

### 5.1 Untersuchungen zur Bindungsfähigkeit von *B. burgdorferi* sensu lato an Säugerzellen

*B. burgdorferi* ist, wie *T. pallidum*, ein invasives Bakterium, das nach Adhärenz an endotheliales Gewebe dieses entweder durch interzelluläre Zwischenräume oder durch direkte Penetration der Endothelzellen durchdringen und auf diese Weise in verschiedene Wirtsgewebe disseminieren kann (COMSTOCK und THOMAS, 1991).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die getesteten Borrelienstämme und –klone, PKo, PKo97 K37, PKo345 II-2-3 und PBi an primär isolierte und immortalisierte humane Endothelzellen adhäreren (vgl. Abbildung 4.1.4).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass sich der *B. afzelii* Stamm PKo und dessen Klone PKo97 K37 und PKo345 II-2-3 durch eine gegenüber dem *B. garinii* PBi signifikant erhöhte Zellbindungsaffinität an die endothelialen Zelllinien ECV304 und CRL-2480 bzw. an HUVEC auszeichnen. Auffälligerweise ist die Bindungsaffinität aller getesteten Borrelien bei primär isolierten HUVEC gegenüber den immortalisierten endothelialen Zelllinien ECV304 und CRL-2480 erhöht. Der Unterschied war hierbei für jeden getesteten Stamm bzw. Klon zu jedem getesteten Zeitpunkt signifikant. Diese Beobachtung ist vermutlich auf die höhere Dichte verschiedener zellulärer Rezeptoren bei primär isolierten HUVEC gegenüber den mehrfach passagierten Zelllinien zurückzuführen.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten Borrelienstämme und –klone an die neuronale Zelllinie 1321N1 adhäreren (vgl. Abbildung 4.1.4). Hierbei zeichnet sich der *B. garinii* Stamm PBi (OspA-Serotyp 4) gegenüber PKo und dessen Klone PKo97 K37 und PKo345 II-2-3 durch eine signifikant erhöhte Zellbindungsaffinität auf. Insgesamt konnte für den Wildtypstamm PKo, verglichen mit beiden Klonen, unabhängig vom getesteten Säugerzelltyp eine erhöhte Zellbindungsfähigkeit gezeigt werden, wobei sich der OspC-überexprimierende Klon PKo97 K37 gegenüber dem OspC-negativen Klon PKo345 II-2-3 wiederum durch eine signifikant erhöhte Zellbindungsaffinität auszeichnete. Die unterschiedliche Wirtszellaffinität von PKo, PKo97 K37 und PKo345 II-2-3 ist möglicherweise auf deren differentielles Osp-Expressionsmuster (vgl. Tabelle 4.1.1) zurückzuführen. Als weitere Ursache kommt der Verlust oder eine mögliche Veränderung bestimmter, bislang nicht identifizierter, Oberflächenstrukturen während Mutagenese und klonaler Selektion in Frage. Möglich ist auch ein Zusammenspiel beider Komponenten.

Insgesamt sprechen diese Ergebnisse (höhere Säugerzellbindungsaffinität von Stamm PKo und Klon PKo97 K37 gegenüber dem OspC-negativen PKo-Klon PKo345 II-2-3) für eine zentrale Bedeutung von OspC bei der Dissemination der Borrelien in verschiedene Wirtsorgane (FINGERLE et al., 1995). Insgesamt stützen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zur Säugerzellbindungsaffinität von PKo97 K37 und PKo345 II-2-3 die zentrale Bedeutung von OspC bei der Dissemination in die verschiedenen Organe infizierter Wirtstiere (FINGERLE et al., 1995, 2002; FUCHS et al., 1994; PAL et al., 2000; WILSKE und PFISTER, 1995b). Möglicherweise handelt es sich bei OspC um ein wichtiges Adhäsion bei der Adhäsion von *B. burgdorferi* s.l. an Wirtszellen.

Neurologische Manifestationen der Lyme-Borreliose sind nach Meinung zahlreicher Autoren mit einer *B. garinii* Infektion (OspA-Serotypen 3-7) assoziiert (BALMELLI und PIFFARETTI, 1995; BUSCH et al., 1996; HUBALEK und HALOUZKA, 1997; LEBECH et al., 1994; PETER et al., 1997; VAN DAM et al., 1993; WILSKE et al., 1996a). Diese Prävalenz von *B. garinii* bei Liquorisolaten könnte auf die in der vorliegenden Arbeit gezeigte erhöhte Bindungsaffinität von *B. garinii* (hier Stamm PBi, OspA-Serotyp 4) an neuronale Zellen zurückzuführen sein. RÖSSLE (2002) beschrieb in diesem Zusammenhang eine erhöhte Invasivität von PBi, die möglicherweise dessen Persistenz in neuronalem Wirtsgewebe vermittelt. Unsere Beobachtung könnte erklären, dass neurologische Manifestationen erst Monate bis Jahre nach dem Zeckenstich auftreten können (WEBER et al. 1993b).

Innerhalb des in der vorliegenden Arbeit verwendeten nicht-synchronisierten Koinkubationsassaysystems (vgl. 3.4.3.1) erreichte die Anzahl zellassoziierter Bakterien bei allen getesteten Borreliensstämmen und -klonen unabhängig von Säugerzelltyp nach 24-48 h ein Maximum. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass diese Stagnation auf die mit zunehmender Koinkubationsdauer abnehmende Motilität der Bakterien zurückzuführen ist. Denkbar ist auch, dass nach 24-48 h diejenigen Borrelien, die aufgrund ihres Osp-Expressionsmusters zur Adhärenz befähigt sind, bereits an die Säugerzellen gebunden haben, während diejenigen Borrelien, die nicht an die Säugerzellen binden können, im Überstand verbleiben.

Die Zunahme der mittleren Anzahl zellassoziierter Borrelien proportional zur Koinkubationsdauer ist hierbei nicht auf ein Wachstum der Spirochäten im Koinkubationsansatz zurückzuführen. Es konnte gezeigt werden, dass weder Medienbestandteile, die Temperaturerhöhung von 34 °C (Borrelienkulturtemperatur)

auf 37 °C (Säugerzellkulturtemperatur), noch Wirtszellfaktoren Wachstum der Spirochäten erlauben (vgl. 4.1.1.2, 4.1.1.3 und Abbildung 4.1.2).

Anders als bei FINGERLE et al. (2000), wonach in Kokulturexperimenten nur etwa 5 % der inokulierten Borrelien adhärent waren, konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass nach 24 h Koinkubation 12-70 % der inokulierten Borrelien zellassoziiert waren (vgl. Tabelle 8.1, siehe Anhang). Hierbei gilt es jedoch zu berücksichtigen, dass FINGERLE et al. (2000) mit ISE6 Zeckenzellen arbeiteten, während in dieser Studie mit Zellen humanen Ursprungs experimentiert wurde. Möglicherweise zeichnen sich Borrelien durch eine gegenüber einer aus Zecken hervorgegangenen Zelllinie höhere Affinität zu bestimmten Säugetierzellstrukturen aus. Hierbei bleibt unklar, welche zellulären Faktoren eine Rolle spielen. Interessant war in diesem Zusammenhang die Verteilung von OspA und OspC auf den einzelnen zellassoziierten bzw. nicht-zellassoziierten Borrelien im Koinkubationsexperiment mit Säugerzellen (vgl. Abbildungen 4.1.5 - 4.1.8). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass adhärente Borrelien des Stammes PKo bzw. seines Klones PKo97 K37 hauptsächlich entweder OspA-positiv oder OspA/C-koexprimierend waren, wobei verglichen mit den nicht-zellassoziierten Bakterien der Anteil an nur OspA-positiven signifikant erhöht war. Im zeitlichen Verlauf der Koinkubation stieg hierbei der Prozentsatz an OspA-positiven zellassoziierten Borrelien bei PKo und PKo97 K37 unabhängig vom getesteten Säugerzelltyp proportional zur Koinkubationsdauer an. Auch nicht-adhärenente Borrelien des Stammes PKo bzw. des Klones PKo97 K37 waren für jeden untersuchten Säugerzelltyp hauptsächlich entweder OspA-positiv oder koexprimierend. Es konnte gezeigt werden, dass der Anteil an nur OspA-positiven Bakterien proportional zur Koinkubationsdauer abnimmt. Die Ergebnisse korrelieren mit den Untersuchungen von FINGERLE et al. (2000), wonach in Koinkubationsexperimenten mit der Zeckenzelllinie ISE6 bei zellassoziierten Borrelien gegenüber nicht-zellassoziierten der Anteil an OspA-exprimierenden Borrelien relativ zu OspC und OspA/C-exprimierenden Borrelien am höchsten war. Die Interpretation des Ergebnisses ist sehr komplex. Möglicherweise findet während der Kokultur von Säugerzellen und Bakterien die Aufteilung der jeweils inokulierten Borrelienpopulation in zwei unabhängige Teilmengen mit unterschiedlichen Zellbindungsaffinitäten statt. Möglicherweise wird aber auch durch den direkten Zellkontakt die Expression von OspA hochreguliert. Gestützt wird diese Hypothese durch Untersuchungen anderer Autoren zur differentiellen Expression der

Osp-Proteine (FINGERLE et al., 2000; OBONYO et al., 1999; SCHWAN et al., 1995; SCHWAN und PIESMAN, 2000; STEVENSON et al., 1995).

Nach der semiquantitativen Analyse der Fluoreszenzintensitäten einzelner Borrelien nach FINGERLE et al. (2000) konnte für den *B. afzelii* Klon PKo97 K37 gezeigt werden, dass mit fortdauernder Koinkubation unter den koexprimierenden zellassozierten Borrelien die Menge an OspC relativ zu OspA zunimmt. Der OspC-Anteil bei zellassoziertem koexprimierendem PKo97 K37 war hierbei höher als bei nicht-zellassoziertem PKo97 K37. Die Zunahme der OspC-Expression ist vermutlich auf die gegenüber der Kulturtemperatur von 34 °C um 3 °C erhöhte Koinkubationstemperatur von 37 °C zurückzuführen. Gestützt wird dieses Hypothese durch eine Reihe von Untersuchungen (FINGERLE et al., 2000; OBONYO et al., 1999; SCHWAN et al., 1995; SCHWAN und PIESMAN, 2000; STEVENSON et al., 1995). So beschrieben beispielsweise FINGERLE et al. (2000) die Hochregulation der OspC-Expression von OspA/C-koexprimierendem PKo97 K37 nach einem Temperaturanstieg von 33 °C auf 37 °C. Die OspC-Expression scheint zudem, wie ebenfalls von FINGERLE et al. (2000) postuliert, durch zelluläre Faktoren stimuliert zu werden.

Ein möglicher Einfluss der Zellkulturmedien auf die Hochregulation der OspC-Expression kann hierbei ausgeschlossen werden, da Borrelien bei Kultur in Säugerzellkulturmedien wie beispielsweise RPMI jegliche Zellteilungsaktivität einstellen (ALBAN et al., 2000; CONCEPCION et al., 2003)

Im Falle des OspC-negativen Klones PKo345 II-2-3 konnte erwartungsgemäß weder eine Zeit-, noch eine Temperatur- oder Säugerzellabhängige Veränderung der OspA-Expression verzeichnet werden (FINGERLE et al., 2000).

Die bei PKo und PKo97 K37 gezeigte Variation der OspA/OspC-Verteilung während der Koinkubation mit Säugerzellen konnte bei dem *B. garinii* Stamm PBi nicht beobachtet werden. Sowohl in zellassozierten als auch in nicht-zellassozierten Borrelienpopulationen zeichnen sich die Bakterien unabhängig vom getesteten Säugerzelltyp durch ein konstantes Verhältnis von OspA, OspC und OspA/C aus. Auffällig ist hierbei, dass PBi, sowohl zellassoziert als auch nicht-zellassoziert, unabhängig von experimentellen Parametern (Koinkubationsdauer, Temperatur, Säugerzelltyp) hauptsächlich OspA/C-koexprimiert (85-95 % aller untersuchten Borrelien). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte nicht geklärt werden, ob der *B. garinii* Stamm PBi die Expression von OspA und/oder OspC während der Koinkubation mit Vektor- oder Wirtszellen generell nicht reguliert, oder ob es sich hierbei um ein

testimmanentes Phänomen handelt. Dies könnte beispielsweise in Koinkubationsexperimenten mit weiteren Wirts- und Vektorzellen überprüft werden.

Ein wichtiger Teilaspekt der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Rolle von OspA und OspC bei der Adhärenz von *B. burgdorferi* s.l. an Säugierzellen. In Koinkubationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass der monoklonale anti-OspA-Antikörper L32 1F11 die Bindungsfähigkeit aller Borrelienstämme und -klone an die neuronale Zelllinie 1321N1 signifikant hemmt (vgl. Abbildung 4.1.9 und Tabelle 4.1.3). Der Inhibitionseffekt ist insbesondere im Falle von PKo und PKo97 K37 zeitabhängig und steigt bei allen getesteten Borrelien proportional zur Antikörperkonzentration an. Letztere wurde jedoch aufgrund des semiquantitativen Versuchsaufbaus im Einzelnen nicht genau bestimmt (vgl. 2.13, 4.1.4). Warum der anti-OspA-Antikörper L32 1F11 die Bindung der Borrelien am stärksten während der ersten 60 min der Koinkubation inhibiert ist unklar. Möglicherweise spielt OspA als Adhäsion in besonderem Maße in der ersten Stunde der Koinkubation eine Rolle. Für die Endothelzelllinie CRL-2480 konnte gezeigt werden, dass der anti-OspA-Antikörper die Bindung von PKo, PKo97 K37 und PKo345 II-2-3 ebenfalls inhibierte. Im Gegensatz dazu wurde die Adhärenz von PBi an CRL-2480 nur geringfügig beeinflusst.

Im Gesamtvergleich ist bemerkenswert, dass die Bindung von PKo345 II-2-3 an 1321N1 und CRL-2480 gegenüber PKo97 K37 durch den Antikörper wesentlich stärker inhibiert wird. Dies ist vermutlich auf die Tatsache zurückzuführen, dass PKo345 II-2-3 im Gegensatz zu PKo97 K37 kein OspC mehr exprimiert und somit die auf der Borrelienoberfläche exponierten OspA-Moleküle für den Antikörper besser zugänglich sind.

Aus der Tatsache, dass die Bindung von PKo345 II-2-3 an die getesteten Säugierzellen durch den anti-OspA-Antikörper zwar massiv, jedoch nicht vollständig blockiert werden kann, lässt sich schlussfolgern, dass die Adhäsion von *B. burgdorferi* s.l. an Wirtszellen neben OspA auch noch von anderen bakteriellen Oberflächenstrukturen vermittelt wird. Gestützt wird diese Hypothese durch den Vergleich von zellassozierten und nicht-zellassozierten Borrelien im Inhibitionsexperiment. Hierbei konnte gezeigt werden, dass neben OspC-positiven und OspA/C-koexprimierenden auch nur OspA-exprimierende Borrelien an die getesteten Säugierzellen adhärieren.

Denkbar wäre in diesem Zusammenhang auch, dass die inhibitorische Wirkung des Antikörpers durch den Wirtszelltyp und die spezifische Reaktivität des verwendeten Antikörpers determiniert ist. Gestützt wird diese Hypothese durch die Arbeiten von

RUPPRECHT (persönliche Mitteilung), der in Untersuchungen mit immortalisierten murinen Neuroblastomzellen (N2a Zellen) und Neuroblastomzellen der Ratte (B50 Zellen) durch die Verwendung von anti-OspA-Antikörpern eine signifikante Inhibition der Adhärenz OspA-exprimierender PBi-Zellen erreichte. Während RUPPRECHT mit dem breitreaktiven anti-OspA-Antikörper L32 1F11 (erkennt OspA-Serotyp 1-7) die Adhärenz von PBi um 46 % (N2a Zellen) bzw. 49 % (B50 Zellen) inhibieren konnte, führte die Verwendung des anti-OspA-Antikörpers L32 1G3 (erkennt spezifisch OspA-Serotyp 4) zu einer nahezu vollständigen Inhibition der Adhärenz OspA-positiver Borrelien. Insgesamt waren allerdings nur 6 bzw. 1 % aller Borrelien zellassoziiert. Interessant wäre es folglich zu testen, ob und inwieweit weitere OspA-Serotyp-spezifische anti-OspA-Antikörper die Bindung von *B. burgdorferi* an Säugerzellen beeinflussen.

Insgesamt korrelieren die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den Untersuchungen von COMSTOCK et al. (1993) und THOMAS und COMSTOCK (1989), wonach nach Koinkubation von *B. burgdorferi* mit einem polyklonalen anti-OspA Kaninchenserum nurmehr 27 % aller Borrelien an HUVEC adhärten (= 73 % Inhibitionseffekt; vgl. Inhibitionseffekt diese Studie, Tabelle 4.1.3). Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Koinkubationsexperimente die essentielle Rolle von OspA bei der Adhäsion von *B. burgdorferi* s.l. sowohl an neuronale als auch an endotheliale Wirtszellen bestätigen.

Inwieweit OspC als potentieller Adhäsion der Anheftung von *B. burgdorferi* s.l. an Wirtszellen eine Rolle spielt, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht näher charakterisiert werden, da der Einsatz des anti-OspC-Antikörpers L22 1F8 in jeder getesteten Verdünnung zur Aggregation der Borrelien führte. Eine Evaluierung zellassoziierter Borrelien war unter diesen Umständen nicht möglich. Um diese experimentelle Problematik zu umgehen, empfiehlt es sich bei künftigen Inhibitionsversuchen mit monoklonalen anti-Osp-Antikörpern mit Fab-Fragmenten anstelle von ganzen Immunglobulin-Molekülen zu arbeiten (COMSTOCK et al., 1993).

Letztlich weisen aber die bereits beschriebenen Unterschiede der Wirtzellaffinität von PKo345 II-2-3 und PKo97 K37 darauf hin, dass neben OspA auch OspC die Adhäsion an Säugerzellen zu vermitteln scheint.

## 5.2 Untersuchung zur Adhärenz von *B. burgdorferi* sensu lato an CD18-defiziente Makrophagen

Die weitverbreitete Anwendbarkeit der Durchflusszytometrie in infektionsbiologischen Fragestellungen klammerte das Arbeiten mit der Spirochäte *B. burgdorferi* bislang nahezu vollständig aus. Neben Arbeiten zur Detektion Borrelien-spezifischer Antikörper im Serum infizierter Wirte (CALLISTER et al., 1994, 1996, 2000, 2002; LIM et al., 1994; SACHSENMEIER et al., 1992) wurde die Durchflusszytometrie hauptsächlich zur Messung des *oxidative burst* in Makrophagen während der Phagozytose von *B. burgdorferi* genutzt (CINCO et al., 2000; BANFI et al., 1989; PERTICARARI et al., 1991; ROTHE, G. und VALET, G., 1988). Erschwert werden die durchflusszytometrischen Untersuchungen mit *B. burgdorferi* insbesondere durch die Morphologie der Spirochäten (geringer Durchmesser bei überdimensionaler Länge) sowie durch deren Neigung zur Aggregation. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein experimentelles System etabliert, das den routinemäßigen Einsatz der Durchflusszytometrie in Untersuchungen zur Interaktion von *B. burgdorferi* mit Säugerzellen erlaubt. Gemessen wird hierbei der Anteil an Zellen an welche Borrelien gebunden haben im Vergleich zur Gesamtzahl der detektierten Zellen, um z.B. die Zellbindungsaffinität von *B. burgdorferi* zu quantifizieren. Hauptziel war die Realisierung einer neuen Quantifizierungsmethode mit hohem Probendurchsatz und guter Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Unter Anwendung dieser neuen durchflusszytometrische Messmethode wurde in Koinkubationsexperimenten mit CD18-defizienten Makrophagen untersucht, ob  $\alpha_M\beta_2$ -Integrine bei der Adhäsion von *B. burgdorferi* an Wirtszellen eine Rolle spielen.

Nach Durchführung zahlreicher Kontrollversuche, gelang die Spezifizierung von CD18-negativen bzw. CD18-positiven murinen Makrophagen in der Probe. Dies wurde u.a. durch die Anwendung von monoklonalen Antikörpern gegen das Leukozytenadhäsionsmolekül CD18 realisiert (vgl. 4.2). Die Quantifizierung der Häufigkeitsrate zellassoziierter Borrelien als Maß für die Zellbindungsaffinität der getesteten Borreliensämme und -klone basierte auf Detektion und anschließender Relation der unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten der getesteten Kontroll- und Koinkubationsansätze. Hierbei galt es, die gemessenen Fluoreszenzintensitäten mit der Anzahl der Messereignisse, die entsprechend die Anzahl der ausgezählten singulären Säugerzellen repräsentiert, in Bezug zu setzen. Falsch positive und unspezifische Messergebnisse konnten durch Isotyp- und Konjugatkontrollen ausgeschlossen werden.

Grundlegende mathematische Voraussetzung für die quantitative Auswertung war die Annahme, dass es sich bei der Anzahl zellassoziierter Borrelien pro einzelner Säugerzelle bei allen getesteten Zelltypen um eine statistisch normal verteilte Zufallsgröße handelte. Dies wurde durch stete lichtmikroskopische Kontrollen der einzelnen Versuchsansätze im Rahmen der experimentellen Möglichkeiten bestätigt.

Durch die isolierte Betrachtung der Borrelien-Makrophagen-Aggregate im *gate* konnten die korrespondierenden Vorwärts- und Seitwärtsstreuwerte dieser Zellen im FSC/SSC-Plot meist als abgegrenzte Punktwolke sichtbar gemacht werden. Dabei wurde berücksichtigt, dass das *gate* klein genug war, um eine möglichst reine Zellpopulation, aber ausreichend groß war, um eine möglichst vollständige Zellpopulation zu definieren. Die Anzahl der zellassozierten Borrelien auf der einzelnen Säugerzelle konnte mit dieser Methode nicht bestimmt werden. Das Ergebnis, das sich als Summe aller Fluoreszenzsignale, resultierend aus der Gesamtzahl zellassoziierter Borrelien, in einer Probe darstellt, gibt im Vergleich von CD18-defizienten und CD18-positiven Makrophagen Aufschluss über die relative Anzahl zellassoziierter Borrelien in der getesteten Zellpopulation.

Bei der Messung der Koinkubationsproben wurde auf Grund der Erfahrung in den Vorversuchen in Kontrollansätzen ohne Borrelien zuerst das Säugerzellgate (CD18<sup>-/-</sup> - bzw. CD18<sup>+/+</sup>-Monozyten) gesetzt und anschließend die Zahl der "Fluoreszenz-positiven", d.h. die Borrelien-positiven, Säugerzellen im Fluoreszenz-Plot ermittelt (*gate*). Anhand der zahlreichen Vorversuche konnte hierbei eine durch die zellassozierten Borrelien hervorgerufene Veränderung der Messparameter Größe und Granularität, die Zielfraktion betreffend, und die daraus resultierende Verschiebung des Zielgates vernachlässigt werden. Da die relevanten Zellfraktionen identisch gegatet wurden, waren die ausführlichen Vorversuche vor allem für die Quantifizierung der Fluoreszenzsignale der einzelnen Koinkubationsproben und entsprechend der Anzahl adhärrierender Borrelien wichtig.

