

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik
im Dr. von Haunerschen Kinderspital
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

**Charakterisierung der zellulären und humoralen Immunantwort auf
VlsE im Vergleich zu anderen Borrelienproteinen bei Kindern mit
Lyme-Borreliose**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Felicitas Nagel
aus München
2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. A. Pohl-Koppe

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. D. Nothdurft
Priv. Doz. Dr. G. Rieder

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 12.10.2006

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Entstehung des Krankheitsbegriffes der Lyme-Borreliose.....	1
1.2	Der Erreger Borrelia burgdorferi.....	1
1.3	Epidemiologie.....	2
1.4	Klinische Stadien.....	3
1.4.1	Stadium I - Erythema migrans.....	3
1.4.2	Stadium II.....	3
1.4.3	Stadium III.....	6
1.5	Diagnostik.....	7
1.6	Therapie.....	9
1.7	Humorale Immunantwort auf B. burgdorferi.....	9
1.8	Zelluläre Immunantwort.....	11
1.8.1	T-Lymphozyten.....	11
1.8.2	T-Helferzellen (Th-Zellen).....	11
1.8.3	Zelluläre Immunantwort auf B. burgdorferi.....	12
2	FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG	14
3	MATERIAL UND METHODEN	15
3.1	Materialien.....	15
3.1.1	Antigene.....	15
3.1.2	Patienten und Kontrollgruppen.....	15
3.2	Methoden.....	17
3.2.1	Serologie.....	17
3.2.2	Lymphoproliferations Assays.....	17
3.2.3	IFN- γ Bestimmung nach Isolierung von PBMCs und Restimulation mit CD3 und CD28/CD49d.....	19
3.2.4	Zytokinbestimmung nach Isolierung von PBMCs und Restimulation mit PMA/Ionomycin.....	20
3.2.5	Statistische Analyse.....	21
3.2.6	Ethikvotum und Probandeneinwilligung.....	22
4	ERGEBNISSE	23
4.1	Serologische Untersuchungen zu B. burgdorferi bei Kindern mit Neuroborreliose und Lyme-Arthritis.....	23

4.1.1	EIA-Titer bei Kindern mit Neuroborreliose und Lyme-Arthritis bei Diagnosestellung und im Verlauf.....	23
4.1.2	Rekombinanter IgM und IgG Immunoblot bei Kindern mit Neuroborreliose und Lyme-Arthritis bei Diagnosestellung	24
4.1.3	Verlaufsbeobachtung der IgM Immunoblotbefunde für p41 und OspC bei Kindern mit Neuroborreliose.....	26
4.1.4	Humorale Immunantwort auf das rekombinante Borrelienprotein VlsE im zeitlichen Verlauf	28
4.2	Humorale und zelluläre Immunantwort auf B. burgdorferi und Tetanustoxoid im Kindes -und Erwachsenenalter.....	30
4.2.1	Humorale und zelluläre Immunantwort auf B. burgdorferi und die rekombinanten Proteine VlsE, OspC und Osp17 im Kindesalter.....	30
4.2.2	Humorale und zelluläre Immunantwort auf B. burgdorferi und die rekombinanten Proteine VlsE, OspC und Osp17 im Erwachsenenalter	36
4.2.3	Vergleich der Lymphoproliferation auf Tetanustoxoid zwischen Kindern und Erwachsenen.....	42
4.3	Verlaufsuntersuchungen zur humoralen und zellulären Immunantwort auf B. burgdorferi, die rekombinanten Proteine VlsE, OspC, Osp17 und Tetanustoxoid im Kindes- und Erwachsenenalter	43
4.3.1	Verlaufsuntersuchungen zur humoralen und zellulären Immunantwort auf B. burgdorferi und Tetanustoxoid im Kindesalter	43
4.3.2	Verlaufsuntersuchungen zur humoralen und zellulären Immunantwort auf die rekombinanten Borrelien-Proteine VlsE, OspC und Osp17 im Kindesalter	44
4.3.3	Erhaltene Lymphoproliferation bei ausbleibender Serokonversion im Verlauf der Erkrankung bei einem Kind mit Neuroborreliose	47
4.3.4	Verlaufsuntersuchungen zur Lymphoproliferation auf B. burgdorferi und die rekombinanten Borrelien-Proteine bei seronegativen pädiatrischen Patienten mit Erythema migrans	47
4.3.5	Verlaufsuntersuchungen zur humoralen und zellulären Immunantwort auf B. burgdorferi, die rekombinanten Proteine VlsE, OspC und Osp17 und Tetanustoxoid im Erwachsenenalter	48
4.4	Funktionelle Charakterisierung von borrelienreaktiven T-Zellen mittels Durchflusszytometrie (FACS).....	49

