

Aus dem Max von Pettenkoffer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie

Lehrstuhl: Bakteriologie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. J. Heesemann

Verbesserter rekombinanter Immunoblot für die serologische Diagnostik der Lymeborreliose  
und Expression der äußeren Membranproteine Osp17 und p58 in unterschiedlichen  
Genospezies von *Borrelia burgdorferi*

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Christiane Bott-Flügel

aus

München

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Andreas Sing

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Sören Schubert

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: -----

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR,  
FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2012

Diese Arbeit ist meinen Eltern gewidmet

Die Arbeit wurde in Teilen in folgenden Originalartikeln publiziert:

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.

Jauris-Heipke, S., Roeßle, B., Wanner, G., Habermann, C., Roessler, D., Fingerle, V., Lehnert, G., Lobentanzer, R., Pradel, I., Hillenbrand, B., Schulte-Spechtel, U. und Wilske, B. (1999). Osp17, a novel immunodominant outer surface protein of *Borrelia afzelii*: rekombinant expression in *Escherichia coli* and its use as a diagnostic antigen for serodiagnosis of Lyme borreliosis. *Med Microbiol Immunol* 187, 213-219.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	1
1.1 Allgemeines .....	1
1.2 <i>Ixodes ricinus</i> .....	2
1.3 Klinik der Lyme-Borreliose .....	4
1.4 Diagnostik und Therapie der Lyme-Borreliose .....	7
1.4.1 Erregernachweis .....	7
1.4.2 Anzucht von <i>Borrelia burgdorferi</i> .....	8
1.4.3 Antikörpernachweis .....	8
1.4.4 Therapie der Lyme-Borreliose .....	10
1.5 Borrelien .....	11
1.5.1 Taxonomie und Morphologie .....	11
1.5.2 Oberflächenproteine von <i>Borrelia burgdorferi</i> .....	12
1.6 Ziele der Arbeit .....	16
<b>2 Material und Methoden</b> .....	17
2.1 Serologie .....	17
2.1.1 Für die Diagnostik etablierte rekombinante Borrelienproteine .....	17
2.1.2 Identifikation, Klonierung und Aufreinigung von Osp17 und p58 .....	17
2.1.3 Monoklonale Antikörper .....	18
2.1.4 Anti-p58-Immunsereum: Herstellung und Austestung .....	18
2.1.5 Durchführung des Westernblots .....	18
2.1.6 Auswahl der Seren .....	22
2.1.7 Auswertung des Westernblots .....	24
2.1.8 Statistische Auswertung.....	25
2.2 Capillary-Feeding Versuche .....	25
2.2.1 Verwendete Borrelienstämme .....	25
2.2.2 Capillary-Feeding der Zecken .....	27
2.2.3 Präparation der infizierten Zecken .....	28
2.2.4 Ansetzen der infizierten Zecken auf Gerbils .....	29

2.2.5 Sektion und Verarbeitung der Gerbilorgane.....	29
2.2.6 Durchführung des Immunfluoreszenztests an den Präparaten .....	31
2.3 Kunststoffschnitte von Zecken.....	33
2.3.1 Kunststoffeinbettung mit Technovit 8100 .....	33
2.3.2. Untersuchung der Kunststoffschnitte auf Borrelien .....	34
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>38</b>
3.1 Serologie .....	36
3.1.1 Verwendete Proteine für die verschiedenen Blotverfahren .....	36
3.1.2 Herstellung und Aufreinigung der Proteine p58 und Osp17 (DbpA) .....	37
3.1.3 Reaktivität der verschiedenen Proteine im IgG-Immunoblot .....	39
3.1.4 Reaktivität der verschiedenen Proteine im IgM-Immunoblot .....	46
3.2 Osp-Expression und Dissemination von <i>Borrelia burgdorferi</i> in <i>Ixodes ricinus</i> nach Capillary-Feeding .....	49
3.2.1 Vorversuche .....	49
3.2.2 Untersuchung der Stämme/ Klone: PKo 345-II23, 97 Klon 1-4 und PKo für Antigen:.....	50
3.2.3 Vergleich der drei untersuchten Stämme .....	59
3.2.4 Untersuchung des Klons PKo 97/ 37 K +3 .....	61
3.3 Osp-Expression und Dissemination von <i>Borrelia burgdorferi</i> in <i>Ixodes ricinus</i> nach Capillary-Feeding und Blutkontakt .....	64
3.3.1 Untersuchung des Klons PKo 345-II23 .....	64
3.3.2 Untersuchung des Klons PKo 345-II23 Reisolat .....	66
3.4 Ergebnisse der Kunststoffschnitte mit Technovit 8100 .....	68
<b>4 Diskussion</b> .....	<b>71</b>
<b>5 Zusammenfassung</b> .....	<b>85</b>
<b>6 Literaturverzeichnis</b> .....	<b>87</b>
Abkürzungsverzeichnis.....	99
Danksagung.....	100
Lebenslauf	

## 1. Einleitung

### 1.1. Allgemeines

Durch Zecken werden weltweit eine Vielzahl von Krankheiten übertragen. In Mitteleuropa sind es vor allem zwei Erreger, die die Gesundheit des Menschen bedrohen. Zum einen das mit dem Gelbfieber-Agens verwandte euro-asiatische Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus (FSME) und zum anderen *Borrelia (B.) burgdorferi* s.l., eine der Syphilis-Treponeme verwandte Spirochäte.

Schon 1883 erkannte Afzelius (Afzelius 1910) erstmals eine Beziehung zwischen dem Erythema migrans und dem Zeckenstich und erfasste so die charakteristische Primärmanifestation der Lyme-Borreliose. Bannwarth veröffentlichte 1941 seine Beobachtungen, dass neurologische Symptome wie Meningitis und Polyneuritis mit dem Erythema migrans in Verbindung gebracht werden müssen (Bannwarth 1941). Durch Arbeiten von Hollström 1951 konnte eine infektiologische Genese gesichert werden, indem er die Therapierbarkeit der Erkrankung mit Penicillin aufzeigte (Hollström 1951). Binder zeigte 1954, dass durch Transplantation von Hautarealen ein Erythem ausgelöst werden kann (Binder 1955). 1976 beobachtete der Rheumatologe A.C. Steere im US-Bundesstaat Connecticut eine Epidemie von unklaren Arthritisfällen, die er als neue juvenile Arthritis beschrieb und nach dem Ort Old Lyme „Lyme arthritis“ benannte (Steere 1976). Erst 1981 wurde die Ursache der Erkrankung aufgeklärt. Der bis dahin unbekannte Erreger wurde im Rahmen eines Rickettsienprojektes durch den Zeckenforscher Willy Burgdorfer entdeckt. Er konnte Borrelien in der Schildzecke *Ixodes (I.) scapularis* mittels Dunkelfeldmikroskopie nachweisen und anschließend kultivieren. Desweiteren konnte er zeigen, dass diese Spirochäten mit Antikörpern von Lyme-Borreliose-Patienten reaktiv waren (Burgdorfer 1982). In kurzen Zeitabständen gelangen von nun an erfolgreiche Anzucht und Isolierungsversuche aus verschiedenen Patientenmaterialien in Amerika und Europa (Asbrink 1985, Benach 1983, Preac-Mursic 1984). Die Überträger gehören alle dem *I. ricinus/ persulcatus*-Komplex an, welche im Nordosten und im mittleren Westen der Vereinigten Staaten durch *I. scapularis* und im Westen durch *I. pacificus* repräsentiert sind. In Asien werden diese Borrelien durch *I. persulcatus*, in Europa durch *I. ricinus* übertragen (Müller 1989).

Während die Zeckenenzephalitis in unserem Lebensraum dank aktiver Schutzimpfung immer mehr zurück gedrängt werden kann, ist aufgrund der genetischen Vielfalt von *B. burgdorferi* s.l. in Europa eine Schutzimpfung derzeit nicht möglich. Es ist damit von eminenter Bedeutung, die Erkrankung möglichst frühzeitig zu erkennen und eine geeignete Therapie einzuleiten.

## 1.2. Ixodes ricinus

Taxonomisch zählen Zecken zur Unterklasse der Acarina. Sie gehören den Spinnentieren an und werden zum Stamm der Gliederfüßler (*Arthropoden*) gezählt. Innerhalb der Ordnung der Zecken werden zwei Familien unterschieden: Lederzecken (*Argasidae*) und Schildzecken (*Ixodidae*) (Mehlhorn 1989). Die für humanpathogene Erkrankungen verantwortlichen *Ixodidae* setzen sich aus 8 verschiedenen Gattungen zusammen: *Amblyomma*, *Aponomma*, *Boophilus*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyaloma*, *Ixodes* und *Rhipicephalus*. In Mitteleuropa ist *I. ricinus* die wichtigste und häufigste Zeckenspezies, nach H.E. Müller gehören etwa 98% aller beim Menschen gefundenen Zecken dieser Art an (Müller 1989). Der Entwicklungszyklus von *I. ricinus* erstreckt sich über 2-5 Jahre. In jedem der Entwicklungsstadien saugt das Tier nur ein einziges mal Blut. Aus den Eiern schlüpft die sechsbeinige Larve, die sich bereits von Blut ernährt und eine Größe von 0,5 mm aufweist. Nach dem Saugakt häutet sie sich zur achtbeinigen Nymphe, deren Größe 1,5-2 mm beträgt. Aus der Nymphe entwickelt sich nach dem Saugakt das adulte Tier, welches etwa 4 mm groß wird. Nach der Befruchtung legt das Weibchen 2000- 3000 Eier.

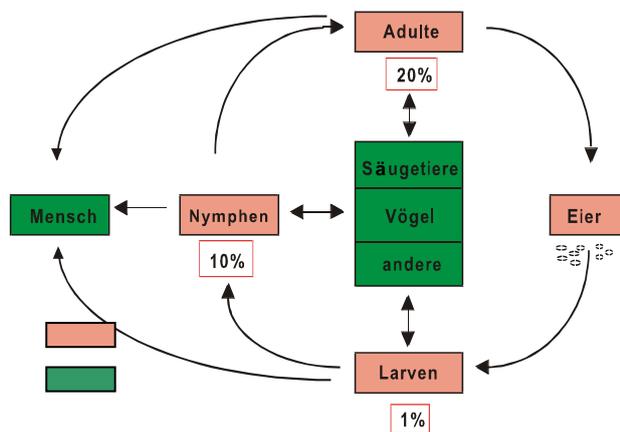
*I. ricinus* sind ubiquitäre Wald- und Waldrandbewohner, deren Aktivität vor allem von den jahreszeitlichen Verläufen der Temperatur und der Bodenfeuchte bestimmt wird. Die Aktivität der Zecke beginnt mit der Erwärmung des Bodens auf 5-7°C (März/April) und endet mit dem Absinken der Bodentemperatur im Oktober/ November. *I. ricinus* benötigt eine relative Luftfeuchtigkeit von mindestens 80 % um ihren Wasserhaushalt aufrechtzuerhalten (Kahl 1989). In Gebieten mit Sommertrockenheit kommt es daher zu einem zweigipfligen Aktivitätsverlauf der Zeckenpopulation und entsprechend zu einem biphasischen Verlauf beim Auftreten des Erythema migrans.

Das Wirtsspektrum von *I. ricinus* ist sehr breit und umfaßt praktisch alle Vertebraten wie Kleinsäuger, Huftiere, Vögel und Eidechsen. Die meisten wild lebenden Träger der Borrelien haben sich an die Erreger adaptiert. Haustiere wie Hunde oder Katzen zeigen aber gelegentlich Krankheitserscheinungen, z. B. in Form einer Arthritis (Riedl 1973). Die Zecken selbst erkranken dabei soweit bekannt nicht.

Zur Wirtssuche erklettern die Zecken die niedere Vegetation. Chemorezeptoren und das mit olfaktorischen Sinneszellen ausgekleidete Haller'sche Organ an den Vorderbeinen ermöglichen der Zecke die Orientierung in Richtung höherer CO<sub>2</sub>-Konzentrationen. Wesentlich für den Wirtstierkontakt sind über den gesamten Körper verteilte, berührungsempfindliche Sinneshaare (Balashov 1967). Die Zecken klammern sich an vorbeistreifende Tiere an und suchen bevorzugt Körperstellen mit erhöhter

Feuchtigkeit auf (Dönges 1980). Als Ektoparasit verankert sie sich mit den Stech-Saugwerkzeugen mittels Widerhaken in der Haut des Wirtes: Die Haut des Wirtes wird mit den scherenartigen Cheliceren angeritzt und das Hypostom in den Schnittkanal vorgeschoben. Um einen festen Halt des Hypostomas am Wirtstier zu gewährleisten, sondert die Zecke eine in den Speicheldrüsen produzierte sogenannte Zementsubstanz ab, welche das Hypostoma fest in der Haut verankert. Die Speicheldrüsen dienen zur Injektion von u.a. Antikoagulantien und Immunsuppressiva, die mit dem Speichel abgesondert werden (Balashov 1967).

Während der Blutmahlzeit können zahlreiche menschen- und tierpathogene Krankheitserreger mit dem Speichel übertragen werden. Zu den bedeutendsten Erregern zählen neben den Borrelien auch Filarien, Babesien, Theilerien, Rickettsien und Viren (Dönges 1980, Ribeiro, 1987). Auch eine transovariale Übertragung auf die Eier ist möglich (Balashov 1967, Ribeiro 1987).



Entwicklungsstadien von *I. ricinus*  
Durchseuchung mit *B. burgdorferi*

Abb. 1.1: Enzootischer Zyklus von *B. burgdorferi* s.l. (mit freundlicher Genehmigung: Wilske)

Die Durchseuchungsrate der Zecken mit *B. burgdorferi* hängt vom jeweiligen Entwicklungsstadium ab (Abb. 1.1). Etwa 1% der Larven, 10% der Nymphen und 20% der adulten Zecken in Süddeutschland tragen Borrelien in sich (Fingerle 1994). In Europa liegt der Anteil der mit Borrelien infizierten Nymphen zwischen 10% und 30%. Das Auftreten von klinischen Manifestationen nach einem Zeckenbiß beträgt ca. 1%. (Paul 1986; Schmutzhard 1988). Schätzungen zur Inzidenz der Erkrankung in Deutschland liegen bei 0.1%-0.7% pro Jahr

(Stanek 1996, Huppertz 1999).

Von besonderem Interesse sind die verschiedenen Organe der Zecke (siehe Abb. 1.2). Die Speicheldrüsen stellen die größten Drüsen im Zeckenkörper dar. Sie bestehen aus traubenartig zusammengelagerten Alveolen, welche sich aus den agranulären Azinuszellen Typ I-III zusammensetzen. Diese Drüsen produzieren eine Vielzahl von Sekreten und Enzymen, u.a. auch die Bestandteile des Zements. Die agranulären Typ I Azinuszellen befinden sich am oberen Teil der Speicheldrüsen. Sie sind für die Feuchtaufnahme zuständig, indem sie eine salzreiche Flüssigkeit produzieren, welche auf der Oberfläche des Hypostomas verteilt wird. Hierdurch kann die

Zecke Feuchtigkeit aus der Atmosphäre aufnehmen. Die Typ II und III Zellen befinden sich dagegen im hinteren Teil des Drüsengebildes. Sie bilden zwei Drittel der Gesamtdrüse und sind für die sekretorischen Vorgänge zuständig. Die Innervation erfolgt über Äste mehrerer Hauptnerven. Die Stimulation zur Sekretion wird in der Zecke größtenteils über Dopamin ausgelöst.

Ein weiteres entscheidendes Organ der Zecke stellt der Magen-Darm-Trakt dar. Er ist das größte Organ der Zecke und setzt sich aus einem zentral gelegenen Magen sowie mehreren weiten

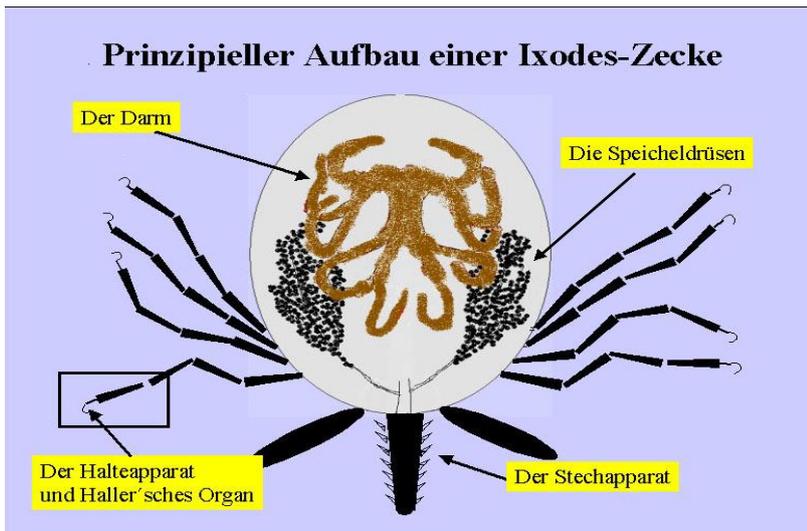


Abb. 1.2: Mit freundlicher Genehmigung: Wilske

Divertikeln zusammen. Die Divertikel erscheinen in ungefütterten Zecken schlauchförmig dünn und falten sich hirschgeweihartig auf. Sie erscheinen aber nach der Nahrungsaufnahme als große weite Säcke. Im Gegensatz zu Wirbeltieren erfolgt die Verdauung ausschließlich intrazellulär (Balashov 1972).

Durch Phagozytose und Endozytose werden Blutbestandteile absorbiert. Da im Lumen des Verdauungstraktes der Zecken keine proteolytischen Enzyme vorhanden sind, können aufgenommene Mikroorganismen dort sehr gut überleben (Sonenshine 1991). Alle Organe der Zecke werden von einer Flüssigkeit, der Hämolymphe, umspült. Sie besteht aus Zellen und Plasma, welches reich an Proteinen, Aminosäuren u. ä. ist.

### 1.3. Klinik der Lyme-Borreliose

Die Lyme-Borreliose ist in Deutschland die häufigste durch Zecken übertragene Infektionskrankheit des Menschen. Die klinischen Manifestationen werden wie auch bei der Lues in drei Stadien eingeteilt (Steere 1984/1986), wobei im Gegensatz zur Lues die Lyme-Borreliose in jedem Stadium beginnen kann. Das Spektrum der Erkrankung ist sehr vielfältig und umfasst Manifestationen an Haut, Herz, Nervensystem und Gelenken. Viele Infektionen verlaufen aber subklinisch (Münchhoff 1987, Wilske 1997). Stark Zecken-exponierte Personen wie Waldarbeiter oder Schafhirten zeigen häufig einen

erhöhten Antikörpertiter, eine positive Anamnese für eine Erkrankung durch Borreliose ist aber nicht vorhanden (Münchhoff, 1987).

### **Stadium I**

Die häufigste Frühmanifestation ist das Erythema migrans (EM) (Weber 1993) (Abb. 1.3).

Tage bis Wochen nach einem Zeckenstich tritt es als eine makulöse bis papulöse Effluoreszenz auf.

Bei typischem Verlauf findet sich ein als zentrifugal expandierendes, zentral ablassendes Ringerythem. Die Ausdehnung, Farbintensität und Dauer ist sehr variabel. Nach einem Andauern der Symptome von mehr als vier Wochen spricht man von einem Erythema chronicum migrans. Neben unspezifischen Allgemeinsymptomen wie Müdigkeit und Abgeschlagenheit kann es auch zur Mitreaktionen verschiedener Organe kommen



Abb. 1.3: Erythema migrans  
Mit freundlicher Genehmigung: Wilske

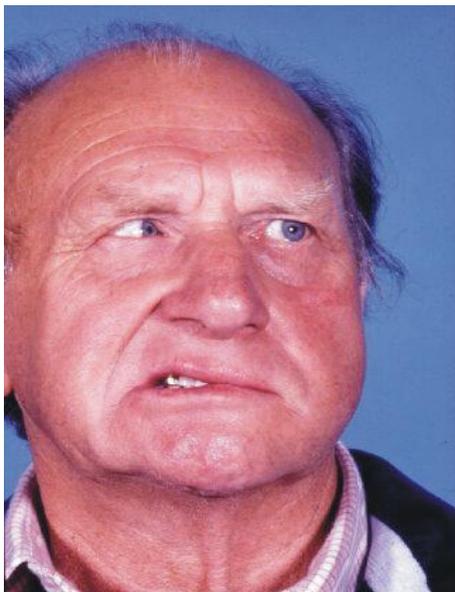


Abb. 1.4: Patient mit Facialisparese; Mit freundlicher Genehmigung: Wilske

(Lymphknoten, Leber, Milz und Augen) (Steere 1983; Weber 1983). In den meisten Fällen ist die Erkrankung selbstlimitierend.

### **Stadium II**

Das Stadium II ist vor allem durch neurologische Symptome gekennzeichnet. Die häufigste klinische Manifestation stellt in diesem Zusammenhang die lymphozytäre Meningoradikulitis–Bannwarth (LMR) dar. Diese tritt gehäuft in den Monaten Juni bis September auf (Wilske 1987). Typische Symptome sind

nachts betont auftretende, brennend stechende, radikuläre

Schmerzen, Paresen der Hirnnerven 2-9 (besonders des N. facialis ; Abb. 1.4) und eine lymphozytäre Liquorpleozytose mit 30-3000/ 3 Zellen (Bannwarth 1941; Pfister 1986; Wilske

1997). Das häufige Auftreten des radikulären Schmerzsyndroms in topographischer Beziehung zur Arthropodenstichstelle legt die Vermutung nahe, dass der Infektionsweg an nervale Strukturen gebunden ist (Pfister 1986). Anamnestisch findet sich ein EM nur bei 40-60% der Fälle.

Auch das Herz kann in diesem Stadium betroffen sein. Die Lyme-Carditis geht vorwiegend mit AV-Blocks wechselnden Grades einher (Duray 1986). Eine weitere Manifestation im Stadium II ist eine Hauterkrankung – das Borrelien-Lymphozytom (BL) (Weber 1983/1986). Dieses stellt sich als derber, livide gefärbter Tumor dar, der sich typischerweise an Ohrläppchen, an der Perimamillar- oder der Genitalregion befindet. Histologisch zeigen sich hier lymphozytäre Infiltrate.

### **Stadium III**

Die häufigsten Manifestationen in Europa stellen die Lyme-Arthritis und die Akrodermatitis chronica atrophicans dar (Asbrink 1993, Herzer 1993). Bei der Lyme-Arthritis kommt es zu akuten, remittierenden Schwellungen der großen Gelenke (meist Kniegelenk) mit Überwärmung. Diese sind mono- bis oligoatrikulär und treten asymmetrisch auf. Ein Übergang in eine chronisch erosive Form ist möglich (Steere 1976/1977; Herzer 1986).

Eine weitere Manifestation des dritten Stadiums ist die Akrodermatitis chronica atrophicans (ACA; Abb. 1.5). Diese entwickelt sich vorwiegend an den Streckseiten der Extremitäten und entsteht nach

jahrelanger Inkubationszeit. Auf ein erythematöses Stadium mit teigig geschwollenen lividrotten Flecken folgt ein atrophisches Stadium. Hierbei entwickelt sich eine zigarettenpapierartige, livide verfärbte Haut mit Phlebektasien (Herxheimer 1902). Außerdem können fibroide Knoten in Gelenknähe auftreten (Hopf 1966). Zusätzlich finden sich Hautsklerosierungen (Bäverstedt 1960) und Polyneuropathien. Diese



Abb. 1.5: Akrodermatitis chronica atrophicans; Mit freundlicher Genehmigung: Wilske

Manifestationsform tritt vorwiegend in Mitteleuropa, aber nicht in den USA auf (Wilske 1988 /1988).

In diesem Stadium kann sich auch die seltene chronische Borrelien-Enzephalomyelitis (CBE) entwickeln. Das sehr vielgestaltige Bild zeigt u.a. Sensibilitätsstörungen, Ataxien und spastische Paresen (Ackermann 1985).

## **1.4. Diagnostik und Therapie der Lyme-Borreliose**

Ohne das Auftreten von typischen Erscheinungsformen wie dem Erythema migrans ist eine klinische Diagnose häufig sehr schwierig zu stellen. Deshalb ist besonders bei unklaren Fällen eine Labordiagnostik von entscheidender Bedeutung.

### **1.4.1 Erregernachweis**

#### **Direktnachweis der Erreger**

Zum direkten Nachweis der Erreger dienen die Dunkelfeldmikroskopie, die Giemsa-Färbung, Carbofuchsin-Färbung und die Silberfärbung. Desweiteren stehen Immunfluoreszenzverfahren und immunhistochemische Färbetechniken zur Verfügung. Der Nachteil dieser Verfahren ist, dass sie methodisch sehr aufwendig sind und nur selten eine Detektion der Erreger ermöglichen. Grund dafür ist die Tatsache, dass in Patientenproben häufig nur wenig Keime enthalten sind (Preac-Mursic 1986; Preac-Mursic, Wilske 1992). Immunfluoreszenzverfahren werden vor allem zum Nachweis von Borrelien in Zecken verwendet und dienen hier epidemiologischen Studien (Fingerle 1994;1995; 1998). Dem Direktnachweis der Erreger kommt für die Routinediagnostik keine Bedeutung zu.

#### **Nukleinsäureamplifikation**

Die Polymerase-Ketten-Reaktion zählt prinzipiell zu den empfindlichsten Nachweismethoden, bei der schon geringste Mengen an erregerspezifischer DNA ausreichen. Dieses Verfahren wird auch in der Borreliose-Diagnostik zunehmend angewendet (Schmid, 1997). Da man bei diesem Verfahren typenspezifische Primer verwenden kann, können mit dieser Methodik auch die verschiedenen Spezies nachgewiesen werden (Rijpkema 1995; Rössler 1996; Eiffert 1995). Trotz der theoretisch sehr hohen Sensitivität ist diese im allgemeinen vergleichbar mit der Kultur. Nur bei der Lyme-Arthritis, bei der die Kultur nur sehr selten positiv ist, hat die Nukleinsäureamplifikation mit ca. 70% eine deutlich höhere Sensitivität. Weiterhin ist sie schon nach 2-3 Tagen, unter Einsatz von Automaten schon nach wenigen Stunden auswertbar, während für die Kultur bis zu 6 Wochen benötigt werden. Zum Ausschluss falsch positiver Befunde muß die Spezifität des Amplifikates durch eine geeignete Methode wie Sequenzierung, Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus oder spezifische Sonden bestätigt werden.

#### **1.4.2 Anzucht von *B. burgdorferi***

*B. burgdorferi* kann in artifiziellem Medium gezüchtet werden (modifiziertes Kelly-Medium) (Preac-Mursic 1992, 1991). Da diese Methode sehr zeitaufwändig, teuer und nur in Speziallaboratorien verfügbar ist, spielt sie in der Diagnostik nur eine untergeordnete Rolle, ist aber bei unklaren Fällen wichtig.

Die verwendeten Untersuchungsmaterialien (Liquor, Hautbiopsate, Gelenkpunktate o.ä.) werden in das flüssige Medium verimpft und bei 33 °C für bis zu 6 Wochen inkubiert. Das Wachstum wird wöchentlich mikroskopisch kontrolliert und es werden Subkulturen angelegt. Ein positives Ergebnis ist in der Regel nach 2-3 Wochen zu erwarten.

#### **1.4.3. Antikörpernachweis**

Die mikrobiologische Diagnostik stützt sich hauptsächlich auf die Antikörperdetektion (Wilske 2002). Das verwendete Substrat ist im allgemeinen Serum. Die mikrobiologischen Ergebnisse müssen immer in Verbindung mit dem klinischen Bild beurteilt werden. Ein negatives serologisches Ergebnis schließt eine frühe Manifestation der Lyme-Borreliose nicht aus. Im Gegenzug ist ein positives Ergebnis kein Beweis einer klinischen Infektion - auch ein Titer, der auf eine frühere Infektion zurückgeht kann einen solchen Befund erklären (Wilske 2001).

Serologische Verfahren werden heute in der Diagnostik der Lyme-Borreliose als Zweistufendiagnostik durchgeführt. Als erste Stufe im Sinne eines Screeningtestes wird meist der immunglobulin-klassenspezifische ELISA durchgeführt, der bei reaktiven Ergebnissen mit dem Immunoblot bestätigt werden soll.

## Spezifität der Antikörpernachweisverfahren

Testgeneration	Spezifität
<b>Erstgenerationsteste</b>	
Sonikat-ELISA Immunfluoreszenztest (ohne Absorbtion) Indirekte Hämagglutination (Sonikat-Antigen)	80-90 %
<b>Zweitgenerationsteste</b>	
Immunfluoreszenztest (mit Absorbtion) Extrakt-Antigen-ELISA (mit Absorption) Flagellin-ELISA Ganzzell-Lysat-Immunblot*	90-95%
<b>Drittgenerationsteste</b>	
rekombinanter ELISA rekombinanter Immunblot*	90-95 %

\*für den Immunblot als Bestätigungstest ist mindestens 95% Spezifität zu fordern  
Abb. 1.6 nach Wilske et al MIQ 12 Lyme-Borreliose

### Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Der ELISA wird üblicherweise immunglobulinklassenspezifisch als Screeningtest durchgeführt. Hier werden vor allem ELISAs der zweiten und dritten Generation verwendet (siehe Abb. 1.6).

Der ELISA ist auch bei einer großen Anzahl von Proben einsatzfähig (Wilske 1997). Unspezifische Reaktivität u.a. durch Rheumafaktoren und Treponemen müssen hierbei berücksichtigt und durch entsprechende Aufbereitungsverfahren (Reitertreponemen-, RF-Absorbtion) verhindert werden (Wilske 1993,1995, 1997). In neueren Testverfahren werden auch rekombinante Proteine für den Elisa-Test eingesetzt (Kaiser 1999; Hauser 1997).

### Immunfluoreszenztest

Der Immunfluoreszenztest wird polyvalent oder immunglobulinklassenspezifisch eingesetzt. Unter Verwendung einer Reitertreponemen-Absorption entspricht er in seiner Wertigkeit einem Test der zweiten Generation. Allerdings kann die Absorption in der Diagnostik der Frühstadien zu einem Sensitivitätsverlust führen (Wilske et al MiQ/ Lyme-Borreliose).

### **Indirekter Hämagglutinationstest**

Dieses Verfahren stellt ein nicht immunglobulinklassendifferenzierendes Verfahren dar. Kommerziell wird er in unterschiedlichen Varianten angeboten, welche sich hauptsächlich in den Testantigenen unterscheiden. Dieser Test kann als Suchtest verwendet werden. Anschließend muß eine Differenzierung der Immunglobulinklassen erfolgen.

### **Immunblotverfahren**

Bei der Lyme-Borreliose wird der Immunblot heute im Rahmen der Stufendiagnostik als sogenannter Bestätigungstest eingesetzt, wobei überwiegend Ganzzelllysatsblots verwendet werden. Der große Nachteil der Ganzzelllysatsblots besteht aber in der schwierigen Standardisierung und der schlechten Identifikationsmöglichkeit der Banden. Für die Auswertung ist ein hohes Maß an Erfahrung zur Beurteilung der Reaktivität und entsprechende Kontrollen erforderlich (Hauser 1997; Wilske 1988; Zoeller 1991; Wilske 1997). Bei diesem Verfahren können nur die in vitro exprimierten Proteine eingesetzt werden. Der Vorteil des Ganzzelllysatsblotverfahrens im Vergleich zum rekombinanten Immunblot besteht aber in der höheren Zahl an immunreaktiven Proteinen verbunden mit einer höheren Sensitivität.