CD18 ist die  $\beta$ -Untereinheit der heterodimeren  $\alpha_M\beta_2$ -Integrine, die beispielsweise Zell-Adhäsionsprozesse bei der Leukozytenwanderung vermitteln, aber auch eine wichtige Rolle als Rezeptor für bakterielle Pathogene spielen. Bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Makrophagen handelt es sich um Peritonealmakrophagen CD18-defizienter Mäuse (WILSON et al., 1993). Die Mäuse verfügen aufgrund ihrer genetischen Disposition über eine CD18-Restexpression in Höhe von 2-8 % verglichen mit dem korrespondierenden Wild-Typ. Unter Stresssituationen, z.B. nach Stimulation

mit PMA (=Paramethoxyamphetamin), kann diese auf bis zu 16 % ansteigen. Nach WILSON et al. (1993) handelt sich bei dem verwendeten Mausstamm folglich nicht um eine vollständige CD18 knock-out Mutante, da bei der Mutagenese anstelle des gewünschten Null-Allels ein so genanntes hypomorphes Allel erzeugt wurde.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die mittlere Anzahl von Makrophagen, die aufgrund adhärerender Borrelien im Durchflusszytometer Fluoreszenz-positiv detektiert wurden, unter Serum-freien Versuchsbedingungen bei CD18-defizienten und CD18-positiven Makrophagen gleich ist (vgl. Tabelle 4.2.1). Interessanterweise weisen die *B. afzelii* Klone PKo97 K37 und PKo345 II-2-3 gegenüber den Stämmen PKo (*B. afzelii*) und PBi (*B. garinii*) eine signifikant ( $p < 0.05$ ) erhöhte Affinität zu den murinen Makrophagen (CD18<sup>-/-</sup> und CD18<sup>+/+</sup>) auf. Möglicherweise ist diese Beobachtung auf die bereits unter 5.1 diskutierte Annahme zurückzuführen, wonach die Adhäsion von *B. burgdorferi* an Wirtszellen durch den Zelltyp determiniert sein könnte. Insgesamt wird das Ergebnis der Studie nicht von einer gemessenen Restexpression des CD18-Moleküls in Höhe von maximal 20 % (diese Studie) beeinträchtigt. Im Vergleich waren Kontrollmakrophagen durchschnittlich zu 98 % CD18-positiv.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erlauben den Schluß, dass unter Serum-freien Bedingungen das Leukozytenadhäsionsmolekül CD18 bei der Bindung von Borrelien an murine Makrophagen keine Rolle spielt und die Adhäsion von *B. burgdorferi* an murine Peritonealmakrophagen unter Serum-freien Bedingungen folglich nicht  $\alpha_M\beta_2$ -Integrin-vermittelt ist. Möglicherweise ist aber das identische Verhalten von CD18-defizienten und CD-18-positiven Makrophagen auf das Fehlen opsonierender Agenzien zurückzuführen. Gestützt wird diese Hypothese von einer aktuellen Studie, in der die Autoren zeigen konnten, dass die Bindung von Borrelien an polymorphnukleäre Leukozyten durch Borrelien-spezifische Antikörper signifikant erhöht wird (MONTGOMERY et al., 2002). Eine Aussage zur tatsächlichen Rolle von  $\beta_2$ -Integrinen als zelluläre Rezeptoren für das pathogene Agens der Lyme-Borreliose kann somit erst nach weiteren Bindungsstudien unter Verwendung opsonierender Agenzien (Serum und/oder Borrelien-spezifische Antikörper) gemacht werden.

### 5.3 Untersuchungen zu Fibronectin-bindenden Proteinen verschiedener *B. burgdorferi* sensu lato Spezies

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden neben dem Fibronectin-bindenden Protein (BBK32) des amerikanischen *B. burgdorferi* s.s. Referenzstammes B31 erstmals BBK32-Varianten des europäischen *B. burgdorferi* s.s. Isolates PKa2 und der *B. garinii* Isolate PHei und TN rekombinant erzeugt.

Die Klonierung der rekombinanten Fibronectin-bindenden Proteine rBBK32<sub>B31</sub>, rBBK32<sub>PKa2</sub>, rBBK32<sub>PHei</sub>, und rBBK32<sub>TN</sub> erfolgte unter Berücksichtigung bereits bekannter Sequenzdaten des *B. burgdorferi* s.s. Referenzstammes B31 (FRASER et al., 1997; PROBERT und JOHNSON, 1998). Die einzelnen BBK32-Expressionseinheiten wurden hierbei als His<sub>6</sub>-tag Fusionsproteine exprimiert. Die in *E. coli*-Expressionssystemen beobachtete schlechte Exprimierbarkeit von Borrelienproteinen mit hydrophoben Leader-Sequenzen wurde umgangen, indem der für den 20 Aminosäure langen Leader kodierende Sequenzbereich nicht kloniert wurde (SCHULTE-SPECHTEL, persönliche Mitteilung sowie PROBERT und JOHNSON, 1998).

Die computerunterstützte Rekonstruktion des Leserahmens (DNA-Man) und die Übersetzung der Nukleotidsequenz in eine putative Aminosäureabfolge bestätigt für alle 4 sequenzierten *rbbk32*-Konstrukte vollständige rekombinante *bbk32*-Expressionseinheiten und entsprechend funktionelle BBK32-Varianten. Die DNA- und Aminosäure-Sequenzen der verschiedenen *bbk32*-Expressionseinheiten wurden mit Hilfe des BLAST-Datensuchprogramms (NIH, Washington) gegen die NCBI-DNA-Datenbank verglichen. Alle 4 *bbk32*-Konstrukte konnten eindeutig der in der Datenbank hinterlegten korrespondierenden Sequenz des *B. burgdorferi* s.s. Referenzstammes B31 [Accession No. AE000788 (Nukleotidsequenz) und AAC66134 (AS-Sequenz)] zugeordnet werden. Das in der vorliegenden Arbeit als Referenzkonstrukt klonierte *bbk32*<sub>B31</sub> weist hierbei eine 99,7 %ige Übereinstimmung mit der veröffentlichten B31 Nukleotidsequenz (AE000788) auf.

Die Nukleotidsequenz der *bbk32*-Expressionseinheiten von B31, PKa2 und TN umfassen jeweils 1005 Basenpaare. Ein Vergleich der putativen Translationsprodukte zeigte, dass die drei Proteinvarianten sowohl auf Nukleotid-, als auch auf Aminosäureebene nahezu identisch waren.

Ein anderes Bild ergibt hingegen die Nukleotidsequenzanalyse der *bbk32*-Expressionseinheit des *B. garinii* Isolates PHei. *rbbk32*<sub>PHei</sub> ist gegenüber *rbbk32*<sub>B31</sub>, *rbbk32*<sub>PKa2</sub> und *rbbk32*<sub>TN</sub> durch eine gegen das 3'-Ende des *bbk32*-ORFs orientierte, 18

Nukleotide lange, Insertion charakterisiert. Wie aus Abbildung 8.1 (siehe Anhang) hervorgeht, ist die Insertion "downstream" derjenigen Proteindomäne lokalisiert, welche die Fibronectinbindung vermittelt. Innerhalb dieser 31 Aminosäure umfassenden, Fibronectin-bindenden Domäne, definiert als "minimal functional binding region" (AS 131-AS 162, PROBERT et al., 2001) weist rBBK32<sub>PHei</sub> gegenüber dem Fibronectin-bindenden Protein des amerikanischen *B. burgdorferi* s.s. Referenzstammes B31 darüber hinaus insgesamt 4 Aminosäureaustausche auf (vgl. Abbildung 5.3.1). Bei 3 der 4 Aminosäureaustausche handelt es sich um sogenannte nicht-konservative Substitutionen, die immer auf den Ersatz eines einzelnen Nukleotids zurückzuführen sind. Die Molekulargewichte der elektrophoretisch aufgetrennten rBBK32-His<sub>6</sub>-Fusionsproteine wurden nach SDS-PAGE Analyse auf 43-45 kDa bestimmt. Die mittels SDS-PAGE ermittelten tatsächlichen und berechneten theoretischen relativen Molekülmassen differieren hierbei um bis zu 5 kDa (vgl. Abbildung 4.3.3 und Tabelle 4.3.2). Diese Abweichungen sind darauf zurückzuführen, dass der theoretische Wert für native Proteine ermittelt wird, während die SDS-PAGE-Analyse hingegen denaturierte Proteine repräsentiert.

---

B31 (diese Studie)	QGSLSLSGSGESGELEEP <u>IESNEID</u> LTIDSDLR
B31 (PROBERT et al., 2001)	-----
PKa2 (diese Studie)	-----
ACA1 (PROBERT et al., 2001)	-----kdt-----f-----
PHei (diese Studie)	k-----k-t----- <u>i</u> -----
TN (diese Studie)	-----
IP90 (PROBERT et al., 2001)	-----t----- <u>i</u> -----
<i>S. pyogenes</i> (CAC87680)	NKDQSP-A-----T-YIT-VYGNQQNPVDIDK

---

**Abbildung 5.3.1:** Gegenüberstellung der Aminosäuresequenzen (AS) der "minimal functional binding region" (AS 131-162 nach PROBERT und JOHNSON, 1998) von BBK32 von *B. burgdorferi* s.l. B31, PKa2 = *B. burgdorferi* s.s., ACA1 = *B. afzelii*, PHei, TN, IP90 = *B. garinii* und der UR-Region des Fibronectin-bindenden Proteins F1 von *Streptococcus pyogenes* (Accession No.: CAC87680). Homologe AS sind mit "-", nicht konservative AS-Austausche mit "x" und konservative AS-Austausche mit "x" bezeichnet. Konservierte Motive sind grau hinterlegt.

Die funktionelle Fibronectin-bindende Domäne zeichnet sich durch zwei stark konservierte Motive aus, LSGESGEL und IESNEID, wobei die Aminosäureaustausche von rBBK32<sub>PHei</sub> ausnahmslos in den nicht-konservierten Bereichen lokalisiert sind (vgl. Abbildung 5.3.1).

Ein Vergleich der BBK32-Ligand-Binderegion ("minimal functional binding region") mit Fibronectin-bindenden Proteinen anderer bakterieller Proteine zeigt, dass das Protein F1 von *Streptococcus pyogenes* identische konservierte Motive aufweist (vgl. Abbildung 5.3.1), während hingegen für die Fibronectin-bindenden Proteine 85b und "fibronectin-attachment protein" von Mycobakterien und FnbpA von *Staphylococcus aureus* keine Homologien identifiziert werden konnten (PROBERT et al., 2001). Nach derzeitigem Stand des Wissens vermittelt Protein F1 die Adhäsion von *S. pyogenes* an Säugerzellen über die Bindung zellulären Fibronectins oder die Interaktion mit löslichem Fibronectin, welches wiederum an zelleigene Oberflächenmoleküle, wie beispielsweise Integrine bindet (JADOUN et al., 1998; MOLINARI et al., 1997; OZERI, et al., 1998). OZERI et al. (1998) konnten zeigen, dass die indirekte Interaktion von Protein F1 mit  $\beta_1$ -Integrinen über eine Fibronectin-Brücke die Internalisierung adhärrierender Bakterienzellen initiiert und somit dem pathogenen Mikroorganismus ermöglicht, zelluläre Barrieren zu durchdringen und massive Gewebsinfektionen hervorzurufen. Es scheint in diesem Zusammenhang naheliegend, dass die Fibronectin-Bindungsfähigkeit von BBK32 einen Integrin-vermittelten Internalisierungsprozess von *B. burgdorferi* im Wirtsgewebe initiiert. Gestützt wird diese Hypothese durch Studien von COBURN et al. (1998), welche die bedeutende Rolle der  $\beta_1$ - und  $\beta_3$ - Integrine im Kontext der Adhäsion von *B. burgdorferi* an humane Zellen beschrieben.

PROBERT und JOHNSON (1998) konnten in Inhibitionsexperimenten zeigen, dass die Bindung von BBK32 an Fibronectin durch die Gelatine-Bindungsdomäne des Fibronectinmoleküls vermittelt wird. Fibronectin-bindende Proteine anderer Spirochäten, wie beispielsweise *Treponema denticola* und *T. pallidum*, die keinerlei Sequenzhomologie zu BBK32 aufweisen, binden Fibronectin hingegen nicht über dessen Gelatine-, sondern über das Arg-Gly-Asp(=RGD)-Motiv der Integrin/Zell-Bindedomäne des Fibronectinmoleküls (DAWSON und ELLEN, 1990; 1994; THOMAS et al., 1985).

In der vorliegenden Arbeit zeichnete sich rBBK32<sub>PHei</sub> in Affinitätsblot-Studien gegenüber rBBK32<sub>B31</sub>, -PKa2 und -TN durch eine stark erhöhte Fibronectin-Bindungsaffinität aus (vgl. Abbildung 4.3.5), die vermutlich auf dessen heterogene Aminosäuresequenz zurückzuführen ist (vgl. Abbildungen 5.3.1 und 8.2, im Anhang). Naheliegend scheint in diesem Zusammenhang, dass weniger die 18 Nukleotide umfassende Insertion im 3'-Bereich des *bbk32*-Genlokus, als vielmehr die

Aminosäureaustausche innerhalb der "minimal functional binding region" die Ursache für die erhöhte Fibronectin-Bindungsaffinität von rBBK32<sub>PHei</sub> ist.

Weiterhin konnte anhand einer Dot-Blot-Studie gezeigt werden, dass Gelatine die Bindung von Fibronectin an rBBK32<sub>B31</sub>, -<sub>PKa2</sub> und -<sub>TN</sub> deutlich reduziert, während die Bindung von Fibronectin an rBBK32<sub>PHei</sub> nicht beeinflusst wird (vgl. Abbildung 4.3.6). Im Falle von rBBK32<sub>PHei</sub> wird der Inhibitionseffekt der Gelatine möglicherweise durch die erhöhte Fibronectin-Bindungsaffinität des rekombinanten Proteins aufgehoben. Die von PROBERT und JOHNSON (1998) konstatierte Überschneidung der BBK32-Bindedomäne humanen Fibronectins mit dessen spezifischer Gelatine-Bindedomäne wird folglich nicht in Frage gestellt.

In der vorliegenden Arbeit konnte auch in zellbiologischen Experimenten mit verschiedenen Säugerzell-Modellsystemen die erhöhte Zellbindungsaffinität von rBBK32<sub>PHei</sub> bestätigt werden. Die Verwendung von rBBK32-konjugierten Mikrosphären in Koinkubationsexperimenten mit Säugerzellen erlaubte hierbei die quantitative Erfassung einzelner adhätierender Moleküle und somit einen Rückschluss auf die Fibronectin-vermittelte Zellbindungsaffinität der einzelnen getesteten rBBK32-Varianten. In Koinkubationsexperimenten mit verschiedenen Säugerzellen zeigten alle getesteten rBBK32-konjugierten Mikrosphären eine spezifische Fibronectin-vermittelte Zellbindungsaffinität (vgl. Abbildung 4.3.10). Hierbei waren bei einer Inokulationsmenge von 10 Mikrosphären pro Säugerzelle nach einer Koinkubationsdauer von > 90 Minuten durchschnittlich 6-9 Mikrosphären zellassoziiert (> 60 %). Unabhängig vom getesteten Säugerzelltyp wiesen wiederum die rBBK32<sub>TN</sub>-Mikrosphären die geringste Bindungsaffinität auf, wobei die Unterschiede zu den rBBK32<sub>B31</sub>- und rBBK32<sub>PKa2</sub>-Mikrosphären jedoch nicht signifikant waren. Dies ist möglicherweise auf die vergleichsweise geringe Stabilität des gereinigten rBBK32<sub>TN</sub>-Proteins zurückzuführen. Die höchste Affinität zu allen getesteten Zelltypen wiesen die rBBK32<sub>PHei</sub>-Mikrosphären auf, deren erhöhte Fibronectin-Bindungsaffinität bereits in Western Blot-Studien zum Konjugationsnachweis gezeigt werden konnte (vgl. Abbildung 4.3.7).

Insgesamt war die erhöhte Zellbindungsaffinität von rBBK32<sub>PHei</sub>-konjugierten Mikrosphären bei den getesteten endothelialen Zelltypen gegenüber allen anderen rBBK32-Varianten zu jedem Zeitwert signifikant ( $p < 0,05$ ). Im Falle der neuronalen Astrozytomzelllinie 1321N1 waren nur gegenüber den rBBK32<sub>TN</sub>-Mikrosphären signifikant mehr rBBK32<sub>PHei</sub>-Mikrosphären zellassoziiert.

Die Kokulturrexperimente der rBBK32-konjugierten Mikrosphären mit den verschiedenen Säugerzelltypen bestätigten somit die Ergebnisse zur erhöhten Fibronectin-Bindungsaffinität von rBBK32<sub>PHei</sub> gegenüber den übrigen getesteten rBBK32-Varianten.

Bei allen getesteten BBK32-Varianten zeichnet sich ein signifikanter Unterschied in der Zellbindungsaffinität zwischen neuronalen und endothelialen Säugerzellmodellen ab, wobei die rBBK32-konjugierten Mikrosphären effektiver an endotheliales, als an neuronales Gewebe binden. Dies könnte möglicherweise auf das unter 4.3.5.2 beschriebene verminderte Fibronectin-Vorkommen auf den verwendeten neuronalen Zellen zurückzuführen sein.

Im Vergleich der verschiedenen endothelialen Zellen ist die Bindung der Mikrosphären an immortalisierte Zellen gegenüber primär isolierten Nabelschnurzellen weniger effizient, wobei die Differenzen statistisch nicht signifikant sind ( $p > 0,05$ ).

Die verwendeten Mikrosphären sind aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften, vor allem für die Anwendung in biologischen Systemen, insbesondere in Phagozytose- und Adhäsionsexperimenten, geeignet. Aufgrund ihrer starken elektrischen Ladung weisen die Mikrosphären keinerlei Affinität zu Zellen auf. Unerwünschte, unspezifische Bindungen zwischen Zellen und Mikrosphären können somit innerhalb des Testsystems vermieden werden. Da die Biomoleküle kovalent an die aktivierten Carboxylgruppen gebunden werden, entstehen wesentlich stabilere Konjugate, als beispielsweise durch passive Adsorption des Biomoleküls.

BARBARA JOHNSON hat in zellbiologischen Experimenten mit Säugerzellen die Zellbindungsaffinität des Fibronectin-bindenden Proteins des *B. burgdorferi* s.s. Referenzstammes B31 untersucht (persönliche Mitteilung auf der Gordon Research Conference im Januar 2002 in Ventura, Californien, USA). JOHNSON beschrieb hierbei die Expression des BBK32-Proteins auf den Flagellen von *E. coli*. In Kokulturrexperimenten mit Fibroblasten und Epithelzellen gelang es JOHNSON, analog dem Mikrosphären-Modell (diese Studie), die spezifische BBK32-vermittelte Adhäsion der *E. coli*-Zellen an Säugerzellen zu zeigen. Das in der vorliegenden Arbeit verwendeten Testsystem zeichnete sich gegenüber dem *E. coli*-Modell vorwiegend durch proteinbiochemische Stabilität und Kompatibilität mit den verwendeten Säugerzellen aus. So konnten beispielsweise durch die stete Aufrechterhaltung physiologisch optimaler Zellkulturbedingungen eine mögliche, durch das *E. coli*-

Kulturmedium bedingte Beeinträchtigung der Fibronectin-Bindungsfähigkeit der Säugerzellen ausgeschlossen werden.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass gemäß den Untersuchungen von PROBERT und JOHNSON (1998), humanes Plasmafibronectin die Zellbindungsaffinität der verschiedenen rBBK32-konjugierten Mikrosphären an HUVEC beeinflusst (vgl. Abbildung 4.3.12). Der statistisch signifikante inhibitorische Effekt humanen Plasmafibronectins auf die Bindungsaffinität rBBK32-markierter Mikrosphären war am stärksten bei denjenigen Mikrosphären, die mit den Fibronectin-bindenden Proteinen der *B. burgdorferi* Isolate B31, PKa2 und TN konjugiert waren. Das lösliche Plasmafibronectin scheint hierbei, wie bereits beschrieben, die Fibronectin-Bindedomänen der einzelnen rBBK32-Varianten zu blockieren und somit mit dem zelleigenen Fibronectin um bestimmte Epitope innerhalb der "minimal functional binding region" zu konkurrieren. Am wenigsten wurde die Zellbindungsaffinität der rBBK32<sub>PHei</sub>-Mikrosphären durch humanes Plasmafibronectin beeinträchtigt. Dieses Ergebnis scheint im Widerspruch zu der unter 4.3.3.2 beschriebenen vermehrten Fibronectin-Bindungsfähigkeit von rBBK32<sub>PHei</sub> zu stehen. Möglicherweise bindet rBBK32<sub>PHei</sub> jedoch bevorzugt zelluläres heterodimäres Fibronectin (550 kDa), das sich von löslichem monomerem Plasmafibronectin (200-250 kDa) durch zusätzliche Polypeptidsegmente unterscheidet.

Die Ergebnisse zur inhibitorischen Wirkung von löslichem Plasmafibronectin auf die Zellbindungsaffinität rBBK32-konjugierter Mikrosphären korrelieren mit den Gelatine-Affinitätsblot-Daten (vgl. Abbildung 4.3.6), wonach Gelatine die Fibronectin-Bindung von rBBK32<sub>B31</sub>, -<sub>PKa2</sub> und -<sub>TN</sub> stark reduziert, während die von rBBK32<sub>PHei</sub> nur unwesentlich beeinträchtigt wird.

Die vorliegende Arbeit liefert keine eindeutige Klärung der Hypothese, wonach die vermehrte Fibronectin-Bindungsfähigkeit von rBBK32<sub>PHei</sub> auf die Aminosäureaustausche innerhalb der "minimal functional binding region" zurückzuführen ist. Interessant wäre in diesem Zusammenhang, die Fibronectin-bindenden Proteine der *B. burgdorferi* s.l. Isolate ACA1 und IP90 (vgl. Abbildung 5.3.1), die jeweils 2 Aminosäureaustausche mit rBBK32<sub>PHei</sub> teilen, hinsichtlich ihrer Fibronectin-Bindungsfähigkeit näher zu charakterisieren. Möglicherweise weisen die Fibronectinbindenden Proteine von ACA1 und IP90 funktionelle Parallelen zu rBBK32<sub>PHei</sub> auf. Eine weitere Möglichkeit eröffnet die Methode der "site-directed mutagenesis", die durch eine gezielte Variation einzelner Aminosäuren innerhalb der

nicht-konservierten Bereiche der Fibronectin-Bindungsdomäne von BBK32, die Identifizierung derjenigen Aminosäuren erlaubt, die möglicherweise für eine vermehrte Fibronectin-Bindungsaffinität von BBK32<sub>PHei</sub> verantwortlich sind. Des Weiteren kann ein möglicher Einfluss der 18 Nukleotide umfassenden Insertion "downstream" der "minimal functional binding region" von rBBK32<sub>PHei</sub> auf dessen vermehrte Fibronectin-Bindungsfähigkeit nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Dies gilt es durch die Herstellung entsprechender rBBK32<sub>PHei</sub>-Deletionsmutanten zu überprüfen.

Erste Hinweise auf die Bedeutung rekombinanter Fibronectin-bindender Proteine in der Diagnostik der Lyme-Borreliose lieferten die Arbeiten von AKIN et al. (1999), FIKRIG et al. (1997, 1998) und HEIKKILÄ et al. (2000). Während AKIN et al. und FIKRIG et al. in ihren Untersuchungen ausschließlich BBK32-Proteine amerikanischer *B. burgdorferi* s.s. Spezies testeten, bezogen HEIKKILÄ et al. erstmals BBK32-Varianten aller drei humanpathogener Spezies, *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* und *B. garinii*, mit ein. Die Autoren beschränkten sich hierbei jedoch ausschließlich auf rBBK32-Varianten finnischer *B. burgdorferi* Isolate. Angesichts der wenig stringenten Kriterien, Anzahl und Auswahl der Testseren betreffend, sind die Ergebnisse dieser Studien mit Sensitivitäten von bis zu 100 % und demgegenüber niedrigen Spezifitäten von 80-90 % kritisch zu interpretieren.

Unter Verwendung einer definierten Auswahl von Patienten- und Kontrollseren (vgl. SCHULTE-SPECHTEL et al., 2003) wurden Sensitivität und Spezifität der Immunoblots für jedes rBBK32-Antigen unabhängig ermittelt. Die 40 getesteten Patientenseren stammen von Spendern, die aufgrund ihrer klinischen Symptomatik sowie positiver intrathekalen Antikörperproduktion und/oder positivem IgM-ELISA, dem Krankheitsstadium der frühen Neuroborreliose (NBII) zugeordnet wurden. Die Spezifität der Western Blot-Analysen wurde entsprechend anhand definierter Kontrollseren (40 Blutspenden, 10 Serumproben mit positivem Rheumafaktor und 9 Serumproben mit positiver Lues-Serologie) ermittelt.