Im Gegensatz zum Ganzzelllysatsblot erlaubt der Immunblot mit rekombinanten Antigenen eine zuverlässige Identifikation immunreaktiver Borrelienproteine (Wilske 1993/ 1993 ;Wilske 1994; Wilske 1999b, Wilske 1997; Roessler 1997). Zur Anwendung kommen verschiedene Antigene, die auf die jeweiligen Verhältnisse des Patientenkollektives abgestimmt und auch auf den Teststreifen eindeutig zugeordnet werden können. Einen weiteren Vorteil bietet die Verwendung von homologen Proteinen verschiedener Spezies bzw. Typen und darüber hinaus sind primär in vivo exprimierte Proteine einsetzbar. Bei vergleichbarer Spezifität erreicht dieses Verfahren jedoch noch nicht die Sensitivität des Ganzzelllysatsblots.

#### **1.4.4 Therapie der Lyme-Borreliose**

Jede Manifestation der Lyme-Borreliose sollte so früh wie möglich antibiotisch therapiert werden, um weitere Manifestationen zu vermeiden. Dosierung, Dauer und das verwendete Antibiotikum richten sich nach dem Stadium und dem klinischen Bild des einzelnen Patienten. Es kommen vor allem

Penicilline, Doxycyclin und Cephalosporine der dritten Generation zur Anwendung (Weber 1993, Wilske 1997).

## **1.5. Borrelien**

### **1.5.1 Taxonomie und Morphologie der Gattung *Borrelia***

Die Ordnung der *Spirochaetales* teilt sich in zwei Familien: Die *Leptospiraceae* und die *Spirochaetaceae*. Letztere unterteilt sich in drei Gattungen: *Spirochaeta*, *Treponema* und *Borrelia*. Die zwei wichtigsten humanpathogenen Vertreter der Gattung *Borrelia* sind die Rückfallfieberborrelien, die in Europa nur eine untergeordnete Rolle spielen, und die Erreger der Lyme-Borreliose, die unter dem Begriff *B. burgdorferi sensu lato* (s.l.) (Baranton 1992) zusammen gefaßt werden und in Europa weit verbreitet sind.

*B. burgdorferi* s.l. ist unregelmäßig gewunden und weist häufig Abknickungen auf. Die Länge schwankt in Abhängigkeit von Entwicklungsstand und Ernährungsbedingungen zwischen 4 und 30 µm. Die Helixbreite variiert zwischen 0,18 und 0,3 µm (Barbour 1988, 1986).

Borrelien sind von einer nur locker mit Protoplasma verbundenen, amorphen Schleimhülle umgeben. Die darunter liegende äußere Zellmembran beherbergt artspezifische Oberflächenproteine. Die 15 bis 22 periplasmatische Endoflagellen, auch als axiale Filamente bezeichnet, inserieren subterminal an beiden Enden des protoplasmatischen Zylinders. Dadurch sind die Borrelien in der Lage schraubenförmige Bewegungen auszuführen. Mittels 16 S rDNA-Analysen wurden die Spirochäten der Division D der Eubakterien zugeordnet. In der Gramfärbung reagieren Borrelien negativ. Borrelien zeigen eine hohe Affinität zu sauren Verbindungen.

#### ***Borrelia burgdorferi sensu lato***

Ursprünglich als einheitliche Spezies *B. burgdorferi* bezeichnet (Burgdorfer 1982, Johnson 1984), wurde durch immunologische Analysen die Heterogenität in Europa entdeckt (Wilske 1986). Dies führte zu einer Aufteilung in mittlerweile zehn verschiedene Spezies, von denen mindestens drei (*B. burgdorferi sensu stricto* (s.s.), *B. garinii* und *B. afzelii*) als humanpathogen einzustufen sind (Baranton 1992, 1998; Canica 1993). Weitere in Europa nachgewiesene Spezies sind *B. valaisiana*, welche möglicherweise ebenfalls eine humanpathogene Spezies darstellt, und *B. lusitaniae* (Baranton 1992; Canica, 1993; Wilske 1993; Marconi 1995). In Amerika kommt nur *B. burgdorferi* s.s. als

humanpathogene Form vor, während in Europa alle drei Spezies verbreitet sind. *B. burgdorferi* s.s. findet sich allerdings nicht in Japan (Wilske 1997). Als Oberbegriff für alle Spezies wird *B. burgdorferi* s.l. verwendet.

*B. burgdorferi* s.l. zeigt Wachstum unter mikroaerophilen Bedingungen und benötigt langkettige Fettsäuren. Es ist aber auch anaerobes Wachstum möglich (Preac-Mursic 1991, 1993). Die Kultivierung wird in modifiziertem Kelly-Medium bei 33°C durchgeführt (Barbour, 1984). In diesen Kulturen kann eine Bakteriendichte von  $10^9$ / ml erreicht werden. Die Generationszeit beträgt 8-20 Stunden (Preac-Mursic und Wilske 1993).

In Europa fand man Unterschiede in der Prävalenz der drei Spezies bei Zecken- und Patientenisolaten. Bei Hautisolaten des Menschen (insbesondere ACA) wird gehäuft *B. afzelii* gefunden. Zecken- und Liquorisolat dagegen zeigen ein vergleichbar heterogenes Verteilungsmuster der *B. burgdorferi* s.l. Spezies (siehe Abb. 1.6). Eine Ausnahme stellt allerdings der *B. garinii* OspA-Typ 4 dar: Dieser Serotyp wurde vor allem aus Liquor isoliert. Eine Anzucht aus Zecken war bisher erst einmal erfolgreich (Hu 2001). *B. burgdorferi* s.s und *B. afzelii* weisen einen jeweils einheitlichen outer surface protein (Osp) A-Serotyp auf (OspA-Serotyp 1 bzw. OspA-Serotyp 2), *B. garinii* wird dagegen in fünf OspA-Serotypen (3-7) eingeteilt (Wilske et al. 1993).

Borrelien zeichnen sich durch ein kleines, lineares Chromosom mit 950 kBp (Ferdows 1989) und eine Vielzahl linearer und zirkulärer Plasmide mit einer Größe zwischen 5,1-75 kBp aus (Barbour 1989, 1988). Diese Plasmide tragen die Gene für zum Teil variabel exprimierte Membranproteine, die als Outer Surface Proteine bezeichnet werden. Diese werden mit der Adaption an den Wirt in Verbindung gebracht. Die linearen Plasmide enthalten den Hauptanteil der extrachromosomalen DNA. Die Gene OspA und OspB liegen auf einem 49 kBb grossen linearen Plasmid (Barbour; 1987), das Gen für OspC auf einem zirkulären (Marconi, 1993, Sadzienne, 1993). Ihr GC-Gehalt liegt zwischen 27% und 32% (Johnson 1984).

### **1.5.2. Oberflächenproteine**

Der Erreger des Rückfallfiebers *B. hermsii* lieferte erste wichtige Hinweise auf die Existenz von Oberflächenproteinen auf Borrelien. Bei dieser Spezies wurde die hochinteressante Entdeckung gemacht, dass Rückfallfieberborrelien eine ausgesprochene Antigenvariabilität aufweisen (Barbour 1986). Die Gene, welche für die Kodierung dieser "variablen Membranproteine" (variable major protein - vmp) zuständig sind, liegen auf linearen Plasmiden (Plasterk 1985). Die Immunantwort des Wirtes

kann durch Exprimierung jeweils neuer Oberflächenproteine umgangen werden (Restrepo 1992). Diesen Mechanismus bezeichnet man als „Immune-Escape-Mechanismus“ und er stellt die Erklärung für das Phänomen des Rückfallfiebers dar. In einem Stamm konnten 25 verschiedene Gene für Vmps gefunden werden (Stoenner 1982).

Relevante Outer Surface Proteine bei *B. burgdorferi* s.l.

Mitte der achtziger Jahre wurden die ersten äußeren Membranproteine (outer surface proteins) von *B. burgdorferi* s.l. beschrieben. Es handelte sich dabei um das OspA und das OspB (Barbour, 1984,

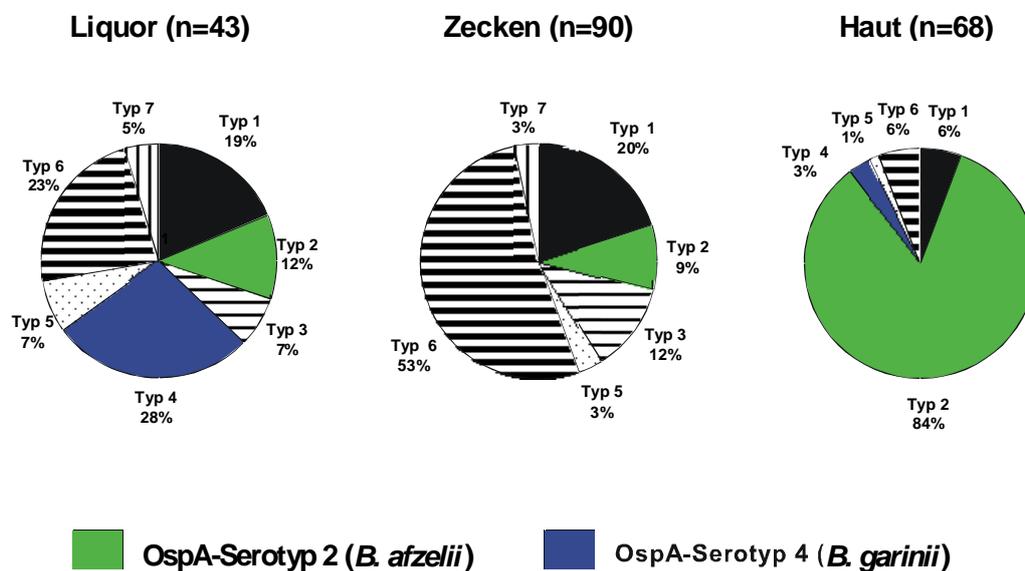


Abb. 1.7: Verteilung der sieben OspA-Serotypen bei europäischen *B. burgdorferi* s.l.-Isolaten aus Liquor, Zecken und Haut (nach Wilske et al., 1996b)

Wilske 1985, Wilske 1988). Die Molekulargewichte dieser Lipoproteine betragen 31-32000 bzw. 34-36000 kDa (Brandt, 1990; Barbour, 1985; Wilske, 1986). Mit monoklonalen anti-OspA Antikörpern konnte Wilske (Wilske et al. 1993) ein OspA Serotypisierungsschema entwickeln, welches 7 verschiedene OspA-Typen aus 25 *B. burgdorferi* Isolaten definierte. Hierbei entspricht Typ 1 *B. burgdorferi* s.s., Typ 2 *B. afzelii* und die Typen 3-7 *B. garinii* (Wilske, 1993, Wilske 1993). In Europa fand man Unterschiede in der Prävalenz der sieben OspA-Typen zwischen Zecken- und Patientenisolaten (Abb. 1.7). Funktional spielt OspA möglicherweise eine Rolle als Adhäsion, denn monoklonale Antikörper gegen OspA verhindern die Adhärenz an Endothelzellen (Comstock, 1993, Sadzienne, 1993, Schwan 2000).

In Amerika wurde 1999 ein auf OspA von *B. burgdorferi* s.s. basierender Impfstoff zugelassen (Steere, 1998). Dieser Wirkstoff zeigt ein bislang einzigartiges Wirkprinzip: Da die Borrelien im Darm der nüchternen Zecke OspA auf ihrer Oberfläche haben, werden sie durch die OspA-Antikörper des Geimpften bereits im Darm der noch saugenden Zecke abgetötet. Somit wird durch eine Impfung die Übertragung der Borrelien vom Vektor auf den Wirt verhindert. Da eine sehr viel stärker ausgeprägte antigenetische Heterogenität der OspA-Proteine in den europäischen Stämmen vorhanden ist (Barbour, 1982,1983, Wilske, 1985, 1986), ist diese Vaccine in Europa nicht anwendbar.

Das OspC stellt ein immundominantes Protein der frühen Immunantwort dar (Wilske 1986). Es ist 20-24 kDa groß (Fuchs 1992, Wilske 1993). Das OspC zeigt eine 70-74 % Identität innerhalb der europäischen Spezies (Jauris-Heipke 1993, Wilske 1993) und konnte in 13 Serotypen unterteilt werden (Wilske 1995). Die Heterogenität dieses Proteins ist also noch deutlich größer als die von OspA. Schon 1992 zeigten Preac-Mursic et al. im Gerbil-Tiermodell, dass mit OspC ein weiterer möglicher Vakzinekandidat zur Verfügung steht (Preac-Mursic, 1992).

Variationen der Antigene des Erregers könnten durch verschiedene Mechanismen entstehen. Zum einen kann eine Rekombination stattfinden, z.B. zwischen OspA und OspB-Genen (Rosa, 1992), und zum anderen kann es auch zu intragenetischen Rekombinationen kommen, z.B. OspC (Jauris-Heipke, 1995).

Als weitere Oberflächenproteine sind noch das OspD mit 28 kDa (Norris, 1992) sowie zwei weitere Proteine in dieser Klasse: OspE mit einer Größe von 19 kDa und OspF mit 26 kDa (Lam, 1994) zu erwähnen. Letztere gehören einer sehr variablen Proteinfamilie an (Marconi 1996).

Zu den neuesten outer surface proteins zählt das Osp17. Schon 1988 konnten Wilske et al. bei der Spezies *B. afzelii* ein 17 kDa großes Protein nachweisen, welches mit der Mehrzahl der Seren von Patienten mit Spätmanifestationen der Lyme-Borreliose reagierte (Wilske et al., 1988). Die drei verschiedenen Stämme Pka2 (*B. burgdorferi* s.s.), PKo (*B. afzelii*) und PBi (*B. garinii*) exprimieren p17 (PKo), p17a (Pka2) und p17b (PBi). P17 von *B. afzelii* stellt ein hochsensitives und spezifisches Antigen für die Diagnostik des Spätstadiums dar (Hauser, 1997).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern bestätigten die Theorie, dass dieses Protein ein äußeres Membranprotein darstellt (Jauris-Heipke 1999). Sequenzanalysen zeigten, dass dieses Protein nur bei der Spezies *B. afzelii* vorkommt. Ein Sequenzvergleich von 10 verschiedenen *B. afzelii*-Stämmen ermöglichte die Unterteilung in 4 verschiedene Gruppen (Jauris-Heipke 1999).

Ein weiteres outer surface protein ist das p58. In Immunoblot-Versuchen konnte dieses Protein klar von p60 abgetrennt werden und als homologes Protein in allen drei humanpathogenen *B. burgdorferi* s. l. Spezies nachgewiesen werden (Hauser 1997).

Diese Oberflächenproteine bilden im Verlauf des komplexen Infektions- und Lebenszyklus der Zecke unterschiedliche Expressionsmuster aus. *B. burgdorferi* ist während dieser Zeit sehr unterschiedlichen und rasch wechselnden Umweltbedingungen ausgesetzt. Unter anderem kommt es zu Veränderungen des osmotischen Druckes und der Temperatur. Dies erfordert eine effiziente Anpassungsstrategie. Die Veränderung des Expressionsmusters der outer surface Proteine auf der Borrelie könnte ein Ausdruck dieser wechselnden Bedingungen sein (Fingerle 1998, 2000).

Studien mit amerikanischen *I. scapularis* und *B. burgdorferi* s.s.-Isolaten zeigten, dass in der frühen Phase des Saugaktes OspC hochreguliert wird, während der Anteil an OspA zurückgeht (Schwan, 1995, 2000). In den Speicheldrüsen fanden sich ausschließlich OspA negative Borrelien (de Silva 1995). Im weiteren zeitlichen Verlauf konnten keine Borrelien mehr in den Speicheldrüsen detektiert werden, die im Darm nachweisbaren Borrelien waren wieder nur OspA positiv (Schwan 2000). Bei europäischen Untersuchungen zeigte sich, dass Borrelien in nüchternen *I. ricinus* nur OspA exprimieren (Fingerle 1995). Die OspC-Expression wird dagegen während des Saugaktes angeschaltet (Fingerle, 1996). In einer Studie (Fingerle 1998) mit von Menschen entfernten, angesogenen Zecken fand sich prinzipiell auch eine Hochregulation der OspC-Expression, allerdings konnten auch alle vorstellbaren Kombinationen bezüglich der OspA- und OspC-Expression gefunden werden. Hierbei fanden sich also Borrelien, welche weder OspA noch OspC, nur OspA, nur OspC oder auch eine OspA und OspC Coexpression zeigten. Im Säugetier zeigt sich ein Überwiegen des OspC, da sich die Primärantwort der Immunabwehr gegen dieses Protein richtet (Wilske 1986, Montgomery 1996).

Ein weiteres outer surface Protein, welches eine große Rolle im Immunprozeß der Lyme-Borreliose spielt, ist das VLSE (variable surface antigen E). Es unterliegt ebenfalls antigener Variation durch Genkonversion. Der immundominante Anteil dieses Proteins in Lyme-Patienten ist die am stärksten konservierte invariable Region des VLSE (Eicken 2001).

## **1.6 Ziele der Arbeit**

In der Diagnostik der Lyme-Borreliose wird der Immunblot als Ganzzelllysatsblot oder mit rekombinant hergestelltem Antigen als Bestätigungstest eingesetzt. Eine Standardisierung der beiden unterschiedlichen Testverfahren ist von entscheidender Bedeutung.

Das Ganzzelllysats-Verfahren zeigt derzeit bei gleicher Spezifität eine höhere Sensitivität als der rekombinante Westernblot.

Um die Sensitivität beim rekombinanten Immunblot zu erhöhen können weitere immunogene Proteine in den Westernblot aufgenommen werden. Zu diesen zählen unter anderem die Proteine Osp17 und p58.

Bei früheren Untersuchungen sind diese Borrelienproteine im Ganzzelllysatsblot als hoch immunogene Proteine erkannt (Hauser 1997), aber noch nicht in rekombinanten Verfahren eingesetzt worden. Der in der Routinediagnostik verwendete rekombinante Immunblot wurde um diese beiden rekombinant hergestellten Proteinen erweitert und anschließend an einem definierten Patientenkollektiv getestet.

Warum manche Stämme überwiegend im Menschen, andere aber vor allem in der Zecke gefunden werden ist noch nicht vollständig geklärt. Die meisten Studien befassen sich mit der Interaktion von *B. burgdorferi* s.s. in dem amerikanischen Vektor *I. scapularis*. Über die Situation in Europa und die Interaktion von *B. burgdorferi* s.l. mit dem Vektor *I. ricinus* ist noch wenig bekannt. Auch die Dynamik der Expression von Membranproteinen bezogen auf die Saugdauer ist ebenfalls weitgehend ungeklärt. Durch Untersuchung der einzelnen Organe der Zecke sowie der Wirtstiere kann ein Einblick über die zeitliche und quantitative Dissemination der einzelnen Stämme vom Magen-Darm-Trakt in die Speicheldrüsen und anschließend ins Wirtstier gewonnen werden.

Ein weiteres Problem besteht in der Detektion der Borrelien innerhalb der Zecken. Bei den konventionellen Immunfluoreszenzverfahren ist zwar die Detektion der Borrelien in der Zecke möglich, es fehlt aber eine genaue Darstellung der Borrelien in Bezug auf die Organe (z.B. Adhärenz an der Darmwand). Dieser Fragestellung wurde im Versuch mit Kunststoffschnitten Rechnung getragen.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Serologie**

#### **2.1.1 Für die Diagnostik etablierte rekombinante Borrelienproteine**

Folgende rekombinante Borrelienproteine wurden für den bisherigen Immunblot verwendet: Das p83/100 von *B. afzelii* (Stamm PKo), die Proteine P39 (BmpA) und OspC jeweils von den drei humanpathogenen Genospezies *B. burgdorferi* s.s. (PKa2), *B. afzelii* (PKo), und *B. garinii* (PBi) sowie das p41 (Flagellin) der Stämme PKo und PBi. Das p41i ist ein trunkiertes Borrelienprotein, das eine höhere Spezifität aufweist. Der Borrelienstamm PKo ist ein humanes Hautisolat. Die Stämme PBi und PKa2 sind humane Liquorisolat.

#### **2.1.2 Identifizierung, Klonierung und Aufreinigung von Osp17 und p58**

Tryptische Peptide von p58 des Stammes PKo wurden N-terminal ansequenziert. Mittels Oligonukleotiden (Sequenzen der Primer), welche mit der dazugehörigen DNA-Sequenz korrespondierten, konnte mit Hilfe der PCR ein Genfragment dieses Proteins amplifiziert werden. Dieses PCR-Fragment wurde mit Digoxigenin-11-dUTP (Boehringer Mannheim GmbH) markiert. Das p58 Gen wurde mittels Southern-Blot auf einem HindIII-Fragment des PKo Genoms lokalisiert. Dieses Fragment (aus der HindIII Datenbank) wurde kloniert und die Sequenz ermittelt. Die anschließende Klonierung des p58 Gens erfolgte in dem Vektor pUHE. Der reverse Primer wurde zusätzlich mit 5 His-Codons designed. Die Expression von p58 in *E. coli* (XL 1Blue) wurde durch Zusatz von Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid induziert. Hochgewachsene Zellen wurden in Puffer A (50mM Natrium Phosphat Puffer pH 8.0, 500 mM NaCl, 1 mM Imidazol) und 20  $\mu$ l Bezonase (Merck, Darmstadt) resuspendiert. Nach Aufschluß in der French Press (SLM AMINCO) bei 800 bis 1000 bar wurde das Protein mittels eines FPLC-System (Pharmacia Biotech, Freiburg) gereinigt. Im ersten Reinigungsdurchlauf wurde die IMAC Säule von MERCK verwendet und mit NiSO<sub>4</sub> geladen. Als Puffer wurde hierbei 25 mM Na-Phosphatpuffer pH 8 mit 500 mM NaCl und 0.1 mM Imidazol verwendet. Ein zweiter Puffer enthielt zusätzlich noch 500 mM Imidazol. Der Pool B mit *E. coli*- Verunreinigung wurde anschließend gegen 25 mM Tris-HCL pH 8.0 dialysiert. Der zweite Reinigungsschritt erfolgte mit Anionenaustauscherchromatographie (Mono Q, Pharmacia Biotech, Freiburg). Die Reinigung wurde mit SDS-Page und mit anschließendem Immunoblot mit Hyperimmunserum gegen *E. coli* kontrolliert.

Für die Klonierung und Reinigung des Osp17 kam dasselbe Verfahren zur Anwendung (Jauris-Heipke 1999).

### **2.1.3 Monoklonale AK**

Für die Identifizierung und Darstellung der einzelnen Proteine wurden folgende monoklonale Antikörper verwendet: L 100 22G3 als Antikörper gegen p83/100, L41 1C11 für p41, L32 1F11 gegen OspA, L22 1F8 gegen OspC, L39 B5 gegen p39 und L17 G2 gegen Osp17 (Wilske 1993a, 1996a). Die monoklonalen Antikörper stammten aus unserem eigenen Labor.

### **2.1.4 Anti-p58-Immunsereums: Herstellung und Austestung**

Zur Herstellung eines Hyperimmunsereums wurde das in *E. coli* exprimierte, hochgereinigte p58 in einer Konzentration von 990 µg/ml eingesetzt. Zur AK-Gewinnung wurde ein 8 Monate altes Kaninchen mit einer Mischung aus 100µl p58, 100µl NaCl und 300µl komplettes Freundsches Adjuvans subcutan immunisiert. Anschließend wurde das Versuchstier zweimal mit Antigen mit inkomplettem Freundsches Adjuvans im Abstand von jeweils 4 Wochen intravenös immunisiert. 4 Wochen nach der letzten Immunisierung wurde das Kaninchen durch Herzpunktion unter Äthernarkose entblutet. Das abzentrifugierte Serum wurde bei -20°C tiefgefroren.

### **2.1.5 Durchführung des Westernblots**

#### **Ultrasonikatblot**

Für den Ultrasonikatblot kam der Stamm PKo der Spezies *B. afzelii* zur Verwendung. Die Kulturen wurden bei 33°C in MKP (modifiziertem Kellymedium) (Preac-Mursic 1991,1992) für 4 Tage bebrütet, bis sie eine Zelldichte von  $10^7$ /ml erreichten. Nach Zentrifugierung bei 10.000 x g für 20 Minuten bei 15°C folgten vier Waschvorgänge mit PBS (phosphate buffered saline) pH 7,4 5mM Mg Cl<sub>2</sub>. Nach jedem Waschvorgang wurde erneut zentrifugiert und das Pellet resuspendiert. Anschließend wurden die Borreliellenpellets in Puffer (50 mM Tris- OH/ HCL pH 8, 2mM Na<sub>2</sub>-EDTA, 0.1mM DTE, 5% Glycerin) resuspendiert und dann in der French Press (SLM AMINCO) aufgeschlossen. Im folgenden Arbeitsschritt erfolgte eine Auftrennung der Antigene durch 12,5 % Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) Für die Gelelektrophorese kam eine standardisierte

Blotvorrichtungen der Fa Biorad, München, Deutschland (Spacer 0.75 mm) zum Einsatz. Die Gelgröße betrug 16cm x 16cm x 0.75 mm.

Es erfolgte die Einstellung auf eine definierte Proteinmenge und anschließend eine Verdünnung mit Lämmli-puffer (Aqua dest, 0.5 M Tris- OH/ HCL, pH 6.8, Glycerin, 10% SDS, Dithiothreitol, Bromphenolblau). Pro Spur im Makrogel wurde 12µg Protein aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine im Polyacrylamidgel erfolgte bei 4.0 mA für 24h bei Raumtemperatur. Anschließend fand eine Transferierung der Proteine auf Nitrocellulosemembran (Schleicher & Schuell, 0.45 mm) mittels Semidry-Blotting für 1 Stunde bei 24 V und 200 mA statt. Zur Darstellung der Banden wurden die Gele mit Ponceau S Solution (0.2% in 3% TCA) für 5 Minuten angefärbt und mit Aqua dest abgewaschen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen inkubierte das Gel in 100 ml TBS/ Tween mit Milchpulver für 1 Stunde bei 37°C. Pro Gel konnten 40 Blotstreifen gewonnen werden, die jeweils 7.5-9 µg Antigen enthielten. Diese Streifen wurden anschließend getrocknet und bei 4°C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt. Die für die Bewertung ausschlaggebenden Proteine (IgG und IgM) sind: p83/100, p58, p43, p39, p30, OspC, p21, Osp17 und p14 (Hauser 1997).

## Rekombinanter Westernblot mit den Proteinen: p83/100, p58, p43, p39, p30, OspC, p21, Osp17 und p14

Verwendete Antigene und Mengen siehe Tab. 2.1. Verdünnung 1:2 mit Lämmli-puffer. Eingesetzt pro Spur im Makrogel ca. 12 µg Protein, im Minigel ca. 3 µg. Die Antigene Osp17 und p58 liefen auf einem zweiten Gel. Die Proteine wurden im Gel elektrisch mit 4 bis 4,5 mA aufgetrennt und anschließend im Semidry-Verfahren bei 150 mA zwei Stunden auf eine Immobilon-P-Polyvinyl-Difluorid-Membran (Millipore, Eschborn, Deutschland) geblottet.

Antigene	Stamm	Menge
p100	PKo	7.20 µg
BmpA p39	PKo	2.92 µg
BmpA p39	PKa2	2.92 µg
OspC	PKo	20.88 µg
OspC	PBi	20.80 µg
OspC	PKa2	6.63 µg
p41i	PKo	26.40 µg
p41i	PBi	10.51 µg
Osp17	PKo	15.35 µg
p58	PBi	8.75 µg

Tab. 2.1: Verwendete Antigene und Mengen

Nach einer anschließenden Anfärbung mit Ponceausolution (0,2% in 3% TCA; Serva, Heidelberg) für 5 Minuten konnte der verwendbare Bereich markiert und anschließend die Membran in Blockingpuffer (pro Gel 100 ml TBS/ Tween mit Milchpulver) bei 37°C eine Stunde lang abgesättigt werden. Die Membranen wurden nun mit Aqua dest und Waschpuffer (0.9% NaCl, 10mM Tris/ HCL, pH 7.4, 0.2% Tween 20) gewaschen. Anschließend wurden die Membranen gestempelt, geschnitten und bei 4°C im Kühlschrank bis zur Verarbeitung gelagert.

### Nachweis spezifischer IgG und IgM Antikörper in Patientenseren

Für den IgM-Nachweis erfolgte eine Vorbehandlung mit RF-Absorbens (Behringwerke AG, Marburg). Das Absorbens enthält eine Anti-Human-IgG-Antikörperpräparation vom Schaf, welche als IgM-

Antikörper gegen IgG gerichtet sind und mit diesen Immunkomplexe bilden. Da durch die Präzipitation auch das erregerspezifische IgG entfernt wird, verhindert man falsch negative IgM Tests durch kompetitive Verdrängung des IgM an Bindungsstellen durch höher avides IgG. Die Sensitivität kann dadurch erhöht werden. Die Probe wurde mit Verdünnungspuffer (Waschpufferlösung (WPT) + 1% Magermilchpulver) im Verhältnis 1:21 verdünnt und anschliessend mit dem Absorbens (Verdünnungsverhältnis 1:2) für 15 Minuten inkubiert. Die Gelstreifen wurden über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Seren wurden hierbei wie folgt mit Verdünnungspuffer für Recomblot (Mikrogen, München) verdünnt: 1:200 für IgG, 1: 100 für IgM. Nach einem viermaligen Waschvorgang mit Waschpuffer (0.9% NaCl, 10mM Tris/ HCL, pH 7.4, 0.2% Tween 20) erfolgte die Inkubation mit Meerrettich-Peroxidase konjugiertem Kaninchen Antihuman IgG bzw. IgM (Dakopatts, Kopenhagen, Dänemark) in der Verdünnung 1:1000 für IgG und 1:500 für IgM-Seren. Nach einem erneuten Waschvorgang wurde eine Anfärbung mit Diaminobenzidin und 95% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durchgeführt. Der Färbeprozess wurde nach Erreichen einer definierten Farbintensität der Positivkontrollen gestoppt (ca. 5 Minuten) und abgelesen. Pro 10 Streifen erfolgte die Mitführung von 2 Kontrollen (Positiv- und Negativkontrolle), bei denen die Positivkontrolle alle rekombinanten Antigene darstellte.

#### **2.1.6 Auswahl der Seren:**

Das zur Austestung verwendete Patientenkollektiv setzte sich wie folgt zusammen:

66 Serumproben stammten von Patienten mit unbehandeltem Erythema migrans (EM), die im Rahmen einer Therapiestudie von einem in der Diagnostik des EM erfahrenen Dermatologen (Prof. Dr Weber) zur Verfügung gestellt wurden. 38 Serumproben kamen von Patienten mit Neuroborreliose Stadium II, aus deren Liquor *B. burgdorferi* isoliert werden konnte (NB I). Weitere 42 Serumproben stammten von Patienten mit typischen Kennzeichen einer akuten Neuroborreliose Stadium II (NB II). In diesen Fällen fand sich eine lymphozytäre Pleocytose mit Schrankenstörung im Liquor. Der borrelienspezifische Liquor/ Serum-Index lag bei Werten größer 2. Serum und Liquor stammten vom selben Abnahmetag. Die Erkrankung bestand im Durchschnitt seit 4 Wochen.