Die Western Blot-Analyse zeigte bei allen getesteten rBBK32-Varianten spezifische IgG-Serumreaktivitäten mit Sensitivitätswerten von 55 bis 65 % (vgl. Tabelle 4.3.4), wobei die Sensitivitätsunterschiede statistisch nicht signifikant waren.

Während alle getesteten rBBK32-Varianten im Vergleich annähernd identische Einzelsensitivitäten zeigten, d.h. für jedes Protein wurde insgesamt eine jeweils annähernd identische Anzahl an spezifischen IgG-Serumreaktivitäten ermittelt, konnte die Gesamtsensitivität durch die Kombination der 4 rBBK32-Varianten auf insgesamt

70 % erhöht werden. Die Erhöhung der Gesamtsensitivität durch Kombination der verschiedenen Antigene ist wahrscheinlich, wie beispielsweise von HEIKKILÄ et al. (2003) diskutiert, auf die auf AS-Ebene ermittelten Sequenzunterschiede (vgl. Tabelle 4.3.3 und Anhang Abb. 8.2) zurückzuführen.

Abschließend läßt sich aus der vorliegenden serologischen Studie schlußfolgern, dass die getesteten rekombinanten Fibronectin-bindenden Proteine rBBK32<sub>B31</sub>, -PKa2, -PHei und -TN, insbesondere in Kombination, zur serologischen Diagnose der Lyme-Borreliose herangezogen werden können. Interessant wäre in diesem Zusammenhang in weiterführenden Studien zu untersuchen, welche IgG-Sensitivitäten sich für die getesteten 4 rekombinanten Fibronectin-bindenden Proteine im Fokus anderer Krankheitsstadien als der in der vorliegenden Studie getesteten frühen Neuroborreliose (Stadium II), wie Erythema migrans (Stadium I) oder Lyme-Arthritis (Stadium III), ergeben.

#### **5.4 Untersuchungen zur Coiling-Phagozytose von *B. burgdorferi* sensu lato durch primäre humane Makrophagen**

In der vorliegenden Arbeit gelang es erstmals das Phänomen der Coiling-Phagozytose mit Hilfe lichtmikroskopischer Methoden morphologisch zu analysieren und diesen speziellen Phagozytosemechanismus auf molekularer Ebene zu charakterisieren.

Borrelien rotieren auch nach der Anheftung an die Phagozyten in ihrer charakteristischen korkenzieherartigen Weise und könnten sich somit theoretisch selbst um zelluläre Membranausstülpungen, wie beispielsweise Pseudopodien, winden. Das Phänomen der Coiling-Phagozytose würde demnach passiv durch die Rotationsbewegung der Borrelien hervorgerufen. Nach RITTIG et al. (1998a) handelt es sich bei dieser speziellen Art der Phagozytose jedoch um einen aktiven, Makrophagen-gesteuerten Prozess, da auch hitzeinaktivierte Borrelien den Effekt des Coilings induzieren. Die Coiling-Phagozytose tritt verglichen mit konventioneller Phagozytose insgesamt selten auf, ist aber ein für Spirochäten relevanter Phagozytosemechanismus. So wird *B. burgdorferi* beispielsweise von professionellen Phagozyten vorwiegend über diesen speziellen Mechanismus aufgenommen (ca. 60-70 % aller Phagozytose-Vorgänge; RITTIG et al., 1992). RITTIG et al. (1994) diskutierten als mögliche Erklärung für die Coiling-Phagozytose zunächst die Disproportion der Borrelien, die, verglichen mit anderen Keimen, wie z.B. *E. coli* (= 1-4  $\mu\text{m}$ ), mit 8-22  $\mu\text{m}$  ungewöhnlich lang sind (vgl. 1.1.7). Unabhängig von ihrer Morphologie variiert jedoch bei den verschiedenen Spirochäten (*Borrelia*, *Leptospira* und *Treponema*) die Häufigkeit der Coiling-Phagozytose sehr stark (RITTIG et al., 1998a), was wiederum die schraubige Form als möglicher Induktor dieser speziellen Art der Phagozytose ausscheiden lässt. Möglicherweise spielen bestimmte Antigenstrukturen, wie die Osp-Proteine von *B. burgdorferi*, eine entscheidende Rolle als induzierendes Agens (MODOLLEL et al., 1994).

In der vorliegenden Arbeit wurden morphologische und molekulare Aspekte der Coiling-Phagozytose analysiert, um diesen speziellen Phagozytosemechanismus insbesondere auf der Ebene professioneller Phagozyten näher zu charakterisieren. In Koinkubationsexperimenten mit primären humanen Makrophagen wurden Veränderungen des zellulären Zytoskeletts der professioneller Phagozyten während der Internalisierung von *B. burgdorferi* s.l. untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass *B. burgdorferi* bei primären humanen Makrophagen die Ausbildung F-Aktin-reicher Strukturen induziert, die aus den Fresszellen hervorstechen und modifizierten

Pseudopodien ähneln (vgl. Abbildung 4.4.2, 4.4.3, 4.4.4). Die Bildung dieser unilateralen Pseudopodien, dem wichtigsten Merkmal der Coiling-Phagozytose, wird möglicherweise durch asymmetrisches Gruppieren bestimmter zellulärer Rezeptoren an der Kontaktstelle zwischen mikrobiellem Agens und dem Phagozyten hervorgerufen (RITTIG et al., 1999). ADEREM und ANDERHILL (1999) sowie KAPLAN et al. (1977) beschrieben in diesem Zusammenhang lokale Aktin-Polymerisationen als Induktor Fcγ- oder CR3-vermittelter Phagozytose.

Die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Phagozytosestrukturen tatsächlich um Coiling-Pseudopodien und nicht um Artefakte handelt, war aufgrund der Häufigkeit dieses Phänomens und der Analyse entsprechend vieler Strukturen bezüglich Morphologie und Proteingehalt sehr groß (diese Studie, RITTIG et al., 1992). Wie groß dennoch der Spielraum bei der Beschreibung der Phagozytose von *B. burgdorferi* durch professionelle Phagozyten ist, zeigte die von SUHONEN et al. (1998) entdeckte "Schlauchphagozytose" (engl. *tube phagocytosis*). Dieser Mechanismus, bei dem humane neutrophile Zellen während der Internalisierung Komplement-opsonierter Borrelien mächtige schlauchförmige Ausstülpungen ausbilden, beschreibt wahrscheinlich die hinlänglich bekannte Coiling-Phagozytose. Zudem wurde die "Schlauchphagozytose" lediglich mittels Video-unterstützter Dunkelfeldmikroskopie analysiert, deren Aussagekraft nach unserer Meinung weit unter den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Immunfluoreszenzmethoden liegt.

In der vorliegenden Untersuchung gelang es, die Genese Borrelien-induzierter F-Aktin-reicher Phagozytosestrukturen, die in Struktur und Genese den von RITTIG et al. (1999) beschriebenen Coiling-Pseudopodien entsprachen, unter experimentellen Bedingungen zu optimieren und zu standardisieren (vgl. 4.4.2.2). Es konnte gezeigt werden, dass durch die Opsonierung der Borrelien wahlweise mit dem monoklonalen Antikörper L32 1F11 (= anti-OspA) bzw. L22 1F8 (= anti-OspC) oder Komplement (humanes Serum) die Rate der zellassozierten Borrelien erhöht wird. Gleichzeitig wurde die Anzahl unilateraler Coiling-Pseudopodien gegenüber den konventionellen symmetrischen Pseudopodien signifikant erhöht. Die Rolle von Komplement bei der Phagozytose von *B. burgdorferi* wird kontrovers diskutiert. Während PETERSON et al. (1984) Komplement keinerlei opsonierende Wirkung beimaß, beschrieben SUHONEN et al. (1998, 2000) eine signifikante Erhöhung der Phagozytoserate nach Komplement-Opsonierung. Die Frage nach der Wirkung verschiedener Opsonine vertieften MOLELL et al. (1994). Während die Autoren durch die Opsonierung mit

monoklonalen anti-OspA-Antikörpern eine Steigerung der Phagozytoserate erzielten, verringerte ein monoklonaler anti-Flagellin-Antikörper interessanterweise nicht nur die Phagozytoserate, sondern reduzierte insbesondere die Anzahl der Coiling-Ereignisse signifikant. Möglicherweise ist die beobachtete Steigerung der Phagozytoserate durch anti-Osp-Antikörper durch die Lokalisation der Zielantigene erklärbar. Osp-Proteine sind auf der äußeren Membran der Borrelien exponiert und können durch Maskierung mit einem spezifischen Antikörper Fc $\gamma$ -vermittelte Phagozytose initiieren, wodurch sich die Phagozytoserate erhöht. Flagellin hingegen ist auf den Endoflagellen lokalisiert, die sich wiederum im periplasmatischen Raum zwischen äußerer Membran und bakterieller Zellwand befinden, und ist somit während des Phagozytoseprozesses nicht für spezifische Antikörper zugänglich. Die unterschiedliche Häufigkeit der Coiling-Phagozytoseereignisse ist in diesem Zusammenhang möglicherweise auf ein asymmetrisches Gruppieren bestimmter zellulärer Rezeptoren an der Kontaktstelle zwischen Spirochäte und Phagozyten zurückzuführen, welches durch Osp-spezifische, nicht jedoch durch Flagellin-spezifische Antikörper initiiert wird (RITTIG et al., 1999).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Eindringen der Borrelien in die primären humanen Makrophagen hauptsächlich *end on* erfolgt, wie auch von MONTGOMERY und MALAWISTA (1996) beschrieben. Die Bakterienzellen heften sich bevorzugt mit ihrer Spitze an den Makrophagen, um dann von den Coiling-Pseudopodien umwickelt und als Membrankomplex internalisiert zu werden. An der Kontaktstelle zwischen Borrelie und Phagozyt ist hierbei die massivste und initiale Aktin-Akkumulation lokalisiert. Diese Beobachtungen korrespondieren mit den Ergebnissen anderer Studien, wonach die Spirochätenspitze bereits als hochspezialisierte Region beschrieben wurde, die nach KLEMPNER et al. (1995) in der Lage ist, verschiedene Wirtsfaktoren, wie Plasminogen, zu binden. COLEMAN et al. (1995) zeigten in diesem Zusammenhang, dass die spezifische Bindung von Plasminogen in Zellkulturversuchen mit HUVEC-Präparationen die Penetration endothelialen Gewebes vermittelt.

In Koinkubationsexperimenten mit primären humanen Makrophagen konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Coiling-Phagozytose von massiver Aktin-Polymerisation und der Akkumulation der kleinen GTPase Rac1/2 begleitet ist (vgl. Abbildung 4.4.6). Weiterhin gelang es, die Proteine WASp und Arp2/3 Komplex innerhalb der Borrelien-induzierten zellulären Phagozytosestrukturen nachzuweisen (vgl. Abbildung 4.4.7, 4.4.8, 4.4.9, 4.4.10). Die Beteiligung von Arp2/3 Komplex ist mit

seinen Eigenschaften als Aktivator der WASp-abhängigen Aktin-Polymerisation bzw. als Aktin-Nukleator gut erklärbar. Die Rolle von Rac bzw. Rho bei diesem Phänomen ist dagegen noch unklar. Mögliche Funktionen sind die Rac-abhängige Aktin-Regulation durch WAVE Proteine sowie Rho/Rho Kinase-vermittelte Aktomyosin-Kontraktilität (HIGGS und POLLARD, 1999; BISHOP und HALL, 2000). Ebenso ist eine Beteiligung von Rho und Rac durch ihre Rolle als Inhibitoren der Aktin-Depolymerisation via LIM-Kinasen und Inaktivierung von Cofilin denkbar (YANG et al., 1998; SUMI et al., 1999). Rho-Aktivität könnte zudem auf die Beteiligung von Forminen, wie mDia1, hindeuten, die Rho-abhängig Aktin regulieren (EVANGELISTA et al., 2001; SAGOT et al., 2002).

Innerhalb der Coiling-Strukturen, die für die Phagozytose von *B. burgdorferi* verantwortlich sind, ist WASp homogen entlang den Spirochätenzellen verteilt (vgl. Abbildung 4.4.7, 4.4.8), während sich der Arp2/3 Komplex in punktartigen Foci darstellt (vgl. Abbildung 4.4.9, 4.4.10). Eine solche punktartige Verteilung des Arp2/3 Komplexes wurde bereits für CR3-abhängige Phagozytose beschrieben (ALLEN und ADEREM, 1996; KAPLAN et al., 1977; MAY et al., 2000). Bei Fc $\gamma$ R-vermittelter Phagozytose ist Arp2/3 Komplex dagegen, wie auch andere Proteine, gleichförmig in den jeweiligen Aufnahmestrukturen verteilt (ALLEN und ADEREM, 1996; MAY et al., 2000). Fc $\gamma$ R-abhängige Phagozytose ist zudem gekennzeichnet durch die Bildung großer, beidseitig die Partikel umschließende Lamellipodien, während bei CR3-vermittelter Phagozytose Partikel ohne Bildung großer Oberflächenextensionen aufgenommen werden. Die Coiling-Phagozytose von *B. burgdorferi* nimmt daher eine intermediäre Stellung zwischen Fc $\gamma$ R-vermittelter und CR3-vermittelter Phagozytose ein, da die Bakterien zum einen wie in Fc $\gamma$ R-abhängiger Phagozytose durch große Pseudopodien aufgenommen werden (RITTIG et al., 1999), zum anderen der Arp2/3 Komplex jedoch wie bei CR3-abhängiger Phagozytose in distinkten Foci vorliegt (MAY et al., 2000).

Mit Hilfe von Mikroinjektionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass in primären humanen Makrophagen die Coiling-Phagozytose Komplement-opsonierter *B. burgdorferi* durch die kleinen GTPasen CDC42Hs und Rac kontrolliert wird. Rho, ebenfalls Mitglied der Familie der kleinen Rho-GTPasen, spielt hingegen keine Rolle (vgl. Abbildung 4.4.11). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von Komplement-opsonierten *B. burgdorferi* bei primären humanen Makrophagen die Ausbildung von *membrane ruffles* induziert. Die Beteiligung der kleinen GTPase Rac

an der Ausbildung der Coiling-Pseudopodien korrespondiert mit den Ergebnissen von RIDLEY und HALL (1992) und HALL (1998), wonach die Ausbildung von *membrane ruffles* ebenfalls Rac-kontrolliert ist.

Die besondere Stellung der Coiling-Phagozytose innerhalb der Fc $\gamma$ -Rezeptor- oder CR3-vermittelten Prozesse wird durch die Beteiligung der verschiedenen Rho-GTPasen unterstrichen. Während nach CARON und HALL (1998) und MASSOL et al. (1998) Fc $\gamma$ -Rezeptor-vermittelte Phagozytose CDC42Hs und Rac1 abhängig ist und CR3-vermittelte Phagozytose als Rho kontrolliert beschrieben wurde (CARON und HALL, 1998), verhält sich die Coiling-Phagozytose kontrovers: die Serum-, also Komplement-opsonierten Borrelien wurden, einheitlich über einen CDC42Hs und Rac1 kontrollierten Signaltransduktionsweg ohne Rho-Beteiligung phagozytiert. An dieser Stelle muss allerdings berücksichtigt werden, dass die in diesem Zusammenhang zitierten Studien mit transfizierten Zelllinien und nicht, wie in der vorliegenden Arbeit, mit primären humanen Makrophagen durchgeführt wurden. In Untersuchungen mit Makrophagen beschrieben COX et al. (1997) hingegen die Beteiligung von CDC42Hs und Rac1 an CR3-vermittelter Phagozytose und entsprechend von Rho in Fc $\gamma$ -Rezeptor-vermittelter Phagozytose (HACKHAM et al., 1997), was durch die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigt wird. Die Kontrollmechanismen phagozytotischer Prozesse scheinen somit, abhängig vom verwendeten Zellmodellsystem, zu variieren.

Ein Vergleich reifender Phagosomen, wie beispielsweise Coiling-Pseudopodien, mit Podosomen zeigt, dass sich beide Strukturen aufgrund ihres Proteingehaltes ähneln (ASPENSTRÖM et al., 1996; RITTIG et al., 1999). Podosomen sind punktförmige, F-Aktin-reiche, hoch-dynamische Adhäsionsstrukturen die von monozytären Zellen und Osteoklasten ausgebildet werden (MARCHISIO et al., 1984; 1987; ZAMBONIN-ZALLONE et al., 1989). Bisher beschränkten sich die Übereinstimmungen von Phagosomen und Podosomen hauptsächlich auf die Proteine F-Aktin, Talin und Proteinase K. Unter Berücksichtigung unserer Ergebnisse konnte das Spektrum der strukturellen Gemeinsamkeiten nun erweitert werden: in Podosomen kolokalisieren, genau wie bei den im Rahmen dieser Arbeit analysierten F-Aktin-reichen Phagozytosestrukturen, die Effektoren der F-Aktin-Polymerisationskaskade WASp und Arp2/3 Komplex. Zudem scheint die Formation der Podosomen, ebenso wie die der Coiling-Pseudopodien, CDC42Hs kontrolliert zu sein (LINDER et al., 1999, 2000b).

Insgesamt scheinen die für den als Coiling-Phagozytose bezeichneten Internalisierungsprozess essentiellen zellulären Zytoskelettmodulationen denselben

Kontrollmechanismen zu unterliegen, wie sie für konventionelle Arten der Phagozytose beschrieben wurden. Coiling-Phagozytose ist somit weder die spezifische Strategie bestimmter Bakterien, noch ein eigenständiger Mechanismus (RITTIG et al., 1998b), sondern vielmehr eine Spielart der konventionellen Phagozytose.

## 6 Zusammenfassung

*B. burgdorferi* s.l. wurde im Verlauf der vorliegenden Arbeit mit Zellen haematopoietischen, und nicht-haematopoietischen Ursprungs konfrontiert, um verschiedene Aspekte der Interaktion des Agens der Lyme-Borreliose mit Wirtszellen zu untersuchen.

Hauptziel der komplexen Untersuchungen im Rahmen der Pathogeneseforschung der Spirochätose war es, Unterschiede im Organotropismus verschiedener Borrelienstämme und -klone näher zu charakterisieren. In Untersuchungen mit nicht-haematopoietischen humanen Zellen und Zelllinien endothelialen und neuronalen Ursprungs konnte gezeigt werden, dass die getesteten Borrelienstämme und -klone, PKo, PKo97 K37, PKo345 II-2-3 und PBi *in vitro* an die verschiedenen Wirtszellen adhären und diese auch invadieren. Hierbei konnte eine Korrelation zwischen der Bindungsfähigkeit und der Variation in der Expression der Oberflächenproteine OspA und OspC der Borrelien, sowie Unterschiede im OspA-Serotyp gezeigt werden. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass Stamm PKo (*B. afzelii*, OspA-Typ 2, typisches Hautisolat) und der Stamm PBi (*B. garinii*, OspA-Typ 4, typisches Liquorisolat) eine signifikant erhöhte Zellbindungsaffinität zu endothelialelem bzw. neuronalem Gewebe aufweisen. Übertragen auf die *in vivo* Situation könnten die im Zellmodell beobachteten Unterschiede in der Adhäsion möglicherweise den Organotropismus der unterschiedlichen OspA-Serotypen erklären.

Weiterhin konnte die essentielle Rolle von OspA und OspC bei der Adhäsion von *B. burgdorferi* s.l. an humane Wirtszellen gezeigt werden, da OspA-Antikörper die Adhäsion signifikant hemmen. Möglicherweise spielt auch OspC eine bedeutende Rolle, da adhärenente OspA/OspC-doppelexprimierende Borrelien eine besonders starke OspC-Expression aufweisen und zudem OspA- und OspC-exprimierende Borrelien stärker adhären als nur OspA-exprimierende Borrelien. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie stützen somit die Arbeitshypothese verschiedener Autoren, die zur Prophylaxe der Lyme-Borreliose die Entwicklung polyvalenter Impfstoffe auf der Basis verschiedener Osp-Typen postulieren.

In weiteren Untersuchungen gelang es, ein experimentelles System zu etablieren, das den routinemäßigen Einsatz der Durchflusszytometrie in Untersuchungen zur Interaktion von *B. burgdorferi* sensu lato mit Säugerzellen erlaubt. Unter Anwendung dieser Methode konnte gezeigt werden, dass das Leukozytenadhäsionsmolekül CD18 keine Rolle bei der Bindung von nicht-opsonierten Borrelien an murine Makrophagen zu spielen scheint und die Adhäsion von *B. burgdorferi* an murine Peritonealmakrophagen unter Serum-freien Bedingungen folglich nicht  $\alpha_M\beta_2$ -Integrin-vermittelt ist.

Um das Fibronektin-bindende Proteine (BBK32), ein wichtiges bakterielles Adhäsins, näher zu charakterisieren, gelang es, rBBK32-Proteine der *B. burgdorferi* sensu lato Isolate B31, PKa2, PHei und TN zu klonieren, rekombinant in *E. coli* zu exprimieren und zu reinigen. Anhand von Untersuchungen zu Struktur und Funktion der verschiedenen rBBK32-Varianten konnte gezeigt werden, dass sich das Fibronektin-bindende Protein des *B. garinii* Stammes PHei (rBBK32<sub>PHei</sub>) gegenüber rBBK32<sub>B31</sub>, -PKa2 und -TN durch eine signifikant erhöhte Zellbindungsaffinität auszeichnet, die vermutlich auf die innerhalb der BBK32-Ligand-Binderegion identifizierten Aminosäureaustausche zurückzuführen ist. Abgesehen von der BBK32-Ligand-Binderegion sind die verschiedenen rBBK32-Varianten auf Nukleotid- und Aminosäureebene nahezu identisch. Dass die Heterogenität der BBK32-Ligand-Binderegion für diagnostische Belange nicht relevant ist, wurde auch in Immunoblotstudien mit Patientenseren bestätigt. Die verschiedenen rBBK32-Varianten wiesen allerdings Unterschiede in der Reaktivität mit Patientenseren auf, wobei die Kombination verschiedener rBBK32-Antigene die Sensitivität des Antikörpernachweises erhöhen konnte.

Ein Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der Coiling-Phagozytose von *B. burgdorferi* durch primäre humane Makrophagen auf molekularer Ebene. Die Untersuchungen fokussierten sich auf morphologische Aspekte und die molekulare Maschinerie der Aktin-Polymerisationskaskade während der Coiling-Phagozytose. Es konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme Komplement-opsonierter Borrelien durch Coiling-Phagozytose von massiver Aktin-Polymerisation entlang den gebildeten Pseudopodien begleitet wird. WASp und Arp2/3 Komplex, die in diese Strukturen rekrutiert werden, steuern diesen Vorgang. Kontrolliert wird der gesamte Prozess letztlich von den kleinen GTPasen CDC42Hs und Rac1. Die GTPase Rho spielt hingegen keine Rolle. Dies spricht für eine intermediäre Stellung der Coiling-Phagozytose zwischen Fcγ- bzw. Komplementrezeptor (CR3)-vermittelter Phagozytose. Die Ergebnisse zeigen, dass die für den besonderen Internalisierungsprozess essentiellen zellulären Zytoskelettmodulationen denselben Kontrollmechanismen unterliegen, die für konventionelle Arten der Phagozytose beschrieben wurden.