Die Gruppe der Patienten mit einer Spätmanifestation teilte sich in 29 Fälle mit Acrodermatitis chronica atrophicans und 10 Patienten mit Lyme-Arthritis auf.

Alle Patientenserumproben wurden von Ärzten zur Verfügung gestellt, die über langjährige Erfahrungen in der Diagnostik und Therapie der Lyme-Borreliose verfügen.

Als Negativkontrollen wurde ein Kollektiv aus 118 gesunden Blutspendern verwendet, welche weder aktuell noch anamnestisch Anhaltspunkte für neurologische, dermatologische oder rheumatologische Erkrankungen zeigten. 11 Seren stammten von Patienten mit Lues. 10 Patienten, deren Serum Rheumafaktor positiv (rh+ >45IE/ml) war, vervollständigten die Kontrollgruppe.

## 2.1.7 Auswertung des Westernblots

Wenn die Positiv- und Negativkontrollen den standardisierten Werten entsprachen, konnten die Westernblots ausgewertet werden. Die Intensität der Banden wurde semiquantitativ mit + (schwach positiv) bis +++ (stark positiv) bewertet, relativ zu den mitgeführten Kontrollen. Zur Auswertung wurden folgende Kriterien herangezogen (vgl Tab. 2.2):

### Auswertungskriterien für den IgG-Immunblot

Art des Blot	Spezies / Stamm	gewertete Proteine	Wertung
Ultrasonikat *	<i>B. afzelii</i> / PKo	p83/100	>= 2 positiv
		p58	
		p43	
		p39	
		p30	
		OspC	
		p21	
		Osp17	
		p14	
Alter Rekomblot **	<i>B. afzelii</i> / PKo	p83/100	>= 2 positiv
	<i>B. afzelii</i> / PKo	p39 ***	
	<i>B. burgdorferi</i> s.s. / PKa2	p39 ***	
	<i>B. burgdorferi</i> s.s. / PKa2	OspC ***	
	<i>B. afzelii</i> / PKo	OspC ***	
	<i>B. garinii</i> / PBi	OspC ***	
	<i>B. afzelii</i> / PKo	p41li ***	
	<i>B. garinii</i> / PBi	p41li ***	
Neuer Rekomblot	<i>B. afzelii</i> / PKo	Osp17	
	<i>B. garinii</i> / PBi	p58	

Tab. 2.2.: \* (Hauser et al., J Clin Microbiol, 1997), \*\* (Wilske et al., Med Microbiol, 1993. Roessler et al., J Clin Microbiol, 1997),\*\*\* Reaktion mehrerer homologer Proteine desselben Proteins wird als eine Bande gewertet, Bewertung OspC/p39 als Gemisch, p41i einzeln

Für den IgM-Blot galten folgende Kriterien:

Ultraschikat-Blot: mindestens 1 Bande positiv. Gewertete Proteinbanden waren: p41, p39, OspC, Osp17.

Alter Rekomblot: mindestens 2 Banden der folgenden Proteine: p39, OspC, p41int.

Neuer Rekomblot: mindestens 2 Banden positiv: p39, OspC, p41int, Osp17, p58

### **2.1.8 Statistische Auswertung des Westernblots**

Die statistische Auswertung aller gewonnenen Daten erfolgte mit dem Fisher-Exact-Test.

P-Werte kleiner 0.05 wurden als signifikant, Werte kleiner 0.005 als extrem signifikant eingestuft.

## **2.2 Capillary-Feeding Versuche**

Um das Verhalten verschiedener Borrelienspezies in der Zecke – zeitlicher Verlauf der Dissemination vom Zeckendarm in die Speicheldrüsen und die differentielle Osp-Expression- zu untersuchen, wurden Zecken mittels Capillary-Feeding infiziert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf das Vorhandensein und die Osp- Expression von Borrelien untersucht.

### **2.2.1 Verwendete Borrelienstämme**

Folgende Stämme/ Klone wurden für das Capillary-Feeding der Nymphen verwendet.

Es wurde eine frühe Passage von PKo eingesetzt, der ursprünglich aus der Haut eines Patienten isoliert wurde und in der Routinediagnostik verwendet wird.

Der *B. afzelii*-Klon PKo 97 wurde durch dreifache Klonierung eines Reisolates aus der Niere eines Gerbils gewonnen, welcher mit einer frühen Passage vom Stamm PKo infiziert wurde. Es wurden die Klone Pko97 37 und Pko97 K1-4 verwendet. In den Versuchen kam der *B. afzelii*- Klon 345-II23 zur Anwendung. Stamm 345 wurde aus dem Kniegelenk desselben Gerbils 3x kloniert. Dieser Klon hat im OspC-Gen eine Insertion nach Base 199 mit frame-shift und Stoppcodon nach Base 222 des offenen Leserahmens. Dies führt zum Abbruch der Translation wodurch kein OspC produziert wird (Fingerle et al., 2000).

Für die Stammklonierungen wurden pro Agarplatte 100 µl einer Borrelienkultur (Borreliendichte etwa 10 Borrelien pro Blickfeld) gleichmäßig verteilt. Um echte Einzelklone zu erzeugen wurden für jeden Klon drei Subklonierungen durchgeführt. Nach jeder Subklonierung wurden selektierte Einzelklone in Rörchen (Eppendorf, Köln, Deutschland) in 1,5 ml modifiziertem Kellymedium kultiviert und mittels

Immunfluoreszenz kontrolliert. Die selektierten Klone wurden bei 33°C im CO<sub>2</sub>-Brutschrank für 10 Tage bebrütet. Alle verwendeten Stämme und Klone sind bezüglich ihrer outer surface Proteine und ihrer Expression genau definiert und dokumentiert (Siehe Tab. 2.3)

Für die Fütterungsversuche wurden in der Osp-Expression mittels IFT und Immunoblot genau definierte Passagen der Stämme/ Klone bei -70°C mit Glycerin in einer Endkonzentration von 15% bis zur Anzucht für die Fütterungsversuche eingefroren (von jedem Klon 50 Röhrchen).

#### **In vitro-Expression immunrelevanter Proteine der eingesetzten Stämme/ Klone**

<b>Spezies</b>	<b>Stamm/Klon</b>	<b>OspA*</b>	<b>OspC*</b>	<b>Osp17*</b>
<i>B. afzelii</i>	PKo f. Ag	positiv	positiv	positiv
<i>B. afzelii</i>	PKo 97 K +2	positiv	positiv	positiv
<i>B. afzelii</i>	345-II23	positiv	negativ	negativ
<i>B. afzelii</i>	PKo 97 K 1-4	negativ	positiv	positiv

Tab. 2.3: \*Charakterisierung der Expression im Westernblot mit monoklonalen Antikörpern

#### **Anzucht der Borrelien**

Die eingefrorenen Stämme wurden bei 33°C für 4-7 Tage in modifiziertem Kelly-Medium (CMRL-1066 (Fa. Gibco), Aqua dest, Neopepton, Hepes, Zitronensäure, Glukose, Pyruvat, N-Acetylglucosamin, Natriumbicarbonat, Gelatine, Kaninchenserum, BSA 35%) (Preac-Mursic, 1986) bis zu einer Konzentration von etwa 10<sup>7</sup>/ml angezüchtet.

Durch Kontrolle am Dunkelfeldmikroskop konnte die Konzentration wie folgt ermittelt werden (Preac-Mursic, 1986, 1987): Nach Auftropfen von 13 µl einer gut gemischten Borreliensuspension auf einen Objektträger wurde dieser mit einem 24 x 60 mm Deckglas abgedeckt. Anschließend wurden 50 Blickfelder im Dunkelfeldmikroskop (Fa. Leitz Dialux 22) bei 400x Vergrößerung (Objektiv 40, Okular 10) ausgezählt. Die Anzahl der Borrelien pro ml ließ sich dann nach folgender Formel ermitteln:

$$\frac{\text{Anzahl der gezählten Borrelien pro Blickfeld}}{\text{Anzahl der Blickfelder}} \times 833,33 \times 1000 = \text{Anzahl der Spirochäten pro Milliliter}$$

833,33 entspricht dabei der errechneten Anzahl der Blickfelder/ml und 1000 ist der Umrechnungsfaktor von µl zu ml.

Es wurden ausschließlich Kulturen mit gut beweglichen Borrelien verwendet.

## **2.2.2 Capillary-Feeding der Zecken**

### **Aufbewahrung der Nymphen**

Zur Anfütterung wurden im Labor von Dr. O. Kahl gezüchtete *I. ricinus*-Nymphen aus dem Zoologischen Institut, Berlin verwendet. Diese Zeckenkolonie ist seit mehreren Generationen frei von Borrelien und wurde bereits erfolgreich für Borrelierversuche eingesetzt (Kahl et al., 1998). Die Zecken wurden in sterilen Falcon-Plastikröhrchen (10ml, Fa Becton- Dickinson, Franklin Lakes; USA), in die Löcher zur Belüftung eingestanzte wurden, gehalten und in einem Exsikkator (Scienceware, Pennacock, USA) mit einem Röhrchengestell aufbewahrt. Zur Aufrechterhaltung einer Luftfeuchtigkeit > 80% wurden 200 ml gesättigter MgSO<sub>4</sub>-Lsg in den Exsikkator gefüllt. Die Lagerung erfolgte im Klimaschrank (WTB Binder, Tuttlingen, Deutschland) bei abwechselnd 7°C nachts und 18°C am Tag.

### **Herstellung der Kapillaren**

Aus 5 µl-Glaskapillaren (Science Products GmbH, Hofheim) wurden durch Erhitzen über einem Bunsenbrenner gleichzeitigem Ziehen nach beiden Seiten zwei spitz zulaufende Kapillaren hergestellt. Anschließend wurden die am spitzen Ende geschlossenen Kapillaren unter mikroskopischer Kontrolle so abgebrochen, dass ihre Öffnung dem 2-3 fachen Durchmesser des Zeckenhypostomas entsprach. Durch Wetzen an einem Speckstein unter mikroskopischer Kontrolle und anschließendem Abflammen konnten die Unregelmäßigkeiten an den Kapillarenden beseitigt werden. Diese stellten sonst eine Verletzungsgefahr für die empfindlichen Saugorgane der Zecken dar und verhinderten außerdem den Fluß der Borrelienflüssigkeit. Um Verunreinigungen zu verhindern wurden die Kapillaren vor jedem Fütterungsvorgang für 30 Minuten in 70% Ethanol desinfiziert, anschließend mit sterilem Aqua dest gespült und getrocknet.

### **Vorbereitung der Nymphen**

Nüchterne Zecken wurden mit Hilfe eines Doppelklebebandes auf dem Rücken liegend fixiert, welches zuvor in einer Petrischale befestigt wurde. Zur weiteren Fixierung wurden alle Beine mit Tesafilm festgeklebt. Der Körper und der Kopf mit den Saugorganen durften nicht einbezogen werden.

### **Ansetzen der Kapillaren**

Die 5µl-Kapillaren wurden mit Flüssigkultur mit  $1 \times 10^6$  Borrelien/ml befüllt.



Abb. 2.1:  
Kapillarfütterung einer Nymphe

Unter mikroskopischer Kontrolle mit dem Binokular (Zeiss, Stemi SV 11, Deutschland, 2-30x Vergrößerung) erfolgte das Ansetzen der Kapillare an die Zecke (siehe Abb. 2.1) Das spitz zulaufende Ende der Kapillare wurde so über dem Hypostoma positioniert, dass die Pedipalpen abgespreizt waren und sich außerhalb der Kapillare befanden. Die so positionierten Kapillaren wurden nun mit Zahnarztwachs am Rand der Petrischale befestigt.

Die Kontrolle des Saugvorganges erfolgte mikroskopisch. Saugende Zecken zeigen typischerweise rhythmische Bewegungen der ösophagealen Muskulatur, vermehrte Darmperistaltik und züngelnde Bewegungen der Chelizeren. Die Zecken wurden nun in einer feuchten Kammer bei 37°C für 3-4 Stunden (bei Zecken für die Gerbilversuche nur 2 Stunden) gesäugt. Da sich aufgrund des Temperatur- und Feuchtigkeitsunterschiedes die Kapillaren häufig verschieben, wurde der Saugvorgang jede halbe Stunde auf den Sitz der Kapillaren sowie die Saugtätigkeit der Zecken kontrolliert. Als Hinweis auf einen erfolgreichen Saugakt gilt ein runderer Leib mit verstrichener Analfalte, Flüssigkeitsaustritt am Anus und ein transparenter Darm. Nur Zecken, welche diese Merkmale aufwiesen, wurden für die weiteren Untersuchungen verwendet.

### 2.2.3 Präparation der infizierten Zecken

Unterschiedlichen Zeitabständen (0h, 12h und 24h) nach dem Capillary-Feeding folgend wurden 24 Nymphen präpariert.

Zunächst wurden die gesaugten Nymphen fünf Minuten in 70% Ethanol sowie dreimal in Aqua dest gewaschen. Anschließend erfolgte eine Befestigung der Tiere mit Doppelklebeband dorsal auf einer Petrischale und Fixierung der Beine mit Klebestreifen.

Nach Auftropfen von 10 µl Aqua dest wurde der Panzer mittels einer 0,40 x 20 mm Sterican-Kanüle (Fa Braun, Melsungen) eröffnet. Der Einstich erfolgte unter mikroskopischer Kontrolle (Binokular, Fa Zeiss, Stemi SV 11, Deutschland) am Übergang vom Panzer zum Kopfteil, die Zecke wurde dann rundherum aufgeschnitten. Der komplett abgetrennte obere Teil des Chitinpanzers wurde nun, ohne den Darm zu verletzen, nach oben geklappt und entfernt. Unter dem Mikroskop wurden um Verunreinigungen durch den Darm zu vermeiden, zuerst die Speicheldrüsen dargestellt. Diese wurden mit einer sterilen Kanüle entfernt und nach dreimaligem Waschen in Aqua dest in einem Tropfen NaCl-Lösung (pH 7.4) zerrieben, zerkleinert und auf 2 Objektträger verteilt. Anschließend wurde der

Mitteldarm entnommen, ebenfalls in einem Tropfen NaCl-Lösung zerrieben und auf Objektträger verteilt.

Die mindestens 3 Stunden lang luftgetrockneten Präparate wurden für 30 Minuten in 96% Methanol fixiert, luftgetrocknet und wurden bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### **2.2.4 Ansetzen der infizierten Zecken auf Gerbils**

Für die Versuche wurden mongolische Gerbils (*Meriones unguilatus*) verwendet. Die Käfige waren mit einem Bodengitter ausgestattet (Maschen 0,5 x 0,5 cm), welches einen Abstand von 2 Zentimeter zum Käfigboden aufwies. Die Käfige waren frei von Streu. Darunter befand sich ein 2 cm tiefer Wasserspiegel am Boden des Käfigs. Während des Versuchs konnten vom Gerbil abgefallene Zecken den Käfig aufgrund des Wassers nicht verlassen.

Nach der Kapillarfütterung verblieben die Zecken für 2 Stunden in einem Reagenzglas. Anschließend wurden sie mit einem Holzstäbchen auf den Gerbil aufgebracht. Am geeignetsten sind Körperstellen mit erhöhtem Feuchtigkeitsgehalt wie Ohren und Schnauze. Herabgefallene Zecken wurden erneut auf den Gerbil angesetzt. Um die vollgesogenen und abgefallenen Zecken möglichst rasch nach Beendigung des Saugaktes untersuchen zu können, erfolgten eine Woche lang zwei Mal täglich Kontrollen des Käfigs.

#### **2.2.5 Sektion und Verarbeitung der Gerbilorgane**

Der Gerbil wurde unter Äthernarkose durch eine substernale Herzpunktion entblutet. Danach wurde die Bauchhöhle mit einem Medianschnitt eröffnet und Niere, Milz und Blase entnommen. Dann erfolgte die Präparation und Entnahme eines Kniegelenks. Als Hautprobe diente ein enthaartes Ohr. Das Gehirn wurde abschließend nach Spaltung der Schädeldecke durch eine Schere entnommen.

Die entnommenen Organe wurden steril mit einem Skalpell geviertelt und jeweils ein Teil für PCR, Mikrotomschnitte und für die Anzucht einer Kultur in MKP-Medium mit und ohne Antibiotika eingesetzt.

### **Proteinase K-Verdauung und In vitro Amplifikation von DNA durch PCR**

Alle gemörsterten Organe wurden mit einem Proteinase K-Gemisch versetzt. Danach erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 56°C und eine 15 minütige Inaktivierung bei 95°C. Nach dieser wurden die Proben dann über eine Quiagensäule gereinigt.

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente wurde eine Semi-nested-OspA spezifische PCR verwendet (Trebesius et al. 2000). Für die Amplifizierung wurde die thermostabile TAQ- DNA-Polymerase mit einem Temperaturoptimum von 72°C eingesetzt, so das mehrfache Zyklen von Denaturierung, Anlagerung der Oligonukleotide und Synthese der DNA-Stränge möglich waren. Unter der Methodik der Semi-nested-PCR versteht man die Durchführung von zwei hintereinandergeschaltete PCR's, wobei für die zweite PCR die amplifizierte DNA der ersten als Matrize diene. Es wurde ein Primer verwendet, der innerhalb des amplifizierten Fragmentes bindet. Für die Amplifizierung aus *B. burgdorferi* s.l. wurden folgende Oligonukleotide eingesetzt (Vasiliu, 1998): OspA-1 und OspA-4 für die erste PCR, Bb sl-1 und OspA-4 für die zweite PCR. Für die Amplifizierung aus *B. afzelii* wurden OspA-1 und OspA-4 für die erste PCR und Ba-1 und OspA-4 für die zweite PCR verwendet.

Die Taq-DNA-Polymerase wurde erst nach Denaturierung (3 min, 94°C) der DNA zugegeben. Daraufhin erfolgte ein Amplifizierungszyklus, der vierzig mal wiederholt wurde. Nach Abschluß der Reaktionsreihe wurde der Thermocycler auf 4°C abgekühlt.

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden Agarose-Gelelektrophoresen in horizontalen Kammern eigener Bauart durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte in Minigelen bei einer Spannung von 50 Volt für 60 Minuten.

### **Reisolierungsversuche**

Zur Anzucht der Borrelien aus Gerbilorganen und Zeckenanteilen wurde ein Viertel der zermörsterten Organe (Kniegelenk, Ohrhaut, Blase Niere, Milz, Gehirn) in MKP-Medium mit Bactrim, 50 µg/ml; Phosphomycin 400 µg/ml; Amikacin 60 µg/ml und ohne Antibiotikum gegeben. Anschließend erfolgte die Bebrütung der Kulturen bei 33°C. Wöchentlich wurde die Kultur zentrifugiert und das Sediment im Dunkelfeldmikroskop auf Borrelien untersucht. Anschließend wurde das Pellet in neuem MKP-Medium resuspendiert und bei oben genannten Bedingungen weiter bebrütet. Wenn nach 6 Wochen kein Borrelienwachstum nachweisbar war, wurde die Kultur als negativ bewertet und verworfen.

## **Untersuchung der Mikrotomschnitte auf Borrelien**

Für die Mikrotomschnitte wurde ein Teil der frisch entnommenen Organe bei  $-270^{\circ}\text{C}$  in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend mit einem Leitz-Mikrotom (Wetzlar, Deutschland) bei  $-20^{\circ}\text{C}$  in  $5\ \mu\text{m}$  dicke Scheiben geschnitten. Diese wurden dann auf unbeschichtete Objektträger aufgetragen, in 96% Methanol für 30 Minuten fixiert und anschließend luftgetrocknet. Der Borreliennachweis erfolgte mittels indirektem Immunfluoreszenztest.

### **2.2.6 Durchführung des Immunfluoreszenztests an den Präparaten**

#### **Monoklonale Antikörper**

Der OspA spezifische Antikörper L32 1F11, welcher für den Immunfluoreszenztest verwendet wurde, detektiert ein Epitop, dass auf allen bisher untersuchten *B. burgdorferi* s.l. Stämmen vorkommt. Er gehört der Subklasse IgG2a an. Für die OspC-Erkennung wurde eine Kombination aus den monoklonalen IgG-Antikörpern L22 1F8, L 22 6C4 und L22 22C11 (alle IgG1) verwendet. Die Kombination dieser Antikörper erlaubt die Detektion von OspC bei allen bislang untersuchten (n= 36) OspC-exprimierenden Stämmen. Für die Darstellung von Osp17 wurde der monoklonale Antikörper - L17 G2 (Subklasse Ig2a) eingesetzt (vgl. Tab. 2.4).

## Übersicht über die verwendeten monoklonalen Antikörper für den IFT

Protein	verwendeter mAK	Subklasse des mAK	beschrieben in:
OspA	L32 1F11	IG2a (Maus)	Wilske; 1993
OspC	L22 1F8	IgG1 (Maus)	Wilske; 1995
OspC	L22 6C4	IgG1 (Maus)	Wilske; 1995
OspC	L22 22C11	IgG1 (Maus)	Wilske; 1995
Osp17 *	L17 G2	IgG2a (Maus)	Jauris-Heipke; 1999

Tab. 2.4: Detektion der Proteine im Immunfluoreszenztest mittels monoklonaler Antikörper

Die optimalen Verdünnungen der verschiedenen monoklonalen AK wurde mittels Schachbrett-Titration ermittelt. Es wurde mit der doppelten Konzentration, die noch eine optimale Reaktion in der Positivkontrolle zeigte, gearbeitet. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde bovines Serumalbumin in einer Endkonzentration von 0.3% zu den primären AK gegeben. Zur Detektion von OspA und OspC wurde eine Mischung aus L32 1F11 (Verdünnung 1:2), L22 1F8 (Verdünnung 1:8), L22 6C4 (Verdünnung 1:8) und L22 22C11 (Verdünnung 1:4) verwendet. Bei einem weiteren Objektträger erfolgte die Inkubation mit dem Osp17 Antikörper L17 G2 (Verdünnung 1:4). In Vorversuchen erfolgte die Austestung der Anfärbung aller oben genannten outer surface Proteine auf einem Objektträger. Eine befriedigende Detektion konnte allerdings in unterschiedlichen Testreihen mit unterschiedlichen Konzentrationen der Antikörper nicht erreicht werden.

Von jeder Antikörperlösung wurden 25 µl auf die Objektträger aufgetropft und bei 37°C 30 Minuten in der feuchten Kammer inkubiert. Es folgte ein dreimaliger Waschvorgang für je 7 Minuten mit IFT-Waschpuffer (PBS, pH 7,4).

Zur Detektion der primären Antikörper wurde Cy3 und FITC verwendet, einer Mischung aus sekundären subklassenspezifischen Antikörpern mit konjugierten Fluoreszenzfarbstoffen (Caltag Laboratories, Burlingame, USA). Pro Objektträger wurden 25 µl der jeweiligen Lösung aufgetragen und diese dann für 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert.

Nach erneutem Waschen erfolgte ein weiterer Färbevorgang zur Detektion aller Borrelien. Mit dem DNA-interkalierenden, blau fluoreszierenden Farbstoff DAPI wurden die Präparate für 1 Minute inkubiert und anschließend vorsichtig mit Aqua dest aus der Spritzflasche gewaschen.

Im Fluoreszenzmikroskop ergibt sich folgendes Bild: Im DAPI-Filter erscheinen alle im Präparat vorhandenen Borrelien blau. Im Grünfilter geben die OspA-positiven Borrelien ein grünes, im Rotfilter die OspC-positiven Borrelien ein rotes Signal. Bei gleichzeitiger Darstellung von OspA und OspC im Rot/Grünfilter resultiert je nach überwiegendem Anteil eine gelbe bis orange Mischfarbe.

Zur Auswertung der Präparate wurden jeweils die gesamten Auftragsstellen bei 400-facher Vergrößerung mit einem Fluoreszenzmikroskop der Firma Leica (Leitz Laborlux 12 DMRD) (40x Objektiv, Okular 10x) durchgemustert.

### **Kontrollen**

Als Positivkontrollen wurden jeweils gewaschene Borrelien des Originalstammes PKo für Ag und die entsprechenden, zur Fütterung verwendeten Stämme/ Klone mitgeführt. Als Negativkontrolle dienten mit *B. hermsii* beschichtete Objektträger.

### **2.3 Kunststoffschnitte von Zecken**

Mit den Capillary-Feeding-Versuchen konnte zwar das Vorkommen der verschiedenen Borrelienkclone/ Stämme im Mitteldarm und in den Speicheldrüsen dargestellt werden, nicht jedoch die genaue Lokalisation innerhalb dieser Organe. Mit dem Ziel eine genaue Lokalisation der Borrelien in vivo zu erhalten, erfolgte die Fixierung von infizierten Zecken in einer Kunststoffeinfbettung. Anschliessend konnte in dünnen Kunststoffschnitten eine Detektion der Borrelien durchgeführt werden.

#### **2.3.1 Kunststoffeinfbettung mit Technovit 8100**

Bei dieser Versuchsreihe wurden Nymphen mittels Capillary-Feeding unter den in 2.2.2 dargestellten Bedingungen infiziert.

Die Auswahl und Anzucht der Borrelienstämme bzw. Klone entsprach dabei den vorangegangenen Versuchen. Die Untersuchung erfolgte sofort nach der Fütterung, nach 12 Stunden oder nach 24 Stunden. Die Zecken wurden mindestens 1 Woche lang in eine Lösung aus 2% gepuffertem Paraformaldehyd in PBS, pH 7.4 bei 4°C gelegt. Um die vollständige Penetration der Fixierlösung zu

gewährleisten, entfernte man die Beine der Versuchstiere und machte den Chitinpanzer mit einigen Löchern durchgängig.

Die Einbettung erfolgte nach Vorschrift der Herstellerfirma (Kulzer Heraeus, Wehrheim) wie folgt:

Bei 4°C wurden die Zecken in PBS (pH 7.4) und 6.8 % Saccharose über Nacht unter ständiger Bewegung ausgewaschen, anschließend in Aceton reinst (Fa MERCK) für 1 Stunde bei 4°C entwässert, in die vorbereitete Mischung aus 0.6 g Härter I (Benzoylperoxid) und 100 ml Basislösung (Hydroxyethylmethacrylat) überführt und dann bei 4°C für 10 Stunden infiltriert.

Im Anschluß daran wurden die Zecken in Einbettformen eingebracht und mit einer Mischung aus Infiltrationslösung (2% gepuffertem Paraformaldehyd in PBS, pH 7.4) und Härter II (Tetramethylanilin) im Verhältnis 30:1 übergossen. Zum luftdichten Abschluss der Kammern verwendete man ein passend zugeschnittenes Stück PE-Folie. Zur Polymerisierung lagerten die Einbettformen für mindestens 8 Stunden bei 4°C.

Zur Verankerung der Mikrotomhalterung diente Technovit 3040, welches mit Aqua dest im Verhältnis 2:1 aufgelöst und zusammen mit der Halterung auf die einzelnen Präparatblöcke aufgesetzt wurde. Nun konnten die einzelnen Präparatblöcke aus ihrer Form entfernt, am Mikrotom (Leitz, Wetzlar, Deutschland) in 5 µm dünne Scheiben geschnitten und auf unbeschichteten Objektträgern fixiert werden.

### **2.3.2 Untersuchung der Kunststoffsnitte auf Borrelien**

Zur Detektion der outer surface Proteine mittels IFT wurde ein Teil der Schnitte für 30 Minuten mit Methanol fixiert und dann mit monoklonalen AK, wie unter 2.2. beschrieben, angefärbt.

Zur Detektion ganzer Borrelien kam eine In-Situ-Hybridisierung zur Anwendung (Moter, Microbiology 1998). Hierfür wurde die Sonde EKB 338-Cy3 (Basenabfolge: 5`GCTGCCTCCCGTAGGAGT) (Fa Metabion, München) verwendet, die auf 50 ng/µl mit Hybridisierungspuffer (1 M TRIS, 5 M NaCl, 10% SDS, Formamid 20%) eingestellt war. Anschließend wurden die Objektträger mit jeweils 200 µl der Lösung gleichmäßig überschichtet und in 50 ml Falcontubes (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, USA) bei 46°C mit angefeuchtetem Filterpapier 3.5 Stunden inkubiert.

Nach dreimaligem 15 minütigen Waschen in auf 46 °C vorgewärmtem Waschpuffer (1 M TRIS, 5 M NaCl, 10% SDS) und einem weiteren Waschschrift in eisgekühltem Aqua dest wurden die Präparate in einer dunklen Kammer getrocknet und anschließend mit einem Deckplättchen versehen.

Die mikroskopische Auswertung (Leitz Laborlux 12 DMRD, , Wetzlar, Deutschland) erfolgte bei 400 x Vergrößerung (Objektiv 40/ Okular 10).

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Serologie**

##### **Verbesserung des rekombinanten Westernblotverfahrens**

Bei dieser Versuchsreihe wurde ein gut charakterisiertes Panel an Patientenseren verwendet, welches auch schon zuvor in Studien zum Einsatz kam (Hauser 1997, Hauser 1998). 66 Seren stammten von Patienten mit Erythema migrans, 42 Patienten hatten eine Neuroborreliose Stadium II und 39 Patienten zeigten eine Spätmanifestation (Arthritis oder ACA) der Lyme-Borreliose. Die Kontrollgruppe bestand aus 118 Blutspendern. Im rekombinanten Immunblot kamen die bereits in der Laborroutine verwendeten Proteine zum Einsatz (siehe unten). Es wurden erstmals die Proteine Osp17 (Stamm PKo) und p58 (PBi) in rekombinanter Form ausgetestet. Diese Antigene wurden in anderen Studien schon als hochsensitive Proteine beschrieben (Hauser 1997).

##### **3.1.1 Verwendete Proteine für die verschiedenen Blotverfahren**

###### **Rekombinanter IgG-Westernblot:**

Für das im Folgenden als „Alter Immunblot“ bezeichnete Verfahren wurden folgende rekombinant hergestellte Proteine verwendet: p83/100, p39, p41i und OspC (siehe Tab. 2.2). In einem erweiterten Blot kamen die neuen Proteine Osp17 und p58 noch hinzu (siehe Tab. 2.2). Dieser wird im Folgenden als „Neuer Immunblot“ bezeichnet. Als drittes Verfahren wurde der Ultrasonikatblot mit Stamm Pko verwendet. Folgende Proteine wurden bewertet: p83/100, p58, p43, p39, p30, OspC, p21, p17 und p14 (siehe Tab. 2.2).

Der einzelnen Austestungen wurde als positiv gewertet, wenn mindestens zwei Banden positiv reagierten.

###### **Rekombinanter IgM-Westernblot:**

Für das im Folgenden als „Alter Immunblot“ bezeichnete Verfahren waren mindestens 2 Banden der Proteine p39, OspC, p41i positiv zu werten. Beim „Neuen Immunblot“ wurden zusätzlich die Proteine Osp17 und p58 eingesetzt und im Ultrasonikat-Blot kamen die Proteine p41, p39, OspC, Osp17 zum Einsatz. Das Auswertungskriterium hier war, dass mindestens eine Bande positiv gewertet wurde.