## 7 Literaturverzeichnis

- ABERER, E., KERSTEN, A. KLADE, H. POITSCHKEK, C. JURECKA, W. (1996) Heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* in the skin. Am. J. Dermatopathol. 18:571-579
- ACKERMANN, R. (1983) Erythema chronicum migrans und durch Zecken übertragene Meningopolyneuritis (Garin-Bujadoux, Bannwarth): Borrelien-Infektion? Dtsch. Med. Wschr. 108:577-580
- ADEREM, A., UNDERHILL, D. M. (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. Annu. Rev. Immunol. 17:593-623
- AEPFELBACHER, M., ESSLER, M., HUBER, E., CZECH, A., WEBER, P. C. (1996) Rho is a negative regulator of human monocyte spreading. J. Immunol. 157:5070-5075
- AEPFELBACHER, M., VAUTI, F., WEBER, P. C., GLOMSET, J. A. (1994) Spreading of differentiating human monocytes is associated with a major increase in membrane-bound CDC42. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4263-4267
- AFZELIUS, A. (1910) Verhandlungen der dermatologischen Gesellschaft zu Stockholm, 16. Dezember 1909. Arch. Dermatol. Syph. (Berlin): 101:405-406
- AKINS, D. R., PORCELLA, S. F., POPVA, T. G., SHEVCHENKO, D., BAKER, S. I., LI, M., NORGARD, M. V., RADOLF, J. D. (1995) Evidence for in vivo but not in vitro expression of a *Borrelia burgdorferi* outer surface protein F (OspF) homologue. Mol. Microbiol. 18:507-520
- AKTORIES, K., BRAUN, S., RÖSENER, S., JUST, I., HALL, A. (1989) The rho gene product expressed in *E. coli* is a substrate for botulinum ADP-ribosyltransferase C3. Biophys. Res. Commun. 158: 209-213
- ALBAN, P. S., JOHNSON, P. W., NELSON, D. R. (2000) Serum-starvation-induced changes in protein synthesis and morphology of *Borrelia burgdorferi*. Microbiology 146:119-127
- ALBELDA, S. M., BUCK, C. A. (1990) Integrins and other cell adhesion molecules. FASEB Journal 4:2868-2880
- ALBRITTON, D. L. und MEIRA FILHO, L. G. (2001) (Technical Summary). in: Houghton, J. T., Ding, Y., Griggs, D. J., Noguer, M., van der Linden, P. J., Dai, X., Maskell, K., Johnson, C. A. (eds.) IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change), Working Group 1, Third Assessment Report. Cambridge, University Press 21-83
- ALLEN, L. A., ADEREM, A. (1996) Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. J. Exp. Med. 184:627-637
- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W., LIPMAN, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215:403-410
- ANDERSON, J. F. (1989) Epizootiology of *Borrelia* in Ixodes tick vectors and reservoir hosts. Rev. Infect. Dis. 11 Suppl. 6:1451-1459

- ÅSBRINK, E., HEDERSTEDT, B., HOVMARK, A. (1984) The spirochetal etiology of erythema chronicum migrans Afzelius. *Acta Derm. Venereol.* 64:291-295
- ÅSBRINK, E., HOVMARK, A., WEBER, K. (1993) Acrodermatitis chronica atrophicans. in: Weber, K., Burgdorfer, W. (eds.) *Aspects of Lyme borreliosis*. Berlin, Heidelberg, New York, Springer 193-204
- ASPENSTRÖM, P., LINDBERG, U., HALL, A. (1996) Two GTPases, Cdc42 and Rac, bind directly to a protein implicated in the immunodeficiency disorder Wiskott-Aldrich syndrome. *Curr. Biol.* 6:70-75
- ASSOUS, M. V., POSTIC, D., PAUL, G., NEVOT, P., BARANTON, G. (1993) Western blot analysis of sera from Lyme borreliosis patients according to the genomic species of the *Borrelia* strains used as antigens. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 12 :261-268
- ATCC (URL: <http://www.atcc.org/>)
- AUSUBEL, F. M., BRENT, R., KINGSTON, R. E., MOORE, D. D., SEIDMAN, J. G., SMITH, J. A., STRUHL, K. (1993) *Current protocols in molecular Biology*. New York, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience
- BACON, R. M., BIGGERSTAFF, B. J., SCHRIEFER, M. E., GILMORE, R. D. JR., PHILLIP, M. T., STEERE, A. C., WORMSER, G. P., MARQUES, A. R., JOHNSON, B. J. (2003) Serodiagnosis of Lyme disease by kinetic enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant VlsE1 or peptide antigens of *Borrelia burgdorferi* compared with 2-tiered testing using whole-cell lysates. *J. Infect. Dis.* 187:1187-1189
- BALMELLI, T., PIFFARETTI, J.-C. (1995) Association between different clinical manifestations of Lyme disease and different species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Res. Microbiol.* 146:329-340
- BANFI, E., CINCO, M., PERTICARARI, S., PRESANI, G. (1989) Rapid flow cytometric studies of *Borrelia burgdorferi* phagocytosis by human polymorphnuclear leukocytes. *J. Appl. Bacteriol.* 67:37-45
- BANNWARTH, A. (1941) Chronische lymphozytäre Meningitis, entzündliche Polyneuritis und "Rheumatismus". Ein Beitrag zum Problem "Allergie und Nervensystem" in zwei Teilen. *Arch. Psychiatr. Nervenkr.* 113:284-376
- BARANTON, G., POSTIC, D., SAINT GIRONS, I., BOERLIN, P., PIFFARETTI, J.-C., ASSOUS, M., GRIMONT, P. A. D. (1992) Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42:378-383
- BARANTON, G., MARTI RAS, N., POSTIC, D. (1998) Molecular epidemiology of the aetiological agents of Lyme borreliosis. *Wien. Klin. Wochenschr.* 110:850-855
- BARBOUR, A. G., TESSIER, S. L., TODD, W. J. (1983) Lyme disease spirochetes and ixodid tick spirochetes share a common surface antigenic determinant defined by a monoclonal antibody. *Infect. Immun.* 41:795-804

- BARBOUR, A. G. (1984) Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. *Yale J. Biol. Med.* 57:521-525
- BARBOUR, A. G.; HAYES, S. F. (1986) Biology of *Borrelia* species. *Microbiol. Rev.* 50:381-400
- BARBOUR, A. G., GARON, C. F. (1987) Linear plasmids of the bacterium *Borrelia burgdorferi* have covalently closed ends. *Science* 237:409-411
- BARBOUR, A. G., FISH, D. (1993) The biological and social phenomenon of Lyme disease. *Science* 260:1610-1616
- BARTUNEK, P., MRAZEK, V., GORICAN, K., BINA, R., LISTVANOVA, S., ZAPLETALOVA, J. (2001) *Borrelia* infection as a cause of carditis (a long-term study). *Wien. Klin. Wochenschr.*: 113:38-44
- BELFAIZA, J., POSTIC, D., BELLENGER, E., BARANTON, G., GIRONS, I. S. (1993) Genomic fingerprinting of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 31:2873-2877
- 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
- BERG, J. M., TYMOCZKO, J. L., STRYER, L. (2003). *Biochemie*. 5. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin
- BISHOP, A. L. AND HALL, A. (2000) Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem. J.* 348:241-255
- BOGGEMEYER, E., STEHLE, T., SCHAIBLE, U. E., HAHNE, M., VESTWEBER, D., SIMON, M. M. (1994) *Borrelia burgdorferi* upregulates the adhesion molecules E-selectin, P-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 on mouse endothelioma cells in vitro. *Cell Adhes. Commun.* 2:145-157
- BÖSEBECK, D. (1998) Entwicklungszyklus der Schildzecke *Ixodes ricinus* und Übertragung des Erregers der Lyme-Borreliose. in: Oschmann, P., Kraiczy, P. (eds.) *Lyme-Borreliose und Frühsommer-Meningoenzephalitis*. Bremen, Uni-med-Verlag 26
- BRADFORD, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254
- BRANDT, M. E., RILEY, B. S. RADOLF, J. D. NORGARD, M. V. (1990) Immunogenic integral membrane proteins of *Borrelia burgdorferi* are lipoproteins. *Infect. Immun.* 58:983-991
- BUCHWALD, A. (1883) Ein Fall von diffuser idiopathischer Hautatrophie. *Dermatol. Vierteljahresschr.* 10:553-556

- BULLOCK, W. O., FERNANDEZ, J. M., SHORT, J. M. (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with Beta-Galactosidase selection. *Biotechniques* 5:376-379
- BURGDORFER, W., BARBOUR, A. G., HAYES, S. F., BENACH, J. L., GRUNWALDT, E., DAVIS, J. P. (1982) Lyme disease - a tick-borne spirochetosis? *Science* 216:1317-1319
- BURGDORFER, W. (1984) Discovery of the Lyme disease Spirochete and its relation to tick vectors. *Yale J. Biol. Med.* 57:515-520
- BURGDORFER, W., HAYES, S. F., CORWIN, D. (1989) Pathophysiology of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, in Ixodid Ticks. *Rev. Infect. Dis.* 11, Suppl. 6:1442-1450
- BURNS, M. J., FURIE, M. B. (1998) *Borrelia burgdorferi* and interleukin-1 promote the transendothelial migration of monocytes in vitro by different mechanisms. *Infect. Immun.* 66:4875-4883
- BURNS, M. J., SELLATI, T. J., TENG, E. I., FURIE, M. B. (1997) Production of interleukin-8 (IL-8) by cultured endothelial cells in response to *Borrelia burgdorferi* occurs independently of secreted IL-1 and tumor necrosis factor alpha and is required for subsequent transendothelial migration of neutrophils. *Infect. Immun.* 65:1217-1222
- BUSCH, U. (1996) Molekulargenische Analysen der *Borrelia burgdorferi* sensu lato-Stämme Bedeutung für die Diagnostik. Dissertation 1-107
- BUSCH, U., HIZO-TEUFEL, C., BOEHMER, R., FINGERLE, V., NITSCHKO, H., WILSKE, B., PREAC-MURSIC, V. (1996) Three species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii* and *B. garinii*) identified from cerebrospinal fluid isolates by pulsed-field gel electrophoresis and PCR. *J. Clin. Microbiol.* 34 :1072-1078
- CALLISTER, S. M., SCHELL, R. F., LIM, L. C. L., JOBE, D. A., CASE, K. L., BRYANT, G. L., MOLLING, P. E. (1994) Detection of borreliacidal antibodies by flow cytometry. *Arch. Intern. Med.* 154:1625-1632
- CALLISTER, S. M., JOBE, D. A., SCHELL, R. F., PAVIA, C. S., LOVRICH, S. D. (1996) Sensitivity and specificity of the borreliacidal antibody test during early Lyme disease: a gold standard? *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 3:399-402
- CALLISTER, S. M., JOBE, D. A., SCHELL, R. F., LOVRICH, S. D., ONHEIBER, K. L., KORSHUS, J. B. (2000) Detection of borreliacidal antibodies in dogs after challenge with *Borrelia burgdorferi*-infected ixodes scapularis ticks. *J. Clin. Microbiol.* 38:3670-3674
- CALLISTER, S. M., JOBE, D. A., AGGER, W. A., SCHELL, R. F., KOWALSKI, T. J., LOVRICH, S. D., MARKS, J. A. (2002) Ability of the borreliacidal antibody test to confirm lyme disease in clinical practice. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9:908-912
- CANICA, M. M., NATO, F., DU MERLE, L., MAZIE, J. C., BARANTON, G., POSTIC, D. (1993) Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. *Scand. J. Infect. Dis.* 25:441-448

- CARON, E., HALL, A. (1998) Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* 282:1717-1721
- CASJENS, S., MURPHY, M., DELANGE, M., SAMPSON, L., VAN VUGT, R., HUANG, W. M. (1997) Telomeres of the linear chromosome of Lyme disease spirochetes nucleotide sequence and possible exchange with linear plasmids telomeres. *Mol. Microbiol.* 26:581-596
- CHARDIN, P., BOQUET, P., MADAULE, P., POPOFF, M. R., RUBIN, E. J., GILL, D. M. (1989) The mammalian G protein Rho C is ADP-ribosylated by *Clostridium botulinum* exoenzyme C3 and affects actin microfilaments in vero cells. *EMBO* 8: 1087-1092
- CINCO, M., MURGIA, R., PRESANI, G., PERTICARARI, S. (1997) Integrin CR3 mediates the binding of nonspecifically opsonized *Borrelia burgdorferi* to human phagocytes and mammalian cells. *Infect. Immun.* 65:4784-4789
- CINCO, M., PANFILI, E., PRESANI, G., PERTICARARI, S. (2000) Interaction with *Borrelia burgdorferi* causes increased expression of the CR3 integrin and increased binding affinity to fibronectin via CR3. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2: 575-579
- CINCO, M., CINI, B., MURGIA, R., PRESANI, G., PRODAN, M., PERTICARARI, S. (2001) Evidence of involvement of the mannose receptor in adhesion of *Borrelia burgdorferi* to monocyte/macrophages. *Infect. Immun.* 69:2743-2747
- COBURN, J., LEONG, J. M., ERBAN, J. K. (1993) Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  mediates binding of the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi* to human platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7059-7063
- COBURN, J., BARTHOLD, S. W., LEONG, J. M. (1994) Diverse Lyme disease spirochetes bind integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  on human platelets. *Infect. Immun.* 62:5559-5567
- COBURN, J., MAGOUN, L. S., BODARY, C., LEONG, J. M. (1998) Integrins  $\alpha_V\beta_3$  and  $\alpha_5\beta_1$  mediate attachment of Lyme disease spirochete to human cells. *Infect. Immun.* 66:1946-1952
- COBURN, J., CHEGE, W., MAGOUN, L., BODARY, S. C., LEONG, J. M. (1999) Characterization of a candidate *Borrelia burgdorferi*  $\beta_3$ -chain integrin ligand identified using a phage display library. *Mol. Microbiol.* 34:926-940
- COBURN, J. (2001) Adhesion mechanisms of the Lyme Disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* 1:171-191
- COBURN, J., CUGINI, C. (2003) Targeted mutation of the outer membrane protein P66 disrupts attachment of the Lyme disease agent, *Borrelia burgdorferi*, to integrin  $\alpha_V\beta_3$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:7301-7306
- COLEMAN, J. L., SELLATI, T. J., TESTA, J. E., KEW, R. R., FURIE, M. B., BENACH, J. L. (1995) *Borrelia burgdorferi* binds plasminogen, resulting in enhanced penetration of endothelial monolayers. *Infect. Immun.* 63:2478-2484

- COLEMAN, J. L., ROEMER, E. J., BENACH, J. L. (1999) Plasmin-coated *Borrelia burgdorferi* degrades soluble and insoluble components of the mammalian extracellular matrix. *Infect. Immun.*: 67:3929-3936
- COMSTOCK, L. E., THOMAS, D. D. (1989) Penetration of endothelial cell monolayers by *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 57:1626-1628
- COMSTOCK, L. E., THOMAS, D. D. (1991) Characterization of *Borrelia burgdorferi* invasion of cultured endothelial cells. *Microb. Pathogen.* 10:137-148
- COMSTOCK, L. E., FIKRIG, E., SHOBERG, R. J., FLAVELL, R. A., THOMAS, D. D. (1993) A monoclonal antibody to OspA inhibits association of *Borrelia burgdorferi* with human endothelial cells. *Infect. Immun.* 61:423-431
- CONCEPCION, M. B., NELSON, D. R. (2003) Expression of *spoT* in *Borrelia burgdorferi* during serum starvation. *J. Bacteriol.* 185: 444-452
- COX, D., CHANG, P., ZAHNG, Q., REDDY, P. G., BOKOCH, G. M., GREENBERG, S. (1997) Requirements for both Rac1 and Cdc42 in membrane ruffling and phagocytosis in leukocytes. *J. Exp. Med.* 186:1487-1494
- COX, D. L., RADOLF, J. D. (2001) Insertion of fluorescent fatty acid probes into the outer surface membranes of the pathogenic spirochetes *Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi*. *Microbiology* 147: 1161-1169
- DATTWYLER, R. J., VOLKMAN, D. J., LUFT, D. J., HALPERIN, J. J. (1987) Lyme disease in Europe and North America. *Lancet*: 21(1987)681
- DAWSON J. R., ELLEN, R. P. (1990) Tip-orientated adherence of *Treponema denticola* to fibronectin. *Infect. Immun.* 58:3924-3928
- DAWSON, J. R., ELLEN, R. P. (1994) Clustering of fibronectin adhesins toward *Treponema denticola* tips upon contact with immobilized fibronectin. *Infect. Immun.* 62:2214-2221
- DEAN, A. G., DEAN, J. A., COULOMBIER, D., BRENDL, K. A., SMITH, D. C., BURTON, A. H., DICKER, R. C., SULLIVAN K., FAGAN, R. F., ARNER, T. G. (1995) Epi Info, version 6: a word-processing, database, and statistics program for public health on IBM-compatible microcomputers. Center for Disease Control and Prevention, Atlanta
- DE SILVA, A. M., TELFORD III, S. R., BRUNET, L. R., BARTHOLD, S. W., FIKRIG, E. (1996) *Borrelia burgdorferi* OspA is an arthropod-specific transmission-blocking Lyme disease vaccine. *J. Exp. Med.* 183:271-275
- DEVEREUX, J., HAEBERLI, P., SMITHIES, O. (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucl. Acid. Res.* 12:387-395
- DORWARD, D. W., FISCHER, E. R., BROOKS, D. M (1997) Invasion and cytopathic killing of human lymphocytes by spirochetes causing Lyme disease. *Clin. Infect. Dis.* 25 Suppl 1: 2-8

- DORWARD, D. W. (1998) Immune ultrastructural evidence of lymphocytic antigen binding by Lyme disease spirochetes. *Scanning* 20:197-199
- DSMZ (URL: <http://www.dsmz.de/dsmzhome.htm>)
- DULBECCO, R., FREEMAN, G. (1959) Plaque production by the Polyoma Virus. *Virology* 8:396-397
- DURAY, P. H., STEERE, A. C. (1986) The spectrum of organ and systems pathology in human Lyme disease. *Zbl. Bakt. Hyg. A*: 263:169-178
- EBNET, K., SIMON, M. M., SHAW, S. (1996) Regulation of chemokine gene expression in human endothelial cells by proinflammatory cytokines and *Borrelia burgdorferi*. *Ann. NY Acad. Sci.* 797:107-117
- EBNET, K., BROWN, K. D., SIEBENLIST, U. K., SIMON, M. M., SHAW, S. (1997) *Borrelia burgdorferi* activates nuclear factor-KB and is a potent inducer of chemokine and adhesion molecule gene expression in endothelial cells and fibroblasts. *J. Immunol.* 158:3285-3292
- EIERMANN, D. F., JOHNSON, C. E., HASKILL, J. S. (1989) Human monocyte inflammatory mediator gene expression is selectively regulated by adherence substrates. *J. Immunol.* 142:1970-1976
- EIFFERT, H., OHLENBUSCH, A., CHRISTEN, H.-J., THOMSEN, R., SPIELMAN, A., MATUSCHKA, F.-R. (1995) Nondifferentiation between Lyme disease spirochetes from vector ticks and human cerebrospinal fluids. *J. Infect. Dis.* 171:476-479
- EVANGELISTA, M., KLEBL, B. M., TONG, A. H., WEBB, B. A., LEEUW, T., LEBERER, E., WHITEWAY, M., THOMAS, D. Y., BOONE, C. (2000) A role for myosin-I in actin assembly through interactions with Vrp1p, Bee1p and the Arp2/3 complex. *J. Cell Biol.* 148:353-362
- EVANS, J. (2000) Lyme disease. *Curr. Opin. Rheumatol.* 12: 311-317
- FIKRIG, E., BARTHOLD, S. W., KANTOR, F. S., FLAVELL, R. A. (1990) Protection of mice against the Lyme disease agent by immunizing with recombinant OspA. *Science* 250:553-556
- FIKRIG, E., BARTHOLD, S. W., KANTOR, F. S., FLAVELL, R. A. (1991) Protection of mice from Lyme borreliosis by oral vaccination with *Escherichia coli* expressing OspA. *J. Infect. Dis.* 164 :1224-1227
- FIKRIG, E., TELFORD III, S. R., BARTHOLD, S. W., KANTOR, F. S., SPIELMAN, A., FLAVELL, R. A. (1992) Elimination of *Borrelia burgdorferi* from vector ticks feeding on OspA-immunized mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5418-5421
- FIKRIG, E., BARTHOLD, S. W., SUN, W., FENG, S., TELFORD S. R., FLAVELL, R. A. (1997) *Borrelia burgdorferi* p35 and p37 are selectively expressed in vivo and elicit protective immunity. *Immunity* 6:531-539

- FIKRIG, E., FENG, W., BARTHOLD, S. W., TELFORD III, S. R., FLAVELL, R. A. (2000) Arthropod- and host-specific *Borrelia burgdorferi* *bbk32* expression and the inhibition of spirochete transmission. *J. Immunol.* 164:5344-5351
- FINGERLE, V., BERGMEISTER, H., LIEGL, G., VANEK, E., WILSKÉ, B. (1994) Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* in Southern Germany. *J. Spirochet. Tick-Borne Dis.* 1:41-45
- FINGERLE, V., HAUSER, U., LIEGL, G., PETKO, B., PREAC-MURSIC, V., WILSKÉ, B. (1995) Expression of outer surface proteins A and C of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus*. *J. Clin. Microbiol.* 33:1867-1869
- FINGERLE, V., LAUX, H., MUNDERLOH, U. G., SCHULTE-SPECHTEL, U., WILSKÉ, B. (2000) Differential expression of outer surface proteins A and C by individual *Borrelia burgdorferi* in different genospecies. *Med. Microbiol. Immunol.* 189:59-66
- FINGERLE, V., RAUSER, S., HAMMER, B., KAHL, O., HEIMERL, C., SCHULTE-SPECHTEL, U., GERN, L., WILSKÉ, B. (2002) Dynamics of dissemination and outer surface protein expression of different european *Borrelia burgdorferi* s.l. strains in artificially infected *Ixodes ricinus* nymphs. *J. Clin. Microbiol.*: 40(2002)1456-1463
- FISCHER, J. R., PARVEEN, N., MAGOUN, L., LEONG, J. M. (2003) Decorin-binding proteins A and B confer distinct mammalian cell type-specific attachment by *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:7307-7312
- 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., FUJII, 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* 390:580-586
- FUCHS, H., WALLICH, R., SIMON, M. M., KRAMER, M. D. (1994) The outer surface protein A of the spirochete *Borrelia burgdorferi* is a plasmin(ogen) receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:12594-12598
- GARIN, C., BUJADOUX, C. H. (1922) Paralysie par les tiques. *J. Med. Lyon* 71:765-767
- GARCIA-MONCO, J. C., FERNANDEZ-VILLAR, B., BENACH, J. L. (1989) Adherence of the Lyme disease spirochete to glial cells and cells of glial origin. *J. Infect. Dis.* 160:497-506
- GENERSCH E., FERLETTA M., VIRTANEN I., HALLER H., EKBLÖM P. (2003) Integrin  $\alpha\beta_3$  binding to human alpha5-laminins facilitates FGF-2- and VEGF-induced proliferation of human ECV304 carcinoma cells. *Eur. J. Cell Biol.* 82:105-117
- GEORGILIS, K., STEERE, A. C., KLEMPNER, M. S. (1991) Infectivity of *Borrelia burgdorferi* correlates with resistance to elimination by phagocytic cells. *J. Infect. Dis.* 163:150-155

- GERGEL, E. I., FURIE, M. B. (2001) Activation of endothelium by *Borrelia burgdorferi* in vitro enhances transmigration of specific subsets of T lymphocytes. *Infect. Immun.* 69:2190-2197
- GERN, L., BURGDORFER, W., AESCHLIMANN, A., KRAMPITZ, H. E. (1993) The ecology of Lyme borreliosis in Europe., p. 59-69. in K. Weber, and W. Burgdorfer (ed.), *Aspects of Lyme borreliosis*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York
- GÖTZ, H. (1954) Die Acrodermatitis chronica atrophicans Herxheimer als Infektionskrankheit. *Hautarzt* 5:491-504
- GÖTZ, H., NASEMANN, T. (1956) Zur Frage der Virusäthiologie der Akrodermatitis chronica atrophicans Herxheimer. *Hautarzt* 7:349-353
- GRAB, D. J., GIVENS, C., KENNEDY, R. (1998) Fibronectin-binding activity in *Borrelia burgdorferi*. *Biochem. Biophys. Acta* 1407:135-145
- GREENER, A. (1990) *Strategies in Molecular Biology (Stratagene News Letters)* 3:5-6
- GRÜNEBERG, T. (1952) Zur Frage der Äthiologie der Acrodermatitis chronica atrophicans. *Dermatol. Wochenschr.* 126:1041-1046
- GÜNER, E. S. (1996) Complement evasion by the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* grown in host-derived tissue co-cultures: role of fibronectin in complement-resistance. *Experientia* 52:364-372
- GUO, B. P., NORRIS, S. J., ROSENBERG, L. C., HOOK, M. (1995) Adherence of *Borrelia burgdorferi* to the proteoglycan decorin. *Infect. Immun.* 63:3467-3472
- GV-SOLAS (URL: <http://www.gv-solas.de>)
- HABICHT, G. S., KATONA, L. I., BENACH, J. L. (1991) Cytokines and the pathogenesis of neuroborreliosis: *Borrelia burgdorferi* induces glioma cells to secrete interleukin-6. *J. Infect. Dis.* 164:568-574
- HABICHT, G. S. (1992) Cytokines in *Borrelia burgdorferi* infection. in: Schutzer, S. E. (eds.) *Lyme Disease: Molecular and immunologic approaches*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press 149-169
- HACKAM, D. J., ROTSTEIN, O. D., SCHREIBER, A., ZHANG, W. J., GRINSTEIN, S. (1997) Rho is required for the initiation of calcium signaling and phagocytosis by Fcγ receptors in macrophages. *J. Exp. Med.* 186:955-966
- HALL, A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279:509-514
- HANSEN, K., LEBECH, A-M. (1991) Lyme neuroborreliosis: a new sensitive diagnostic assay for intrathecal synthesis of *Borrelia burgdorferi* - specific immunoglobulin G, A, and M. *Ann. Neurol.* 30:197-205

- HAUSER, U., LEHNERT, G., LOBENTANZER, R., WILSKÉ, B. (1997) Interpretation criteria for standardized western blots for three european species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. J. Clin. Microbiol. 35:1433-1444
- HAY, R. J., CAPUTO, J. L., MACY, M. L. (1992) ATCC Quality control methods for cell lines. 2<sup>nd</sup> Edition, Published by ATCC
- HECHEMY, K. E., SAMSONOFF, W. A., MCKEE, M., GUTTMAN, J. M. (1989) *Borrelia burgdorferi* attachment to mammalian cells. J. Infect. Dis. 159:805-806
- HECHEMY, K. E., SAMSONOFF, W. A., HARRIS, H. L., MCKEE, M. (1992) Adherence and entry of *Borrelia burgdorferi* in Vero cells. J. Med. Microbiol. 36:229-238
- HERZER, P., WILSKÉ, B., PREAC-MURSIC, V., SCHIERZ, G., SCHATTENKIRCHNER, M., ZÖLLNER, N. (1986) Lyme arthritis: clinical features, serological and radiographic findings of cases in Germany. Klin. Wochenschr. 64:206-215
- HERZER, P. (1993) Joint manifestations. in: Weber, K.; Burgdorfer, W. (eds.) Aspects of Lyme borreliosis. Berlin, Heidelberg, New York, Springer 168-184
- HIGGS, H. N., POLLARD, T. D. (1999) Regulation of actin polymerization by Arp2/3 complex and WASp/Scar proteins. J. Biol. Chem. 274:32531-32534
- HEIKKILÄ, T., SEPPÄLÄ, I., SAXÉN, H., PANELIUS, J., PELTOMAA, M., JULIN, T., CARLSSON, S.-A., LAHDENNE, P. (2002a) Recombinant BBK32 protein in serodiagnosis of early and late Lyme borreliosis. J. Clin. Microbiol. 40:1174-1180
- HEIKKILÄ, T., SEPPÄLÄ, I., SAXÉN, H., PANELIUS, J., YRJÄNÄINEN, H., LAHDENNE, P. (2002b) Species-specific serodiagnosis of Lyme arthritis and neuroborreliosis due to *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, and *B. garinii* by using decorin binding protein A. J. Clin. Microbiol. 40:453-460
- HEIKKILÄ, T., HUPPERTZ, H. I., SEPPÄLÄ, I., SILLANPAA, H., SAXÉN, H., LAHDENNE, P. (2003) Recombinant or peptide antigens in the serology of Lyme arthritis in children. J. Infect. Dis. 187:1888-1894
- HIRSCHFELD, M., KIRSCHNIG, C. J., SCHWANDNER, R., WESCHE, H., WEIS, J. H., WOOTEN, R. M., WEIS, J. J. (1999) Cutting edge: inflammatory signaling by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins is mediated by toll-like receptor 2. J. Immunol. 163:2382-2386
- HORWITZ, M. A. (1984) Phagocytosis of the legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) occurs by a novel mechanism: engulfment within a pseudopod coil. Cell 36:27-33
- HUBALEK, Z., HALOUZKA, J. (1997) Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe, a review. Eur. J. Epidemiol. 13:951-957
- 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. 18:697-18703

- INDEST, K. J., HOWELL, J. K., JACOBS, M. B., SCHOLL-MEEKER, D., NORRIS, S. J., PHILLIP, M. T. (2001) Analysis of *Borrelia burgdorferi* *vlsE* gene expression and recombination in the tick vector. *Infect. Immun.* 69:7083-7090
- ISAACS, R. D. (1994) *Borrelia burgdorferi* bind to epithelial cell proteoglycans. *J. Clin. Invest.* 93:809-819
- JACOBSON, R. M., POLAND, G. A. (1999) The new Lyme virus vaccine. What Minnesota physicians need to know. *Minn. Med.* 82:30-31
- JADOUN, J., OZERI, V., BURTEIN, E., SKUTELSKY, E., HANSKI, E., SELA, S. (1998) Protein F1 is required for efficient entry of *Streptococcus pyogenes* into epithelial cells. *J. Infect. Dis.* 178:147-158
- JAFFE, E. A., NACHMAN, R. L., BECKER, C. G., MINICK, C. R. (1973) Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.* 52: 2745-2756
- JAURIS-HEIPKE, S., ROESSLE, B., WANNER, G., HABERMANN, C., ROESSLER, D., FINGERLE, V., LEHNERT, G., LOBENTANZER, R., PRADEL, I., HILLENBRAND, B., SCHULTE-SPECHTEL, U., WILSKE, B. (1999) Osp17, an novel immunodominant outer surface protein of *Borrelia afzelii*: recombinant expression in *Escherichia coli* and its use as a diagnostic antigen for serodiagnosis of Lyme borreliosis. *Med. Microbiol. Immunol.* 187:213-219
- JOHNSON, R. C., SCHMID, G. P., HYDE, F. W., STEIGERWALD, A. G., BRENNER, D. J. (1984) *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiologic agent of Lyme disease. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34:496-497
- JUNGBLUT, P. R., ZIMNY-ARNDT, U., ZEINDL-EBERHART, E., STULIK, J., KOUPILOVA, K., PLEIßNER, K.-P., OTTO, A., MÜLLER, E.-C., SOKOLOWSKA-KÖHLER, W., GRABHER, G., STÖFFLER, G. (1999) Proteomics in human disease: cancer, heart and infectious diseases. *Electrophoresis*: 20:2100-2110
- KAHL, O., JANETZKI-MITTMANN, C., GRAY, J. S., JONAS, R., STEIN, J., BOER DE, R. (1998) Risk of infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato for a host in relation to the duration of nymphal *Ixodes ricinus* feeding and the method of tick removal. *Zbl. Bakt.* 287:41-52
- KAHLE, R. H. (1942) Pallida-Reaktion bei peripheren Durchblutungsstörungen der Haut, insbesondere bei Acrodermatitis atrophicans. Halle, Universität von Halle
- KAISER, R. (1998) Neuroborreliosis. *J. Neurol.* 245:247-255
- KAPLAN, A., FISCHER, D., ACHORD, D., SLY, W. (1977) Phosphohexosyl recognition is a general characteristic of pinocytosis of lysosomal glycosidases by human fibroblasts. *J. Clin. Invest.* 60:1088-1093
- KAWABATA, H., MASUZAWA, T., YANAGIHARA, Y. (1993) Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. *J. Microbiol. Immunol.* 37 :843-848

- KLEMPNER, M. S., NORING, R., ROGERS, R. A. (1993) Invasion of human skin fibroblasts by the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. J. Infect. Dis. 167 :1074-1081
- KLEMPNER, M. S., NORING, R., EPSTEIN, M. P., MCCLOUD, B., HU, R., LIMENTANI, S. A., ROGERS, R. A. (1995) Binding of human plasminogen and urokinase-type plasminogen activator to the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. J. Infect. Dis. 171:1258-1265
- KOLLURI, R., TOLIAS, K. F., CARPENTER, C. L., ROSEN, F. S., KIRCHHAUSEN, T. (1996) Direct interaction of the Wiskott-Aldrich syndrome protein with the GTPase Cdc42. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:5615-5618
- KOPP, P. A., SCHMITT, M., WELLENSIEK, H.-J., BLOBEL, H. (1995) Isolation and characterization of fibronectin-binding sites of *Borrelia garinii* N34. Infect. Immun. 63:3804-3808
- KOZMA, R., AHMED, S., BEST, A., LIM, L. (1995) The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. Mol. Cell Biol. 15:1942-1952
- KRAUSE, A. (1999) Prophylaxe und Therapie der Lyme Borreliose. in: Krause, A., Burmester, G. (eds.) Lyme Borreliose. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 56-57
- KYHSE-ANDERSEN, J. (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamid to nitrocellulose. J. Biochem. Biophys. Meth. 10:203-209
- KURTTI, T. J., MUNDERLOH, U. G., JOHNSON, R. C., AHLSTRAND, G. G. (1987) Colony formation by Lyme disease spirochetes. J. Clin. Microbiol. 25 :2054-2058
- LAEMMLI, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685
- LAHDENNE, P., PANELIUS, J., SAXÉN, H., HEIKKILÄ, T., SILLANPAA, H., PELTOMAA, M., ARNEZ, M., HUPPERTZ, H. I., SEPPÄLÄ, I. J. (2003) Improved serodiagnosis of erythema migrans using novel recombinant borrelial BBK32 antigens. J. Med. Microbiol. 52:563-567
- LAM, T. T., NGUYEN, T.-P. K., MONTGOMERY, R. R., KANTOR, F. S., FIKRIG, E., FLAVELL, R. A. (1994) Outer surface proteins E and F of *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease. Infect. Immun. 62:290-298
- LEBECH, A.-M., HANSEN, K., WILSKE, B., THEISEN, M. (1994) Taxonomic classification of 29 *Borrelia burgdorferi* strains isolated from patients with Lyme borreliosis: a comparison of five different phenotypic and genotypic typing schemes. Med. Microbiol. Immunol. 183:325-341
- LENNHOFF, C. (1948) Spirochetes in aetiologically obscure diseases. Acta Derm. Venereol. 28:295-324

- LEONG, J. M., MORRISSEY, P. E., ORTEGA-BARRIA, E., PEREIRA, M. E., COBURN, J. (1995) Hemagglutination and proteoglycan binding by the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 63:874-883
- LEONG, J. M., WANG, H., MAGOUN, L., FIELD, J. A., MORRISSEY, P. E., ROBBINS, D., TATRO, J. B., COBURN, J., PARVEEN, N. (1998a) Different classes of proteoglycans contribute to the attachment of *Borrelia burgdorferi* to cultured endothelial and brain cells. *Infect. Immun.* 66:994-999
- LEONG, J. M., ROBBINS, D., ROSENFELD, L., LAHIRI, B., PARVEEN, N. (1998b) Structural requirements for glycosaminoglycan recognition by the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 66:6045-6048
- LIM, L. C. L., LIU, Y. F., SCHELL, K., LOVRICH, S. D., CALLISTER, S. M., SCHELL, R. F. (1994) Detection of borreliacidal antibody by using acridine orange and flow cytometry. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1:44-50
- LINDER, S., NELSON, D., WEISS, M., AEPFELBACHER, M. (1999) Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates podosomes in primary human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:9648-9653
- LINDER, S., HIGGS, H., HÜFNER, K., SCHWARZ, K., PANNICKE, U., AEPFELBACHER, M. (2000a) The polarization defect of Wiskott-Aldrich syndrome macrophages is linked to dislocalization of the Arp2/3 complex. *J. Immunol.* 165:221-225
- LINDER, S., HÜFNER, K., WINTERGERST, U., AEPFELBACHER, M. (2000b) Microtubule-dependent formation of podosomal adhesion structures in primary human macrophages. *J. Cell Science* 113:4165-4176
- LINDER, S. (2002) Regulation des Aktin-Zytoskeletts primärer humaner Makrophagen: Bedeutung für Adhäsion, Migration und Phagozytose. Habilitationsschrift 1-91
- LINDGREN, E., TALLEKLINT, L., POLFELDT, T. (2000) Impact of climatic change on the northern latitude limit and population density of the disease-transmitting European tick *Ixodes ricinus*. *Environ. Health Perspect.* 108:119-123
- LIVERIS, D., GAZUMYAN, A., SCHWARTZ, I. (1995) Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* 33:589-595
- MA, Y., STURROCK, A., WEIS, J. J. (1991) Intracellular localization of *Borrelia burgdorferi* within human endothelial cells. *Infect. Immun.* 59:671-678
- MA, Y., WEIS, J. J. (1993) *Borrelia burgdorferi* outer surface lipoproteins OspA and OspB possess B-cell mitogenic and cytokine-stimulatory properties. *Infect. Immun.* 61:3843-3853
- MACHESKY, L. M., INSALL, R. H. (1998) Scarl and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr. Biol.* 8:1347-1956

- MAGNARELLI, L. A., FIKRIG, E., PADULA, S. J., ANDERSON, J. F., FLAVELL, R. A. (1996) Use of recombinant antigens of *Borrelia burgdorferi* in serologic tests for diagnosis of Lyme borreliosis. *J. Clin. Microbiol.* 34:237-240
- MAGNARELLI, L. A., IJDO, J. W., PADULA, S. J., FLAVELL, R. A., FIKRIG, E. (2000) Serologic diagnosis of Lyme borreliosis by using enzyme-linked immunosorbent assays with recombinant antigens. *J. Clin. Microbiol.* 38:1735-1739
- MARCHISIO, P. C., CIRILLO, D., NALDINI, L., PRIMAVERA, M V., TETI, A., ZAMBONIN-ZALLONE, A. (1984) Cell-substratum interaction of cultured avian osteoclasts is mediated by specific adhesion structures. *J. Cell Biol.* 99:1696-1705
- MARCHISIO, P. C., CIRILLO, D., TETI, A., ZAMBONIN-ZALLONE, A. (1987) Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts and cells of monocytic origin display a peculiar dot-like organization of cytoskeletal proteins involved in microfilament-membrane interactions. *Exp. Cell Res.* 169:202-214
- MARCONI, R. T., GARON, C. F. (1992) Development of polymerase chain reaction primer sets for diagnosis of Lyme disease and for species-specific identification of Lyme disease isolates by 16S rRNA signature nucleotide analysis. *J. Clin. Microbiol.* 30:2830-2834
- MARCONI, R. T., SAMUELS, D. S., GARON, C. F. (1993) Transcriptional analyses and mapping of the ospC gene in Lyme disease spirochetes. *J. Bacteriol.* 175:926-932
- MARCONI, R. T., LIVERIS, D., SCHWARTZ, I. (1995) Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates. *J. Clin. Microbiol.* 33:2427-2434
- MARQUES, A. R., MARTIN, D. S., PHILLIP, M.T. (2002) Evaluation of the C6 peptide enzyme-linked immunosorbent assay for individuals vaccinated with the recombinant OspA vaccine. *J. Clin. Microbiol.* 40:2591-2593
- MASSOL, P., MONTCOURRIER, P., GUILLEMOT, J. C., CHAVRIER, P. (1998) Fc receptor-mediated phagocytosis requires CDC42 and Rac 1. *EMBO J.* 17:6219-6229
- MAY, R. C., CARON, E., HALL, A., MACHESKY, L. M. (2000) Involvement of the Arp2/3 complex in phagocytosis mediated by FcγR or CR3. *Nat. Cell Biol.* 2:246-248
- MÉRESSE, S., STELLE-MORTIMER, O., MORENO, E., DESJARDINS, M., FINLAY, B., GORVEL, J.-P. (1999) Controlling the maturation of pathogen-containing vacuoles: a matter of life and death. *Nat. Cell Biol.* 1:E183-E188
- MODELELL, M., SCHAIBLE, U. E., RITTIG, M., SIMON, M. M. (1994) Killing of *Borrelia burgdorferi* by macrophages is dependent on oxygen radicals and nitric oxide and can be enhanced by antibodies to outer surface proteins of the spirochete. *Immunol. Lett.* 40:139-146

- MOLINARI, G., TALAY, S. R., VALENTIN-WEIGAND, P., ROCHE, M., CHHATWAL, G. S. (1997) The fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*, SfbI, is involved in the internalization of group A streptococci by epithelial cells. *Infect. Immun.* 65:1357-63
- MONTGOMERY, R. R., NATHANSON, M. H., MALAWISTA, S. E. (1993) The fate of *Borrelia burgdorferi*, the agent for Lyme disease, in mouse macrophages. *J. Immunol.* 150: 909-915
- MONTGOMERY, R. R., MALAWISTA, S. E. (1996) Entry of *Borrelia burgdorferi* into macrophages is end-on and leads to degradation in lysosomes. *Infect. Immun.* 64:2867-2872
- MONTGOMERY, R. R., LUSITANI, D., DE BOISFLEURY CHEVANCE, A., MALAWISTA, S. (2002) Human phagocytic cells in the early innate immune response to *Borrelia burgdorferi*. *J. Infect. Dis.* 185:1773-1779
- MOODY, K. D., BARTHOLD, S. W., TERILLIGER G. A. (1990) Lyme borreliosis in laboratory animals: effect of host species and in vitro passage of *Borrelia burgdorferi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 43:87-92
- MÜLLER, H. E. (1989) Die Infektionserreger des Menschen: Klinik, Epidemiologie, Ökologie und Nomenklatur. Berlin, Springer 342-343
- MULLINS, R. D. (2000) How WASP-family proteins and the Arp2/3 complex convert intracellular signals into cytoskeletal structures. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12:91-96
- NORRIS, S. J., CARTER, C. J., HOWELL, J. K., BARBOUR, A. G. (1992) Low-passage-associated proteins of *Borrelia burgdorferi* B31: characterization and molecular cloning of OspD, a surface-exposed, plasmid-encoded lipoprotein. *Infect. Immun.* 60:4662-4672
- OBONYO, M., MUNDERLOH, U. G., FINGERLE, V., WILSKE, B., KURTTI, T. J. (1999) *Borrelia burgdorferi* in tick cell culture modulates expression of outer surface proteins A and C in response to temperature. *J. Clin. Microbiol.* 37:2137-2141
- O'CONNELL, S., GRANSTROM, M., GRAY, J.S., STANEK, G. (1998) Epidemiology of European Lyme borreliosis. *Zentralbl. Bakteriol.* 287:229-40
- OZERI, V., ROSENSHINE, I., MOSHER, D. F., FASSLER, R., HANSKI, E. (1998) Roles of integrins and fibronectin in the entry of *Streptococcus pyogenes* into cells via protein F1. *Mol. Microbiol.* 30:625-637
- PAL, U., DE SILVA, A. M., MONTGOMERY, R. R., FISH, D.; ANGUIA, 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.* 106:561-569
- PANELIUS, J., LAHDENNE, P., SAXEN, H., HEIKKILÄ, T., SEPPÄLÄ, I. (2001) Recombinant flagellin A proteins from *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii*, and *B. garinii* in serodiagnosis of Lyme borreliosis. *J. Clin. Microbiol.* 39:4013-4019

- PANELIUS, J., LAHDENNE, P., SAXEN, H., CARLSON, S.-A., HEIKKILÄ, T., PELTOMAA, M., LAUHIO, A., SEPPÄLÄ, I. (2003) Diagnosis of Lyme neuroborreliosis with antibodies to recombinant proteins DbpA, BBK32, and OspC, and VlsE IR<sub>6</sub> peptide. *J. Neurol.* 250:1318-1327
- PARVEEN, N., CAIMANO, M., RADOLF, J. D., LEONG, J., M. (2003) Adaptation of the Lyme disease spirochaete to the mammalian host environment results in enhanced glycosaminoglycan and host cell binding. *Mol. Microbiol.* 47:1433-1444
- PASTER, B. J., DEWHIRST, F. E., WEISBURG, W. G., TORDOFF, L. A., FRASER, G. J., HESPELL, R. B., STANTON, T. B., ZABLEN, L., MANDELCO, L., WOESE, C. R. (1991) Phylogenetic analysis of the spirochetes. *J. Bacteriol.* 173:6101-6109
- PAUL, H., GERTH, H.-J., ACKERMANN, R. (1986) Infectiousness for humans of *Ixodes ricinus* containing *Borrelia burgdorferi*. *Zbl. Bakt. Hyg. A* 263:473-476
- PÉTER, O., BRETZ, A.-G., POSTIC, D., DAYER, E. (1997) Association of distinct species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato with neuroborreliosis in Switzerland. *Clin. Microbiol. Infect.* 3:423-431
- PETERSEN, L. R., SWEENEY, A. H., CHECKO, P. J., MAGNARELLI, L. A., MSHAR, P. A., GUNN, R. A., HADLER, J. L. (1989) Epidemiological and clinical features of 1.149 persons with Lyme disease indentified by laboratory-based surveillance in Connecticut. *Yale J. Biol. Med.* 62:253-262
- PETERSON, P. K., CLAWSON, C. C., LEE, D. A., GARLICH, D. J., QUIE, P. G., JOHNSON, R. C. (1984) Human phagocyte interactions with the Lyme disease spirochete. *Infect. Immun.* 46:608-611
- PERTICARARI, S., PRESANI, G., MANGIAROTTI, M. A., BANFI, E. (1991) Simultaneous flow cytometric method to measure phagocytosis and oxidative burst products by neutrophils. *Cytometry* 12:687-693
- PFISTER, H.-W., KRISTOFERITSCH, W., MEIER, C. (1993) Early neurological involvement (Bannwarth's Syndrome) in: Weber K., Burgdorfer W. (eds.) *Aspects of Lyme borreliosis*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 152-167.
- PFISTER, H.-W., WILSKE, B., WEBER, K. (1994) Lyme borreliosis: basic science and clinical aspects. *Lancet* 343:1013-1016
- POSTIC, D., EDLINGER, C., RICHAUD, C., GRIMONT, F., DUFRESNE, Y., PEROLAT, P., BARANTON, G., GRIMONT, P. A. D. (1990) Two genomic species in *Borrelia burgdorferi*. *Res. Microbiol.* 141:465-475
- POSTIC, D., BELFAIZA, J., ISOGAI, E., SAINT GIRONS, I., GRIMONT, P. A. D., BARANTON, G. (1993) A new genomic species in *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolated from Japanese ticks. *Res. Microbiol.* 144:467-473
- PREAC-MURSIC, V., WILSKE, B., SCHIERZ, G. (1986) European *Borrelia burgdorferi* isolated from humans and ticks: culture conditions and antibiotic susceptibility. *Zbl. Bakt. Hyg. A* 263:112-118

- PREAC-MURSIC, V., WILSKE, B., SCHIERZ, G., HOLMBURGER, M., SÜB, E. (1987) *In vitro* and *in vivo* susceptibility of *Borrelia burgdorferi*. Eur. J. Clin. Microbiol. 6:424-426
- PREAC-MURSIC, V., WILSKE, B., REINHARDT, S. (1991) Culture of *Borrelia burgdorferi* on six solid media. Eur. J. Microbiol. Infect. Dis. 10:1076-1079
- PREAC-MURSIC, V., WILSKE, B., PATSOURIS, E., JAURIS, S., WILL, G., SOUTSCHEK, E., REINHARDT, S., LEHNERT, G., KLOCKMANN, U., MEHRAEIN, P. (1992) Active immunization with pC protein of *Borrelia burgdorferi* protects gerbils against *Borrelia burgdorferi* infection. Infection 20:342-349
- PREAC-MURSIC, V., WILSKE, B. (1993) Biology of *Borrelia burgdorferi*. in: Weber K., Burgdorfer W. (eds.) Aspects of Lyme borreliosis. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 44-58
- PRIEM, S., KRAUSE, A. (1999) Labordiagnostik der Lyme Borreliose. in: Krause, A., Burmester, G.(eds.) Lyme Borreliose. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 17-24
- PROBERT, W. S., JOHNSON, B. J. B. (1998) Identification of a 47 kDa fibronectin-binding protein expressed by *Borrelia burgdorferi* isolate B31. Mol. Microbiol. 30:1003-1015
- PROBERT, W. S., KIM, J. H., HÖÖK, M., JOHNSON, B. J. B. (2001) Mapping the ligand-binding region of *Borrelia burgdorferi* fibronectin-binding protein BBK32. Infect. Immun. 69: 4129-4133
- RANDOLPH, S. E. (2001) The shifting landscape of tick-borne zoonoses: tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis in Europe. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 356:1045-1056
- REIMER, B., MARSCHANG, A., FINGERLE, V., WILSKE, B., v. SONNENBURG, F., v. HOECKE, C. (1999) Epidemiology of Lyme borreliosis in South-Eastern Bavaria (Germany). Zentralbl. Bakteriol. 289:653-654
- REIMERS, C. D., NEUBERT, U., KRISTOFERITSCH, W., PFLUGER, K. H., MAYR, W.R. (1992) *Borrelia burgdorferi* infection in Europe: an HLA-related disease? Infection 4:197-200
- RETZER-LIDL, M. (2002) Lysophospholipide als Modulatoren proinflammatorischer und thrombogener Signalwege in humanen Endothelzellen und Thrombozyten. Dissertation 1-117
- RIBEIRO, J. M. C., MATHER, T. N., PIESMAN, J., SPIELMAN, A. (1987) Dissemination and salivary delivery of Lyme disease spirochetes in vector ticks (acari:ixodidae). J. Med. Entomol. 24:201-205
- RIDLEY, A. J., HALL, A. (1992) The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. Cell 70:389-399
- RIDLEY, A. J., PATERSON, H. F., JOHNSTON, C. L., DIEKMANN, D., HALL, A. (1992) The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. Cell 70:401-410