### 3.1.2 Herstellung und Aufreinigung der Proteine p58 und Osp17 (DbpA)

#### p58

Das p58-Gen des *B. garinii* Stammes PBi wurde in *E. coli* kloniert. Die Aufreinigung des exprimierten Proteins erfolgte durch ein FPLC-System (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) (Abb. 3.1). Im Immunblot mit hochtitrigem Immunsereum gegen *E. coli* konnte keinerlei Verunreinigung festgestellt werden.

#### Rekombinantes Osp (DbpA) 58 im SDS-Page und Immunblot



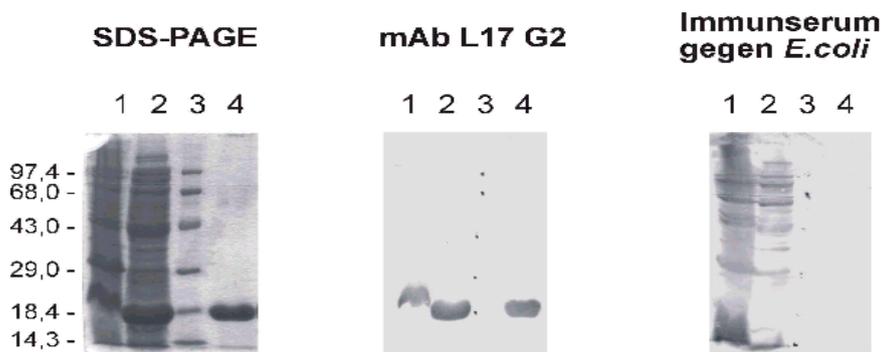
Spur 1: Rekombinanter *E. coli* (Ganzzelllysat)  
Spur 2: gereinigtes p58  
Spur 3: Markerproteine

Abb. 3.1: Aufreinigung und Austestung des rekombinanten p58 des Stammes PBi. SDS-Page und Immunoblot. Mit freundlicher Genehmigung: Wilske et al.

## Osp17 (DbpA)

Zur Gewinnung des rekombinanten Osp17 (DbpA) wurde ein Klon des Stammes PKo eingesetzt. Durch die Anwendung eines FPLC- Systems (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) konnte ein hoch gereinigtes Protein gewonnen werden. Im Immunoblot mit hochtitrigen Immunsersums gegen *E. coli* konnte keinerlei Verunreinigung festgestellt werden. (Jauris-Heipke, 1999) (Abb. 3.2).

### Aufreinigung des rekombinanten Osp (DbpA) 17, SDS-Page und Immunoblot



Spur 1: rekombinanter *E. coli* (Ganzzelllysat)  
Spur 2: rekombinanter *E. coli* (nach Behandlung mit French Press)  
Spur 3: Markerproteine  
Spur 4: gereinigtes Osp17

Abb 3.2: Aufreinigung und Austestung des rekombinanten Osp17 des Stammes PKo. SDS-Page und Immunoblot. Mit freundlicher Genehmigung: Wilske et al.

### 3.1.3 Reaktivität der verschiedenen rekombinanten Proteine im IgG-Immunoblot

Das p100 des Stammes PKo erreichte im Spätstadium der Erkrankung die höchste Sensitivität (67%). Die geringste Sensitivität ergab sich zu Beginn der Erkrankung (11%). Dieses Protein zeigte mit 94% die niedrigste Spezifität aller Proteine.

Bei p41i des Stammes PKo zeigte sich ein sehr ähnliches Ergebnis. Die größte Sensitivität konnte im Spätstadium mit 69% festgestellt werden. Die geringste zeigte dieses Protein bei den Seren der Erstmanifestation (5%).

#### Reaktivität der rekombinanten Borrelienproteine im IgG Immunoblot

Gruppe	p100	p58	p41i*	p41i*	p 39	OspC	Osp17
	<i>rec (PKo)</i>	<i>rec (PBi)</i>	<i>rec (PKo)</i>	<i>rec (PBi)</i>	<i>Rec (B31/PKo/PBi)</i>	<i>rec (B31/PKo/PBi)</i>	<i>rec(PKo)</i>
	n (%)	n (%)	n (%)				
<b>EM n=66</b>	7 (11%)	1 (2%)	3 (5%)	0 (0%)	0 (0%)	6 (9%)	10 (15%)
<b>NBII n=42</b>	14 (33%)	17 (40%)	7 (17%)	6 (14%)	15 (36%)	6 (14%)	15 (36%)
<b>Spätstadium n=39</b>	26 (67%)	36 (92%)	27 (69%)	16 (41%)	20 (51%)	4 (10%)	35 (90%)
<b>neg.K. n=135</b>	8 (6%)	1 (1%)	4 (3%)	3 (2%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (1%)

Tab. 3.1 Reaktivität der verschiedenen rekombinanten Proteine im IgG-Immunoblot unter Verwendung eines gut charakterisierten Panels an Patientenseren, Reaktivität der neu verwendeten Proteine Osp17 und p58 grau unterlegt.

Die Spezifität lag bei 97%. Sie war somit etwas höher als bei p100. Das p41i des Stammes PBi zeigte insgesamt geringere Reaktionen. Auch hier konnte die höchste Sensitivität im Spätstadium der Borreliose mit 41% erreicht werden. Im Stadium I der Erkrankung reagierten überhaupt keine Seren positiv. Die Spezifität lag bei 98%.

Das p39 der Stämme B 31, PKo und PBi verhielt sich sehr ähnlich. Die Sensitivität lag bei den Seren im Spätstadium bei 51%. Mit den Seren im Stadium I der Erkrankung fand keine Reaktion statt. Die Spezifität dieses Proteins lag bei 100%.

### Rekombinanter Immunoblot (Stadium II)

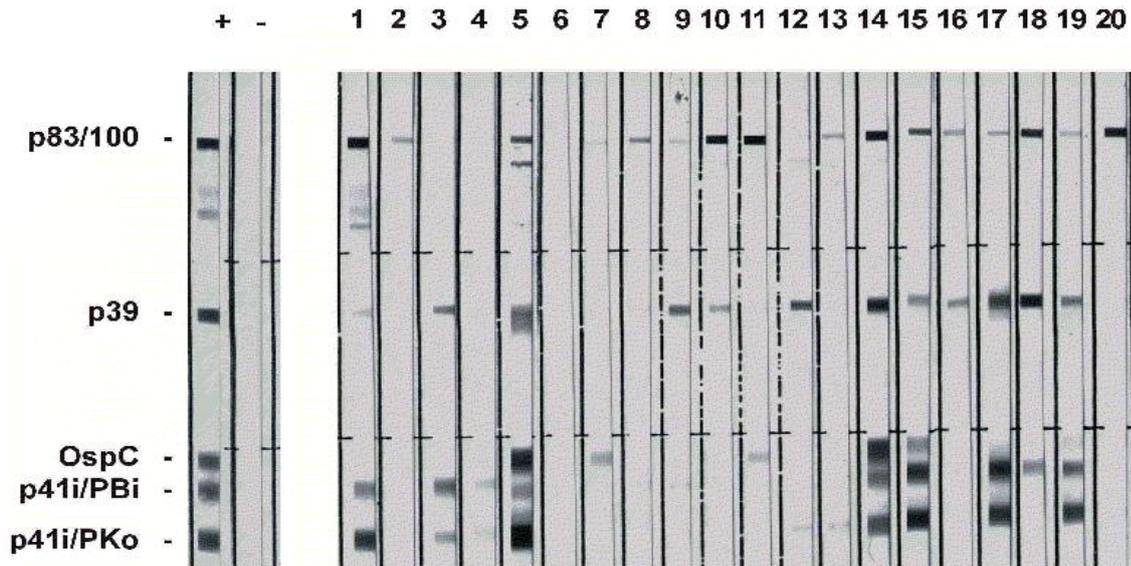


Abb.3.2.:Rekombinanter Immunoblot von Neuroborreliose Patienten (Stadium III)  
Mit freundlicher Genehmigung: Wilske et al.

Das OspC der Stämme B31, PKo und PBi zeigte insgesamt eine geringe Reaktion (Abb. 3.2.). Die Unterschiede der einzelnen Stadien waren hier nicht sehr ausgeprägt. Die Sensitivität der Seren im Stadium I lag bei 9%. 14% Sensitivität konnte im Stadium II und 10% Sensitivität im Stadium III der Erkrankung erreicht werden. Die Spezifität lag bei diesem Protein bei 100%.

### IgG-Immunoblot mit rekombinatem p58 und Osp17 im Stadium II

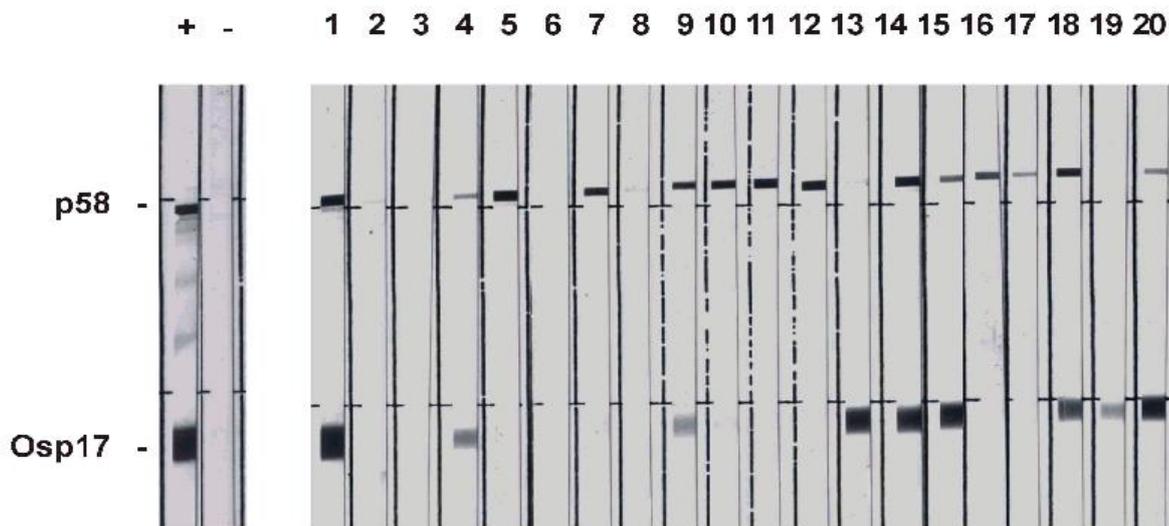


Abb. 3.2: IgG-Immunoblot mit rekombinatem p58 und Osp17 mit Seren von Neuroborreliose-Patienten (Stadium III). Mit freundlicher Genehmigung: Wilske et al.

Das p58 des Stammes PBi zeigte eine Reaktion mit den Seren des Stadium II und erreichte hier eine Sensitivität von 40%. Bei den Spätmanifestationen der Erkrankung konnte eine Sensitivität von 92% ermittelt werden. Im Stadium I konnte allerdings nur eine Sensitivität von 2% erreicht werden. Die Spezifität lag bei 99% (siehe Tab. 3.1).

Das Osp17 zeigte im Stadium I eine Sensitivität von 15 %. Ein Anstieg der Sensitivität konnte zum

Stadium II hin ermittelt werden. Hier lag die Sensitivität bei 36 %. Im Stadium III der Lyme-Borreliose konnte eine Sensitivität von 85 % (vgl. Tab. 3.2) ermittelt werden. Auch hier lag die Spezifität bei 99%. Insgesamt läßt sich feststellen, dass die Proteine p58 und Osp17 die sensitivsten Antigene für das Stadium II und III der Erkrankung darstellten.

#### **Vergleich der Reaktivität von rekombinanten und natürlichen Proteinen im IgG-Blot**

Das p58 zeigte als natürliches Protein des Stammes PKo 26 % Sensitivität im Stadium I der Erkrankung. Im Stadium II erreichte es eine Sensitivität von 40% und im Spätstadium von 97 %. Die Spezifität betrug 97%. Es zeigte sich also eine vergleichbare Reaktion der beiden Verfahren im Stadium II und III der Erkrankung. Im Stadium des Erythema migrans aber war die Sensitivität des natürlichen Proteins um 24 % höher (vgl. Tab. 3.2).

### Vergleich der Reaktivität rekombinanter mit natürlichen Proteinen im IgG-Blot

Gruppe	p58 (nat PKo)	p58 (rec PBi)	Osp17 (nat PKo)	Osp17 (rec PKo)
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<b>EM n=66</b>	17 (26%)	1 (2%)	18 (27%)	10 (15%)
<b>NB II n=42</b>	17 (40%)	17 (40%)	16 (38%)	15 (36%)
<b>Spätstadium * n=39</b>	38 (97%)	36 (92%)	36 (92%)	35 (85%)
<b>Kontrollen ** n=139</b>	4 (3%)	1 (1%)	6 (4%)	2 (1%)
<b>Gesamt</b>	72 (100%)	54 (100%)	70 (100%)	60 (100%)

Tab. 3.2. Vergleich der Reaktivität rekombinanter mit natürlichen Proteinen im IgG-Blot , \* Patienten mit Acrodermatitis (n= 29) oder Lyme- Arthritis (n= 10) \*\* Blutspender (n=118), Patienten mit Syphilis (n=11)

Das natürliche Osp17 des Stammes PKo erreichte im Stadium I der Lyme-Borreliose eine Sensitivität von 27%. Im Stadium II erhöhte sich diese auf 38 %, im Stadium III weiter auf 92 %. Die Spezifität dieses Proteins erreichte 94 %. Die Spezifität des rekombinanten Proteins des Stammes Pko betrug 99 %. Auch hier zeigte sich eine vergleichbare Sensitivität des natürlichen und rekombinanten Proteins in den Stadien II und III der Erkrankung.

Nur im Stadium I war die Sensitivität des natürlichen Proteins um 12 % höher (vgl. Tab. 3.2).

## Statistische Auswertung

### Statistische Auswertung der Proteine Osp17 und p58 im IgG- Westernblot

	<b>p58</b> (Ultrasonikatblot/ Neuer Immunblot)	<b>Osp17</b> (Ultrasonikatblot/ Neuer Immunblot)
<b>EM</b>	extrem signifikant	nicht signifikant
<b>NBII</b>	nicht signifikant	nicht signifikant
<b>Spätmanifestationen</b>	nicht signifikant	nicht signifikant
<b>Kontrollen</b>	nicht signifikant	nicht signifikant

Tab. 3.3: Statistische Auswertung der Proteine Osp17 und p58 im IgG-Westernblot, \* Vergleich von neuem Rekomblot und Ultrasonikatblot, \*\* verwendetes Verfahren: Fisher's Exact Test, \*\*\* p-value: < 0.05: signifikant; < 0.005: extrem signifikant

Bei der statistischen Auswertung konnte beim Vergleich des Ultrasonikatblots mit dem neuen Immunblot gezeigt werden, dass tendenziell eine niedrigere Sensitivität des rekombinanten p58 im Vergleich zum nativen Protein vorhanden war. Eine signifikant höhere Sensitivität des natürlichen p58 war nur im Stadium des Erythema migrans nachzuweisen. Für das Osp17 konnte in keinem Stadium ein signifikanter Unterschied zwischen den Verfahren nachgewiesen werden (siehe Tab. 3.3).

## Vergleich der drei Blotverfahren

### Vergleich verschiedener IgG-Immunoblots

Gruppe	Anzahl der Seren	neuer Immunblot	alter Immunblot	Ultraschallblot
<b>EM</b>	66	7 (11%)	3 (5%)	22 (33%)
<b>NBII</b>	42	19 (45%)	12 (29%)	24 (57%)
<b>Spätstadium *</b>	39	38 (97%)	29 (74%)	39 (100%)
<b>Kontrollen **</b>	139	3 (2%)	3 (2%)	3 (2%)

Tab. 3.4: Vergleich der verschiedenen Blotverfahren, \* Patienten mit Acrodermatitis (n= 29) oder Lyme-Arthritis (n= 10), \*\* Blutspender (n=118), Patienten mit Syphilis (n=11), Rheumafaktor positive Seren (n=11)

Durch Hinzunahme der beiden neuen Proteine konnte im Vergleich der Immunblotverfahren (alter und neuer Immunblot) eine Erhöhung der Sensitivität auf 11% (mit p58 und Osp17) im Stadium I erreicht werden.

Im Stadium II kam es zu einer Steigerung auf 45% (mit p58 und Osp17). Bei den Spätmanifestationen konnte durch die Hinzunahme der zwei Proteine ein Sensitivitätsanstieg auf 97% erzielt werden. Bei beiden Immunblots konnte eine Spezifität von 98% verzeichnet werden.

Beim Vergleich des neuen Immunblots mit dem Ultraschallblot, zeigte der Ultraschallblot im Stadium I eine Sensitivität von 33%, das neue Immunblotverfahren erreichte nur 11%. Dies entsprach einem Sensitivitätsunterschied von 22% zugunsten des Ultraschallblots. Im Stadium II der Erkrankung betrug der Unterschied in der Sensitivität nur noch 12% zugunsten des Ultraschallblots. Bei den Spätmanifestationen war der Sensitivitätsunterschied zwischen den beiden Verfahren 3%. (vgl. Tab. 3.4).

### Statistischer Vergleich der drei Westernblotverfahren im IgG- Blot

	Alter Immunblot / neuer Immunblot	Neuer Immunblot / Ultrasonikatblot	Alter Immunblot / Ultrasonikat
<b>EM *</b>	nicht signifikant	extrem signifikant	extrem signifikant
<b>NB II **</b>	nicht signifikant	nicht signifikant	signifikant
<b>Spätmanifestationen ***</b>	extrem signifikant	nicht signifikant	extrem signifikant
<b>Kontrollen</b>	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant

Tab. 3.5: Statistischer Vergleich der drei Westernblotverfahren: Fisher's Exact Test, \* EM: Erythema migrans, \*\* NB II: Neuroborreliose \*\*\* ACA/Arthritis grau unterlegt: Verbesserung des Recomblotverfahrens bei Hinzunahme der neuen Proteine Osp17 und p58

In der statistischen Auswertung zeigte sich, dass sowohl der alte, als auch der neue Immunblot keine signifikanten Sensitivitätsunterschiede aufwiesen. Eine Ausnahme bildeten die Spätmanifestationen. Hier konnte eine signifikante Verbesserung der Sensitivität beim Vergleich von neuem und altem Immunblotverfahren zugunsten des neuen Immunblots belegt werden

Im Vergleich des alten Immunblots mit dem Ultrasonikatblot zeigte sich ein hoch signifikanter Unterschied der Sensitivität bei Erythema migrans sowie in den Spätmanifestationen. Ein signifikanter Unterschied konnte bei der Neuroborreliose Stadium II festgestellt werden. Die Spezifität der beiden Verfahren zeigte keinen signifikanten Unterschied.

Vergleicht man nun den Ultrasonikatblot mit dem neuen Immunblot, konnte die Sensitivität des neuen Immunblots so gesteigert werden, dass bei der Neuroborreliose und den Spätmanifestationen keinerlei signifikanter Unterschied mehr zwischen beiden Verfahren vorhanden ist. Der Unterschied in der Spezifität war ebenfalls nicht signifikant (vgl. Tab. 3.5).

### 3.1.4 Reaktivität der verschiedenen Proteine im IgM-Immunoblot

#### Reaktivität ausgewählter, rekombinanter Borrelienproteine im IgM- Immunoblot

Gruppe	p100	p58	p41i*	p41i*	p39	OspC	Osp17
	(PKo) n (%)	(PBi) n (%)	(PKo) n (%)	(PBi) n (%)	(B31/PKo/PBi) n (%)	(B31/PKo/PBi) n (%)	(PKo) n (%)
<b>EM</b> ** n=64	22 (34 %)	2 (3%)	19 (30 %)	17 (27 %)	2 (3 %)	16 (25 %)	4 (6 %)
<b>NB II</b> *** n=33	9 (27 %)	1 (3%)	12 (36%)	8 (24 %)	3 (9 %)	11 (33 %)	1 (3 %)
<b>NB I</b> *** n=38	13 (34 %)	0 (0%)	6 (16%)	14 (37 %)	4 (11 %)	3 (8 %)	0 (0 %)
<b>Kontrollen</b> n=135	11 (8 %)	0 (0%)	7 (5 %)	3 (2 %)	0 (0 %)	3 (2 %)	0 (0 %)

Tab. 3.6: Reaktivität der verschiedenen Proteine im IgM-Immunoblot, \* p41i, inneres Flagellinfragment; p41, gesamtes Flagellin, \*\* EM: Erythema migrans, \*\*\*NB: Neuroborreliose

Insgesamt zeigte der IgM-Blot eine wesentlich geringere Reaktivität als der IgG-Blot. Bei der Reaktion mit den Seren von Patienten mit Erythema migrans erreichte das Protein p100 eine Sensitivität von 34%. Bei Neuroborreliose Stadium II sank die Sensitivität auf 27%. Die Spezifität dieses Proteins war 92%. Das p41i des Stammes PKo zeigte mit den Seren im Stadium I der Erkrankung eine Sensitivität von 30%. Die Sensitivität stieg bei der Neuroborreliose auf 36% an. Die Spezifität dieses Proteins entsprach 95%. Das p41i des Stammes PBi zeigte dagegen ein etwas anderes Reaktionsmuster. Mit den Seren von Patienten mit Erythema migrans ergab sich eine Sensitivität von 27%. Im Stadium I Neuroborreliose stieg diese auf 37% an und sank dann im Stadium II Neuroborreliose auf 24% ab. Die Spezifität dieses Proteins lag bei 98%. Das rekombinante p39 der Stämme B31/ PKo / PBi zeigte mit den Seren von Patienten mit Erythema migrans eine Sensitivität von 3%. Im Stadium I Neuroborreliose reagierte es mit einer Sensitivität von 11%. Die Sensitivität sank im Stadium II Neuroborreliose auf 9% ab. Dieses Protein erreichte eine Spezifität von 100%. Das OspC der gleichen Stämme reagierte mit Seren von Patienten im Stadium I der Lyme-Borreliose mit einer Sensitivität von 25%. Diese sank im Stadium I Neuroborreliose auf 8% ab und stieg wieder zum Stadium II Neuroborreliose auf 33% an. Diese Protein erreichte eine Spezifität von 98%. Das Osp17 des Stammes PKo zeigte insgesamt eine sehr schwache Reaktion. Die Sensitivität im Stadium I der

Erkrankung erreichte 6%. Im Stadium I Neuroborreliose der Erkrankung reagierten keine Seren. Im Stadium II Neuroborreliose erreichte dieses Protein eine Sensitivität von 3%. Die Spezifität für dieses Protein betrug 100%. Bei der Reaktion mit Seren von Patienten im Stadium I zeigte das p58 eine Sensitivität von 3%. Im Stadium I Neuroborreliose reagierten keine Seren. Im Stadium II Neuroborreliose konnte das Protein eine Sensitivität von 3 % erreichen. Die Spezifität entsprach 100 % (vgl. Tab. 3.6).

### Vergleich der Reaktivität von rekombinanten und natürlichen Proteinen im IgM-Immunoblot

#### Reaktivität ausgewählter, rekombinanter und natürlicher Proteine im IgM-Blot

Gruppe	p58 (nat PKo)	p58 (rec PBi)	Osp17 (nat PKo)	Osp17 (rec PKo)
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
EM * n=64	0 (0%)	2 (3%)	4 (6%)	4 (6%)
NB ** II n=33	0 (0%)	1 (3%)	3 (9%)	1 (3%)
NB ** I n= 38	1 (3%)	0 (0%)	1 (3%)	0 (0%)
Kontrollen * n=135	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Tab. 3.7: Vergleich der Reaktivität von rekombinanten und natürlichen Proteinen im IgM-Immunoblot, Blutspender (n=118), Patienten mit Syphilis (n=11), Rheumafaktor positive Seren (n=11), nat: natürliches Protein, rec: rekombinantes Protein, \* EM: Erythema migrans, \*\* NB: Neuroborreliose

Das natürliche p58 des Stammes PKo reagierte mit keinem der ausgetesteten Seren von Patienten mit Erythema migrans. Das rekombinante Protein p58 des Stammes PBi erreichte in diesem Stadium der Erkrankung eine Sensitivität von 3%. Im Stadium I Neuroborreliose reagierte das natürliche p58 mit einer Sensitivität von 3%, während das rekombinante p58 keine Reaktion mit den Patientenseren zeigte. Bei beiden Proteinen ergab sich hier eine Spezifität von 100%. Die Sensitivität des natürlichen Proteins im Stadium I Neuroborreliose entsprach 3%, während das rekombinante Osp17 keine Reaktion mit den Patientenseren zeigte. Im Stadium II Neuroborreliose erreichte das natürliche Osp17 eine Sensitivität von 9%, während das rekombinante Protein nur 3% Sensitivität erreichte. Auch in diesem Stadium entsprach die Spezifität beider Proteine 100% (vgl. Tab. 3.7).

## Vergleich der drei Westernblotverfahren im IgM-Immunblot

### Vergleich der drei verschiedenen IgM-Immunblots

Gruppe	Anzahl	Neuer Blot	Alter Blot	Ultrasonikatblot
		n (%)	n (%)	n (%)
<b>EM **</b>	64	24 (38%)	22 (34%)	29 (45%)
<b>NBII ***</b>	33	11 (33%)	11 (33%)	14 (42%)
<b>NBI ***</b>	38	14 (37%)	14 (37%)	16 (42%)
<b>Kontrollen *</b>	135	5 (4%)	5 (4%)	2 (2%)

\* Blutspender (n= 117), Syphillispatienten (n= 10), Seren mit RF positiv (n= 8), \*\* EM: Erythema migrans, \*\*\* NB: Neuroborreliose

Beim Vergleich des alten Immunblots mit dem neuen zeigte sich, dass durch Hinzunahme der beiden neuen Proteine im Stadium I und II Neuroborreliose keinerlei Erhöhung der Sensitivität erreicht werden konnte. Bei der Reaktion mit Seren von Patienten mit Erythema migrans konnte eine Verbesserung der Sensitivität von 4% erzielt werden. Die Spezifität beider Immunblots zeigte keinen Unterschied. Der Ultrasonikatblot verzeichnete im Vergleich zum neuen Immunblot in allen Gruppen der Testreihe ein besseres Ergebnis. Bei der statistischen Auswertung mit dem Fisher's Exact-Test konnte keines der drei Westernblotverfahren in keinem Stadium der Lyme-Borreliose ein signifikant besseres Ergebnis erreichen.

### 3.2 Osp-Expression und Dissemination von *B. burgdorferi* in *I. ricinus* nach Capillary-Feeding

In diesem Teil der Arbeit sollte die Dissemination der verschiedenen Borrelienstämme vom Magen-Darm-Trakt der Zecke in die Speicheldrüsen untersucht werden. Ein großes Problem stellte die hohe Raumtemperatur im Sommer dar, da die Nymphen in diesem Zustand nicht genügend Flüssigkeit aufnehmen. Durch Nachstellen des natürlichen Temperaturverlaufes im Frühling in einem Klimaschrank (Binder Nürthingen, Deutschland) (Nacht: 7°C; Tag: 18°C), konnte der Sauganreiz um ein Vielfaches gesteigert werden.

Insgesamt wurden in dieser Versuchsreihe 24 Nymphen untersucht. Es wurden zwei Zecken sofort, zwei Zecken 12 Stunden und weitere zwei Zecken 24 Stunden nach Capillary-Feeding seziiert. Untersucht wurde die Anzahl der Borrelien, welche nur OspC, nur OspA, OspC/ OspA-Coexpression, Osp17 oder gar keine Expression der angegebenen outer surface Proteine zeigten. Als Bezugsquelle für die Dynamik der Osp-Expression wurden mindestens 100 Borrelien der verfütterten Kultur ausgezählt und in ihrer Osp-Expression beurteilt.

#### 3.2.1 Vorversuche

Ziel der Vorversuche war es eine Methode zur gleichzeitigen Darstellung der outer surface Proteine OspA, OspC und Osp17 auf den einzelnen Borrelien zu etablieren. Zu diesem Zweck wurden Kombinationen von monoklonalen Antikörper ausgetestet, die sowohl eine Anfärbung des OspC als auch eine Anfärbung des Osp17 ermöglichen könnten. Zur Austestung wurden folgende Antikörper verwendet: OspC: 1F8, 22 C11 und 6 C4 (alle Subklasse IgG1) und Osp 17: L17 G2 (Subklasse IgG 2a). In einer Schachbrettiteration wurden die verschiedenen Stämme mit den Antikörpern und ihren unterschiedlichen Verdünnungen ausgetestet. Die Verdünnung der monoklonalen Antikörper erfolgte in einer festgesetzten Reihenfolge. Für die Austestung kamen folgende Stämme zur Anwendung: PKo Originalstamm Passage 7 (Positivkontrolle), *B. hermsii* (Negativkontrolle) und der Klon PKo 97 K 37. Bei keiner der Anfärbungen konnte die gleichzeitige Anfärbung aller Proteine erreicht werden. Aus diesem Grund mußte in den folgenden Versuchen eine getrennte Anfärbung der Proteine OspA /C und des outer surface Proteins Osp17 auf jeweils zwei getrennten Objektträgern erfolgen (Verdünnungen siehe Material und Methoden).