- 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.* 60:4205-4212
- RITTIG, M. G., HÄUPL, T., KRESSEL, M., FABIAN, D., KRAUSE, A., BURMESTER, G. R. (1994a) Ultrastructural alterations in human phagocytes upon incubation with *B. burgdorferi*: a clue to pathogenicity? in: Cevenini, R.; Sambri, V.; La Placa, M. (eds.) *Advances in Lyme borreliosis research. Proceedings of the VI international conference on Lyme borreliosis.* June 19-22. Bologna, Societa Editrice Esculapio 80-83
- RITTIG, M. G., JAGODA, J. C., WILSKE, B., MURGIA, R., CINCO, M., REPP, R., BURMESTER, G. R., KRAUSE, A. (1998a) Coiling phagocytosis discriminates between different spirochetes and is enhanced by phorbol myristate acetate and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Infect. Immun.* 66:627-635
- RITTIG, M. G., BURMESTER, G.-R., KRAUSE, A. (1998b) Coiling phagocytosis: when the zipper jams, the cup is deformed. *Trends Microbiol.* 6:384-388
- RITTIG, M., WILSKE, B., KRAUSE, A. (1999) Phagocytosis of microorganisms by means of overshooting pseudopods: where do we stand? *Micr. Infect.* 1:727-735
- RÖSSLE, B. (2002) Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Borrelien – Ultrastruktur und Immun cytologie. Dissertation 1-151
- RÖSSLER, D. (1994) Klonierung und Expression von Domänen der schweren Kette des humanen Kininogens und biochemische Charakterisierung der rekombinanten Domäne 3. Dissertation 1-115
- ROTHE, G., VALET, G. (1988) Phagocytosis, intracellular pH, and cell volume in the multifunctional analysis of granulocytes by flow cytometry. *Cytometry* 9:316-324
- ROUSLAHTI, E., HAYMAN, E. G., PIERSCHBACHER, M., ENGVALL, E. (1982) Fibronectin: purification, immunochemical properties and biological activities. *Meth. Enzymol.* 82:803-831
- SACHSENMEIER, K. F., SCHELL, K., MORRISSEY, L. W. ET AL. Detection of borreliacidal antibodies in hamsters by using flow cytometry, *J. Clin. Microbiol.* 30:1457-1461
- SADZIENE, A., WILSKE, B., FERDOWS, M. S., BARBOUR, A. G. (1993) The cryptic ospC gene of *Borrelia burgdorferi* B31 is located on a circular plasmid. *Infect. Immun.* 61:2192-2195
- SAGOT, I., KLEE, S. K., PELLMAN, D. (2002) Yeast formins regulate cell polarity by controlling the assembly of actin cables. *Nat. Cell Biol.* 4:42-50
- SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S., HIGUCHI, R., HORN, G. T., MULLIS, K. B., EHRLICH, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-Polymerase. *Science* 239: 487-491
- SALINOVICH UND MONTALARO (1986)

- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2<sup>nd</sup> edn. vol. 1, 2, 3., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- SCHAIBLE, U. E., KRAMER, M. D., EICHMANN, K., MODOLELL, M., MUSETEANU, C., SIMON, M. M. (1990) Monoclonal antibodies specific for the outer surface protein (OspA) prevent Lyme borreliosis in severe combined immunodeficiency (scid) mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:3768-3772
- SCHMUTZHARD, E., STANEK, G., PLESCHETTE, M., HIRSCHL, A. M., PALLUA, A., SCHMITZBERGER, R., SCHLÖGL, R. (1988) Infections following tickbites. Tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis - a prospective epidemiological study from Tyrol. Infection 16:269-272
- SCHWAN, T. G., PIESMAN, J., GOLDE, W. T., DOLAN, M. C., ROSA, P. A. (1995) Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:2909-2913
- 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. 38:382-388
- SCHULTE-SPECHTEL, U., LEHNERT, G., LIEGL, G., FINGERLE, V., HEIMERL, C., JOHNSON, B. J., WILSKE, B. (2003) Significant improvement of the recombinant *Borrelia*-specific immunoglobulin G immunoblot test by addition of VlsE and a DbpA homologue derived from *Borrelia garinii* for diagnosis of early neuroborreliosis. J. Clin. Microbiol. 41:1299-1303
- SELLATI, T. J., ABRESCIA, L. D., RADOLF, J. D., FURIE, M. B. (1996) Outer surface lipoproteins of *Borrelia burgdorferi* activate vascular endothelium in vitro. Infect. Immun. 64:3180-3187
- SELLATI, T. J., BURNS, M. J., FICAZZOLA, M. A., FURIE, M. B. (1995) *Borrelia burgdorferi* upregulates expression of adhesion molecules on endothelial cells and promotes transendothelial migration of neutrophils in vitro. Infect. Immun. 63:4439-4447
- SEKINE, A., FUJIWARA, M., NARUMIYA, S. (1989) Asparagine residue in the Rac gene product is the modification site for botulinum ADP-ribosyltransferase. J. Biol. Chem. 264: 8602-8605
- SHAW, M. (1972) Acta Pathol Scand 80:267
- SIGAL, L. H., ZAHRADNIK, J. M., LAVIN, P., PATELLA, S. J., BRYANT, G., HASELBY, R., HILTON, E., KUNKEL, M., ADLER-KLEIN, D., DOHERTY, T., EVANS, J., MALAWISTA, S. E., The recombinant outer-surface protein A Lyme Disease Vaccine study consortium. (1998) A vaccine consisting of recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface protein A to prevent Lyme disease. N. Engl. J. Med. 339:216-222
- SIMON, M. M., BAUER, Y., ZHONG, W., HOFMANN, H., WALLICH, R. (1999) Lyme disease: pathogenesis and vaccine development. Zbl. Bakt. 289 (5-7) 690-695
- STANEK, G. (1985) Lyme disease and related disorders. Microbiol. Sci. 2 (8): 231-234

- STANEK, G., SATZ, N., STRLE, F., WILSKÉ, B. (1993) Epidemiology of Lyme Borreliosis. in: Weber K., Burgdorfer W. (eds.) Aspects of Lyme borreliosis. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 358-370
- STEERE, A. C., MALAWISTA, S. E., SNYDMAN, D. R., ANDIMAN, W. A. (1976) A cluster of arthritis in children and adults in Lyme, Connecticut. *Arthritis Rheum.* 19: 824
- STEERE, A. C., MALAWISTA, S. E., HARDIN, J. A., RUDDY, S., ASKENASE, P. W., ANDIMAN, W. A. (1977) Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis. The enlarging clinical spectrum. *Ann. Intern. Med.* 86:685-698.
- STEERE, A. C., BRODERICK, T. F., MALAWISTA, S. E. (1978) Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis: epidemiologic evidence for a tick vector. *Am. J. Epidemiol.* 108:312-321
- STEERE, A. C., MALAWISTA, S. E. (1979) Cases of Lyme disease in the United States: locations correlated with distribution of *Ixodes dammini*. *Ann. Intern. Med.* 91:730-733
- STEERE, A. C., GRODZICKI R. L., KORNBLATT A. N., CRAFT J. E., BARBOUR A. G., BURGDORFER W., SCHMID G. P., JOHNSON E., MALAWISTA S. E. (1983) The spirochetal etiology of Lyme disease. *N Engl J Med* 308:733-740
- STEERE, A. C. (1989) Medical progress - Lyme disease. *N. Engl. J. Med.* 321:586-596
- STEERE, A. C., TAYLOR, E., MCHUGH, G. L., LOGIGIAN, E. L. (1993) The overdiagnosis of Lyme disease. *J. Am. Med. Ass.* 269:812-1816
- STEERE, A. C., SIKAND, V. K., MEURICE, F., PARENTI, D. L., FIKRIG, E., SCHOEN, R. T., NOWAKOWSKI, J., SCHMID, C. H., LAUKAMP, S., BUSCARINO, C., KRAUSE, D. S. The Lyme Disease vaccine study group. (1998) Vaccination against Lyme disease with recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface lipoprotein A with adjuvant. *N. Engl. J. Med.* 339:209-215
- STEVENSON, B., SCHWAN, T. G., ROSA, P. A. (1995) Temperature-related differential expression of antigens in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 63:4535-4539
- STEWART, D. M., TREIBER-HELD, S., KURMAN, C. C., FACCHETTI, F., NOTARANGELO, L. D., NELSON, D. L. (1996) Studies of the expression of the Wiskott-Aldrich syndrom protein. *J. Clin. Invest.* 97:2627-2634
- SUBAK, S. (2003) Effects of climate on variability in Lyme disease incidence in the northeastern United States. *Am. J. Epidemiol.* 157:531-538
- SUHONEN, J., HARTIALA, K., VILJANEN, M. K. (1998) Tube phagocytosis, a novel way for neutrophils to phagocytize *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 66:3433-3435
- SUMI, T., MATSUMOTO, K., TAKAI, Y., SASAKAWA, C. (1999) Cofilin phosphorylation and actin cytoskeletal dynamics regulated by rho- and Cdc42-activated LIM-kinase 2. *J. Cell Biol.* 147:1519-1532

- SYMONS, M., DERRY, J. M., KARLAK, B., JIANG, S., LEMAHIEU, V., MCCORMICK, F., FRANCKE, U., ABO, A. (1996) Wiskott-Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase CDC42Hs, is implicated in actin polymerization. *Cell* 84:723-734
- SZCZEPANSKI, A., FURIE, M. B., BENACH, J. L., LANE, B. P., FLEIT, H. B. (1990) Interaction between *Borrelia burgdorferi* and endothelium in vitro. *J. Clin. Invest.* 85:1637-1647
- TAKAHASHI, K., SAWASAKI, Y., HATA, J., MUKAI, K., GOTO, T. (1990) Spontaneous transformation and immortalization of human endothelial cells. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 26: 265-74
- THOMAS, D. D., BASEMAN, J. B., ALDERETE, J. F. (1985) Fibronectin tetrapeptide is target for syphilis spirochete cytoadherence. *J. Exp. Med.* 162:1715-1719
- THOMAS, D. D., COMSTOCK, L. E. (1989) Interaction of Lyme disease spirochetes with cultured eucaryotic cells. *Infect. Immun.* 57:1324-1326
- THOMAS, D. D., CADAVID, D., BARBOUR, A. G. (1994) Differential association of *Borrelia* species with cultured neural cells. *J. Infect. Dis.* 169:445-448
- UMEMOTO, T., NAKATANI, Y., NAKAMURA, Y., NAMIKAWA, I. (1993) Fibronectin-binding of a human oral spirochete *Treponema denticola*. *Microbiol. Immunol.* 37:75-78
- VAN DAM, A. P., KUIPER, H., VOS, K., WIDJOKUSUMO, A., DE JONGH, B. M., SPANJAARD, L., RAMSELAAR, A. C. P., KRAMER, M. D., DANKERT, J. (1993) Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. *Clin. Infect. Dis.* 17:708-717
- VAN DER LINDE, M. R., BALLMER, P. E. (1993) Lyme carditis. in: Weber, K., Burgdorfer, W. (eds.) *Aspects of Lyme borreliosis*. Berlin, Heidelberg, New York, Springer 131-151
- VOGEL, R., MÜLLER-ESTERL, W. (1986) Optimierungsstrategien beim Westernblotting und Immunoprinting. in: Radola (eds.) *Elektrophorese Forum* 86, Bode 81-88
- WALLICH, R., BRENNER, C., KRAMER, M. D., SIMON, M. M. (1995) Molecular cloning and immunological characterization of a novel linear-plasmid-encoded gene, pG, of *Borrelia burgdorferi* expressed only in vivo. *Infect. Immun.* 63:3327-3335
- WANG, G, VAN DAM, A. P., SCHWARTZ, I., DANKERT, J. (1999) Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* 12:633-653
- WEBER, K., SCHIERZ, G., WILSKE, B., PREAC-MURSIC, V. (1985) Das Lymphozytom-eine Borreliose? *Z. Hautkr.* 60:1585-1598
- WEBER, K., PREAC-MURSIC, V., NEUBERT, U., THURMAYR, R., HERZER, P., WILSKE, B., SCHIERZ, G., MARGET, W. (1988) Antibiotic therapy of early European Lyme borreliosis and acrodermatitis chronica atrophicans. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 539:324-345

- WEBER, K., BURGDORFER, W.(1993) (eds.) Aspects of Lyme borreliosis. Berlin, Heidelberg, New York, Springer
- WEBER, K., NEUPERT, U., BÜCHNER, S. A. (1993a) Erythema migrans and early signs and symptoms. in: Weber, K., Burgdorfer, W. (eds.) Aspects of Lyme borreliosis. Berlin, Heidelberg, New York, Springer 105-122
- WEBER, K., PFISTER, H.-W., REIMERS, C. D. (1993b) Clinical overview. in: Weber, K.; Burgdorfer, W. (eds.) Aspects of Lyme borreliosis. Berlin, Heidelberg, New York, Springer(1993)93-104
- WEBER, K.; PFISTER, H.-W.(1994) Clinical management of Lyme borreliosis. Lancet 343:1017-1020
- WIENECKE, R., ZÖCHLING, N., NEUBERT, U., SCHLÜPEN, E.-M., MEURER, M., VOLKENANDT, M. (1994) Molecular subtyping of *Borrelia burgdorferi* in erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans. J. Invest. Dermatol. 103:19-22
- WILSKE, B., SCHIERZ, G., PREAC-MURISIC, V., WEBER, K., PFISTER, H. W., EINHÄUPL, K. (1984) Serological diagnosis of erythema migrans disease and related disorders. Infection 12:331-337
- WILSKE, B., PREAC-MURISIC, V., SCHIERZ, G. (1985) Antigenic heterogeneity of European *Borrelia burgdorferi* strains isolated from patients and ticks. Letter. Lancet 11:1099
- WILSKE, B. (1986) Durchseuchung von Zecken mit *Borrelia burgdorferi*. Hautarzt 37:415
- WILSKE, B., STEINHUBER, R., BERGMESTER, H., FINGERLE, V., SCHIERZ, G., PREAC-MURISIC, V., VANEK, E., LORBEER, B. (1987) Lyme-Borreliose in Süddeutschland. Dtsch. Med. Wochenschr. 112:1730-1736
- WILSKE, B., PREAC-MURISIC, V., SCHIERZ, G., KÜHBECK, R., BARBOUR, A. G., KRAMER, M. (1988) Antigenic variability of *Borrelia burgdorferi*. Ann. NY Acad. Sci. 539:126-143
- WILSKE, B., PREAC-MURISIC, V., SCHIERZ, G. (1988a) Lyme-Borreliose. in: Schwick, H. G.; Osterhus, W. (eds.) Die gelben Hefte. Immunbiologische Informationen. Marburg, Die Medizinische Verlagsgesellschaft mbH, Jg. XXVIII 4:146-159
- WILSKE, B., PREAC-MURISIC, V., SCHIERZ, G., KÜHBECK, R., BARBOUR, A. B., KRAMER, M. (1988b) Antigenic variability of *Borrelia burgdorferi*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 539:126-143
- WILSKE, B., SCHIERZ, G., PREAC-MURISIC, V., PFISTER, H. W., WEBER, K., VON BUSCH, K., BARUSCHKE, A. (1989) IgM- and IgG immune response to *Borrelia burgdorferi* in erythema migrans and neuroborreliosis. Proceedings of the Lyme borreliosis update Europe. Zbl. Bakt. Suppl.18:290-298
- WILSKE, B., BADER, L., PFISTER, H. W., PREAC-MURISIC, V. (1991) Diagnostik der Lyme-Neuroborreliose (Nachweis der intrathekalen Antikörperbildung). Fortschr. Med. 109:441-446

- WILSKE, B., PREAC-MURSIC, V., FUCHS, R., SCHIERZ, G. (1990) Diagnostik der Lyme-Borreliose. Diagnose und Labor, Laboratoriumsblätter 40:24-36
- WILSKE, B., LUFT, B., SCHUBACH, W. H., ZUMSTEIN, G., JAURIS, S., PREAC-MURSIC, V., KRAMER, M. D. (1992a) Molecular analysis of the outer surface protein A (OspA) of *Borrelia burgdorferi* for conserved and variable antibody binding domains. Med. Microbiol. Immunol. 181:191-207
- WILSKE, B., BARBOUR, A. G., BERGSTRÖM, S., BURMAN, N., RESTREPO, B. I., ROSA, P. A., SCHWAN, T., SOUTSCHEK, E., WALLICH, R. (1992b) Antigenic variation and strain heterogeneity in *Borrelia* spp. Res. Microbiol. 143:583-59
- WILSKE, B., PREAC-MURSIC, V., GÖBEL, U. B., GRAF, B., JAURIS-HEIPKE, S., SOUTSCHEK, E., SCHWAB, E., ZUMSTEIN, G. (1993a) An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis. J. Clin. Microbiol. 31:340-350
- WILSKE, B., PREAC-MURSIC, V., JAURIS, S., HOFMANN, A., PRADEL, I., SOUTSCHEK, E., SCHWAB, E., WILL, G., WANNER, G. (1993b) Immunological and molecular polymorphisms of OspC, an immunodominant major outer surface protein of *Borrelia burgdorferi*. Infect. Immun. 61:2182-2191
- WILSKE, B., JAURIS-HEIPKE, S., LOBENTANZER, R., PRADEL, I., PREAC-MURSIC, V., ROESSLER, D., SOUTSCHEK, E., JOHNSON, R. C. (1995a) Phenotypic analysis of the outer surface protein C (OspC) of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by monoclonal antibodies: relationship to genospecies and OspA-serotype. J. Clin. Microbiol. 33:103-109
- WILSKE, B., PFISTER, H.-W. (1995b) Lyme borreliosis research. Curr. Opin. Infect. Dis. 8:137-144
- WILSKE, B., BUSCH, U., EIFFERT, H., FINGERLE, V., PFISTER, H.-W., RÖSSLER, D., PREAC-MURSIC, V. (1996a) Diversity of OspA and OspC among cerebrospinal fluid isolates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from patients with neuroborreliosis in Germany. Med. Microbiol. Immunol. 184:195-201
- WILSKE, B., BUSCH, U., FINGERLE, V., JAURIS-HEIPKE, S., PREAC-MURSIC, V., RÖSSLER, D., WILL, G. (1996b) Immunological and molecular variability of OspA and OspC. Implications for *Borrelia* vaccine development. Infection 24: 208-212
- WILSKE, B., FINGERLE, V., HAUSER, U., RÖSSLER, D. (1997) Borrelien. Diagnostische Bibliothek: 481-12
- WILSKE, B., HABERMANN, C., FINGERLE, V., HILLENBRAND, B., JAURIS-HEIPKE, S., LEHNERT, G., PRADEL, I., RÖSSLER, D., SCHULTE-SPECHTEL, U. (1999) An improved recombinant IgG immunoblot for serodiagnosis of Lyme borreliosis. Med. Microbiol. Immunol. 188:139-144
- WILSKE, B., FINGERLE, V. (2000a) Therapie der Lyme-Borreliose. Stadiengerechte Antibiotikaauswahl und Dosierung. MMW Fortschr. Med. 142:32-33

- WILSKE, B., FINGERLE, V. (2000b) Erratum zum Beitrag "Therapie der Lyme-Borreliose", erschienen in MMW Fortschr. Med. 15/2000, S. 32. MMW Fortschr. Med. 142:14
- WILSKE, B., ZÖLLER, L., BRADE, V., EIFFERT, M., GÖBEL, U. B., STANEK, G. unter Mitarbeit von H. W. PFISTER. (2000c) MIQ 12 Lyme-Borreliose. in: Mauch, H., Lütticken, R., Gatermann, S., im Auftrag der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) (eds.) Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik. Urban & Fischer Verlag, München Jena1-59
- WILSON, R. W., BALLANTYNE, C. M., SMITH, C. W., MONTGOMERY, C., BRADLEY, A., O'BRIEN, W. E., BEAUDET, A. L. (1993) Gene targeting yields a CD18-mutant mouse for study of inflammation. J. Immunol. 151:1571-1578
- WOOTEN, R. M., MODUR, V. R., MCINTYRE, T. M., WEIS, J. J. (1996) *Borrelia burgdorferi* outer membrane protein A induces nuclear translocation of nuclear factor- $\kappa$ B and inflammatory activation in human endothelial cells. J. Immunol. 157:4584-4590
- WUNDERLICH, F., LONDERSHAUSEN, M., STENDEL, W. (1996) Vakzine gegen Zecken. Biologie in unserer Zeit 26:43-51
- YANG, N., HIGUCHI, O., OHASHI, K., NAGATA, K., WADA, A., KANGAWA, K., NISHIDA, E., MIZUNO, K. (1998) Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. Nature 393:809-812
- ZAMBONIN-ZALLONE, A., TETI, A., GRANO, M., RUBINACCI, A., ABBADINI, M., GABOLI, M., MARCHISIO, P. C. (1989) Immunocytochemical distribution of extracellular matrix receptors in human osteoclasts: A  $\beta$ 3-integrin is colocalised with vinculin and talin in the podosomes of osteoclastoma giant cells. Exp. Cell Res. 182:645-652
- ZHANG, J.-R., HARDHAM, J. M., BARBOUR, A. G., NORRIS, S. J. (1997a) Antigenic variation in Lyme disease *Borreliae* by promiscuous recombination of VMP-like sequence cassettes. Cell 89:275-285
- ZHANG, Z. F., WAN, K. L., ZHANG, J. S. (1997b) Studies on epidemiology and etiology of Lyme disease in China. Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi 18:8-1

## 8 Anhang

**Tabelle 8.1:** Übersicht über die Anzahl zellassoziierter Borrelien pro 10 Säugerzellen nach verschiedenen Koinkubationszeiträumen.