### 3.2.2 Osp-Expression und Dissemination von *B. burgdorferi* in *I. ricinus* nach Capillary-Feeding

Untersuchung der Stämme/ Klone: 345-II23, PKo 97 Klon 1-4 und PKo für Ag

#### Klon PKo 345-II23

**Stamm PKo 345-II23 nach Capillary-Feeding in *I. ricinus*:-  
OspA und OspC-Expression der Borrelien im Darm**

Zecken-Nr	Organ/ Zeit ***	OspA*	OspC*	A/C*	Gesamtzahl **
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<b>Kultur*</b>		35 (35%)	0 (0%)	0 (0%)	100 (100%)
<b>Zecke 1</b>	MG**** 0h	90 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	90 (100%)
<b>Zecke 2</b>	MG**** 0h	25 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	25 (100%)
<b>Zecke 3</b>	MG**** 12h	40 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	40 (100%)
<b>Zecke 4</b>	MG ****12h	150 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	150 (100%)
<b>Zecke 5</b>	MG**** 24h	40 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	40 (100%)
<b>Zecke 6</b>	MG ****24h	10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	10 (100%)

Tab. 3.8: Stamm PKo 345-II23: OspA und OspC-Expression der Borrelien im Darm bei *I. ricinus* nach Capillary-Feeding. \* Detektion mit monoklonalen AK, \*\* Detektion der weder OspA noch OspC exprimierenden Borrelien mit DAPI aufgrund technischer Mängel nicht auswertbar; Gesamtzahl bezieht sich auf Osp- exprimierende Borrelien, \*\*\* Magen-Darm-Trakt der Nymphen, untersucht nach 0, 12, 24h, Infektion der Zecken durch Capillary Feeding, Konzentration der Borrelien  $10^7$ /ml, Kapillarsaugzeit 3-4 Stunden, \*\*\*\* Auszählung von 100 Borrelien; in A/C-Färbung dargestellt, nur durch DAPI detektierte Borrelien in der Kultur 65 (65%)

\*\*\*\*\* In keiner Speicheldrüse waren Borrelien nachweisbar, Mg = Darm

### Stamm Pko 345-II23- nach Capillary-Feeding in *I. ricinus* : Osp17-Expression

Zecken-NR	Organ/ Zeit	Osp17*	nur DAPI*	Gesamt
		n (%)	n (%)	n(%)
	Kultur**	5 (5%)	95 (95%)	100 (100%)
<b>Zecke 1</b>	MG 0h	0 (0%)	20 (100%)	20 (100%)
<b>Zecke 2</b>	MG 0h	1 (7%)	13 (93%)	14 (100%)
<b>Zecke 3</b>	MG 12h	0 (0%)	8 (100%)	8 (100%)
<b>Zecke 4</b>	MG 12h	2 (3%)	58 (97%)	60 (100%)
<b>Zecke 5</b>	MG 24h	0 (0%)	13 (100%)	13 (100%)
<b>Zecke 6</b>	MG 24h	0 (0%)	20 (100%)	20 (100%)

Tab. 3.9: Stamm Pko 345-II23- nach Capillary-Feeding in *I. ricinus* : Osp17-Expression, \* Detektion mit monoklonalen AK; Anzahl der weder OspA noch OspC exprimierenden Borrelien mit DAPI detektiert; Magen-Darm-Trakt der Nymphen, untersucht nach 0, 12, 24h, Infektion der Zecken durch Capillary Feeding, Konzentration der Borrelien  $10^7$ /ml, Kapillarsaugzeit 3-4 Stunden, In keiner zum Capillary Feeding eingesetzter Speicheldrüse Borrelien nachweisbar, \*\* Auszählung von 100 Borrelien der Kultur, MG= Darm, grau unterlegt: Osp17 positive Präparate

In dieser Versuchsreihe wurden sechs Nymphen mittels Capillary-Feeding mit PKo Klon 345-II23 infiziert. Dieser Klon zeigt in vitro keinerlei OspC-Expression. Jeweils zwei Nymphen wurden sofort nach der Anfütterung, zwei nach 12 Stunden und weitere zwei nach 24 Stunden untersucht. In der Kultur zeigten 35% der Borrelien eine OspA-Expression, 5% der Borrelien exprimierten Osp17, OspC-



Abb. 3.3. OspA exprimierende Borrelien im Darm einer Zecke 24h nach dem Saugen

Expression konnte in der Kultur nicht nachgewiesen werden. Alle Speicheldrüsenpräparate waren borrelienneutral. Es erfolgte also keine Dissemination in die Speicheldrüsen. In den Darmabschnitten konnte zu allen Zeitpunkten in allen Präparaten OspA positive Borrelien nachgewiesen werden (Abb. 3.3), d.h. alle Zecken wurden erfolgreich gefüttert. Eine OspC-Expression konnte, wie erwartet, zu keiner Zeit in den Präparaten nachgewiesen werden (Tab. 3.8). Eine Osp17-Expression konnte nur in zwei Präparaten gefunden werden (Tab.3.9).

Auffällig waren in den Darmpräparaten folgende Befunde: Keinerlei Dissemination in die Speicheldrüsen. Desweiteren zeigte sich nach 24h eine niedrigere Gesamtborrelienanzahl als zu den anderen beiden Zeitpunkten. Es konnten dort zumindest in jeweils einem Präparat mehr als doppelt so viele Borrelien nachgewiesen werden als zum Zeitpunkt 24h. Bei den Osp17 Präparaten ist aufgrund der niedrigen Borrelienzahl eine Bewertung nicht oder nur eingeschränkt möglich.

Eine Auswertung der DAPI-Färbung bei den OspA/C-Präparaten war aufgrund technischer Mängel zu diesem Zeitpunkt nicht möglich.

Klon PKo 97 1-4

PKo 97 K 1-4 nach Capillary-Feeding in *I. ricinus*: OspA und OspC-Expression:

Zecken-Nr	Organ/ Zeit	OspA* n (%)	OspC* n (%)	A/C* n (%)	Gesamt n (%)
<b>Kultur **</b>		0 (0%)	82 (82%)	0 (0%)	100 (100%)
<b>Zecke 1</b>	SP 0h	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	2 (100%)
<b>Zecke 2</b>	SP 0h	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>Zecke 3</b>	SP 12h	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	2 (100%)
<b>Zecke 4</b>	SP 12h	0 (0%)	5 (100%)	0 (0%)	5 (100%)
<b>Zecke 5</b>	SP 24h	0 (0%)	5 (100%)	0 (0%)	5 (100%)
<b>Zecke 6</b>	SP 24h	0 (0%)	20 (100%)	0 (0%)	20 (100%)
<b>Zecke 1</b>	MG 0h	0 (0%)	30 (100%)	0 (0%)	30 (100%)
<b>Zecke 2</b>	MG 0h	0 (0%)	20 (100%)	0 (0%)	20 (100%)
<b>Zecke 3</b>	MG 12h	0 (0%)	20 (100%)	0 (0%)	20 (100%)
<b>Zecke 4</b>	MG 12h	0 (0%)	16 (100%)	0 (0%)	16 (100%)
<b>Zecke 5</b>	MG 24h	0 (0%)	10 (100%)	0 (0%)	10 (100%)
<b>Zecke 6</b>	MG 24h	0 (0%)	30 (100%)	0 (0%)	30 (100%)

Tab. 3.10: OspA und OspC-Expression bei PKo 97 K 1-4 nach Capillary-Feeding in *I. ricinus*: \* Detektion mit monoklonalen AK, Detektion der weder OspA noch OspC exprimierenden Borrelien mit DAPI aufgrund technischer Mängel nicht auswertbar, Gesamtzahl bezieht sich auf Osp exprimierende Borrelien, Magen-Darm-Trakt und Speicheldrüsen der Nymphen, untersucht nach 0, 12, 24h; Infektion der Zecken durch Capillary-Feeding ; Konzentration der Borrelien  $10^7$ /ml, Saugzeit 3-4 Stunden, \*\* Auszählung von 100 Borrelien in A/C - Färbung dargestellt; nur durch DAPI detektierte Borrelien in Kultur MG= Darm; SP= Speicheldrüse; grau unterlegt: borrelienpositives SP-Präparat direkt nach Capillary-Feeding

**PKo 97 K 1-4 nach Capillary-Feeding in *I. ricinus*: Osp17-Expression**

Zecken-Nr	Organ/ Zeit	Osp17*	nur DAPI*	Gesamt
		n (%)	n (%)	n (%)
<b>Kultur **</b>		52 (52%)	48 (48%)	100 (100%)
<b>Zecke 1</b>	SP 0h	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>Zecke 2</b>	SP 0h	0 (0%)	1 (100%)	1 (100%)
<b>Zecke 3</b>	SP 12h	0 (0%)	6 (100%)	6 (100%)
<b>Zecke 4</b>	SP 12h	19 (100%)	0 (0%)	19 (100%)
<b>Zecke 5</b>	SP 24h	9 (100%)	0 (0%)	9 (100%)
<b>Zecke 6</b>	SP 24h	13 (100%)	0 (0%)	13 (100%)
<b>Zecke 1</b>	MG 0h	10 (56%)	8 (44%)	18 (100%)
<b>Zecke 2</b>	MG 0h	30 (100%)	0 (0%)	30 (100%)
<b>Zecke 3</b>	MG 12h	15 (100%)	0 (0%)	15 (100%)
<b>Zecke 4</b>	MG 12h	8 (35%)	15 (65%)	23 (100%)
<b>Zecke 5</b>	MG 24h	0 (0%)	0 (0%)	0 (100%)
<b>Zecke 6</b>	MG 24h	100 (100%)	0 (0%)	100 (100%)

Tab. 3.11: PKo 97 K 1-4 Osp17-Expression nach Capillary-Feeding in *I. ricinus*: Detektion mit monoklonalen AK ; Anzahl der weder OspA noch OspC exprimierenden Borrelien mit DAPI detektiert, Magen-Darm-Trakt und Speicheldrüsen der Nymphen, untersucht nach 0 ,12 , 24h, Infektion der Zecken durch Capillary-Feeding, Konzentration der Borrelien  $10^7$ /ml; Kapillarsaugzeit 3-4 h,\*\* Auszählung von 100 Borrelien in Osp17- Anfärbung, MG= Darm, SP= Speicheldrüse, grau unterlegt: borrelienpositives Präparat während des Capillary-Feedings

Bei diesem Versuch wurden ebenfalls sechs Nymphen infiziert. Der untersuchte Klon Pko 97 K 1-4 zeigte in vitro und damit auch in der mitgeführten Kontrolle keine OspA-Expression. Die Untersuchung erfolgte nach 0h, 12h und 24h. Über die Hälfte der ausgezählten Borrelien zeigte eine Expression von Osp17. In den Speicheldrüsen konnte bei beiden direkt nach Capillary-Feeding untersuchten Nymphen in je einem Präparat Borrelien nachgewiesen werden (A/C- und Osp17-Präparat) (vgl. Tab. 3.10 und 3.11). Dies zeigt, dass die Borrelien schon während des Capillary-Feedings in die Speicheldrüsen wandern. Bei allen untersuchten Zecken konnten Borrelien im Darm nachgewiesen

werden, d.h. es erfolgte auch hier eine erfolgreiche Fütterung. In keinem der Präparate konnte eine OspA-Expression nachgewiesen werden (vgl. Tab. 3.10 und Tab. 3.11). Es zeigte sich auch hier keine Änderung des Expressionsmusters zur Kultur.

In den nach 12h und 24h seziierten Zecken fanden sich in allen Speicheldrüsen Borrelien (siehe Abb. 3.4 a und b). Die Anfärbung mit DAPI konnte nur bei den Osp17-Präparaten dargestellt werden, da die DAPI-Färbung der Borrelien in den A/C-Präparaten von den ebenfalls mit DAPI gefärbten Zeckendarm bzw. Speicheldrüsenanteilen stark überstrahlt wurde. Die Osp17-Expression in den einzelnen Präparaten war zum Teil sehr schwankend. Es zeigte sich eine Zunahme der Osp17 Expression im Vergleich zur OspC-Expression im Verlauf bis 24h.

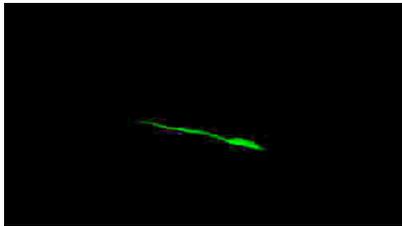
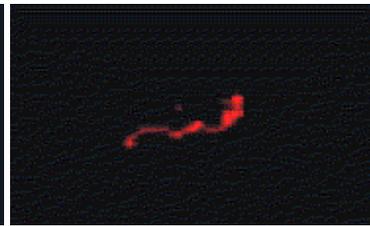


Abb. 3.4.b: Osp17 exprimierende Borrelie nach 24H Saugzeit im



Abb. 3.4.a: OspC exprimierende Borrelie in der Speicheldrüse



## Stamm PKo für AG

### PKo für AG nach Capillary-Feeding in *I. ricinus*: OspA- und OspC-Expression

Zecken-Nr	Organ/ Zeit	OspA*	OspC*	A/C*	Gesamt
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<b>Kultur **</b>	Dapi: 15 (15%)	15 (15%)	8 (8%)	62 (62%)	100(100%)
<b>Zecke 1</b>	SP 0h	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>Zecke 2</b>	SP 0h	5 (62%)	0 (0%)	3 (38%)	8 (100%)
<b>Zecke 3</b>	SP 12h	5 (83%)	0 (0%)	1(17%)	6 (100%)
<b>Zecke 4</b>	SP 12h	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)
<b>Zecke 5</b>	SP 24h	7 (70%)	0 (0%)	3 (30%)	10 (100%)
<b>Zecke 6</b>	SP 24h	1 (7%)	10 (72%)	3 (21%)	14 (100%)
<b>Zecke 1</b>	MG 0h	14 (82%)	0 (0%)	3 (18%)	17 (100%)
<b>Zecke 2</b>	MG 0h	30 (40%)	0 (0%)	45 (60%)	75 (100%)
<b>Zecke 3</b>	MG 12h	11 (15%)	0 (0%)	62 (85%)	73 (100%)
<b>Zecke 4</b>	MG 12h	10 (17%)	0 (0%)	50 (83%)	60 (100%)
<b>Zecke 5</b>	MG 24h	19 (79%)	0 (0%)	5 (21%)	24 (100%)
<b>Zecke 6</b>	MG 24h	3 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (100%)

Tab. 3.12: PKo für AG OspA- und OspC-Expression nach Capillary-Feeding in *I. ricinus*:

\* Detektion mit monoklonalen AK, Detektion der nicht OspA und OspC exprimierenden Borrelien mit DAPI aufgrund technischer Mängel nicht auswertbar; Gesamtzahl bezieht sich auf Osp- exprimierende Borrelien, Magen-Darm-Trakt und Speicheldrüsen der Nymphen, untersucht nach 0, 12, 24h, Infektion der Zecken durch Capillary-Feeding, Konzentration der Borrelien  $10^7$ /ml, Kapillarsaugzeit 3-4 Stunden,

\*\* Auszählung von 100 Borrelien in A/C –Färbung dargestellt, nur durch DAPI detektierte Borrelien in der Kultur 15 (15%), Mg= Darm, SP= Speicheldrüse, grau unterlegt: borrelienpositive Präparate während des Capillary-Feedings

**PKo für AG nach Capillary-Feeding in *I. ricinus*: Osp17-Expression**

Zecken-Nr	Organ/ Zeit	Osp17*	nur DAPI*	Gesamt
		n (%)	n (%)	n (%)
	Kultur **	76 (76%)	24 (24%)	100 (100%)
<b>Zecke 1</b>	SP 0h	0 (0%)	0 (0%)	0 (100%)
<b>Zecke 2</b>	SP 0h	0 (0%)	1 (100%)	1 (100%)
<b>Zecke 3</b>	SP 12h	0 (0%)	2 (100%)	2 (100%)
<b>Zecke 4</b>	SP 12h	6 (100%)	0 (0%)	6 (100%)
<b>Zecke 5</b>	SP 24h	2 (18%)	9 (82%)	11 (100%)
<b>Zecke 6</b>	SP 24h	20 (100%)	0 (0%)	20 (100%)
<b>Zecke 1</b>	MG 0h	0 (0%)	6 (100%)	6 (100%)
<b>Zecke 2</b>	MG 0h	3 (100%)	0 (0%)	3 (100%)
<b>Zecke 3</b>	MG 12h	3 (19%)	13 (81%)	16 (100%)
<b>Zecke 4</b>	MG 12h	25 (100%)	0 (0%)	25 (100%)
<b>Zecke 5</b>	MG 24h	30 (75%)	10 (25%)	40 (100%)
<b>Zecke 6</b>	MG 24h	100 (100%)	0 (0%)	100 (100%)

Tab. 3.13: PKo für AG Osp17-Expression nach Capillary-Feeding in *I. ricinus*:

\* Detektion mit monoklonalen AK, Anzahl der weder OspA noch OspC exprimierenden Borrelien mit DAPI detektiert, Magen-Darm-Trakt der Nymphen, untersucht nach 0,12,24H ;Infektion der Zecken durch Capillary-Feeding, Konzentration der Borrelien  $10^7$ /ml, Kapillarsaugzeit 3-4 Stunden, \*\* Auszählung von 100 Borrelien in Osp17- Anfärbung, MG= Darm, SP= Speicheldrüse. grau unterlegt: borrelienpositives Präparat während des Capillary-Feedings

Für diese Versuchsreihe wurden ebenfalls sechs Nymphen verwendet. Der Stamm Pko für Ag zeigt in vitro eine OspA/C-Coexpression: In der Kultur exprimierten von 100 Borrelien 62 Osp A/C, 15 nur OspA- und 8 nur OspC-Expression. Von 100 Borrelien konnte bei 76 eine Osp17-Expression in der Kultur nachgewiesen werden. In einer der beiden direkt nach Capillary-Feeding untersuchten Nymphen fanden sich in den Speicheldrüsen-Präparaten Borrelien (vgl. Tab. 3.12 und 3.13). Ein A/C-gefärbtes und ein Osp17-gefärbtes Präparat waren borrelienpositiv (siehe Abb. 3.5a). Somit zeigte auch dieser Stamm eine sehr frühe Dissemination in die Speicheldrüsen. Alle Darmpräparate waren borrelienpositiv, so dass eine erfolgreiche Fütterung auch in diesem Versuch stattgefunden hatte. Die Zeckenpräparate im Vergleich zur mitgeführten Kultur zeigten kaum Unterschiede im

Expressionsmuster. Borrelien, welche ausschließlich OspC exprimieren, wurden in den Zecken nur in einem Speicheldrüsenpräparat gefunden (vgl. Tab 3.12). In allen anderen Präparaten zeigte sich nur eine OspA- oder eine OspA/C-Coexpression. Die Borrelien exprimierten zu unterschiedlichen Zeitpunkten sowohl in den Speicheldrüsen, als auch im Darm OspA, OspC und Osp17 (Abb.3.5 a und b). Ab dem Untersuchungszeitpunkt 12h ließen sich in allen Speicheldrüsen Borrelien nachweisen. Es fanden sich in fast allen Präparaten nur OspA-exprimierende Borrelien. In diesen Präparaten konnten

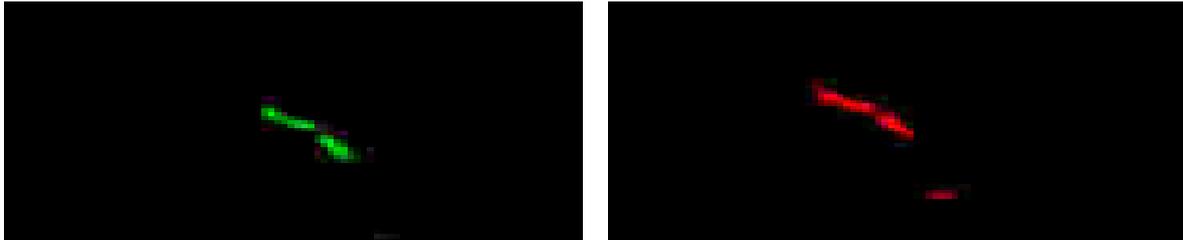


Abb. 3.5 a: OspA und OspC exprimierende Borrelie sofort nach dem Capillary-Feeding in der Speicheldrüse

deutlich weniger Borrelien nachgewiesen werden als im Darmtrakt der untersuchten Zecken.

Insgesamt kam es zu einer Zunahme der Osp17-exprimierenden Borrelien in allen Präparaten im zeitlichen Verlauf. Ein Maximum der OspA-Expression fand sich bei 12h.

Während bei der Expression von OspA keine Veränderungen im Zeitverlauf auftraten, kann eine abrupte Abnahme der A/C-Expression von 12h auf 24h festgestellt werden. Auch in dieser Versuchsreihe konnte in den OspA/C- Färbungen keine Auswertung der DAPI-Färbung erfolgen (siehe oben).

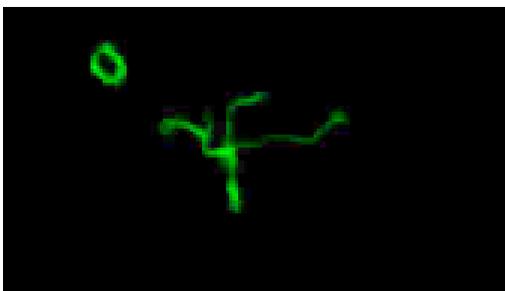


Abb. 3.5.b: Osp17 exprimierende Borrelie nach 24H im Darm einer Zecke

### 3.2.3 Osp-Expression und Dissemination von *Borrelia burgdorferi* in *I. ricinus* nach Capillary-Feeding : Vergleich der Stämme PKo 345-II23, PKo für Ag und PKo 97 K 1-4

Bei allen Stämmen konnte in der A/C-Färbung keine Gesamtauszählung stattfinden, da eine DAPI-Auszählung aufgrund der Überlagerung durch gleichzeitig angefärbte Zeckenzell-DNA nicht möglich war.

Vergleicht man die Stämme zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten, kann ein doch sehr unterschiedliches Verhalten bezüglich der Dissemination in die Speicheldrüsen der Zecke festgestellt werden (vgl. Abb. 3.6).

Der Klon 345-II23 zeigt zu keiner Zeit eine Dissemination in die Speicheldrüsen, war aber die gesamte

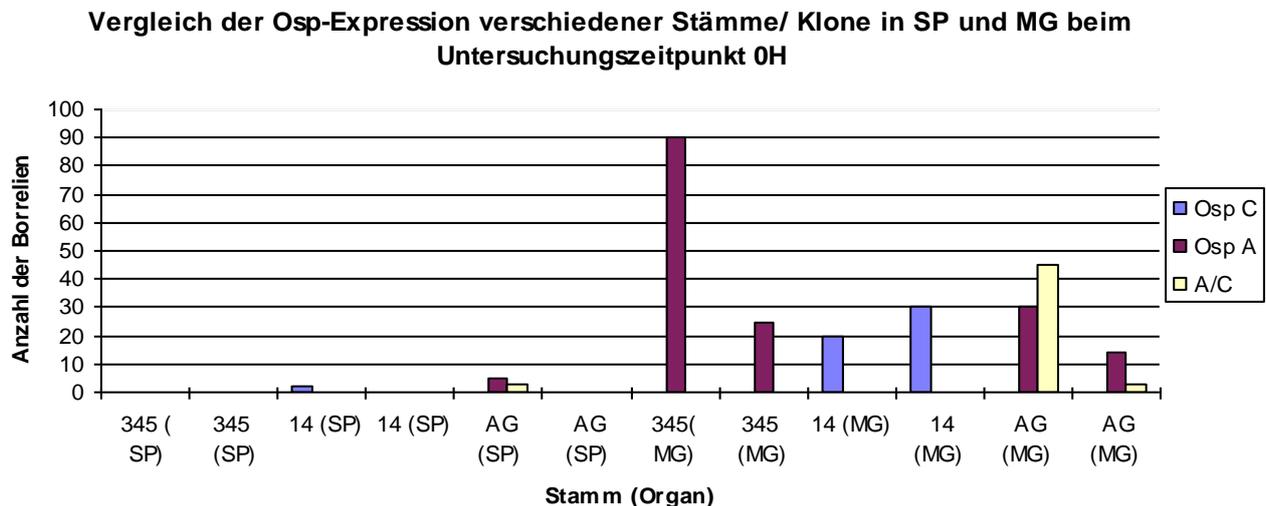


Abb. 3.6

untersuchte Zeitspanne im Darm nachweisbar. In den Speicheldrüsen konnten nur Borrelien der Stämme PKo 97 K 1-4 und PKo für AG gefunden werden. Besondere Beachtung verdient die Tatsache, dass die Zecken in der A/C-Färbung zum Zeitpunkt 0h schon Borrelien in den Speicheldrüsen aufwiesen. Die Borrelien sind also schon während des Fütterungsvorganges in die Speicheldrüsen disseminiert.

Im Expressionsmuster der outer surface Proteine war kein relevanter Unterschied zwischen der Versuchsreihe und den Kulturborrelien nachweisbar. PKo 97 Klon 1-4 zeigt in keiner Zecke eine OspA-Expression, obwohl das Gen hierfür vorhanden wäre.

In Bezug auf das Osp17 konnte mit diesen Versuchen gezeigt werden, dass der Stamm 345-II23 insgesamt nur eine geringe Expression dieses Proteins zeigt. Die anderen beiden Stämme exprimierten im Mittel zwischen 50-100% Osp17 zu allen Zeitpunkten.

**3.2.4 Osp-Expression und Dissemination von *B. burgdorferi* in *I. ricinus* nach Capillary-Feeding: Untersuchung des Klons PKo 97/ 37**

**PKo97/ 37 nach Capillary-Feeding in *I. ricinus*: OspA- und OspC-Expression**

<b>Zecken-Nr</b>	<b>Organ/ Zeit ***</b>	<b>OspC * n (%)</b>	<b>OspA * n (%)</b>	<b>A/C * n (%)</b>	<b>Nur DAPI ** n (%)</b>	<b>Gesamt n (%)</b>
<b>Kultur *****</b>		15 (15%)	3 (3%)	49 (49%)	33 (33%)	100 (100%)
<b>Zecke 1</b>	SP 0h	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (100%)
<b>Zecke 2</b>	SP 0h	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (100%)
<b>Zecke 3</b>	SP 12h	22 (84%)	1 (4%)	2 (8%)	1 (4%)	26 (100%)
<b>Zecke 4</b>	SP 12h	7 (58%)	0 (0%)	3 (25%)	2 (17%)	12 (100%)
<b>Zecke 5</b>	SP 24h	11 (61%)	0 (0%)	1 (6%)	6 (33%)	18 (100%)
<b>Zecke 6</b>	SP 24h	15 (60%)	0 (0%)	7 (28%)	3 (12%)	25 (100%)
<b>Zecke 1</b>	MG 0h	12 (16%)	12 (16%)	10 (13%)	43 (55%)	77 (100%)
<b>Zecke 2</b>	MG 0h	17 (43%)	1 (2%)	1 (2%)	21 (53%)	40 (100%)
<b>Zecke 3</b>	MG 12h	13 (33%)	3 (8%)	5 (13%)	18 (46%)	39 (100%)
<b>Zecke 4</b>	MG 12h	15 (65%)	0 (0%)	2 (9%)	6 (26%)	23 (100%)
<b>Zecke 5</b>	MG 24h	12 (75)	0 (0%)	1 (6%)	3 (19%)	16 (100%)
<b>Zecke 6</b>	MG 24h	4 (36%)	0 (0%)	0 (0%)	7 (64%)	11 (100%)

Tab. 3.14: PKo97/ 37 OspA- und OspC-Expression nach Capillary-Feeding in *I. ricinus*: \* Detektion mit monoklonalen AK, \*\* Detektion der nicht OspA und OspC exprimierenden Borrelien mit DAPI, \*\*\* Magen-Darm-Trakt und Speicheldrüsen der Nymphen, untersucht nach 0, 12, 24h, Infektion der Zecken durch Capillary-Feeding, Konzentration der Borrelien  $10^7$ /ml, Kapillarsaugzeit 3-4 Stunden., \*\*\*\* Auszählung von 100 Borrelien in A/C –Färbung dargestellt, Mg= Darm, SP= Speicheldrüse

**PKo97/ 37 nach Capillary-Feeding in *I. ricinus*: Osp17-Expression**

<b>Organ/ Zeit **</b>	<b>Osp17 n (%)*</b>	<b>nur DAPI * n (%)</b>	<b>Gesamt*** n (%)</b>
Kultur****	43 (43%)	57 (57%)	100 (100%)
SP 0h	11 (100%)	0 (0%)	11 (100%)
SP 0h	0 (0%)	4 (100%)	4 (100%)
SP 12h	6 (15%)	33 (85%)	39 (100%)
SP 12h	4 (36%)	7 (64%)	11 (100%)
SP 24h	1 (7%)	13 (93%)	14 (100%)
SP 24h	6 (33%)	12 (67%)	18 (100%)
MG 0h	10 (31%)	22 (69%)	32 (100%)
MG 0h	16 (37%)	26 (63%)	42 (100%)
MG 12h	8 (23%)	27 (77%)	35 (100%)
MG 12h	3 (17%)	15 (83%)	18 (100%)
MG 24h	0 (0%)	6 (100%)	6 (100%)
MG 24h	15 (50%)	15 (50%)	30 (100%)

Tab. 3.15: PKo97/ 37 Osp17-Expression nach Capillary-Feeding in *I. ricinus*: \* Detektion mit monoklonalen AK, Anzahl der nicht Osp- exprimierenden Borrelien mit DAPI, \*\* Magen-Darm-Trakt der Nymphen, untersucht nach 0,12,24H; Infektion der Zecken durch Capillary-Feeding, Konzentration der Borrelien  $10^7$ /ml, Kapillarsaugzeit 3-4 Stunden, \*\*\*\* Auszählung von 100 Borrelien in Osp17-Anfärbung, MG= Darm, SP= Speicheldrüse, grau unterlegt: borrelienpositive Präparate während des Capillary-Feedings

In einer weiteren Versuchsreihe wurden ebenfalls sechs Nymphen mit PKo 97/37 infiziert. In der mitgeführten Kultur zeigte sich folgendes Expressionsmuster: Von 100 Borrelien reagierten 49 mit einer A/C-Doppelexpression, 3 Borrelien zeigten nur OspA- und 15 Borrelien nur OspC-Expression (vgl. Tab. 3.14). In der Osp17-Färbung reagierten 43 mit einer Osp17-Expression, der Rest (57 Borrelien) zeigte nur eine Anfärbung mit DAPI (vgl. Tab.3.15).

In allen Darmpräparaten fanden sich Borrelien womit die erfolgreiche Infektion der Zecken durch Borrelien nachgewiesen war. In beiden Zecken disseminierten schon während des Capillary-Feedings Borrelien in die Speicheldrüsen (vgl. Tab. 3.15). Die Expression der outer surface Proteine in den Zeckenpräparaten zeigte das gleiche Muster wie die mitgeführten Kulturborrelien.

Im allgemeinen kann zu diesen Versuchen gesagt werden, dass die Borrelienanzahl in den Speicheldrüsen im Zeitverlauf nach 12h bis 24h unverändert blieb. Im Darm zeigte sich die höchste Borreliendichte nach 0h. In der A/C-Färbung konnten in den Speicheldrüsen erst zum Zeitpunkt 12h Borrelien nachgewiesen werden (Abb. 3.7). In diesen Organen überwiegte bei dieser Anfärbung auch die OspC-Expression. Nur OspA-exprimierende Borrelien konnten in den Speicheldrüsenpräparaten 12h nach Capillary-Feeding nachgewiesen werden. Interessanterweise übertraf in den Präparaten 24h nach Capillary-Feeding die Anzahl der Borrelien in den Speicheldrüsen die Anzahl im Magen-Darm-Trakt. In den Darmpräparaten überwog schon während des Capillary-Feedings die OspA-Expression. Zum Zeitpunkt 12h und 24h nahm die Zahl der Borrelien im Darm wieder ab. Die A/ C-Coexpression war in diesen Präparaten bei 0h am stärksten. Zum Zeitpunkt 24h konnten wieder weniger OspA/C exprimierende Borrelien nachgewiesen werden. Eine Osp17-Expression war auch zum Zeitpunkt 24h noch nachweisbar. Die DAPI-Anfärbung überwog hier im Gegensatz zur Kultur. Insgesamt war bei diesem Versuch die OspC-Expression im Vergleich zur Kultur prozentual stärker vorhanden, die A/C-Coexpression dagegen war geringer ausgeprägt.



Abb. 3.7: OspC, OspA exprimierende und DAPI gefärbte Borrelie in der Speicheldrüse einer Zecke nach 12H.

### 3.3 Osp-Expression und Dissemination von *B. burgdorferi* in *I. ricinus* nach Capillary-Feeding und Blutkontakt

In dieser Versuchsreihe sollte der Einfluss von Blutkontakt nach Infektion der Zecke mit Borrelien untersucht werden. Bei diesem Versuch wurden 20 Zecken durch Capillary-Feeding mit Borrelien infiziert. 14 davon konnten an Gerbils angesetzt werden. Nach 4 Tagen konnten 3 Zecken lebend und mit Blut vollgesaugt entfernt sowie untersucht werden. Der Gerbil wurde nach 2 Wochen seziiert und auf eine mögliche Organbeteiligung der Borrelieninfektion untersucht. Es wurden keine Anzeichen einer Infektion des Tieres festgestellt (Untersuchung der Organe, siehe Material und Methoden).

#### 3.3.1 Osp-Expression und Dissemination von *B. burgdorferi* in *I. ricinus* nach Capillary-Feeding und Blutkontakt : Untersuchung des Klons PKo 345- II23

Auch in dieser Versuchsreihe (Abb. 3.8) wurde ein Kulturpräparat mitgeführt. Es zeigten 43 Borrelien eine OspA-Expression. Es konnten keine Borrelien mit OspC-Expression detektiert werden. 7

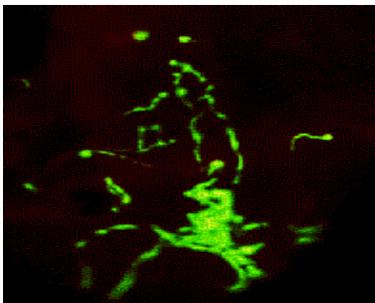


Abb. 3.8: OspA-exprimierende Borrelien in einer blutgesaugten Zecke nach 4 Saugtagen

Borrelien zeigten eine Expression des Osp17. In allen Darmpräparaten konnten Borrelien nachgewiesen werden. Es hat also auch hier ein erfolgreiches Capillary-Feeding stattgefunden. In den Speicheldrüsen konnten keine Borrelien detektiert werden. Wie schon bei den Versuchen mit Capillary-Feeding fand sich auch unter diesen Versuchsbedingungen keine Dissemination in die Speicheldrüsen. Bei Vergleich der mitgeführten Kultur mit den Zeckenpräparaten konnte hinsichtlich des Expressionsmusters eine

Tendenz zu mehr OspA- und Osp17-Expression festgestellt werden (Tab. 3.16 und 3.17). In 2 der 3 Zecken konnte jeweils eine Borrelie detektiert werden, die Osp17 exprimierte (vgl. Tab. 3.17).

**Pko 345-II23 nach Capillary-Feeding und Blutkontakt: OspA- und OspC-Expression**

Zecken- Nr	Organ	OspA	OspC	Nur DAPI *	Gesamt
		n (%)	n (%)	n (%)	n(%)
	Kultur **	43 (43%)	0 (0%)	57 (57%)	100 (100%)
<b>Zecke 1</b>	SP I	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0(0%)
	MG I	70 (75%)	0 (0%)	23 (25%)	93 (100%)
<b>Zecke 2</b>	SP II	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0(0%)
	MG II	31 (86%)	0 (0%)	5 (14%)	36 (100%)
<b>Zecke 3</b>	SP III	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	MG III	15 (68%)	0 (0%)	7 (32%)	22 (100%)

Tab. 3.16: Pko 345-II23 OspA- und OspC-Expression nach Capillary-Feeding und Blutkontakt: \* Detektion mit monoklonalen AK und Anfärbung der nicht OspA und OspC exprimierenden Borrelien, Kapillarsaugzeit 2h; Saugzeit auf Gerbils 4 Tage mit DAPI, Konzentration der Borrelien 10<sup>7</sup> /ml; \*\* Auszählung von 100 Borrelien; in A/C-Färbung dargestellt, MG= Darm, SP= Speicheldrüse

**Pko 345-II23 nach Capillary-Feeding in *I. ricinus* und Blutkontakt: Osp17-Expression**

Zecken-Nr	Organ	Osp17	nur DAPI *	Gesamt
		n (%)	n (%)	n (%)
	Kultur **	7 (7%)	93 (93%)	100 (100%)
Zecke 1	SPI	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	MGI	1 (33%)	2 (67%)	3 (100%)
Zecke 2	SPI	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	MGII	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Zecke 3	SPIII	0 (0%)	0 (0%)	0(0%)
	MGIII	1 (33%)	2 (67%)	3 (100%)

Tab. 3.17: Pko 345-II23 Osp17-Expression nach Capillary-Feeding in *I. ricinus* und Blutkontakt: \* Detektion mit monoklonalen AK und Anfärbung der nicht OspA und OspC exprimierenden Borrelien mit DAPI, Konzentration der Borrelien 10<sup>7</sup> /ml; Kapillarsaugzeit 2h; Saugzeit auf Gerbils 4 Tage, \*\* Auszählung von 100 Borrelien; in Osp17-Färbung dargestellt, MG=Darm; SP=Speicheldrüse, grau unterlegt: Osp 17 positive Präparate

Insgesamt ist es auffällig, dass alle blutgesaugten Zecken nach 4 Tagen abfielen und bei späteren Untersuchungen des Gerbils keine weiteren Zecken gefunden werden konnten.

### 3.3.2 Osp-Expression und Dissemination von *B. burgdorferi* in *I. ricinus* nach Capillary-Feeding und Blutkontakt : Untersuchung des Klons PKo 345- II23 Reisolat:

#### Pko 345-II23 Reisolat nach Capillary-Feeding und Blutkontakt: OspA /OspC-Expression nach verschiedenen Saugtagen

Zecken-Nr	Organ (Tag)**	OspA *	OspC *	A/C *	Nur DAPI*	Gesamt
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
	Kultur***	63 (63%)	0 (0%)	0 (0%)	37 (37%)	100 (100%)
<b>Zecke 1</b>	SPI **** (3d)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0(0%)
	MG I (3d)	7 (58%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (42%)	12 (100%)
<b>Zecke 2</b>	SP II ****(3d)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0(0%)
	MG II (3d)	10 (77%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (23%)	13 (100%)
<b>Zecke 3</b>	SPI ****(4d)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0(0%)
	MGI (4d)	90 (78%)	0 (0%)	0 (0%)	25 (22%)	115 (100%)
<b>Zecke 4</b>	SPII ****(4d)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0(0%)
	MGII (4d)	10 (83%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (17%)	12 (100%)
<b>Zecke 5</b>	SPIII ****(4d)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0(0%)
	MGIII (4d)	14 (70%)	0 (0%)	0 (0%)	6 (30%)	20 (100%)
<b>Zecke 6</b>	SP ****(5d)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0(0%)
	MG (5d)	4 (67%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (33%)	6 (100%)
<b>Zecke 7</b>	SP ****(6d)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0(0%)
	MG (6d)	4 (33%)	0 (0%)	0 (0%)	8 (67%)	12 (100%)

Tab. 3.18: Pko 345-II23 Reisolat OspA /OspC- Expression nach verschiedenen Saugtagen nach Capillary-Feeding und Blutkontakt: \* Detektion mit monoklonalen AK und Anfärbung der nicht OspA und OspC exprimierenden Borrelien mit DAPI,\*\* Infektion der Zecken durch Capillary-Feeding; Konzentration der Borrelien 10<sup>7</sup> /ml; Kapillarsaugzeit 2h; Saugzeit auf Gerbils 3 bis 6 Tage, \*\*\* Auszählung von 100 Borrelien, \*\*\*\* In keiner Speicheldrüse waren Borrelien nachweisbar, MG= Darm, SP= Speicheldrüse

**Stamm PKo 345-II23 Reisolat: Osp17-Expression nach verschiedenen Saugtagen**

Zecken-Nr	Organ/Tag **	Osp17 *	Nur DAPI *	Gesamt
		n (%)	n (%)	n(%)
	Kultur	11 (11%)	89 (89%)	100(100%)
<b>Zecke 1</b>	SP ****I (3d)	0 (0%)	0 (0%)	0(0%)
	MG I (3d)	2 (29%)	5 (71%)	7 (100%)
<b>Zecke 2</b>	SP**** II (3d)	0 (0%)	0 (0%)	0(0%)
	MG II (3d)	4 (20%)	16 (80%)	20 (100%)
<b>Zecke 3</b>	SPI ****(4d)	0 (0%)	0 (0%)	0(0%)
	MGI (4d)	0 (0%)	10 (100%)	10 (100%)
<b>Zecke 4</b>	SPII ****(4d)	0 (0%)	0 (0%)	0(0%)
	MGI (4d)	0 (0%)	7 (100%)	7 (100%)
<b>Zecke 5</b>	SPIII ****(4d)	0 (0%)	0 (0%)	0(0%)
	MGI (4d)	0 (0%)	5 (100%)	5 (100%)
<b>Zecke 6</b>	SP ****(5d)	0 (0%)	0 (0%)	0(0%)
	MG (5d)	0 (0%)	5 (100%)	5 (100%)
<b>Zecke 7</b>	SP**** (6d)	0 (0%)	0 (0%)	0(0%)
	MG (6d)	0 (0%)	10 (100%)	10 (100%)

Tab. 3.19: Stamm PKo 345-II23 Reisolat: Osp17-Expression nach verschiedenen Saugtagen \* Detektion mit monoklonalen AK und Anfärbung der nicht OspA und OspC exprimierenden Borrelien mit DAPI, \*\* Infektion der Zecken durch Capillary-Feeding; Konzentration der Borrelien 10<sup>7</sup> /ml, Kapillarsaugzeit 2h; Saugzeit auf Gerbils 4 Tage, \*\*\* Auszählung von 100 Borrelien, \*\*\*\* In keiner Speicheldrüse waren Borrelien nachweisbar, MG=Darm; SP=Speicheldrüse, grau unterlegt: Osp17 positive Präparate

Bei diesem Versuch wurde der Klon 345-II23-Reisolat verwendet, welcher zuvor aus einer vollgesogenen Zecke aus dem Darm isoliert und angezchtet werden konnte. Dabei wurden 20 Zecken des Stammes 345-II23 mittels Capillary-Feeding angefüttert. 14 Zecken konnten anschließend auf einen Gerbil angesetzt werden. Nach 3 bis 6 Tagen konnten 7 Zecken vollgesaugt vom Gerbil entfernt und untersucht werden. Neben den Zeckenpräparaten wurden hier zusätzlich noch Flüssigmedien mit Speicheldrüsenanteilen bzw. Darmanteilen versetzt, um eine erneute Anzchtung des Klones zu erreichen. Der Gerbil wurde nach 2 Wochen sezirt, um eine Organbeteiligung des Tieres nachzuweisen. Auch hier zeigte der Gerbil keine Borrelieninfektion. In der mitgeführten Kultur

exprimierten 63% Borrelien OspA-, und 11% Borrelien Osp17. Es konnten keine OspC-exprimierenden Borrelien nachgewiesen werden. Sowohl die Speicheldrüsen-Präparate als auch die Anzuchtversuche aus Speicheldrüsen waren negativ. In allen Darmpräparaten konnten Borrelien nachgewiesen werden. Im Vergleich zur Kultur zeigte sich in den Präparaten keine OspC-Expression. Eine Änderung des Expressionsmusters konnte hier nicht nachgewiesen werden. In allen Darmpräparaten waren Borrelien mit OspA-Expression vorhanden (siehe Abb. 3.9). Am 6. Tag stieg der prozentuale Anteil der nur DAPI positiven Borrelien auf knapp 70% an. Die meisten Borrelien mit OspA-Expression fand sich am 4.Tag nach dem Blutsaugen (vgl. Tab.3.18;). Es zeigten sich in nur zwei Präparaten Borrelien, welche

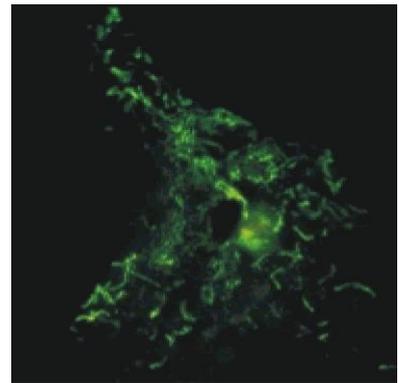


Abb. 3.9: OspA exprimierende Borrelien des Stammes 345-II23 Reisolat aus dem Darm einer blutgesaugten Zecke nach 4 Saugtagen

Osp17 exprimierten. Beide Zecken wurden am dritten Tag nach Ansetzen an den Gerbil untersucht. In allen anderen Zecken fanden sich keine Borrelien, welche Osp17 exprimierten (vgl. Tab.3.19).

Allgemein zeigte dieser Stamm im Vergleich zum 345-II23 beweglichere und lebendigere Zecken nach dem Saugakt. Die mit diesem Stamm gefütterten Zecken blieben durchschnittlich länger auf dem Wirtstier. Außerdem konnten 50% der gesogenen Zecken wiedergefunden werden. Beim Stamm 345-II23 dagegen nur 21%. Es konnten aus zwei Zecken, welche nach vier Tagen untersucht wurden, Borrelien aus dem Darm angezüchtet werden. Eine Rekultivierung aus den Speicheldrüsen war nicht möglich.

### 3.4 Ergebnisse der Kunststoffschnitte mit Technovit 8100:

Für diese Versuchsreihe wurden insgesamt 16 Zecken, die mit drei verschiedenen Klonen angefüttert wurden, verwendet. Von Klon PKo 345-II23, PKo 97 Klon 1-4 und PKo für Ag wurden jeweils 1 Zecke sofort nach der Anfütterung, 2 Zecken nach 12h und weitere 2 Zecken nach 24h Wartezeit in 2% Paraformaldehyd eingelegt und darin fixiert. Nach anschließender Gewebereinbettung mit Technovit 8100 wurden 5µm dünne Schnitte gemacht. Diese wurden anschliessend auf einen Objektträger aufgebracht. Da der Flüssigkeitsgehalt der einzubettenden Substanzen stark mit der Erhärtung des Kunststoffes korreliert, konnten nur 9 der 15 Zecken mit dem Mikrotom geschnitten und untersucht werden. Bei diesen 15 Zecken handelte es sich um Nymphen, welche mit dem Stamm PKo für Ag und

dem Klon PKo 97 1-4 gefüttert und nach 0h bzw. 12h fixiert wurden. Aus 2 Nymphen, die mit dem Klon 345-II23 angefüttert wurden und nach 12h bzw. 24h fixiert wurden, konnten ebenfalls Schnitte hergestellt werden. Insgesamt waren 20 Schnitte auswertbar.

Um sicherzustellen, dass die Fixierlösung keinerlei Einfluß auf die Detektierbarkeit der outer surface Proteine hat, wurden Kulturborrelien des Stammes PKo für Ag über Nacht auf einem Objektträger fixiert und anschließend nach Protokoll angefärbt. Es wurde in diesem Versuch keine Detektion der Proteine erreicht, weder in der A/C-, noch in der DAPI-Anfärbung.

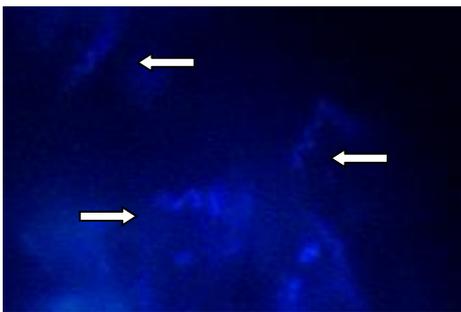


Abb. 3.10: DAPI gefärbter Kunststoffschnitt mit an der Darmwand adhärenen Borrelien des Klons 345-II23

Um die dichte Kunststofffläche zu durchdringen, wird im Protokoll der Firma Technovit die Vorbehandlung mit Trypsin empfohlen. Dies war bei diesen Versuchen nicht durchführbar, da eine Austestung an Kulturborrelien mit 0,01% Trypsinlösung für 5 Minuten eine völlige Verdauung der Membranproteine zur Folge hatte. Ein weiterer Austestungsversuch mit einem Zeckenschnitt zeigte aber die wesentlich effizientere Eindringtiefe der Farbpartikel in die basalen Strukturen des Kunststoffschnittes.

Ohne Vorbehandlung mit Trypsin konnten ausschließlich die obersten Schichten des Zeckenschnittes angefärbt werden.

Um eine möglichst zahlreiche Reaktion der Borrelien in den Schnitten zu gewährleisten, wurden sowohl polyvalente Kaninchenserum als auch monoklonale Antikörper verwendet. Diese Schnitte wurden bei Inkubationszeiten von 30 Minuten bis 15 Stunden untersucht. Keine dieser Methoden konnte ein Durchdringen der Kunststoffschichten erreichen. Auch bei einer Schnittdicke von 1µm konnte in dieser Versuchsreihe weder eine bessere Durchfärbung noch eine Detektierung von Borrelien verzeichnet werden.

Bei der Austestung mit dem interkalierenden Farbstoff DAPI konnte eine gute Eindringtiefe erreicht werden, wobei trotz verschiedener Verdünnungsstufen von 1:100 bis 1: 10000 keine Verbesserung erreicht werden konnte. Somit wurde weiterhin die Konzentration, wie im Protokoll angegeben, bei 1:1000 bei einer Inkubationszeit von 1 Minute verwendet.

Bei der Verwendung von DAPI konnten in drei Präparatschnitten Borrelien nachgewiesen werden. In den Schnitten 345-II23 nach 12h Saugzeit konnten zahlreiche Borrelien identifiziert werden, welche adhären der Darmwand anlagen (Abb. 3.10). Bei Stamm PKo für Ag zeigte sich in den Präparaten

sofort nach dem Saugen (0h) eine geringere Menge an Borrelien, welche ebenfalls adhären der Darmwand anlagen. Eine genaue Anzahl kann aufgrund der Schnitte nicht gegeben werden.

Bei einem Präparat des Klonen 345-II23 nach 24h Saugzeit zeigte sich ein ganzes Konglomerat von 10 bis 30 Borrelien in der Darmmitte, welches an Teile des Darmes angelagert war. Desweiteren waren auch hier vereinzelt Borrelien an der Darmwand nachweisbar. 2 Borrelien konnten in einer Schicht zwischen den Darmzellen nachgewiesen werden. Alle anderen Schnitte dieser Zecken sind als negativ bewertet worden.

Bei einer weiteren Versuchsreihe wurde eine Hybridisierung mit der Sonde EKB 338-Cy 3 ausgetestet. Ein Vergleich der Inkubationslösung mit und ohne 20% Formamid zeigte, dass durch Formamid eine bessere Anfärbung des Gewebes/ Stoffes erreicht werden konnte. Bei einer Variation der Inkubationsdauer von 2h auf 15h zeigte sich jedoch keinerlei weitere Verbesserung der Anfärbung, so dass eine Hybridisierung der Schnitte für 3,5 Stunden nach Protokoll beibehalten wurde. Zusammenfassend konnte hier eine gute Anfärbung der Präparate festgestellt werden, eine Detektion von Borrelien war jedoch nicht möglich.

#### 4. Diskussion

Die Lyme-Borreliose ist die häufigste durch Zecken (in Deutschland *I. ricinus*) übertragene Erkrankung der nördlichen Hemisphäre mit geschätzten 50.000 - 100.000 Neuerkrankungen pro Jahr allein in der BRD. Sie ist eine Multisystemerkrankung, welche in mehreren Stadien auftritt. Im Stadium I der Erkrankung tritt innerhalb von Tagen bis Wochen nach dem Zeckestich ein makulopapulöses Erythem, das Erythema migrans auf. Häufigste Manifestation des II. Stadiums ist die Neuroborreliose (Lymphozytäre Meningoradikulitis). Weitere klinische Manifestationen sind die Lyme-Karditis und die Ophthalmoborreliose. Die Lyme-Arthritis und die Acrodermatitis chronica atrophicans stellen die häufigsten Manifestationen des Stadium III dar. Die serologischen Befunde der Lyme-Borreliose sind abhängig von der Krankheitsdauer und der klinischen Manifestation der Erkrankung. Mehrere Arbeiten zeigten, daß im Stadium I (Erythema migrans) eine 20-50 % Wahrscheinlichkeit, im Stadium II eine 70- 90 % und bei den Spätmanifestationen eine 90-100 % Wahrscheinlichkeit für einen signifikant erhöhten Antikörper-Titer bestehen (Wilske 1993, Weber 1986).

Ein prinzipielles Problem für mikrobiologisch-diagnostische Verfahren ist die große Heterogenität des Erregers: Die Erkrankung wird von mindestens 3 unterschiedlichen Spezies des *B. burgdorferi s.l.* Komplexes, der mittlerweile 10 Spezies umfasst, hervorgerufen. Weiterhin lassen sich die humanpathogenen Borrelien anhand der outer surface Proteine OspA und OspC noch in eine Vielzahl von Subspezies unterteilen (Wilske et al. 1993, 1993, 1994, Will et al. 1995). Zur Frage welche Stämme bzw. Spezies tatsächlich für die serologische Diagnostik geeignet sind, liegen dagegen nur wenige Untersuchungen vor (Hauser et al. 1997, 1999, Robertson 2000).

Laut Empfehlung des CDC und der Richtlinien der DGHM (MiQ; Mikrobiologische Qualitätsstandarts) wird für die serologische Diagnostik der Lyme-Borreliose ein Zweistufenverfahren empfohlen: Sensitiver Suchtest in der 1. Stufe, Bestätigung in der 2. Stufe mittels Immunblot, dem somit eine besondere Wertigkeit zukommt. Prinzipiell kann der Bestätigungstest als Ganzzell-Lysat Test mit natürlichen Proteinen oder als Immunblot mit rekombinant hergestellten Proteinen durchgeführt werden.

Der Ganzzell-Lysat Immunblot-Test bietet dabei die Möglichkeit viele verschiedene Proteine im Test zu detektieren. Nachteilig ist aber, daß er von geschultem Personal durchgeführt werden muß, da eine Identifikation der einzelnen Banden auf den Teststreifen oft schwierig ist (Wilske 2002). Zudem ist die Identifikation der Banden auch erheblich vom verwendeten Stamm abhängig (Wilske 1988a, Zöller 1991, 1993, Hauser 1997). Die Detektion sollte bei diesem Test mittels monoklonaler Antikörper

durchgeführt werden (Wilske 2002). Aufgrund der Heterogenität der Borrelienspezies variieren die Interpretationskriterien in den verschiedenen Ländern.

Der rekombinante Immunblot bietet einige Vorteile: Die Blots mit rekombinanten Antigenen sind wesentlich einfacher zu standardisieren (definierte Antigene in definierter Menge). Auch ist die Identifikation der Banden bei diesem Testverfahren einfacher und zuverlässiger, was besonders für den Bestätigungstest sehr wichtig ist. Hier können spezifische immundominante Antigene selektioniert und ausschliesslich in vivo (und nicht in der Kultur) exprimierte Antigene (z.B: VlsE) sowie hochreaktive homologe Proteine verschiedener Stämme kombiniert eingesetzt werden. Es kann somit den Problemen der Heterogenität und differentiellen Antigenexpression Rechnung getragen werden (Wilske 1994, Roessler 1997).

Der einzige Nachteil ist die begrenzte Anzahl von rekombinanten Antigenen, die derzeit zur Verfügung stehen.

Die Spezifität ist ebenfalls von entscheidender Bedeutung (siehe Tab. 2.2). Nach dem sensitiven Suchtest (z.B. ELISA) mit akzeptabler Spezifität soll ein Bestätigungstest mit hoher Spezifität angeschlossen werden (Wilske et al. 2002). Trotz aller Vorteile erreicht der rekombinante Immunblot bei gleicher Spezifität (mindestens 95%) noch nicht die Sensitivität des Ultrasonikatblots.

#### Interpretationskriterien

Aufgrund unterschiedlicher Einflussfaktoren auf die Qualität des Immunblots sind an die Standardisierung und Evaluierung der Blotverfahren hohe Anforderungen zu stellen. Ganz im Gegensatz dazu steht die hohe Anzahl an kommerziellen Testsystemen bei denen Daten zu Sensitivität und Spezifität in Zusammenhang mit den angegebenen Interpretationskriterien in der Regel nicht zur Verfügung stehen.

Für die USA wurden Interpretationskriterien empfohlen, welche sich auf den Ganzzell-Lysat Blot eines *B. burgdorferi* s.s.-Stammes beziehen (Engström 1995, Dressler 1993): Beim IgM-Blot sollen 2 von 3 Banden (24 kDa (OspC), 39 kDa (BmpA) und 41 kDa (Fla)) positiv sein. Beim IgG-Blot werden 5 von 10 Banden (18 kDa, 21 kDa (OspC), 28 kDa, 30 kDa, 39 kDa (BmpA), 41 kDa (Fla), 45 kDa, 58 kDa, 66 kDa und 93 kDa) als positives Ergebnis gewertet.

Eine Reaktion mit 5 Banden kommt selten vor und tritt meist bei den Spätmanifestationen auf (Dressler 1993). Diese Kriterien können für die Diagnostik in Europa nicht übernommen werden, da sie nur für *B. burgdorferi* s.s und amerikanische Seren entwickelt wurden.

In 2 Studien konnte gezeigt werden, daß die Interpretationskriterien für Europa stammspezifisch definiert werden müssen, da Spezifität und Sensitivität stark vom verwendeten Stamm abhängen (Hauser 1997, Hauser 1998). So zeigte beispielsweise PKo (*B. afzelii*) in einer Studie (Hauser et al 1997) eine höhere Sensitivität bei höherer Spezifität als die Stämme PBi (*B. garinii*) und PKa2 (*B. burgdorferi* s.s.). In dieser Studie wird der Stamm PKo (*B. afzelii*) deshalb als Referenzstamm empfohlen.

Hauser et al. entwickelte Interpretationskriterien für den Ganzzell-Lysat Test, die in Europa angewendet werden sollen und auf die spezielle Situation der Heterogenität der verschiedenen Borrelienspezies abgestimmt ist (siehe Tab.4.1). Die Kriterien, die Hauser et al. in ihren Studien darstellt wurden in weiteren Studien wieder aufgegriffen (Kaiser 1999).

Auch die Reaktion von Osp17 und p58 in Ganzzell-Lysat Testen zeigte, daß diese Proteine stark immunreaktiv sind und es wurde die Vermutung aufgestellt, dass der Einsatz in rekombinanten Testverfahren die Sensitivität erhöhen würde (Hauser 1997, 1998). Im Vergleich der lymphoproliferativen Antwort zu der humoralen Antwort auf das rekombinante Osp17 fand sich in einer Studie an Kindern eine Reaktion auf dieses Protein nur selten (Pohl-Koppe, 2001).

Für das rekombinante Testverfahren mußten eigene Testkriterien entwickelt werden. Beim konventionellen rekombinanten Immunblotverfahren kommen bestimmte Proteine zur Anwendung, welche schon in früheren Arbeiten eingesetzt wurden (Wilske 1993, Roessler 1995; siehe Tab.4.1).

Aus den genannten Studien lassen sich die unten angeführten Interpretationskriterien für die verwendeten Immunblotverfahren ableiten, die in dieser Arbeit angewendet wurden:

Das Ziel dieser Arbeit war die Verbesserung der Sensitivität des rekombinanten Immunblots bei gleichbleibender Spezifität. Zu diesem Zweck wurden neben den oben aufgeführten Kriterien die immunreaktiven outer surface Proteine p58 und Osp17 zum rekombinanten Immunblot neu hinzugefügt. Dieser "neue rekombinante Immunblot" wurde mit dem in der Diagnostik schon etablierten "alten rekombinanten Immunblot" verglichen, welcher diese beiden Proteine nicht mitverwendete. Die erzielten Sensitivitäts- und Spezifitätsergebnisse wurden dann mit dem alternativ anzuwendenden Verfahren - dem Ganzzell-Lysat Test verglichen. Alle drei Verfahren wurden sowohl im IgG-Blot als auch im IgM-Blot durchgeführt.

IgM-Immunblot

Der rekombinate IgM-Blot zeigte eine schlechtere Reaktion als der IgG-Blot. Die Sensitivität der Proteine in allen Stadien der Lyme-Borreliose lag unter 50%.

Vergleicht man nun speziell die beiden neu hinzugefügten Proteine lassen sich folgende Aussagen machen:

Das rekombinante Osp17 des Stammes PKo zeigte insgesamt eine sehr schwache Reaktion. Die Reaktion mit Seren von Patienten mit Erythema migrans erreichte eine Sensitivität von 6 %. Auch in der Studie von Hauser et al. war die Sensitivität von Osp17 (PKo) im Ganzzell-Lysat Test nur 6%. Im Stadium der Neuroborreliose (II) fanden sich im rekombinanten Blot niedrigere Werte für die Sensitivität (3%), der Ganzzell-Lysat Blot zeigte dagegen eine Sensitivität von 9%. Die Spezifität entsprach in beiden Blotverfahren 100%.

Die Sensitivität des rekombinanten p58 mit Seren von Patienten mit Neuroborreliose Stadium II war 3%. Die gleiche Sensitivität konnte mit Seren von Patienten mit Erythema migrans erreicht werden. Im Ganzzell-Lysat Blot reagierten mit p58 nur Seren von Patienten mit Neuroborreliose Stadium I, auch hier erreichte die Sensitivität 3%. Die Spezifität erreichte in beiden Blotverfahren 100%.

Die Sensitivität des "alten rekombinanten Immunblots" kann durch Hinzunahme der beiden neuen Proteine leicht gesteigert werden (von 34% auf 38%), bei der statistischen Auswertung zeigt sich aber kein signifikanter Unterschied.

Beim Vergleich der Sensitivität des neuen rekombinanten IgM-Blots mit allen verwendeten Proteinen mit dem Ganzzell-Lysat Test zeigte letzterer in den Stadien I und II der Lyme-Borreliose eine höhere Sensitivität. Im statistischen Vergleich zeigte sich aber kein signifikanter Unterschied zwischen den Blotverfahren.

Insgesamt lässt sich also sagen, dass Osp17 und p58 für IgM in der hier verwendeten Form nicht relevant sind und damit nicht in die Kriterien einfließen sollten.

#### IgG-Blot

Bessere Ergebnisse konnten in dieser Arbeit mit dem IgG-Immunblot erreicht werden.

Durch Hinzunahme der beiden neuen Proteine Osp17 und p58 konnte insgesamt eine Verbesserung des rekombinanten IgG-Blots erreicht werden:

In einer Studie von Hauser et al. (1998) wurden diese beiden Proteine im Ganzzell-Lysat Test im IgG-Blot eingesetzt. Hier lag die Sensitivität des p58 (PKo) bei 46,6% und die Spezifität bei 97,2%. Das hier eingesetzte Osp17(PKo) erreichte eine Sensitivität von 40,7% und eine Spezifität von 96,5%.

Beide Proteine wurden in dieser Studie aufgrund der hohen Sensitivität bei gleichzeitig hoher Spezifität als mögliche Favoriten zur Verbesserung des Blotverfahrens erwähnt.

In dieser Arbeit konnten folgende Ergebnisse gewonnen werden:

Vergleicht man die beiden natürlichen Proteine Osp17 und p58 (beide vom Stamm PKo) und die beiden rekombinanten Proteine Osp17 (PKo) und p58 (PBi) bezüglich ihrer Sensitivität in den verschiedenen Stadien der Lyme-Erkrankung, zeigte sich bei der Neuroborreliose Stadium II und bei den Spätmanifestationen kein signifikanter Unterschied bei beiden Proteinen. Bei Seren von Patienten mit Erythema migrans ist die Sensitivität des natürlichen p58 signifikant höher. Die Sensitivität des natürlichen Osp17 zeigt dagegen keinen signifikanten Unterschied. Der Ganzzell-Lysat Blot erreicht mit dem natürlichen p58 (PKo) mit Seren von Patienten mit Erythema migrans eine Sensitivität von 26%. Der neue rekombinante Immunblot erreicht bei dem rekombinanten p58 dagegen nur eine Sensitivität von 2%. Das natürliche Osp17 (PKo) reagierte mit Seren von Patienten mit Erythema migrans mit einer Sensitivität von 27%. Das rekombinante Osp17 (PKo) reagierte mit diesen Seren mit einer Sensitivität von 15%. Der Grund warum der Ganzzell-Lysat Blot in diesem Stadium der Lyme-Borreliose eine um soviel höhere Sensitivität zeigt ist noch nicht geklärt. Eine mögliche Erklärung wäre, daß Antikörper im Frühstadium der Erkrankung gegen Epitope gerichtet sind, welche in den rekombinanten Proteinen nicht vorhanden sind. Auch die Heterogenität von p58 im Vergleich der unterschiedlichen Spezies könnte eine Rolle spielen. Da das rekombinante p58 aus *B. garinii* stammt, daß Erythema migrans aber bevorzugt von der Spezies *B. afzelii* verursacht wird, könnte diese Tatsache eine ganz entscheidende Rolle spielen.