Zelltyp	Stamm	10 min	60 min	120 min	3 h	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h
I321N1	PKo	13,27 ± 4,23	22,19 ± 5,70	23,28 ± 9,80	55,37 ± 11,23	67,42 ± 23,40	89,3 ± 13,26	107,24 ± 28,45	120,89 ± 22,40	121,67 ± 23,87
	PKo97 K37	11,12 ± 6,78	23,40 ± 7,56	37,80 ± 8,68	49,87 ± 9,25	87,69 ± 6,48	95,21 ± 11,57	98,67 ± 27,40	109,23 ± 22,67	112,20 ± 9,65
	PKo345 II-2-3	6,13 ± 3,28	23,87 ± 11,39	29,24 ± 9,45	34,56 ± 5,31	47,25 ± 5,77	52,11 ± 7,89	51,27 ± 9,61	57,30 ± 11,78	63,89 ± 13,20
	PBi	45,34± 7,23	67,76 ± 19,2	101,10 ± 15,21	106,17 ± 24,12	114,73 ± 7,89	118,49 ± 13,2	116,92 ± 23,27	114,73 ± 31,79	106,77 ± 23,47
ECV304	PKo	24,13± 17,20	46,72± 11,33	60,65± 15,33	107,51± 13,69	121,56± 17,23	156,89± 11,67	173,47± 27,23	176,28± 23,15	174,37± 34,91
	PKo97 K37	16,00± 9,41	31,78± 10,63	27,08± 9,43	34,74± 7,76	54,80± 14,28	67,21± 4,58	91,12± 12,23	102,26± 24,18	98,56± 8,47
	PKo345 II-2-3	20,71± 15,92	31,14± 12,95	52,74± 9,94	41,62± 10,57	53,84± 11,97	55,35± 13,42	57,23± 11,89	62,70± 13,04	75,19± 26,50
	PBi	9,28± 5,58	17,12± 6,42	35,48± 18,04	53,30± 30,27	98,10± 24,36	104,03± 17,43	132,47± 25,09	134,63± 29,50	136,87± 31,45
CRL-2480	PKo	25,46± 9,28	46,78± 11,35	89,37± 19,77	162,0± 21,83	191,78± 12,54	241,23± 21,26	267,78± 31,58	278,89± 45,20	289,21± 34,87
	PKo97 K37	23,38± 11,39	70,11± 14,22	110,45± 17,68	132,49± 21,87	172,89± 16,29	193,48± 17,90	240,36± 33,87	263,97± 21,26	271,97± 29,80
	PKo345 II-2-3	17,56± 5,89	23,87± 7,60	29,24± 8,21	34,56± 12,72	92,78± 23,81	120,27± 13,62	106,74± 34,93	124,36± 45,82	134,56± 24,20
	PBi	13,22± 3,23	31,13± 13,11	34,52± 8,91	56,37± 12,93	77,69± 13,28	106,38± 11,56	116,29± 43,20	128,22± 21,89	121,24± 17,92
HUVEC	PKo	27,84± 11,23	58,67± 6,37	125,58± 21,24	204,29± 17,80	243,41± 31,22	292,32± 27,96	335,89± 18,16	330,78± 27,61	322,17± 35,89
	PKo97 K37	12,88± 21,28	41,21± 17,37	103,29± 23,28	136,49± 19,71	150,84± 26,78	210,26± 33,82	241,47± 13,29	262,39± 37,29	245,44± 27,80
	PKo345 II-2-3	7,23± 11,29	41,26± 25,87	45,78± 13,29	41,29± 13,67	67,55± 17,82	73,43± 24,39	90,67± 19,21	110,11± 25,76	93,54± 17,29
	PBi	22,34± 15,87	47,75± 19,27	90,21± 35,49	125,34± 34,20	170,75± 19,26	196,48± 22,19	211,34± 29,55	237,67± 22,91	256,69± 27,21

**Tabelle 8.2:** Übersicht über die prozentuale Verteilung von OspA und OspC in zellassoziierten Borrelien nach verschiedenen Koinkubationszeiträumen.

Zelltyp	Stamm	Osp-Typ	t <sub>0</sub> (34 °C)	60 min (37 °C)	4 h (37 °C)	24 h (37 °C)
I321N1	PKo	A	22,6	25,5	37,0	57,4
		C	3,7	4,1	7,2	13,4
		A+C	73,7	70,4	55,8	29,2
	PKo97 K37	A	27,1	31,3	37,4	55,5
		C	11,9	11,9	9,3	7,2
		A+C	61,0	56,8	53,3	37,3
	PKo345 II-2-3	A	100,0	100,0	100,0	100,0
		C	0,0	0,0	0,0	0,0
		A+C	0,0	0,0	0,0	0,0
PBi	A	5,6	6,3	7,7	11,7	
	C	2,2	2,8	2,2	1,6	
	A+C	92,2	90,0	90,1	86,7	
ECV304	PKo	A	22,6	22,4	35,7	52,9
		C	3,7	5,5	9,3	11,3
		A+C	73,7	72,1	55,1	35,8
	PKo97 K37	A	27,1	29,8	35,3	61,9
		C	11,9	8,0	9,2	6,8
		A+C	61,0	62,2	55,5	31,3
	PKo345 II-2-3	A	100,0	100,0	100,0	100,0
		C	0,0	0,0	0,0	0,0
		A+C	0,0	0,0	0,0	0,0
PBi	A	5,6	8,8	8,7	9,7	
	C	2,2	1,9	1,9	2,1	
	A+C	92,2	89,3	89,5	88,3	
CRL-2480	PKo	A	22,6	19,3	33,9	45,3
		C	3,7	3,3	5,5	7,1
		A+C	73,7	77,4	60,7	47,6
	PKo97 K37	A	27,1	31,7	42,7	52,6
		C	11,9	8,7	11,3	8,7
		A+C	61,0	59,6	46,1	38,7
	PKo345 II-2-3	A	100,0	100,0	100,0	100,0
		C	0,0	0,0	0,0	0,0
		A+C	0,0	0,0	0,0	0,0
PBi	A	5,6	5,5	9,3	13,2	
	C	2,2	2,1	2,0	1,7	
	A+C	92,2	92,4	88,7	85,2	
HUVEC	PKo	A	22,6	24,8	34,0	49,3
		C	3,7	5,4	9,2	9,2
		A+C	73,7	69,8	56,8	41,5
	PKo97 K37	A	27,1	34,3	41,8	49,3
		C	11,9	8,3	7,2	9,3
		A+C	61,0	26,0	51,0	41,5
	PKo345 II-2-3	A	100,0	100,0	100,0	100,0
		C	0,0	0,0	0,0	0,0
		A+C	0,0	0,0	0,0	0,0
PBi	A	5,6	6,5	7,0	8,2	
	C	2,2	1,5	1,7	1,8	
	A+C	92,2	92,1	91,3	90,0	

**Tabelle 8.3:** Übersicht über die prozentuale Verteilung von OspA und OspC in nicht-zellassozierten Borrelien nach verschiedenen Koinkubationszeiträumen.

Zelltyp	Stamm	Osp-Typ	0 (34 °C)	60 min (37 °C)	4 h (37 °C)	24 h (37 °C)
<b>I321N1</b>	<b>PKo</b>	A	22,6	24,3	17,6	12,7
		C	3,7	3,5	3,3	2,9
		A+C	73,7	72,2	79,1	84,4
	<b>PKo97 K37</b>	A	27,1	25,2	17,3	9,3
		C	11,9	10,8	7,3	4,2
		A+C	61,0	64,1	75,4	86,5
	<b>PKo345 II-2-3</b>	A	100,0	100,0	100,0	100,0
		C	0,0	0,0	0,0	0,0
		A+C	0,0	0,0	0,0	0,0
	<b>PBi</b>	A	5,6	5,2	5,0	3,2
		C	2,2	2,7	1,5	1,9
		A+C	92,2	92,1	93,5	94,9
<b>ECV304</b>	<b>PKo</b>	A	22,6	19,3	16,9	12,0
		C	3,7	2,9	3,3	2,8
		A+C	73,7	77,8	79,8	85,2
	<b>PKo97 K37</b>	A	27,1	22,2	19,8	13,2
		C	11,9	10,8	7,3	4,2
		A+C	61,0	67,0	72,9	82,6
	<b>PKo345 II-2-3</b>	A	100,0	100,0	100,0	100,0
		C	0,0	0,0	0,0	0,0
		A+C	0,0	0,0	0,0	0,0
	<b>PBi</b>	A	5,6	5,4	5,1	4,9
		C	2,2	1,9	1,8	2,2
		A+C	92,2	92,7	93,1	92,9
<b>CRL-2480</b>	<b>PKo</b>	A	22,6	22,8	21,9	15,8
		C	3,7	3,3	2,8	2,8
		A+C	73,7	73,9	75,3	81,4
	<b>PKo97 K37</b>	A	27,1	21,9	21,9	13,2
		C	11,9	11,5	9,3	7,5
		A+C	61,0	66,6	68,8	79,3
	<b>PKo345 II-2-3</b>	A	100,0	100,0	100,0	100,0
		C	0,0	0,0	0,0	0,0
		A+C	0,0	0,0	0,0	0,0
	<b>PBi</b>	A	5,6	4,4	5,7	4,2
		C	2,2	1,8	2,9	2,2
		A+C	92,2	93,8	91,4	93,6
<b>HUVEC</b>	<b>PKo</b>	A	22,6	24,3	17,6	12,7
		C	3,7	3,5	3,3	2,9
		A+C	73,7	72,2	79,1	84,4
	<b>PKo97 K37</b>	A	27,1	25,2	17,3	9,3
		C	11,9	10,8	7,3	4,2
		A+C	61,0	64,0	75,4	86,5
	<b>PKo345 II-2-3</b>	A	100,0	100,0	100,0	100,0
		C	0,0	0,0	0,0	0,0
		A+C	0,0	0,0	0,0	0,0
	<b>PBi</b>	A	5,6	4,5	4,7	3,9
		C	2,2	1,8	1,9	2,1
		A+C	92,2	93,7	93,4	94,0

**Tabelle 8.4:** Übersicht über die mittlere Anzahl zellassoziierter Borrelien pro 10 Säugerzellen unter dem Einfluß des monoklonalen anti-OspA-Antikörpers L32 1F11.

Zelltyp	Stamm	Koinkubationsdauer	mAK-Verdünnung					
			1:1	1:2	1:10	1:100	1:1000	ohne mAK
I321N1	PKo	60 min	6,72 ± 3,21	13,2 ± 5,23	17,81 ± 9,27	21,27 ± 11,29	19,2 ± 7,23	22,19 ± 5,71
		8 h	65,2 ± 9,78	66,7 ± 11,3	74,2 ± 7,87	93,89 ± 7,27	92 ± 8,96	89,3 ± 13,26
	PKo 97 K37	60 min	19,2 ± 9,13	21,45 ± 2,3	22,87 ± 8,73	25,55 ± 7,97	25,27 ± 9,23	23,4 ± 7,56
		8 h	68,36 ± 11,23	65,87 ± 9,87	76,43 ± 6,89	89,95 ± 9,81	94,23 ± 7,93	95,21 ± 11,14
	PKo 345 II-2-3	60 min	13,88 ± 4,33	16,34 ± 7,17	19,73 ± 6,39	21,28 ± 3,21	22,15 ± 7,23	23,87 ± 11,39
		8 h	31,21 ± 9,28	38,9 ± 12,31	46,78 ± 6,82	49,26 ± 7,26	55,78 ± 11,2	52,11 ± 7,89
	PBi	60 min	35,21 ± 13,25	41,54 ± 9,27	57,39 ± 7,45	61,2 ± 11,76	69,89 ± 13,55	67,76 ± 19,2
		8 h	56,77 ± 5,38	63,51 ± 9,66	87,63 ± 4,78	103,27 ± 11,41	115,65 ± 6,25	118,49 ± 8,71
CRL-2480	PKo	60 min	16,7 ± 2,54	17,67 ± 7,35	22,89 ± 8,28	35,29 ± 9,45	44,38 ± 9,12	43,29 ± 7,86
		8 h	176,2 ± 13,23	198,9 ± 15,87	207,4 ± 11,29	211,57 ± 15,22	250,41 ± 9,17	283,29 ± 22,70
	PKo 97 K37	60 min	51,17 ± 8,28	49,2 ± 9,25	57,7 ± 6,39	65,25 ± 13,95	73,29 ± 11,26	69,40 ± 9,27
		8 h	185,4 ± 14,31	187,2 ± 17,9	199,4 ± 15,66	195,48 ± 18,76	197,28 ± 19,72	201,80 ± 22,76
	PKo 345 II-2-3	60 min	9,55 ± 2,18	11,27 ± 3,24	15,76 ± 4,3	23,24 ± 7,21	25,78 ± 8,19	27,89 ± 5,67
		8 h	42,99 ± 9,28	51,2 ± 12,31	67,8 ± 6,82	89,25 ± 7,26	121,97 ± 11,2	131,20 ± 9,26
	PBi	60 min	29,8 ± 5,23	34,2 ± 7,18	25,98 ± 5,28	29,8 ± 7,32	31,29 ± 11,29	31,17 ± 2,86
		8 h	87,99 ± 4,32	96,6 ± 7,58	93,2 ± 8,69	109,12 ± 9,33	113,48 ± 13,2	121,29 ± 17,29

**Tabelle 8.5:** Übersicht über die mittlere Anzahl zellassoziierter Mikrosphären pro Säugerzelle nach verschiedenen Koinkubationszeiträumen.

Zelltyp	Mikrosphärentyp	Koinkubationsdauer					
		15 min	30 min	60min	90 min	6 h	18 h
I321N1	ungelabelt	0,11 ± 0,21	0,17 ± 0,11	0,22 ± 0,12	0,18 ± 0,09	0,2 ± 0,18	0,21 ± 0,03
	<i>E. coli</i> -Lysat	0,11 ± 0,13	0,16 ± 0,21	0,44 ± 0,14	0,44 ± 0,12	0,44 ± 0,04	0,25 ± 0,15
	BSA	0,26 ± 0,23	0,33 ± 0,14	0,11 ± 0,13	0,07 ± 0,02	0,15 ± 0,06	0,1 ± 0,02
	rBBK32_B31	1,1 ± 0,17	2,6 ± 0,91	3,43 ± 0,78	3,88 ± 0,98	4,08 ± 2,3	4,28 ± 1,23
	rBBK32_PKaII	1,17 ± 0,23	2,97 ± 0,51	3,66 ± 0,67	4,2 ± 1,23	4,57 ± 2,04	4,57 ± 1,24
	rBBK32_PHei	0,92 ± 0,11	2,83 ± 0,08	4,08 ± 0,13	4,85 ± 0,89	5,58 ± 1,2	5,6 ± 1,34
	rBBK32_TN	0,9 ± 0,03	1,88 ± 0,24	3,09 ± 0,26	3,57 ± 0,18	3,62 ± 1,23	3,66 ± 0,88
	ECV304	ungelabelt	0,09 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,13 ± 0,07	0,32 ± 0,19	0,3 ± 0,07
<i>E. coli</i> -Lysat		0,06 ± 0,03	0,14 ± 0,07	0,37 ± 0,12	0,2 ± 0,15	0,23 ± 0,16	0,26 ± 0,18
BSA		0,3 ± 0,02	0,31 ± 0,15	0,17 ± 0,13	0,14 ± 0,08	0,17 ± 0,06	0,25 ± 0,06
rBBK32_B31		0,5 ± 0,24	1,73 ± 0,56	3,78 ± 1,18	4,87 ± 1,23	5,66 ± 1,87	6,07 ± 1,93
rBBK32_PKaII		1,53 ± 0,78	2,56 ± 0,76	4,67 ± 1,45	5,23 ± 1,15	5,78 ± 1,56	6,03 ± 1,77
rBBK32_PHei		1,32 ± 0,07	3,67 ± 0,64	5,85 ± 1,27	6,78 ± 1,03	7,68 ± 2,09	7,89 ± 1,87
rBBK32_TN		1,1 ± 0,9	1,57 ± 0,24	2,89 ± 0,87	4,96 ± 1,28	5,67 ± 1,79	5,69 ± 1,76
CRL-2480		ungelabelt	0,11 ± 0,05	0,17 ± 0,03	0,22 ± 0,16	0,18 ± 0,01	0,2 ± 0,09
	<i>E. coli</i> -Lysat	0,11 ± 0,03	0,16 ± 0,13	0,22 ± 0,09	0,22 ± 0,2	0,27 ± 0,19	0,25 ± 0,15
	BSA	0,03 ± 0,01	0,08 ± 0,02	0,11 ± 0,08	0,11 ± 0,08	0,15 ± 0,06	0,1 ± 0,09
	rBBK32_B31	1,1 ± 0,27	2,27 ± 0,13	4,32 ± 0,78	5,4 ± 1,14	5,88 ± 1,06	5,88 ± 1,76
	rBBK32_PKaII	1,17 ± 0,06	2,97 ± 1,07	4,51 ± 0,97	5,66 ± 0,76	5,95 ± 2,24	5,91 ± 1,65
	rBBK32_PHei	1,37 ± 0,87	3,86 ± 0,45	6,82 ± 1,32	7,95 ± 0,94	8,53 ± 1,44	8,55 ± 1,87
	rBBK32_TN	0,9 ± 0,05	1,88 ± 1,07	4,17 ± 1,76	4,96 ± 2,03	5,64 ± 1,73	5,5 ± 1,89
	HUVEC	ungelabelt	0,12 ± 0,07	0,16 ± 0,06	0,17 ± 0,03	0,2 ± 0,13	0,25 ± 0,09
<i>E. coli</i> -Lysat		0,16 ± 0,01	0,2 ± 0,04	0,2 ± 0,13	0,11 ± 0,18	0,23 ± 0,14	0,25 ± 0,21
BSA		0,2 ± 0,02	0,17 ± 0,03	0,21 ± 0,17	0,23 ± 0,09	0,3 ± 0,07	0,31 ± 0,9
rBBK32_B31		1,7 ± 0,7	2,96 ± 1,14	4,12 ± 1,86	6,23 ± 0,97	6,39 ± 0,76	6,45 ± 1,24
rBBK32_PKaII		1,53 ± 0,11	2,56 ± 0,11	4,67 ± 0,11	6,37 ± 1,13	6,48 ± 0,11	6,6 ± 0,11
rBBK32_PHei		1,8 ± 0,78	5,1 ± 1,24	7,29 ± 1,33	8,6 ± 0,78	9,35 ± 1,76	9,31 ± 2,07
rBBK32_TN		1,26 ± 1,13	2,15 ± 1,56	3,44 ± 1,2	5,19 ± 0,67	5,23 ± 1,75	5,37 ± 0,84

**Tabelle 8.6:** Übersicht über die mittlere Anzahl zellassoziierter Borrelien pro HUVEC unter dem Einfluß löslichen Plasmafibronektins.

<b>Mikrosphärentyp</b>	<b>mit Fibronektin</b>	<b>ohne Fibronektin</b>
<b>ungelabelt</b>	0,11 ± 0,08	0,2 ± 0,13
<b><i>E. coli</i>-Lysat</b>	0,17 ± 0,13	0,11 ± 0,18
<b>BSA</b>	0,22 ± 0,11	0,23 ± 0,09
<b>rBBK32_B31</b>	1,71 ± 0,23	6,23 ± 0,97
<b>rBBK32_PKa2</b>	2,37 ± 0,1	6,37 ± 1,13
<b>rBBK32_PHei</b>	7,11 ± 0,9	8,6 ± 0,78
<b>rBBK32_TN</b>	2,19 ± 0,23	5,19 ± 0,67

**Tabelle 8.7:** Übersicht über die mittlere Anzahl f-aktinreicher Strukturen pro 90 Makrophagen unter opsonierenden und nicht-opsonierenden Bedingungen

<b>opsonierendes Agens</b>	<b>Anzahl der F-Aktin-reichen Strukturen</b>
<b>-/-</b>	17,3 ± 2,1
<b>MAK L32 1F11</b>	91,7 ± 15,3
<b>MAK L22 1F8</b>	89,3 ± 7,7
<b>Humanserum</b>	85,6 ± 11,2

**Tabelle 8.8:** Übersicht über die Häufigkeit der F-Aktin-reichen Strukturen relativ zur GST-Kontrolle pro 90 Makrophagen nach Mikroinjektion verschiedener Effektorproteine

<b>Mikroinjiziertes Agens</b>	<b>F-Aktin-reiche Strukturen pro Zellpopulation [%]</b>
<b>-/-</b>	138,1 ± 32,9
<b>GST</b>	100,0 ± 6,2
<b>CDC42Hs<sup>V12</sup></b>	109,5 ± 38,1
<b>CDC42Hs<sup>N17</sup></b>	34,8 ± 5,2
<b>Rac1<sup>V12</sup></b>	106,2 ± 30,5
<b>Rac1<sup>N17</sup></b>	71,4 ± 13,3
<b>C3-Transferase</b>	100,0 ± 9,5

**Tabelle 8.9:** Übersicht über die Anzahl adhätierender Borrelien pro einzelner Makrophage

<b>Mikroinjiziertes Agens</b>	<b>Anzahl adhätierender Borrelien pro Makrophage</b>
-/-	$8,2 \pm 3,4$
<b>GST</b>	$5,0 \pm 0,0$
<b>CDC42Hs<sup>V12</sup></b>	$6,3 \pm 3,2$
<b>CDC42Hs<sup>N17</sup></b>	$10,4 \pm 2,1$
<b>Rac1<sup>V12</sup></b>	$8,2 \pm 0,7$
<b>Rac1<sup>N17</sup></b>	$7,4 \pm 0,3$
<b>C3-Transferase</b>	$8,6 \pm 0,4$