Diese Theorie wird auch durch die Tatsache unterstützt, dass das rekombinante p58 (PBi) mit Seren von Patienten mit Erythema migrans eine Sensitivität von 2% aufweist, während die Sensitivität des rekombinanten Osp17 (PKo), welches von *B. afzelii*-Stämmen abstammt, in diesem Stadium der Erkrankung bei 15% liegt.

Aufgrund dieser Daten könnte eine weitere Verbesserung des rekombinanten Immunblots dadurch erreicht werden, dass zusätzlich homologe Proteine (p58 und Osp17-Proteine von verschiedenen Stämmen/Subspezies) angewendet werden. Ein Beispiel stellen die Proteine OspC und p39 dar, die als homologe Proteine verschiedener Stämme/ Spezies in den rekombinanten Blotverfahren Verwendung finden (Roessler 1997, Wilske 1994).

Mit dieser Arbeit konnte experimentell gezeigt werden, daß bei zusätzlicher Anwendung der Proteine p58 und Osp17 eine Verbesserung der Sensitivität in allen Stadien der Lyme-Borreliose im Vergleich

zum früher angewendeten rekombinanten Immunblot erreicht wird. Bei der statistischen Auswertung zeigte sich aber nur bei den Spätmanifestationen ein signifikant besseres Abschneiden des neuen Immunblots.

Vergleicht man die einzelnen Reaktivitäten in den Stadien, reagiert der Ultrasonikatblot zwar in allen Stadien mit einer höheren Sensitivität, die Spezifität allerdings ist bei beiden Tests gleich. Beim statistischen Vergleich des gesamten neuen rekombinanten Immunblots mit dem Ultrasonikatblot wirkt sich diese geringfügig bessere Reaktivität bei Seren von Patienten mit Neuroborreliose Stadium II, im Spätstadium und in den Kontrollen nicht aus. Es besteht hier kein signifikanter Unterschied der Blotverfahren mehr. Beide Blotverfahren können also in diesen Stadien als gleichwertig betrachtet werden. Nur bei Patienten mit Erythema migrans besteht weiterhin ein signifikanter Unterschied zugunsten des Ultrasonikatblots.

Zur Weiterentwicklung des rekombinanten Immunblots werden neue rekombinante Proteine eingesetzt und ausgetestet. Das rekombinante VlsE des *B. burgdorferi* s.s. Stammes PKa2, decorin binding protein A (DbpA) (entspricht Osp17) des *B. garinii* Stammes PBr und OspC des *B. garinii* Stammes 20047 werden derzeit zur Verbesserung der Sensitivität des rekombinanten Blotverfahrens eingesetzt (Wilske 1999).

Die aktuellsten Studien werden mit verschiedenen DbpA- und VlsE-Homologen, sowie dem Fibronectin-bindenden protein durchgeführt (Göttner et al. 2004).

#### Zeckenversuche mit und ohne Blutkontakt

Ein wesentlicher Punkt für das Risiko sich mit Borrelien zu infizieren ist der früheste Zeitpunkt der Übertragung nach Beginn des Saugaktes. Tierexperimentelle Untersuchungen amerikanischer Autoren haben gezeigt, dass bei *B. burgdorferi* s.s. und *I. scapularis* dieser Zeitpunkt bei 36 Stunden nach Beginn der Blutmahlzeit liegt (Piesman 1993). Die Ergebnisse europäischer Arbeiten lassen jedoch Zweifel zu, ob diese Befunde mit der europäischen Situation (unterschiedliches Erregerspektrum mit vorwiegend *B. afzelii* und *B. garinii*, die in den USA nicht vorkommen) und dem anderen Vektor (*I. ricinus*) vergleichbar sind. So konnte Kahl et al. bei Infektionsversuchen an Gerbils zeigen, daß *I. ricinus* bereits nach 17h Saugdauer Nagetiere infizieren kann (Kahl et al. 1998).

Es ist aber noch unklar wie sich unterschiedliche Borreliensämme/ Klone innerhalb der Zecke verhalten. Besonders die Dissemination aus dem Magen-Darm-Trakt in die Speicheldrüsen ist hier

von Bedeutung. Auch die Bedeutung der Expression unterschiedlicher Outer-Surface-Proteine im Hinblick auf die Dissemination ist noch weitgehend unklar. Besonders interessant ist auch die Frage, wie sich ein Borrelienklon verhalten würde, der kein OspC exprimieren kann.

Mittels der Capillary-Feeding-Methode wurden Nymphen der Gattung *I. ricinus* mit verschiedenen Borrelienkulturen infiziert. Auch ohne Blutkontakt kommt es zur Dissemination von Borrelien in die Speicheldrüsen der Zecke. Dies konnte Hu et al. für *B. garinii* nachweisen (Hu et al. 1996).

Vorangegangene Studien zeigten, daß die Capillary-Feeding-Methode eine gute Möglichkeit zur Untersuchung von infizierten Zecken darstellt (Xiaohong 1996a). In dieser Arbeit konnte eine Penetration vom Magen-Darm-Trakt in die Speicheldrüsen über die Hämolymphe in 30- 40% der Zecken nachgewiesen werden. Vergleicht man PCR und Immunfluoreszenz, um Borrelien aus ungefütterten Nymphen zu detektieren, werden bei der Detektion durch Immunfluoreszenzverfahren insgesamt bessere Ergebnisse erzielt (Kahl 1998) als bei der PCR. Amerikanische Autoren belegten in ihren Versuchsreihen mit *B. burgdorferi s. s.* und *I. scapularis*, daß die Wanderung der Borrelien in die Speicheldrüsen zwischen 36- 48 Stunden benötigt (Piesmann 1993, De Silva 1995a). Ob diese Zeiten auch für Europa zutreffen (mit unterschiedlichen Erregern und dem Vektor *I. ricinus*) ist allerdings unklar. Kahl et al. konnte zeigen, daß bereits nach 17 Stunden Saugdauer mehr als 50 % der Gerbils infiziert werden konnten (Kahl 1998).

In den durchgeführten Versuchen sollte die Dynamik der Dissemination unterschiedlicher Borrelienstämme/ -klone in der infizierten Zecke und die Osp-Expression untersucht werden.

Es sollte geklärt werden, ob es zu einer Veränderung der Osp-Expression innerhalb der Zecke kommt, und ob bzw. wann eine Dissemination in die Speicheldrüsen erfolgt.

Es wurden verschiedene Klone der Spezies *B. afzelii* zur Anfütterung verwendet. Durch Westernblotversuche und korrelierende Immunfluoreszenz-Anfärbung der Kulturen konnten zu Beginn der Versuchsreihe folgende Aussagen zur in vitro Situation getroffen werden:

Der Klon PKo 345- II23 verhielt sich in der Expression von OspC negativ und der Expression von Osp17 schwach positiv. Eine Insertion des Leserasters führt bei diesem Klon zu einem Stoppcodon nach einem Drittel des offenen Leserahmens und eine Expression von OspC wird dadurch verhindert. Alle anderen Klone/ Stämme waren OspC positiv. PKo 97 K 1-4 zeigte nur OspC- und Osp17-Expression. Zwei weitere Stämme/ Klone exprimierten alle drei Proteine (PKo für AG und PKo 97 K 37).

Für die Versuchsreihe wurden die infizierten Zecken sofort nach Capillary-Feeding, 12 Stunden und 24 Stunden nach Capillary-Feeding auf Borrelien untersucht.

Die Auswertung der einzelnen Zeckenpräparate erfolgte mittels Dunkelfeldmikroskopie und Immunfluoreszenz.

In den Versuchen zeigten alle OspC positive Klone/ Stämme eine Dissemination in die Speicheldrüsen. Schon direkt nach dem Capillary-Feeding waren bei einigen Stämmen/ Klonen - Klon PKo 97 Klon 1-4, PKo für Ag und PKo 97/37 bereits Borrelien in den Speicheldrüsen nachweisbar. Wir konnten zeigen, daß schon während des Capillary-Feeding eine Dissemination in die Speicheldrüsen erfolgt (Saugzeit an den Kapillaren beträgt 3 bis 4 Stunden). In den Präparaten direkt nach dem Capillary-Feeding ist die Anzahl der Borrelien jedoch sehr gering und die Aussagekraft der Ergebnisse eingeschränkt. Alle Stämme/ Klone, welche sofort in die Speicheldrüsen disseminierten zeigten allerdings auch zu den anderen Untersuchungszeitpunkten Borrelien in den Speicheldrüsen. Hier waren die detektierten Mengen erheblich größer und die Ergebnisse somit aussagekräftiger. So konnten für den Klon PKo 97/37 bis zu 39 Borrelien pro Präparat gefunden, für den Stamm PKo für Ag und den Klon PKo 97 1-4 jeweils bis zu 20 Borrelien. Damit konnte bestätigt werden, dass auch ohne Blutkontakt Borrelien der Spezies *B. afzelii* in die Speicheldrüsen disseminieren. Hu et al konnten dies für *B. garinii* zeigen (Hu et al. 1996). In vorrausgehenden Studien konnte gezeigt werden, dass OspC positive Borrelien in von Menschen entfernten Zecken vorkommen, jedoch ikaum in nüchternen Zecken (Fingerle 1998 und 1995).

Der Klon 345-II23 dagegen (bei dem durch Mutation eine Expression des OspC verhindert wird) zeigte zu keinem Zeitpunkt eine Dissemination in die Speicheldrüsen. Im Magen-Darm-Trakt waren dagegen zu jedem Zeitpunkt Borrelien nachweisbar.

Auch in anderen Studien konnte durch Veränderung der Umgebung - z.B. durch einen Temperaturshift keine Änderung des negativen OspC-Phänotyps erreicht werden (Fingerle 2000).

Bei einem weiteren Versuch mit diesem Klon, bei dem Kapillar gefütterte Zecken auf Gerbils angesetzt wurden und damit Blutkontakt aufwiesen, konnten keinerlei Veränderungen in der Expression der outer surface Proteine belegt werden. Eine Disseminierung in die Speicheldrüsen fand auch hier nicht statt. In den Darmpräparaten mit Blutkontakt konnten dagegen Borrelien nachgewiesen werden. Auch eine erneute Anzucht von Borrelien aus einer Nymphe (PKo 345-II23 Resiolat ) zeigte keinerlei OspC-Expression und damit keinerlei Veränderung zur Kontrollkultur.

Unterschiedliches Verhalten der Serotypen bei der Dissemination könnte eine Erklärung für das Verhalten in der Zecke und dem Vertebraten geben. OspA Serotyp 2 und 4 treten gehäuft bei Patienten auf, während OspA Serotyp 6 häufiger in Zecken anzutreffen ist (Wilske 1996).

Schwan et al. zeigte in einer Arbeit, daß ungefütterte Zecken OspA, aber kein OspC auf der Oberfläche exprimierten (Schwan 1995). Bei einem Vorkommen in Wirbeltieren kam es allerdings zu weitreichenden Oberflächenveränderungen. In diesem Falle wird OspC, aber kein OspA mehr exprimiert. Nach Blutkontakt konnte OspC auch im Magen-Darm-Trakt der Zecke nachgewiesen werden. Dies legt die Theorie nahe, daß OspC eine Rolle bei der Infektion des Menschen spielen könnte. Auch andere Autoren belegten die wichtige Rolle des OspC für die Dissemination in der Zecke und die darauf folgende Infektiosität (De Silva 1995). Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche mit dem OspC negativen Klon PKo 345-II23 konnten diese Theorien bestätigen.

Bei den anderen Klonen/ Stämmen konnten Borrelien in den Speicheldrüsen nachgewiesen werden, welche sowohl reine OspA, als auch reine OspC-Expression, sowie eine A/ C-Coexpression zeigten.

Der Stamm PKo für Ag zeigte zum Beispiel eine stärkere OspA-Expression im Verhältnis zur OspC-Expression in den Speicheldrüsen. Bei diesem Stamm wandert eine gemischte Population in die Speicheldrüsen. Diese Aussage wirft die Frage auf, ob OspC als wichtiger Cofaktor hier wirklich so entscheidend ist. Beim ebenfalls OspA exprimierenden Klon Pko 97 Klon 37 konnte nur ein einziges Mal eine reine OspA-Expression nach 12 Stunden dargestellt werden. Die geringe Anzahl hat auch hier nur eine geringe Aussagekraft. Es bleibt demnach die Frage offen, ob nur OspC positive Borrelien die Darmwand durchdringen können. Ebenso wäre allerdings auch ein Verlust des OspC nach der Dissemination möglich.

Vergleicht man die Darmpräparate mit der jeweilig mitgeführten Kultur, zeigt sich keinerlei Änderung des Expressionsverhaltens der einzelnen Stämme im Hinblick auf die unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkte.

In diesem Teil der Arbeit wurde einem weiteren Oberflächenprotein Beachtung geschenkt. Das Osp17 stellt bei der Immunantwort in Lyme-Borreliose Patienten ein immundominantes Protein dar, welches besonders in der späten Immunantwort wichtig ist (Hauser 1997, Jauris- Heipke 1999). In Westernblotversuchen mit monoklonalen und polyklonalen Antikörpern gegen rekombinantes Osp17 konnte gezeigt werden, daß nur ein Teil der *B. afzelii*-Stämme dieses Protein exprimiert. Nach Hauser und Jauris-Heipke könnte es zu einem Wechsel von OspC nach Osp17 kommen, da das entsprechende Gen ebenfalls plasmidcodiert ist und damit einem ähnlichen oder gleichen

Regulationsprozess unterworfen sein könnte. Bei dem in dieser Arbeit getesteten Stamm PKo für Ag und dem Klon PKo 97 Klon 1-4 zeigte sich eine Zunahme der Expression dieses Proteins in den Speicheldrüsen bei den aufeinanderfolgenden Untersuchungszeitpunkten. Beim Klon PKo97/ 37 konnte sogar in beiden Speicheldrüsen während des Saugens schon Osp17 positive Borrelien nachgewiesen werden.

Auch in den Darmpräparaten aller dieser Borrelienstämme/ Klone war ein Teil der Borrelien Osp17 positiv. Der Klon 345-II23 exprimiert ebenfalls eine geringe Menge dieses Proteins. In den Präparaten des Magen-Darm-Traktes bei 0 Stunden und 12 Stunden Saugzeit konnten wenige Borrelien nachgewiesen werden, welche Osp17 exprimieren. In den Präparaten mit Blutkontakt exprimierten ebenfalls zwei Borrelien Osp17. Bei den Borrelien des Klons 345-II23 Reisolat zeigte sich ein ähnliches Ergebnis. Hier könnten also auch andere Mechanismen eine Rolle spielen. Allerdings sind auch hier die Zahlen der Borrelien in allen Präparaten nicht wirklich aussagekräftig. Das unterschiedliche Verhalten der Borrelien in Quantität und Qualität der Osp17-Expression könnte u.a. mitverantwortlich sein für die Unterschiede im Organotropismus der verschiedenen Spezies. So kann *B. afzelii* als Erreger der Acrodermatitis chronica atrophicans jahrelang in der Haut überleben.

Bei den Versuchen zeigten sich ebenfalls eine Anzahl an Borrelien, die keine der zu detektierenden outer surface Proteine zeigten und nur mit dem DNA interkalierenden Stoff DAPI angefärbt werden konnten. Auch in wild gefangenen Zecken konnte dieses Phänomen beobachtet werden (Fingerle 1995). Es besteht die Möglichkeit, daß in diesen Borrelien andere Oberflächenantigene exprimiert werden, welche für die Anpassung an das Wirtstier von großer Bedeutung sind. Auch ein Verbleib des bestehenden Expressionsmusters vom vorherigen Saugakt oder die frühzeitige Expression von Proteinen für den kommenden Saugakt ist möglich.

In den hier durchgeführten Versuchen wurde eine künstliche Fütterung durch Capillary-Feeding durchgeführt. Ob dieses Verfahren eine langzeitige Infektion der Zecken erlaubt und ob diese den wahren Verhältnissen in der Natur Rechnung trägt, ist noch ungeklärt.

Bei wild gefangenen Zecken waren die Borrelien OspC negativ und OspA positiv (Fingerle 1995, 1998). Welche Oberflächenproteine zu einem bestimmten Zeitpunkt exprimiert werden, stellt auch eine entscheidende Frage zur Entwicklung einer Vaccine dar. Eine Abtötung der Borrelien sollte bestenfalls bereits im Darm der saugenden Zecke stattfinden, wie es bei der in Amerika verwendeten OspA-Vaccine der Fall ist. So könnte schon die Dissemination in die Speicheldrüsen verhindert werden. Eine Studie zeigte, daß das im Wirbeltier auf Borrelien vorhandene Decorin bindende Protein

(DbpA) eine gute Vaccine im Mausmodell darstellt, wenn die Mäuse intracutan infiziert wurden. Bei Zeckenversuchen war diese Vaccine allerdings nicht erfolgreich (Hagmann 2000).

Das Capillary-Feeding ist eine für den Untersucher sehr anspruchsvolle Methode, die durchaus auch einige Mängel mit sich bringt. Zum einen können mit dieser Methode nur geringe Anzahlen an Zecken untersucht werden, da der Zeitaufwand pro Individuum sehr groß ist. Zum anderen finden sich in den entsprechenden Organen selten mehr als hundert Borrelien. Da besonders in den Speicheldrüsen auch häufig weniger als zehn Borrelien pro Organ bzw. Zecke nachweisbar sind, ist eine statistische Auswertung aufgrund der geringen Zahlen nicht aussagekräftig. Besonders bei der Sezierung der Speicheldrüsen ist die Gewinnung einer aussagekräftigen Menge an Material von entscheidender Bedeutung für die Auswertung, da diese Organe sehr klein sind (Nachweisgrenze für immunserologische Methoden ca.  $> 1000/ \text{ml}$ ). Um eine Kontamination mit Darmmaterial zu vermeiden, müssen diese mehrere Male ausgewaschen werden. Es besteht die Gefahr, daß Borrelien bei diesem Vorgang in die Waschlösung geschwemmt werden, da eine Unversehrtheit der Speicheldrüsen nicht immer gewährleistet werden kann. Ein weiterer Faktor ist die Kontamination der Speicheldrüsen mit Darmmaterial. Es ist in manchen Fällen sehr schwierig zu entscheiden, ob es sich um eine echte Infektion oder um eine Kontamination handelt. Meist stellt sich die Kontamination als strichförmige, lokale Borrelienansammlung dar, bei der sich in anderen Anteilen des Organs keine weiteren Borrelien zeigen. In infizierten Präparaten wird meist eine gleichmäßige Verbreitung über den gesamten Objektträger beobachtet. Um eine möglichst unabhängige Kontrolle des Testverfahrens zu gewährleisten, wurde bei allen Testreihen eine Positivkontrolle in Form einer mitgeführten Borrelienkultur des entsprechenden Stammes/ Klonen und des Stammes PKo für Ag mitgeführt. Als Negativkontrolle wurde ein Präparat des Stammes *B. hermsii* verwendet. Dabei muß angemerkt werden, daß dies nur eine Kontrolle des Immunfluoreszenztests an sich darstellt, eine Kontrolle über den erfolgreichen Saugvorgang der Zecke kann nur nach optischen Gesichtspunkten (siehe Material und Methoden-Teil) durchgeführt werden und läßt keinerlei Schluß über die tatsächlich angefütterte Borrelienmenge zu. Um solche Fehlerquellen weitestgehend einzuschränken, wurden zur Kontrolle der Anzahl der Borrelien in der Kultur regelmäßig dunkelfeldmikroskopische Zählungen durchgeführt (siehe Material- und Methodenteil).

Mit den Capillary-Feeding Versuchen konnte zwar Einblick in das Verhalten der Borrelien innerhalb der einzelnen Organe erzielt werden, wie sich diese aber in vivo verhalten und in welchen Anteilen des entsprechenden Organs sie vorkommen, konnte damit nicht geklärt werden.

### 3. Kunststoffschnitte

In diesem Teil der Arbeit sollte die Herstellung borrelieninfizierter Zeckenschnitte verbessert werden. Dafür wurden Mikrotomschnitte von mit Capillary-Feeding gesäugten Zecken in Kunststoff (Technovit 8100) eingebettet. Anschließend wurden diese mittels Fluoreszenz- In Situ-Hybridisation (FISH) angefärbt um eventuell vorhandene Borrelien im Darmtrakt oder in den Speicheldrüsen zu detektieren. Andere Autoren bewerteten die FISH-Technik als eine gute Methode, um Mikroorganismen in ihrer natürlichen Umgebung zu untersuchen (Wagner 1994, Moter 1998). Auch eine Anwendung bei bis jetzt noch nicht kultivierbaren Bakterien in klinischen sowie pathologischen Präparaten wurde beschrieben (McNicol 1997). Durch eine weitere Verbesserung der Technik erfolgte eine immer genauere Lokalisation der Mikroorganismen (Amann 1996). In der Vergangenheit zeigten sich starke unspezifische Hintergrundreaktionen bei Paraffin eingebetteten Präparaten (Licht 1996, Poulsen 1994). Auch eine Vorandauung mit Proteinase verbesserte die Ergebnisse kaum (Yoshii 1995). Bei zu hoher Proteinase-Konzentration werden die Präparate teilweise sogar zerstört (Karttunen 1996). Da bei dieser Vorbehandlung vorhandene outer surface Proteine zerstört werden, konnte diese Technik in den hier durchgeführten Versuchen nicht angewendet werden. Die ebenfalls mögliche Paraffineinbettung der Zecken und anschließende Herstellung von Gefrierschnitten führte zu einer anatomisch unkorrekten Darstellung der Zeckenorgane. Es kam in einem Großteil der Präparate zu einem Zusammenschieben des Schnittes auf dem Objektträger. Bei Verwendung von Plastikeinbettungen nach Technovit 8100 wird das entsprechende Präparat so ausgehärtet, daß dieses im Mikrotom in beliebig dünne Schnitte zerlegt werden kann, ohne die Struktur zu verlieren. Schon Moter et al. konnten zeigen, daß diese Methodik eine gute Möglichkeit zur Erforschung der Pathogenese gemischter bakteriell verursachter Infektionen darstellt, wenn sie in Verbindung mit der FISH-Technik eingesetzt wird (Moter 1998).

Die für diese Versuche interessante Frage der outer surface Protein-Expression konnte hier nicht beantwortet werden, da ein Durchdringen des Kunststoffes mit herkömmlichen Antikörpern nicht möglich war. Auch die Anwendung der FISH-Technik zeigte keine positiven Ergebnisse. Durch Anfärben mit dem DNA interkalierenden Stoff DAPI konnten dagegen einige Borrelien im Darm der Zecken detektiert werden. Dieser Stoff kann die Poren des Kunststoffes durchdringen. Sowohl Zecken, die mit dem Klon 345-II23 als auch mit dem Stamm PKo für Ag angefüttert wurden, zeigten Borrelien, die der Darmwand adhärent anlagen. Für eine statistische Auswertung waren die gewonnenen Präparate jedoch zahlenmäßig zu gering.

## 5. Zusammenfassung

Die Lyme-Borreliose ist eine Multisystemerkrankung mit einem sehr breiten und variablen Spektrum an Symptomen. Daher ist eine suffiziente serologische Diagnostik von entscheidender Bedeutung. Beim Ganzzelllysatsblot sind die spezifischen und kreuzreaktiven Banden auf den Teststreifen häufig nicht eindeutig identifizierbar. Er kann daher nur von geschultem Personal durchgeführt werden. Des Weiteren ist der konventionelle Blot sehr schwer zu standardisieren. Beim Blot mit rekombinanten Proteinen (rekombinanter Blot) dagegen ist sowohl die Bandenidentifikation als auch die Standardisierung sehr viel einfacher. Außerdem können hier, im Gegensatz zum Ganzzelllysatsblot, homologe Proteine verschiedener Spezies und Subspezies kombiniert und auch nur in vivo exprimierte Proteine eingesetzt werden. Trotz dieser Vorteile erreicht der rekombinante Blot bei gleicher Spezifität noch nicht die Sensitivität des Ganzzelllysatsblots. Der erste Teil der Arbeit befasst sich mit der Fragestellung, ob bei zusätzlichem Einsatz von p58 und dem Oberflächenprotein Osp17-zwei rekombinant hergestellten und hochimmunogenen Proteinen eine Steigerung der Sensitivität bei gleicher Spezifität erreicht werden kann. Die Austestung dieser Proteine an einem gut definierten Panel von Seren von Patienten in unterschiedlichen Stadien der Lyme-Borreliose konnte zeigen, dass durch diese Proteine die Sensitivität des zuvor verwendeten rekombinanten IgG-Immunsblots signifikant verbessert werden kann: Bei einer Spezifität von 97,8%, konnte durch die beiden neuen Proteine eine Verbesserung der Sensitivität von 28,6% auf 45,2% im Stadium der Neuroborreliose erreicht werden. Bei den Spätmanifestationen zeigte sich eine Verbesserung der Sensitivität von 74,4% auf 97,4%. In der statistischen Auswertung war in diesen beiden Stadien der Lyme-Borreliose kein signifikanter Unterschied zum Ganzzelllysatsblot mehr festzustellen. Beim IgM-Blot zeigte sich durch die Hinzunahme der beiden neuen Proteine dagegen keine entsprechende Verbesserung der Sensitivität: Bei einer Spezifität von 98% zeigten sich in beiden Stadien der Neuroborreliose gleiche Ergebnisse (NB II 33% Sensitivität, NB I 37% Sensitivität mit und ohne Hinzunahme der Proteine Osp17 und p58).

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit dem Überleben der Borrelien in der Zecke. Die Borrelien leben in ungesogenen Zecken vorwiegend im Darm und können während des Saugaktes über die Speicheldrüsen auf das entsprechende Wirtstier übertragen werden. Bei diesem Vorgang sind die Oberflächenproteine OspA und OspC von *B. burgdorferi* s.l. beteiligt. Während des Saugaktes kommt es zu einer Hochregulation von OspC, während die Expression von OspA abnimmt. In diesem Teil der

Arbeit wird die Frage bearbeitet, zu welchem Zeitpunkt eine Dissemination der unterschiedlichen Borreliestämme/ Klone vom Darm in die Speicheldrüsen erfolgt und wie sich die Osp-Expression in der durch Capillary-Feeding infizierten Zecke verhält. Für diese Versuche wurden verschiedene *I. ricinus* Nymphen mittels Capillary-Feeding mit verschiedenen Klonen von *B. afzelii* infiziert. Darm und Speicheldrüsen der Zecken wurden getrennt auf Vorhandensein und Osp-Expression der verschiedenen Klone überprüft. Durch Untersuchung der Zecken nach 0, 12 und 24 Stunden sollte der zeitliche Verlauf der Osp-Expression in Bezug auf die Dissemination vom Darm in die Speicheldrüsen dargestellt werden. Es konnte belegt werden, dass alle untersuchten Stämme in der Lage waren, den Darm der Zecken zu infizieren. Im Vergleich zur Kultur zeigte sich keinerlei Veränderung bezüglich des Expressionsmusters. Für die Infektion der Speicheldrüsen konnte festgestellt werden, dass die OspC-exprimierenden Klone nach spätestens 12 Stunden in den Speicheldrüsen nachweisbar waren. Teilweise waren sie schon während des Capillary-Feedings in der Lage, in diese zu disseminieren. Der OspC-negative Klon PKo 345-II23 dagegen war zu keinem Zeitpunkt in den Speicheldrüsen nachweisbar. Desweiteren wurden Zecken mittels Capillary-Feeding mit diesem Klon infiziert und auf Gerbils angesetzt. Auch hier konnte keine Dissemination der Borrelien in die Speicheldrüsen belegt werden. Die Gerbils zeigten ebenfalls keine Infektion durch Borrelien. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass auch ein Blutkontakt der Borrelien keine Änderung bezüglich der Osp-Expression und Dissemination in die Speicheldrüsen bewirkt.

Diese Versuche zeigen, dass OspC eine wichtige Funktion bei der Übertragung in die Speicheldrüsen hat.

Um das Verhalten der Borrelien unter möglichst authentischen Bedingungen zu klären, wurde in einem weiteren Abschnitt der Arbeit eine neue Technik zur Herstellung von Kunststoffschnitten eingeführt. Mit dieser Methode konnten Zeckenschnitte erzeugt werden, welche eine genaue Darstellung der Zeckenorgane ermöglichte. Eine Detektion der Oberflächenproteine der enthaltenen Borrelien in den Schnitten durch monoklonale Antikörper war nicht möglich. Durch Anwendung des DNA-interkalierenden Farbstoff DAPI konnten wenige Borrelien in den Darmabschnitten der Zecken nachgewiesen werden. Zur statistischen Auswertung sind diese Versuche aufgrund der geringen Borrelienanzahl nicht heranzuziehen.