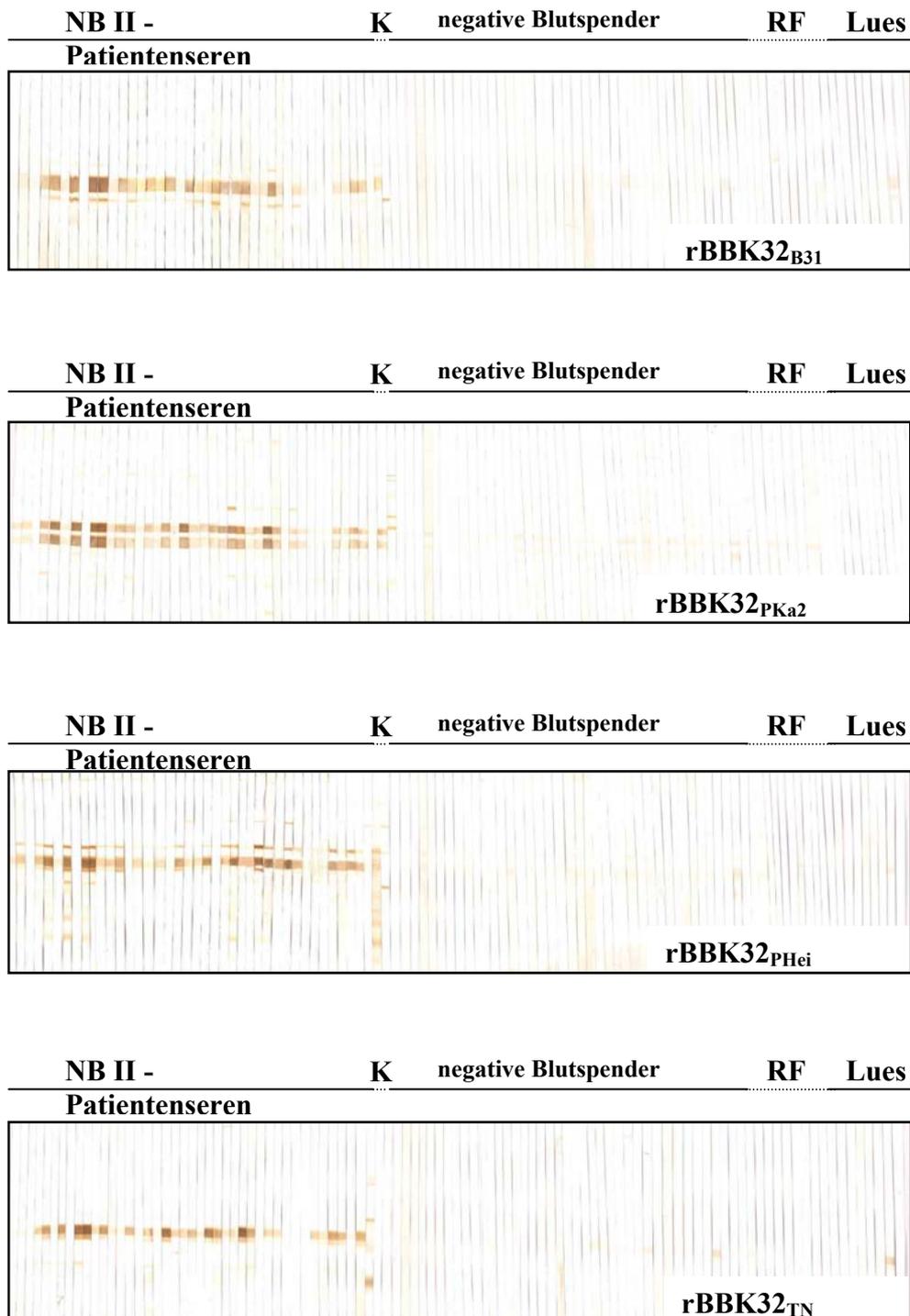
	-	homologe Nukleotide	x	substituierte Nukleotide	
<i>bbk32</i> von B31		GATTTATTCA TAAGATATGA AATGAAAGAG GAATCCCCTG GCTTATTTGA			50
<i>bbk32</i> von PKa2		-----		-----	50
<i>bbk32</i> von PHei		-----		-----c-----	50
<i>bbk32</i> von TN		-----		-----	50
<i>bbk32</i> von B31		TAAGGGAAAC TCTATTTTAG AGACTAGCGA GGAATCTATT AAAAAGCCTA			100
<i>bbk32</i> von PKa2		-----		-----	100
<i>bbk32</i> von PHei		-----		-----	100
<i>bbk32</i> von TN		-----		-----	100
<i>bbk32</i> von B31		TGAATAAGAA AGGTAAAGGT AAGATTGCTA GAAAGAAAGG CAAAAGCAAG			150
<i>bbk32</i> von PKa2		-----		-----g-----	150
<i>bbk32</i> von PHei		-----		-----c-----a-----	150
<i>bbk32</i> von TN		-----		-----	150
<i>bbk32</i> von B31		GTTTCTAGAA AAGAACC GTA TATTCATAGT TTAAAAAGGG ACTCTGCTAA			200
<i>bbk32</i> von PKa2		-----		-----	200
<i>bbk32</i> von PHei		-----g-----		-----t-----t-----a-----g-----	200
<i>bbk32</i> von TN		-----		-----	200
<i>bbk32</i> von B31		TAAAAGCAAT TTTTACAAA AAAATGTAAT TTTAGAGGAA GAAAGTTTAA			250
<i>bbk32</i> von PKa2		-----		-----	250
<i>bbk32</i> von PHei		-----		-----g-----	250
<i>bbk32</i> von TN		-----		-----	250
<i>bbk32</i> von B31		AAACTGAATT ATTAAAAGAG CAATCTGAGA CTAGAAAAGA AAAAATACAA			300
<i>bbk32</i> von PKa2		-----		-----	300
<i>bbk32</i> von PHei		-----		-----c-----	300
<i>bbk32</i> von TN		-----		-----	300
<i>bbk32</i> von B31		AAACAACAAG ATGAATATAA AGGGATGACT CAAGGAAGTT TAAATCCCT			350
<i>bbk32</i> von PKa2		-----		-----	350
<i>bbk32</i> von PHei		-----		-----a-----	350
<i>bbk32</i> von TN		-----		-----	350
<i>bbk32</i> von B31		TAGCGGTGAA AGTGGTGAAT TGGAGGAGCC TATTGAAAGT AATGAAATTG			400
<i>bbk32</i> von PKa2		-----		-----	400
<i>bbk32</i> von PHei		-----		-----a-----a-----c-----	400
<i>bbk32</i> von TN		-----		-----	400
<i>bbk32</i> von B31		ATCTTACTAT AGATTCTGAT TTAAGGCCAA AGAGTTCCTT ACAAGGCATT			450
<i>bbk32</i> von PKa2		-----		-----	450
<i>bbk32</i> von PHei		-----a-----		-----a-----	450
<i>bbk32</i> von TN		-----		-----	450
<i>bbk32</i> von B31		GCAGGATCAA ACTCTATTTT ATACACTGAT GAAATAGAGG AAGAGGATTA			500
<i>bbk32</i> von PKa2		-----		-----	500
<i>bbk32</i> von PHei		-----		-----	500
<i>bbk32</i> von TN		-----		-----	500
<i>bbk32</i> von B31		TGATCAGTAT TATTTAGATG AATATGATGA AGAGGATGAA .....			540
<i>bbk32</i> von PKa2		-----		-----	540
<i>bbk32</i> von PHei		-----c-----g-----		-----g-----t-----	550
<i>bbk32</i> von TN		-----		-----	540

<i>bbk32</i> von B31	.....GA	GGAAATAAGA	TTAAGCAATC	GATATCAATC	TTATCTAGAA	582
<i>bbk32</i> von PKa2	.....--	-----	-----	-----	-----	582
<i>bbk32</i> von PHei	atgattat--	-----	-----	-----	-----	600
<i>bbk32</i> von TN	.....--	-----	-----	-----	-----	582
<i>bbk32</i> von B31	GGTGTTAAAT	ATAATGTAGA	TTCAGCAATT	CAAACAATTA	CTAAGATATA	632
<i>bbk32</i> von PKa2	-----	-----	-----	-----	-----	632
<i>bbk32</i> von PHei	-----	-----	-----	a-c-----	a-----	650
<i>bbk32</i> von TN	-----	-----	-----	-----	-----	632
<i>bbk32</i> von B31	TAATACTTAT	ACATTATTTT	CAACAAAGCT	AACCCAAATG	TATTCTACAC	682
<i>bbk32</i> von PKa2	-----	-----	-----	-----	-----	682
<i>bbk32</i> von PHei	-g-----	-----c-	-----	-----	-----	700
<i>bbk32</i> von TN	-----	-----	-----	-----	-----	682
<i>bbk32</i> von B31	GCCTTGACAA	CTTTGCTAAA	GCCAAAGCTA	AAGAAGAAGC	TGCAAAGTTT	732
<i>bbk32</i> von PKa2	-----	-----	-----	-----	-----	732
<i>bbk32</i> von PHei	-----	-c-----	-----	-----	-----	750
<i>bbk32</i> von TN	-----	-----	-----	-----	-----	732
<i>bbk32</i> von B31	ACAAAAGAAG	ACCTTGAAAA	AAATTTCAAG	ACCTTATTAA	ATTATATTCA	782
<i>bbk32</i> von PKa2	-----	-----	-----	-----	-----	782
<i>bbk32</i> von PHei	-----	-----	-----	-----g--	---c-----	800
<i>bbk32</i> von TN	-----	-----	-----	-----	-----	782
<i>bbk32</i> von B31	AGTAAGTGTA	AAGACTGCAG	CAAATTTTGT	ATACATAAAT	GACACGCATG	832
<i>bbk32</i> von PKa2	-----	-----	-----	-----	-----	832
<i>bbk32</i> von PHei	-----	-----a	-----	-----	--a-t-----	850
<i>bbk32</i> von TN	-----	-----	-----	-----	-----	832
<i>bbk32</i> von B31	CAAAAAGGAA	ATTAGAGAAC	ATTGAAGCAG	AAATAAAAAC	TTTAATTGCA	882
<i>bbk32</i> von PKa2	-----	-----	-----	-----	-----	882
<i>bbk32</i> von PHei	-----	-----	-----a	-----	-----	900
<i>bbk32</i> von TN	-----	-----	-----	-----	-----	882
<i>bbk32</i> von B31	AAGATCAAAG	AACAATCTAA	TTTATACGAA	GCATATAAAG	CAATAGTAAT	932
<i>bbk32</i> von PKa2	-----	-----	-----	-----	-----c	932
<i>bbk32</i> von PHei	-----	--a-----	-----tc-	-----	-----g	950
<i>bbk32</i> von TN	-----	-----	-----	-----	-----c	932
<i>bbk32</i> von B31	GTCAATCTTA	TTAATGAGGG	ATTCTCTTAA	AGAAGTGCAA	GGTATCATTG	982
<i>bbk32</i> von PKa2	-----	-----	-----	-----	-----	982
<i>bbk32</i> von PHei	t-----	-----	-----	-----	ta-gc-----	1000
<i>bbk32</i> von TN	-c-----	-----	-----	-----	-----	982
<i>bbk32</i> von B31	ACAAGAATGG	CGTTTGGTAC	TAA			1005
<i>bbk32</i> von PKa2	-----	-----	---			1005
<i>bbk32</i> von PHei	-----	-----	---			1023
<i>bbk32</i> von TN	-----	-----	---			1005

**Abbildung 8.1:** Nukleinsäuresequenzvergleich der rekombinanten *bbk32*-Expressionseinheiten der klonierten Fibronectin-bindenden Proteine von *B. burgdorferi* s.l.-Isolat B31, PKa2, PHei und TN. Die Nummerierung entspricht den in 5'→3'-Richtung aufgeführten cDNA-Fragmenten. Der für die Fibronectin-Bindung relevante DNA-Sequenzbereich ist hervorgehoben (PROBERT et al., 2001), ebenso Nukleinsäureaustausche innerhalb dieses Bereiches, die AS-Austausche hervorrufen.

	- homologe AS	x substituierte AS	<u>x</u> konservativ substituierte AS			
BBK32 von B31	DLFIRYEMKE	ESPGLFDKGN	SILETSEESI	KKPMNKKGKG	KIARKKGKSK	70
BBK32 von PKa2	-----	-----	-----	-----	-----	70
BBK32 von PHei	-----	-----	-----	-----	-----n-----	70
BBK32 von TN	-----	-----	-----	-----	-----	70
BBK32 von B31	VSRKEPYIHS	LKRDSANKSN	FLQKNVILEE	ESLKTPELLKE	QSETRKEKIQ	120
BBK32 von PKa2	-----	-----	-----	-----	-----	120
BBK32 von PHei	--g--f--	<u>f</u> --a----	-----m--	-----	h-----	120
BBK32 von TN	-----	-----	-----	-----	-----	120
BBK32 von B31	KQQDEYKGMT	QGSLNSLSGE	SGELEPIES	NEIDLTIDSD	LRPKSSLQGI	170
BBK32 von PKa2	-----	-----	-----	-----	-----	170
BBK32 von PHei	-----	k-----	---k-t--	--- <u>i</u> ----	-----d-	170
BBK32 von TN	-----	-----	-----	-----	-----	170
BBK32 von B31	AGSNSISYTD	EIEEEDYDQY	YLDEYDEEDE	QYYLDEYDEE	DE.....EE	214
BBK32 von PKa2	-----	-----	-----	-----	-----	214
BBK32 von PHei	-----	-----ar-	---d- <u>d</u> --	r-----d--d	--yyeddy--	220
BBK32 von TN	-----	-----	-----	-----	-----	214
BBK32 von B31	IRLSNRYQSY	LEGVKYNVDS	AIQTITKIYN	TYTLFSTKLT	QMYSTRLDNF	264
BBK32 von PKa2	-----	-----	-----	-----	-----	264
BBK32 von PHei	-----	-----	--n- <u>n</u> ---d	-----	----- <u>l</u>	270
BBK32 von TN	-----	-----	-----	-----	-----	264
BBK32 von B31	AKAKAKEEAA	KFTKEDLEKN	FKTLLNYIQV	SVKTAANFVY	INDTHAKRKL	314
BBK32 von PKa2	-----	-----	-----	-----	-----	314
BBK32 von PHei	-----	-----	-----	-----t---	-- <u>em</u> -----	320
BBK32 von TN	-----	-----	-----	-----	-----	314
BBK32 von B31	ENIEAEIKTL	IAKIKEQSNL	YEAYKAIVMS	ILLMRDSLKE	V	355
BBK32 von PKa2	-----	-----	-----t-	-----	-	355
BBK32 von PHei	-----k----	-----k---	-s-----s-	-----	-	361
BBK32 von TN	-----	-----	-----tp	-----	-	355

**Abbildung 8.2:** Aminosäuresequenz-Alignment der verschiedenen Fibronectin-bindenden Proteine der *B. burgdorferi* s.l.-Isolate B31, PKa2, PHei und TN. Die putativen Translationsprodukte wurden anhand der unter Abbildung 8.1 dargestellten DNA-Sequenzdaten errechnet (Computerprogramm DNA-Man). Die Aminosäuren sind im Ein-Buchstabenkode aufgeführt und gemäß den Angaben aus der Literatur nummeriert (PROBERT und JOHNSON, 1998). Der für die Fibronectin-Bindung relevante Aminosäurebereich ist hervorgehoben (PROBERT und JOHNSON, 1998).



**Abbildung 8.3:** Serologische Studie zum Test der diagnostischen Relevanz der rekombinanten Fibronektin-bindenden Proteine der *B. burgdorferi* s.l.-Isolate B31, PKa2, PHei und TN. Die Immunoblots wurden wie angegeben mit standardisierten Serenpanels nach SCHULTE-SPECHTEL et al. (2003) bestehend aus NBII-Patientenseren und den entsprechenden Kontrollseren inkubiert und mit anti-Human-IgG POD-Konjugat detektiert.

NBII-Patientenseren = 40 Patientenseren mit sicher diagnostizierter Neuroborreliose Stadium II

K = *E. coli*-Kontrollserum

negative Blutspender = 40 Humansen ohne serologischen Befund

RF = 10 Patientenseren mit positiver Rheumafaktorreaktivität

Lues = 9 Patientenseren mit positiver Lues-Serologie

**Tabelle 8.10:** Semiquantitative Auswertung der Western Blot-Ergebnisse aus der serologischen Studie zur diagnostischen Relevanz der rekombinanten Fibronectin-bindenden Proteine der *B. burgdorferi s.l.*-Isolate B31, PKa2, PHei und TN.

Seren-Nr.	Bezeichnung	Reaktivität mit Antigen				Gesamt
		rBBK32 <sub>B31</sub>	rBBK32 <sub>PKa2</sub>	rBBK32 <sub>PHei</sub>	rBBK32 <sub>TN</sub>	
HS 87-18570	NBII	0	0,5	0,5	0,5	(+)
HS 87-19174	NBII	0,5	1	1	0,5	+
HS 87-22043	NBII	0	0	0	0	-
HS 88-18429	NBII	1	2	2	1	+
HS 88-18430	NBII	2	3	3	2	+
HS 88-25326	NBII	0,5	0,5	0,5	0,5	(+)
HS 88-26289	NBII	3	3	3	2	+
HS 88-28662	NBII	0	0	0	0	-
HS 88-28673	NBII	3	3	3	3	+
HS 88-32683	NBII	3	3	3	3	+
HS 91-08438	NBII	0,5	1	1	1	+
HS 91-23380	NBII	2	2	1	2	+
HS 93-24062	NBII	1	1	2	0,5	+
HS 93-27532	NBII	0,5	0,5	0,5	0,5	(+)
HS 94-13329	NBII	1	1	1	2	+
HS 94-14856	NBII	0,5	0,5	0,5	0	(+)
HS 94-18187	NBII	2	2	1	2	+
HS 94-17957	NBII	0,5	0,5	0	0	(+)
HS 94-18058	NBII	2	2	2	3	+
HS 94-18484	NBII	0,5	1	1	1	+
HS 94-18627	NBII	0,5	1	1	1	+
HS 94-18628	NBII	1	2	2	1	+
HS 94-19043	NBII	2	2	0	0,5	+
HS 94-19207	NBII	2	3	1	2	+
HS 94-19736	NBII	2	3	2	1	+
HS 94-19775	NBII	1	0,5	1	0,5	+
HS 94-19904	NBII	1	1	0,5	0,5	+
HS 94-20360	NBII	3	3	3	3	+
HS 94-21456	NBII	0,5	2	2	2	+
HS 94-23726	NBII	0	0	0,5	0	(+)
HS 94-24060	NBII	1	1	1	1	+
HS 94-24061	NBII	0,5	1	1	1	+
HS 94-24062	NBII	0	0	0,5	0	(+)
HS 94-24530	NBII	0	0	0	0	-
HS 94-25884	NBII	0	0	0	0	-
HS 94-17637	NBII	1	1	0	1	+
HS 01-09964	NBII	1	0,5	1	0,5	+
HS 01-02874	NBII	2	2	0,5	2	+
HS 87-18926	NBII	2	1	1	2	+
HS 00-12781	NBII	0,5	0,5	0,5	0,5	(+)
HS 93-19400	KO	2	1	0	2	+
K54a	KO	0	0	0	0	-
HS 94-03622	NEG	0	0	0	0	-
HS 95-24787	NEG	0	0	0	0	-
HS 95-23715	NEG	0	0	0	0	-
HS 95-24788	NEG	0	0	0	0	-
HS 95-24789	NEG	0	0	0	0	-
HS 95-24790	NEG	0	0	0	0	-
HS 95-24902	NEG	0	0	0	0	-
HS 95-25184	NEG	0	0	0	0	-
HS 95-25185	NEG	0	0	0	0	-
HS 95-25388	NEG	0	0	0	0	-
HS 95-25389	NEG	0	0	0	0	-
HS 95-25390	NEG	0	0	0	0	-
HS 95-26141	NEG	0	0	0	0	-
HS 95-26194	NEG	0	0	0	0	-
HS 95-26415	NEG	0	0	0	0	-
HS 95-26983	NEG	0	0	0	0	-
HS 95-26984	NEG	0	0	0	0	-
HS 95-26992	NEG	0	0	0	0	-
HS 95-26993	NEG	0	0	0	0	-
HS 95-27201	NEG	0	0	0	0	-
HS 96-00064	NEG	0	0	0	0	-
HS 96-00065	NEG	0	0	0	0	-
HS 96-00066	NEG	1	1	1	1	+

HS 96-00067	NEG	1	0	0	0,5	+
HS 96-00209	NEG	0	0	0	0	-
HS 96-00379	NEG	0	0	0	0	-
HS 96-00380	NEG	0	0	0	0	-
HS 96-00381	NEG	0	0	0	0	-
HS 96-00382	NEG	0	0	0	0	-
HS 96-00666	NEG	0	0	0	0	-
HS 96-00775	NEG	0	0	0	0	-
HS 96-00776	NEG	0	0	0	0	-
HS 96-00797	NEG	0	0	0	0	-
HS 96-01510	NEG	0	0	0	0	-
HS 96-01512	NEG	0	0	0	0	-
HS 96-01513	NEG	0	0	0	0	-
HS 96-01561	NEG	0	0	0	0	-
HS 94-00395	LUES	0	0	0	0	-
HS 94-00923	LUES	1	1	1	1	+
HS 94-09965	LUES	0	0	0	0	-
HS 94-23329	LUES	0	0	0	0	-
HS 94-23371	LUES	0	0	0	0	-
HS 95-16892	LUES	0	0	0	0	-
HS 95-18177	LUES	0	0	0	0	-
HS 95-18843	LUES	0	0	0	0	-
HS 01-10855	LUES	0	0	0	0	-
HS 95-21064	RF	0	0	0	0	-
HS 95-21382	RF	0	0	0	0	-
HS 95-23998	RF	0	0	0	0	-
HS 95-24507	RF	0	0	0	0	-
HS 96-05792	RF	0	0	0	0	-
HS 96-06490	RF	0	0	0	0	-
HS 00-00543	RF	0	0	0	0	-
HS 00-07423	RF	0	0	0	0	-
HS 00-10921	RF	0	0	0	0	-
HS 01-12066	RF	0	0	0	0	-

NBII = Neuroborreliose II

KO = Kontrolle

NE = Blutspender

LUES = Lues-positives Patientenserum

RF = Rheumafaktor-positives Patientenserum

"+" = Die als Gesamtreaktivität bezeichnete Reaktivität des jeweiligen Serums mit mindestens einem der vier verschiedenen rBBK32-Proteine, wobei (+) als fraglich positiv gilt

"-" = Die als Gesamtreaktivität bezeichnete Reaktivität des jeweiligen Serums mit keinem der vier verschiedenen rBBK32-Proteine

0 = keine Serumreaktivität

0,5 = fraglich positive Serumreaktivität

1 = schwach positive Serumreaktivität

2 = stark positive Serumreaktivität

1 = sehr stark positive Serumreaktivität

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Bakteriologie des Max von Pettenkofer-Instituts für Hygiene und Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München (Leitung Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann) in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Bettina Wilske durchgeführt und wird durch Herrn Prof. Cremer vor der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München vertreten.

Frau Prof. Bettina Wilske, der Initiatorin der Arbeit, danke ich für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und den hervorragenden Beistand, der es mir stets ermöglichte, mich voll auf die Arbeit zu konzentrieren. Weiterhin möchte ich Frau Prof. Wilske für die vertrauensvolle Zusammenarbeit, ihr Engagement bei der schriftlichen Fixierung der Arbeit und für ihre Geduld und die zahlreichen ausdauernden und konstruktiven Diskussionen der Ergebnisse danken. Die stete Hilfsbereitschaft war für mich nicht nur in fachlicher, sondern auch in menschlicher Hinsicht ein sehr großer Gewinn.

Herrn Prof. Cremer danke ich für seine Bereitschaft, die vorliegende Arbeit als Erstgutachter vor der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München zu vertreten.

Dem Sprecher des Graduiertenkollegs "Infektion und Immunität", Herrn Prof. Heesemann, danke ich für die freundliche Aufnahme in das Graduiertenkolleg, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen und sein Engagement bei der wissenschaftlichen Förderung der Stipendiaten.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Ulrike Schulte-Spechtel, die mich stets bei meinen Projekten unterstützt hat und v.a. durch kritisches Hinterfragen der Ergebnisse maßgeblich zum Erfolg der Arbeit beigetragen hat.

Herrn Dr. Volker Fingerle danke ich für sein großes Interesse am Fortgang der Arbeit und seine unermüdliche Bereitschaft in unzähligen Diskussionen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kritisch zu interpretieren.

Für das angenehme Arbeitsklima bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Max von Pettenkofer-Instituts. Ganz besonders großer Dank gilt dem Lyme-Team und hier insbesondere Frau Ruth Hillermann, Frau Gisela Lehnert, Frau Gabi Liegl, Frau Cecilia Hizo-Teufel und Frau Sofia Reinecke für das tägliche Miteinander.

Ferner möchte ich den DiplomandInnen und DoktorandInnen des Lyme-Teams, Frau Christiane Habermann, Frau Sandra Rauser, Frau Birgit Rössle, Herrn Gereon Göttner, Herrn Holger Laux und Herrn Holger Michel für das kollegiale Miteinander danken.

Herrn Dr. Stefan Linder, Herrn Prof. Martin Aepfelbacher und Frau Barbara Böhlig danke ich für die Realisierung des Kooperationsprojekts "Coiling Phagozytose von Borrelien", insbesondere für die ausgezeichnete Zusammenarbeit, die weit über das Projekt hinausging. Ganz besonders möchte ich Herrn Dr. Linder für die geduldige und fachkundige Einweisung in die Mikroinjektionstechnik, die Immunfluoreszenzmikroskopie und die digitale Bildbearbeitung danken. Seine hervorragende Anleitung und die stete Unterstützung haben den Erfolg dieses interessante Projekts überhaupt erst ermöglicht.

Ganz besonderer Dank gilt der "Crew des Schreibzimmers 301" für die vielen guten Gespräche und die gute Atmosphäre.

Mein tiefster Dank gilt jedoch meiner Familie und hier insbesondere meiner Mutter, deren rückhaltlose Zuwendung, Verständnis und Unterstützung auf der nichtwissenschaftlichen Seite meines Lebens noch mehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat als alle anderen vorstehend erwähnten.

## Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name	Christiane Heimerl
Geburtsdaten	08.06.1972 in Schwabmünchen
Familienstand	ledig

### Schulausbildung

1979 – 1983	Grundschule Schwabmünchen
1983 – 1992	Leonhard Wagner Gymnasium Schwabmünchen
1992	Allgemeine Hochschulreife (Note 1,7)

### Hochschulstudium

1992 – 1998	Studium der Diplombiologie an der Ludwigs-Maximilians-Universität München
1997	Diplom-Hauptprüfung (Note 1,7)
1998	Diplomarbeit am Zoologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München, AG Dr. B. Wetterauer Thema: "Molekulare Analysen von <i>Dictyostelium discoideum</i> -Insertionsmutanten"
1999-2003	Promotionsarbeit am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Mikrobiologie, LMU, München unter Leitung von Prof. Bettina Wilske  Thema: "Untersuchungen zur Interaktion von <i>B. burgdorferi</i> sensu lato mit Wirtszellen"  Stipendiatin des Graduiertenkollegs "Infektion und Immunität", Sprecher: Prof. Dr. Dr. J. Heesemann und wissenschaftliche Angestellte am Max von Pettenkofer-Institut
seit April 2004	Ausbildung im gewerblichen Rechtsschutz in der Kanzlei MÜLLER FOTTNER STEINECKE in München