## 6. Literaturverzeichnis

- Ackermann, R., Gollmer, E., Rehse-Küpper, B. (1985). Progressive Borrelien-Encephalomyelitis. Dtsch Med Wochenschr. 26, 1039-1042.
- Amann R, Snaidr J, Wagner M, Ludwig W, Schleifer KH.(1996) In situ visualization of high genetic diversity in a natural microbial community. J Bacteriol. Jun;178(12):3496-500.
- Association of State and Territorial Public Health Laboratories for Disease Control and Prevention (1995). Proceedings of the Second national Conference on Serologic Diagnosis of Lyme Disease. In: Centers for Disease Control (ed) 44: 590-591
- Afzelius, A. (1910). Verhandlungen der dermatologischen Gesellschaft zu Stockholm, 16. Dezember 1909. Arch Dermatol Syph (Berlin). 101, 405-406.
- Asbrink, E., Hovmark, A. (1985). Successful cultivation of spirochetes from skin lesions of patients with erythema chronicum migrans Afzelius and acrodermatitis chronica atrophicans. Acta path microbiol Immunol scand Sect, B: 93, 161-163.
- Asbrink, E., Hovmark, A., Weber, K. (1993). Acrodermatitis chronica atrophicans., p. 193-204. In K. Weber, and W. Burgdorfer (ed.), Aspects of Lyme borreliosis. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Bärfverstedt, B.: (1960). Lymphadenosis benigna cutis (LABC) its nature, course and prognosis. Acta Derm Venerol (Stockh.). 40, 10-18.
- Balashov, Y. S. (1967) Bloodsucking ticks (ixodidae) – Vectors of disease of man and animals. Leningrad, Nauka Publishers, Leningrad department.
- Balashov, Y.S (1972) Bloodsucking ticks (ixodidae) – Vectors of disease of man and animals. Leningrad. Misc. Publ.Entomol.Soc. Am.8:161-376.
- 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. und 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.
- Barbour, A.G., Tessier, S.L., Stoenner, H.G. (1982). Variable major proteins of *Borrelia hermsii*. J. Exp. Med. 156, 1312
- Barbour, A. G., Tessier, S.L. und Hayes, S.F.(1984). Variation in a major surface protein of Lyme disease spirochetes. Infect. Immun. 45, 94-100.
- Barbour, A. G., Tessier, S.L. und Todd, W. J. (1983). Lyme disease spirochetes and ixodic tick spirochetes share a common surface antigenic determinant defined by a monoclonal antibody. Infect. Immun. 41, 795-804.
- Barbour, A.G., Hayes, S.F., Heiland, R.A. et al. (1986). A *Borrelia* specific monoclonal antibody binds to a flagellar epitope. Infect Immun. 52, 549-554.
- Barbour, A.G. und Garon, C.F. (1987) . Linear Plasmid of the bacterium *Borrelia burgdorferi* have

- covalently close ends. *Science* 237, 409-411.
- Barbour, A.G. (1988). Plasmid analysis of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. *J Clin Microbiol.* 26, 475-478.
- Barbour, A.G. (1989). Classification of *Borrelia burgdorferi* on the basis of plasmid profiles. *Zbl Bakt Suppl.* 18, 1-7.
- Barbour, A.G., Burgdorfer, W., Hayes, S.F., Peter, O., Aeschlimann, A. (1983). Isolation of a cultivable spirochete from *Ixodes ricinus* ticks of Switzerland. *Curr Microbiol* 8, 123-126.
- Benach, J.L., Bosler, E.M., Hanrahan, J.P., Coleman, J.L., Habicht, G.S., Bast, T.F., Cameron, D.J., Ziegler, J.L., Barbour, A.G.; Burgdorfer, W., Edelmann, R., Kaslow, R.A. (1983). Spirochetes isolated from the blood of two patients with Lyme disease. *N Engl J Med.* 308, 740-742.
- Binder E., Doepfmer R., Hornstein O. (1955). Experimental transmission of chronic erythema migrans from man to man. *Hautarzt* 6(11): 494-496.
- Brandt ME, Riley BS, Radolf JD, Norgard MV. (1990) Immunogenic integral membrane proteins of *Borrelia burgdorferi* are lipoproteins. *Infect Immun.* Apr;58(4):983-91.
- Burgdorfer, W., Barbour, A., G., Hayes, S., F., Benach, J., L., Grunwaldt, E., Davis, J., P., (1982). Lyme disease- a tick- born spirochetosis?. *Science* 216, 1317-1319.
- Burmester, G., Krause, A. (1999). Lyme Borreliose. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Busch, U.; Hizo-Teufel, C.; Böhmer, R.; Fingerle, V.; Rößler, D.; Wilske, B.; Preac- Mursic, V. (1996). *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains isolated from cutaneous Lyme borreliosis biopsies differentiated by pulsed-field gel electrophoresis. *Scand. J. Infect. Dis.:* 28, 583-589 .
- Cadavid, D.; Thomas, D. D.; Crawley, R.; Barbour, A.G. (1994). Variability of a bacterial surface protein and disease expression in a possible mouse model of systemic Lyme borreliosis. *J. Exp. Med.:* 179, 631-642.
- Canica, M., Nato, F., Du Merle, L., Mazie, J. C., Baranton, G. und Postic, D. (1993): Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestation of Lyme borreliosis. *Scand. J Infect. Dis.* 25, 441-448.
- Carroll, J. A.; Garon, C. F.; Schwan, T. G. (1999). Effects of environmental pH on membrane proteins in *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.:* 67, 3181-3187.
- 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, *Infekt. Immun.* 61, 423-431.
- De Silva, A. M. und Fikrig, E. (1995). Growth and migration of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes* ticks during blood feeding. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53, 397-404.
- Dönges, J. Parasitologie (1980) : mit besonderer berücksichtigung humanpathogener Formen. Stuttgart, Thieme, 394-398.
- Dressler, F., Whalen, J.A., Reinhardt, B.N., Steere, A.C. (1993). Western blotting in the serodiagnosis of the Lyme disease. *J Infect Dis,* 167, 392-400.
- 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.

- Eicken C, Sharma V., Klabunde T., Lawrenz MB., Hardham JM., Norris SJ., Sacchetti JC (2001). Crystal structure of Lyme disease variable surface antigen VlsE of *Borrelia burgdorferi*, *Infect Immun*, 69: 7083-90.
- Eiffert, H., Ohlenbusch, A., Christen, H-J., Thomssen, R., Spielman, A., Matuschke, F-R. (1995). Nondifferentiation between Lyme disease spirochetes from vector ticks and human cerebrospinal fluids. *J Infect Dis* 171, 476-479.
- Engström S M, Shoop E, Johnson R C (1995) Immunoblot interpretation criteria for serodiagnosis of early Lyme disease. *J Clin Microbiol* 33: 419-427.
- Ferdows, M.S, Barbour, A.G. (1989). Megabase- sized linear D NA in the bacterium *Borrelia burgdorferi* the Lyme disease agent. *Proc Natl Acad Sci. USA* 86. 5969-5973.
- Fingerle, V., Bergmeister, H., Liegl, G., Vanek, E., Wilske, B. (1994). Prevalence of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in *Ixodes ricinus* in Southern Germany. *J Spiroch Tick Dis* 1, 41-45.
- Fingerle, V., Hauser, U., Liegl, G., Petko, B., Preac-Mursic, V. und Wilske B. (1995). Expression of outer Surface Protein A and C of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus*. *J Clin Microbiol*, Vol.33, No. 7, 1867-1869.
- Fingerle, V., Liegl, G., Wilske, B. (1996). Expression of outer surface proteins A and C of *Borrelia burgdorferi* in engorged *Ixodes ricinus* ticks removed from humans., p. Abstract C414 S. 76. In D. J. Gubler, and R.S. Lane (ed.), VII International Congress on Lyme Borreliosis, June 16-21, San Francisco, California.
- Fingerle, V.; Liegl, G.; Munderloh, U.; Wilske, B. (1998). Expression of outer surface proteins A and C of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks removed from humans. *Med. Microbiol. Immunol.:* 187,121-126.
- Fingerle, V., Laux, H., Munderloh, U.G., Schulte- Spechtel, U., Wilske, B. (2000). Differential expression of outer surface proteins A and C by individual *Borrelia burgdorferi* in different genospecies. *Med Microbiol Immunol*
- Fuchs, R., Jauris, S., Lottspeich, F., Preac-Mursic, V., Wilske, B., Soutschek, E. (1992). Molecular analysis and expression of a *Borrelia burgdorferi* gene encoding a 22 kDa protein (pC) in *Escherichia coli*. *Molec. Microbiol.* 6, 503-509.
- Göttner G, Schulte-Spechtel U, Wilske B . (2004) Heterogeneity of the immunodominant surface protein VlsE among the three genospecies of *Borrelia burgdorferi* pathogenic for humans. *Int J Med Microbiol.* Apr;293 Suppl 37:172-3. No abstract available.
- Hagman, K.E., Yang, X., Wikel, S.K., Schoeler, G.B., Caimano, M. J., Radolf, J.D., Norgard, M.V. (2000). Decorin-binding protein A (DbpA) of *Borrelia burgdorferi* is not protective when immunized mice are challenged via tick infestation and correlates with the lack of DbpA expression by *B. burgdorferi* in ticks. *Infect Immun.* 68, 4759- 4764.
- Hamann-Brand A, Flondor M, Brade V (1994) Evaluation of hemagglutination assay as screening test and of a recombinant immunoblot as a confirmatory test for serological diagnosis of Lyme disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13:572-575

- Herxheimer, K., Hartmann, K. (1902). Über Acrodermatitis chronica atrophicans. Arch Dermatol Syph. 61, 57-76.
- Herzer, P., Wilske, B. (1986). Lyme Arthritis in Germany. Zbl Bakt Hyg. A 263, 268-274.
- Herzer, P. (1993). Joint manifestations., p. 168-184. In K. Weber, and W. Burgdorfer (ed.), Aspects of Lyme borreliosis. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Hauser, U., Lehnert, G., Lobentanzer, R., Wilske, B. (1997). Interpretation criteria for standardized western blots for three european species of *Borrelia burgdorferi sensu lato*. J Clin Microbiol 35, 1433-1444.
- Hauser, U., Lehnert, G., Wilske, B. (1998). Diagnostic value of proteins of three *Borrelia* species (*Borrelia burgdorferi sensu lato*) and implications for development and use of recombinant antigens for serodiagnosis of Lyme Borreliosis in Europe. Clin Diagn Labor Immunol 5, 456-462.
- Hauser, U., Wilske, B. (1997). Enzyme-linked immunosorbent assays with recombinant internal flagellin fragments derived from different species of *Borrelia burgdorferi sensu lato* for the serodiagnosis of Lyme neuroborreliosis. Med Microbiol Immunol. 186, 145-151.
- Hauser, U., Krahl, H., Peters, H., Fingerle, V., Wilske, B. (1998). Impact of strain heterogeneity on Lyme disease serology in Europe: comparison of enzyme-linked immunosorbent assays using different species of *Borrelia burgdorferi sensu lato*. J Clin Microbiol. 36, 427-436.
- Hollström, E. (1951). Successful treatment of erythema migrans Afzelius. Acta Derm Venerol. 31, 235-243.
- Hopf, H.C., Klingmüller, G. (1966). Acrodermatitis chronica atrophicans mit Gelenkbeteiligung und neurologischen Ausfällen. Nervenarzt. 36, 364-366.
- Huppertz HI, Böhme M, Standaert SM, Karch H, Plotkin SA.(1999) Incidence of Lyme borreliosis in the Würzburg region of Germany. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. Oct;18(10):697-703.
- Hu, C.M., Simon, M., Kramer, M.D., Gern, L. ( 1996): Tick factors and in vitro cultivation influence the protein profile, antigenicity and pathogenicity of a cloned *Borrelia garinii* isolate from *Ixodes ricinus* hemolymph. Infection 24, 251- 257.
- Hu CM, Wilske B, Fingerle V, Lobet Y, Gern L. (2001) Transmission of *Borrelia garinii* OspA serotype 4 to BALB/c mice by *Ixodes ricinus* ticks collected in the field. J Clin Microbiol. Mar;39(3):1169-71.
- Jauris-Heipke, S.; Fuchs, R.; Motz, M.; Preac-Mursic, V.; Schwab, E.; Soutschek, E.; Will, G.; Wilske, B. (1993). Genetic heterogeneity of the genes coding for the outer surface protein C (OspC) and the flagellin of *Borrelia burgdorferi*. Med. Microbiol. Immunol.: 182,37-50.
- Jauris-Heipke, S., Liegl, G., Preac-Mursic, V., Roessler, D., Schwab, E., Soutschek, E., Will, G. und Wilske, B. (1995). Molecular analysis of genes encoding outer surface protein C (OspC) of *Borrelia burgdorferi sensu lato*: relationship to ospA genotype and evidence of lateral gene exchange of ospC. J. Clin. Microbiol. 33, 1860-1866.
- Jauris-Heipke, S., Roeßle, B., Wanner, G., Habermann, C., Roessler, D., Fingerle, V., Lehnert, G., Lobentanzer, R., Pradel, I., Hillenbrand, B., Schulte-Spechtel, U. und Wilske, B. (1999). Osp17, a novel immunodominant outer surface protein of *Borrelia afzelii*: rekombinant

- expression in *Escherichia coli* and its use as a diagnostic antigen for serodiagnosis of Lyme borreliosis. *Med Microbiol Immunol* 187, 213-219.
- Johnson, R., 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.
- Kahl, O. (1989). Untersuchungen zum Wasserhaushalt von Zecken (Acari: Ixodoidea) im Laufe ihrer postembryonalen Entwicklung unter besonderer Berücksichtigung der aktiven Wasserdampfabgabe bei gesogenen Stadien. *Biol Diss Berlin*.
- Kahl, O., Janetzki-Mittmann, C., Gray, J.S., Jonas, R., Stein, J., de Boer, 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 Hyg A.* 287 (1-2), 41-52.
- Kahl, O.; Gern, L.; Gray, J. S.; Guy, E. C.; Jongejans, F.; Kirstein, F.; Kurtenbach, K.; Rijpkema, S. G. T.; Stanek, G. (1998). Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks: immunofluorescence assay versus polymerase chain reaction. *Zbl. Bakt.:* 287, 205-210.
- Kaiser, R., Rauer, S. (1999). Serodiagnosis of neuroborreliosis: comparison of reliability of three confirmatory assays. *Infection* 27. 177-182.
- Karttunen TJ, Genta RM, Yoffe B, Hachem CY, Graham DY, el-Zaatari FA. (1996) Detection of *Helicobacter pylori* in paraffin-embedded gastric biopsy specimens by in situ hybridization. *Am J Clin Pathol.* Sep;106(3):305-11.
- Lam TT, Nguyen TP, Montgomery RR, Kantor FS, Fikrig E, Flavell RA. (1994) Outer surface proteins E and F of *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease. *Infect Immun.* Jan;62(1):290-8.
- Licht TR, Krogfelt KA, Cohen PS, Poulsen LK, Urbance J, Molin S. (1996) Role of lipopolysaccharide in colonization of the mouse intestine by *Salmonella typhimurium* studied by in situ hybridization. *Infect Immun.* Sep;64(9):3811-7.
- Marconi, R.T., Samuels, D.S., Garon, C.F. (1993). Transcriptional analysis and mapping of the *OspC* gene in Lyme disease spirochetes. *J Bacteriol.* 175, 926-932.
- Marconi, R. T.; Samuels, D. S.; Schwan, T. G.; Garon, C. F. (1993). Identification of a protein in several *Borrelia* species which is related to *OspC* of the Lyme disease spirochetes. *J. Clin. Microbiol.:* 31, 2577-2583 .
- Marconi, R.T., Sung, X.Y., Hughes, C.A.N., Carlyon, J. (1996). Molecular and evolutionary analyses of a variable series of genes in *Borrelia burgdorferi* that are related to *ospE* and *ospF*, comprise a gene family, and that share a common upstream homology box. *J bacteriol.* 178, 5615-5626.
- Marconi, R.T., Liveris, D., Schwartz, I. (1995). Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S 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.
- McNicol AM, Farquharson MA. (1997) In situ hybridization and its diagnostic applications in pathology. *J Pathol.* Jul;182(3):250-61. Review.
- Mehlhorn, H. *Grundriß der Parasitenkunde. Parasiten des Menschen und der Nutztiere.* (1989). Stuttgart, New York, Fischer Verlag, 292-300.

- Montgomery, R. R.; Malawista, S. E.; Feen, K. J. M.; Bockenstedt, L. K. (1996). Direct demonstration of antigenic substitution of *Borrelia burgdorferi* ex vivo: exploration of the paradox of the early immune response to outer surface proteins A and C in Lyme disease. *J. Exp. Med.*: 183, 261-269 .
- Moter, A., Leist, G., Rudolph, R., Schrank, U., Choi, B.K., Wagner, M., Göbel, U.B. (1998). Fluorescence in situ hybridization shows spatial distribution of as yet uncultured treponemes in biopsies from digital dermatitis lesions. *microbiol* 144, 2459-2467.
- Müller, H.E. (1989). Die Infektionserreger des Menschen: Klinik, Epidemiologie, Ökologie und Nomenklatur. Berlin, Springer, 342-343.
- Münchhoff, P., Wilske B., Preac-Mursic, V., Schierz, G. (1987). Antibodies against *Borrelia burgdorferi* in Bavarian forest workers. *Zbl Bakt Hyg A* 263, 412-419.
- Norris SJ, Carter CJ, Howell JK, Barbour AG. (1992) Low-passage-associated proteins of *Borrelia burgdorferi* B31: characterization and molecular cloning of OspD, a surface-exposed, plasmid-encoded lipoprotein. *Infect Immun.* Nov;60(11):4662-72.
- Paul, H., Gerth, H.J., Ackermann, R. (1986). Infectiousness for humans of *Ixodes ricinus* containing *Borrelia burgdorferi*. *Zbl Bakt Hyg A*, 263, 473-476.
- Pfister, H.W., Einhüpl, K.M., Wilske, B., Preac-Mursic, V. (1986). Bannwarth's syndrome and the enlarged neurological spectrum of arthropod-borne borreliosis. *Zbl Bakt Hyg A*, 263, 343-347.
- Piesmann, J. (1993). Dynamics of *Borrelia burgdorferi* transmission by nymphal *Ixodes dammini* ticks. *J Infect Dis.* 167, 1082- 1085
- Plasterk, R.H., Simon, M.I., Barbour, A.G. (1985). Transposition of structural genes to an expression sequence on a linear plasmid causes antigenic variation in the bacterium *Borrelia hermsii*. *Nature* 318. 257-263.
- Pohl-Koppe A., Kaunicnik A., Wilske B. (2001) Characterization of the cellular and humoral immune response to outer surface protein C and outer surface protein 17 in children with early disseminated Lyme borreliosis. *med Microbiol Immunol (Berl)*, 189: 193-200.
- Poulsen LK, Lan F, Kristensen CS, Hobolth P, Molin S, Kroghfelt KA. (1994) Spatial distribution of *Escherichia coli* in the mouse large intestine inferred from rRNA in situ hybridization. *Infect Immun.* Nov;62(11):5191-4.
- Preac-Mursic, V., Schierz, G., Pfister, H.-W., Einhüpl, K., Wilske, B., Weber, K. (1984). Isolierung einer Spirochäte aus Liquor cerebrospinalis bei der Meningoradiculitis- Bannwarth. *Münch Med Wschr.* 126, 275-276.
- Preac-Mursic, V., Wilske, B. und Schierz, G. (1986). European *Borrelia burgdorferi* isolates from human and ticks: culture conditions and antibiotic susceptibility. *Zbl. Bakt. Hyg. A* 263, 112-118.
- Preac-Mursic, V. und Wilske, B. (1992). Flexible Schraubenbakterien – Gattung *Borrelia*. In: Burkhardt, F. (Hrsg) *Mikrobiologische Diagnostik*. Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 289-295.
- Preac-Mursic, V. und 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., Wilke, B., Reinhardt, S. (1991). Culture of *Borrelia burgdorferi* on six solid media. *Eur J Microbiol Infect Dis* 10; 1076-1079.
- Restrepo, B.I., Kitten, T.N., Carter, C.J., Infante, D., Barbour, A.G. (1992). Subtelomeric expression regions of *Borrelia hermsii* linear plasmids are highly polymorphic. 6, 3299-3311.
- Ribeiro, J.M.C., Mather, T.N., Piesman, J., Spielman, A. (1987). Dissemination and salivary delivery of Lyme disease spirochetes in vector ticks (*Acari\_ Ixodae*). *J Med Entomol.* 24, 201-205.
- Riedl, H., Sixl, W., Nossek, J. (1973). Studien zur Synökologie des FSME- Virus in Österreich. *Ztschr ges Hyg.* 19, 733-737.
- Rijpkema, S.G, Molkenboer M.J., Schouls L.M., Jongejan F, Schellekens J.F., (1995). Simultaneous detection and genotyping of three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Dutch *Ixodes ricinus* ticks by characterization of the amplified intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA genes. *J. Clin. Microbiol.:* 33(12): 3091-5
- Robertson, J.; Guy, E.; Andrews, N.; Wilske, B.; Anda, P.; Granström, M.; Hauser, U.; Moosmann, Y.; Sambri, V.; Schellekens, J.; Stanek, G.; Gray, J. (2000). A european multicenter study of immunoblotting in serodiagnosis of Lyme borreliosis. *J. Clin. Microbiol.:* 38, 2097-2102.
- Roessler, D., Hauser U., Wilske, B. (1997). Heterogeneity of BmpA (p39) among european isolates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and influence of interspecies variability on serodiagnosis. *J Clin Microbiol* 35, 2752-2758.
- Roessler, D., Eiffert, H., Jauris-Heipke, S., Lehnert, G., Preac-Mursic, V., Teepe, J., Schlott, T., Soutschek, E., Wilske, B. (1995). Molecular and immunological characterization of the p83/100 protein of various *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains. *Med Microbiol Immunol.* 184, 23-32.
- Roessler, D., Vasiliu, V., Wilske B. (1996). Development of Osp A type specific PCR for characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *J Microbiol Methods*, 27, 102, Abstract 19.
- Rosa PA, Schwan T, Hogan D. Recombination between genes encoding major outer surface proteins A and B of *Borrelia burgdorferi*. *Mol Microbiol.* 1992 Oct;6(20):3031-40.
- 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.
- Schmutzhard, E., Stanek, G., Pleschett, M. et al. (1988). Infections following tickbites. Tick-born encephalitis and Lyme borreliosis – a prospective epidemiological study from Tyrol. *Infecton* 16, 269-272.
- Schmidt, B.L. (1997). PCR in laboratory diagnosis of human *Borrelia burgdorferi* infections. *Clin Microbiol Rev.* 10, 185-201.
- Stanek, G., Burger, I., Hirschl, A., Wewalka, G., Radda, A. (1986). *Borrelia* transfer by ticks during their life cycle. *Zbl Bakt Hyg A.* 263, 29-33
- Stanek, G., O'Connell, S., Cimmino, M., Aberer, E., Kristoferitsch, W., Granström, M., Guy, E., Gray, J. (1996). European Union concerted action on risk assessment in Lyme borreliosis: clinical

- case definitions for Lyme borreliosis. *Wien. Klin. Wochenschr.* 108/23, 741-747.
- 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., Piesmann, J. (2000). Temporal changes in outer surface proteins A and C of the Lyme disease-associated spirochete, *Borrelia burgdorferi*, during tick feeding. *Proc Natl Acad Sci. USA* 92:2909-2913.
- Steere, A.C., Malawista, S.E., Snyderman, D.R., Andiman, W.A.. (1976). A cluster of arthritis in children and adults in Lyme, Connecticut. *Arthritis Rheum.* 19, 824.
- Steere, A.C., Bartenhagen, N.H., Craft, J.E., Hutchinson, G.J., Newmann, J.H., Pachner, A.R., Rahn, D.W., Sigal, L.H., Taylor, E., Malawista, S.E. (1986). Clinical manifestations of Lyme disease. *Zbl Bakt Hyg A.* 263, 201-205.
- Steere, A.C., Bartenhagen, N.H., Craft, J.E., Hutchinson, G.J., Newmann, J.H., Rahn, D.W., Sigal, L.H., Spieler, P.N., Stenn, K.S., Malawista, S.E. (1983). The early clinical manifestations of Lyme disease. *Ann Intern Med.* 99, 76-82.
- Steere, A.C., Malawista, S.E., Bartenhagen, N.H., Spieler, P.N., Newman, J.H., Rahn, D.W., Hutchinson, G.J., Green, J., Snyderman, D.R., Taylor, E. (1984). The clinical spectrum of Lyme disease. *Yale J Biol Med.* 57, 3-10.
- 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., Malawista, S.E., Snyderman, D.R., Shope, R.E., Andiman, W.A., Ross, M.R., Steele, F.M. (1977). Lyme arthritis. An epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. *Arthritis Rheum.* 20, 7-17.
- 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. (1998). The Lyme Disease vaccine study group: Vaccination against Lyme Disease with recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface Lipoprotein A with adjuvant. *N Engl J Med.* 339, 209-215.
- Stoenner, H.G., Dodd, T., Larsen, C. (1982). Antigenic variation of *Borrelia hermsii*. *J. Exp. Med.* 156, 1297 – 1311.
- Trebesius K, Leitritz L, Adler K, Schubert S, Autenrieth IB, Heesemann J. (2000) Culture independent and rapid identification of bacterial pathogens in necrotising fasciitis and streptococcal toxic shock syndrome by fluorescence in situ hybridisation. *Med Microbiol Immunol.* Jun;188(4):169-75.
- Vasiliu, V., Herzer, P., Rössler, D., Lehnert, G., Wilske, B. (1998). Heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato demonstrated by an ospA-type-specific PCR in synovial fluid from patients with Lyme arthritis. *Med Microbiol Immunol* 187, 97-102.
- Wagner M, Assmus B, Hartmann A, Hutzler P, Amann R. (1994) In situ analysis of microbial consortia in activated sludge using fluorescently labelled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and confocal scanning laser microscopy. *J Microsc.* Dec;176(Pt 3):181-7.

- Weber, K., Burgdorfer, W. (Eds) (1993). Aspects of Lyme Borreliosis. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Weber, K., Puzik, A., Becker, T. (1983). Erythema migrans Krankheit. Dtsch Med Wschr. 108, 1182-1190.
- Weber, K. (1986). Remarks on the infectious disease caused by *Borrelia burgdorferi*. Zbl Bakt Hyg A, 263, 206-208.
- Will G, Jauris-Heipke S, Schwab E, Busch U, Rössler D, Soutschek E, Wilske B, Preac-Mursic V. (1995) Sequence analysis of *ospA* genes shows homogeneity within *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia afzelii* strains but reveals major subgroups within the *Borrelia garinii* species. Med Microbiol Immunol. Aug;184(2):73-80.
- Wilske, B., Fingerle, V., Herzer, P., Hofmann, A., Lehnert, G., Peters, H., Pfister, H-W, Preac-Music, V., Soutschek, E., Weber, K. (1993). Recombinant immunoblot in the serodiagnosis of Lyme borreliosis. Med Microbiol Immunol. 182, 255-270.
- Wilske, B., Preac-Mursic, V., Göbel, U.B. et al (1993). An Osp A serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and Osp A sequence analysis. J Clin Microbiol. 31, 340-350.
- Wilske, B., Preac-Music, V., Jauris, S., Hofmann, A., Pradel, I., Soutschek, E., Schwab, E., Will, G., Wanner, G. (1993). Immunological and molecular polymorphisms of OspC, an immunodominant major outer surface protein of *Borrelia burgdorferi*. Infect Immun 61, 2182-2191.
- Wilske, B., Fingerle, V., Preac-Mursic, V., Jauris-Heipke, S., Hofmann, A., Loy, H., Pfister, H-W., Rössler, D., Soutschek, E. (1994). Immunoblot using recombinant antigens derived from different genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Med Microbiol Immunol. 183, 43-59.
- Wilske, B., Jauris-Heipke, S., Lobentanzer, R., Pradel, I., Preac-Mursic, V., Roessler, D., Soutschek, E., Johnson, R.C. (1995). 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. (1995). Diagnostik der Lyme-Borreliose. Internist. 36, 114-119.
- Wilske, B., Busch, U., Eiffert, H., Fingerle, V., Pfister, H-W., Rössler, D., Preac-Mursic, V. (1996). 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. (1996). Immunological and molecular variability of osp A and osp C. Implications for *Borrelia* vaccine development. Infection 24, 208- 212
- Wilske, B., Preac-Mursic, V., Göbel, U.B., Graf, B., Jauris.Heipke, S., Soutschek, E., Schwab, E., Zumstein, G. (1993). 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., Schierz, G., Gueye, W., Herzer, P., Weber, K. (1988). Immunochemical analysis of the immune response in late manifestations of Lyme borreliosis. Zbl Bakt Hyg A 267, 549-558.

- Wilske, B., Preac-Music, V., Schierz, G., Kühlbeck, R., Barbour, A.G., Kramer, M. (1988). Antigenic variability of *Borrelia burgdorferi*. *Ann NY Academic Sci* 539, 126-143.
- Wilske, B., Preac-Mursic, V., Schierz, G., von Busch, K. (1986). Immunochemical and immunological analysis of *Borrelia burgdorferi* strains. *Zbl Bakt Hyg, A* 263, 92-102.
- Wilske, B., Steinhuber, R., Bergmeister, H., Fingerle, V., Schierz, G., Prea-Mursic, V., Vanek, E., Lorbeer, B. (1987). Lyme-Borreliose in Süddeutschland. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 112, 1730-1736.
- 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., Zöller, L., Brade, V., Eiffert, H., Göbel, U.B., Stanek, G. (1999). Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik (MIQ). *Lyme-Borreliose*. Urban & Fischer Verlag.
- Wilske, B., Preac-Mursic V, Schierz G, Kühbeck R, Barbour A G, Kramer M (1988). Antigenic variability of *Borrelia burgdorferi*, *Ann N Y Acad Sci* 539: 126-143
- Wilske, B. (2002). Microbiological diagnosis in Lyme borreliosis, *Int J Med Microbiol* 291 Suppl 33: 114-9.
- Wilske, B., Fingerle V. (2001). Patient with questionable Lyme borreliosis. Which laboratory parameters validate your clinical suspicion?, *MMW Fortschr Med* 144:29-32.
- Xiaohong Li, Roberts S. (1996). Vector competence of ixodic ticks (Acari) for *Borrelia burgdorferi* as determined with a capillary-feeding technique. *J Spir Dis*, 116-123.
- Yoshii A, Koji T, Ohsawa N, Nakane PK. (1995). In situ localization of ribosomal RNAs is a reliable reference for hybridizable RNA in tissue sections. *J Histochem Cytochem. Mar*;43(3):321-7.
- Zoeller, L., Burkhard, S., Schaefer, H. (1991). Validity of Western immunoblot band patterns in the serodiagnosis of Lyme borreliosis. *J Clin Microbiol.* 29, 174-182.
- Zoeller, L, Cremer J, Faulde M (1993). western blot as a tool in the diagnosis of lyme borreliosis. *Electrophoresis* 14:937-944

## Zusammenstellung der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACA	Acrodermatitis chronica atrophicans
AK	Antikörper
B. burgdorferi	Borrelia burgdorferi
BL	Borrelien- Lymphozytom
CBE	chronische Borrelien- Encephalomyelitis
d	Tag
ECM	Erythema chronicum migrans
ELISA	enzyme- linked- immunosorbent assay
EM	Erythema migrans
FISH	Fluoreszenz- In Situ Hybridisation
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSME	Frühsommer Meningoenzephalitis
h	Stunde
I	Ixodes
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IHA	indirekter Hämagglutinations Test
IFT	Immunfluoreszenztest
MG	Midgut
NB	Neuroborreliose
Osp	Outer surface protein
PCR	polymerase chain reaction
RH	Rheumafaktor
SDS- PAGE	Sodium- Dodecyl- Sulfat- Polyacrylamid- Gelelektrophorese
SS	sensu stricto
SL	sensu lato
SP	Speicheldrüse
Tab	Tabelle

## **Danksagung**

Hiermit möchte ich mich bei Frau Prof. Wilske für die Überlassung des Themas sowie der großzügigen Unterstützung mit Bildmaterial bedanken. Weiterhin möchte ich Herrn Dr. Fingerle für die gute Betreuung während des experimentellen Teils der Arbeit und für zahlreiche Vorschläge zur Gestaltung der Dissertationsschrift danken. Besonderen Anteil am Gelingen dieser Arbeit hatte auch Frau Lehnert, der ich für die unermüdliche Unterstützung während der Durchführung der Versuche herzlichst danken möchte. Auch allen anderen Mitarbeitern des Labors Prof. Wilske danke ich für ihre Hilfe.

Besonderer Dank gebührt auch meinem Ehemann, Herrn Dr. Lorenz Bott-Flügel, und meinem Vater, Herrn Dr. Jürgen Habermann, die mir bei der Durchsicht und Korrektur des Manuskripts halfen.