4.4.1	Zytokinsekretion nach Isolierung von PBMCs und Restimulation mit CD3 und CD28/CD49d.....	50
4.4.2	Zytokinsekretion nach Isolierung von PBMCs und Restimulation mit PMA/Ionomycin	51
5	DISKUSSION	56
5.1	Serologische Untersuchungen zu <i>B. burgdorferi</i> bei Kindern mit Neuroborreliose und Lyme-Arthritis.....	57
5.1.1	EIA Titer und rekombinanter IgM und IgG Immunoblot bei Kindern mit Neuroborreliose und Lyme-Arthritis.....	57
5.1.2	Humorale Immunantwort auf das rekombinante Borrelienprotein VlsE im zeitlichen Verlauf.....	59
5.2	Humorale und zelluläre Immunantwort auf <i>B. burgdorferi</i> im Kindes- und Erwachsenenalter.....	60
5.2.1	Humorale und zelluläre Immunreaktion auf <i>B. burgdorferi</i> und die rekombinanten Proteine VlsE, OspC und Osp17 im Kindesalter.....	60
5.2.2	Humorale und zelluläre Immunreaktion auf <i>B. burgdorferi</i> und die rekombinanten Proteine VlsE, OspC und Osp17 im Erwachsenenalter	63
5.2.3	Lymphoproliferation auf <i>B. burgdorferi</i> und auf rekombinante Borrelien-Proteine bei seronegativen pädiatrischen Patienten mit Erythema migrans65	
5.3	Verlaufsuntersuchungen zur humoralen und zellulären Immunantwort auf <i>B. burgdorferi</i> , die rekombinanten Proteine VlsE, OspC und Osp17 im Kindes- und Erwachsenenalter.....	65
5.4	Funktionelle Charakterisierung von borrelienreaktiven T-Zellen mittels Durchflusszytometrie (FACS).....	67
6	ZUSAMMENFASSUNG	69
7	LITERATURVERZEICHNIS	72
8	ANHANG TABELLEN	84
9	VERZEICHNISSE	90
9.1	Abkürzungen	90
9.2	Wichtige Lieferanten für den Laborbedarf	91
10	DANKSAGUNG	92
11	VERÖFFENTLICHUNGEN	93
12	LEBENS LAUF	94

1 EINLEITUNG

1.1 Entstehung des Krankheitsbegriffes der Lyme-Borreliose

Das Krankheitsbild der "Lyme-Arthritis" wurde 1976 erstmals von Allen Steere (Steere et al. 1976) beschrieben, nachdem in der kleinen Ortschaft Lyme in Connecticut/USA das gehäufte Auftreten von Arthritiden bei Kindern beobachtet wurde. Das klinische Spektrum des später als Lyme-Krankheit geprägten Begriffs wurde durch das Erkennen von Zusammenhängen zwischen der Arthritis und davor aufgetretenen Hauteffloreszenzen, kardialen und neurologischen Begleiterscheinungen erweitert.

Bereits seit Ende des vorletzten Jahrhunderts liegen Beschreibungen der klinischen Symptome der Lyme-Borreliose vor. So wurde das häufig am Anfang der Erkrankung stehende Erythema migrans (EM) bereits 1910 von Afzelius beschrieben (Afzelius 1910). Und auch schon Garin und Bujadoux (Garin C, Bujadoux 1922) und später Bannwarth (Bannwarth 1941) lieferten ausführliche Beschreibungen des neurologischen Symptomenkomplexes der Lyme-Borreliose. Auch das Krankheitsbild der Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA) fand bereits Beachtung bei den Dermatologen Herxheimer (1902) und Buchwald (1883). Als 1982 Willi Burgdorfer schließlich als Erreger eine Spirochäte identifizierte (Burgdorfer 1982), wurde diese zu Ehren ihres Entdeckers *Borrelia burgdorferi* (*B. burgdorferi*) benannt und der Begriff der Lyme-Borreliose entstand.

1.2 Der Erreger *Borrelia burgdorferi*

B. burgdorferi ist eine dünne, helixartig gewundene, sehr bewegliche Spirochäte, die nach Anfärbung mit Giemsa oder mit der Dunkelfeld- und Phasenkontrastmikroskopie optisch dargestellt werden kann. Kultiviert werden die Borrelien am besten bei 33°C in einem modifizierten Kelly Medium (Barbour 1984). Aufgrund genetischer Analysen wird der Erreger *B. burgdorferi* in drei verschiedene humanpathogene Spezies eingeteilt: *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii* und *B. afzelii* (Adam et al. 1991). Als Oberbegriff dient der Name *B. burgdorferi sensu lato*. Im Gegensatz zu anderen Bakterien besitzt *B. burgdorferi* ein lineares Chromosom

und lineare Plasmide (Barbour et al. 1986), die u.a. die Gene für die Oberflächenproteine, die so genannten outer surface proteine (Osp) OspA, OspB, OspC, OspD, OspE und OspF tragen. Desweiteren hat *B. burgdorferi* wie alle Spirochäten einen Protoplasma-Zylinder, der aus einer Zellmembran, Flagellen und einer äußeren Membran besteht. Die auf der äußeren Membran des Erregers gelegenen Oberflächenantigene sind genetisch und immunologisch heterogen (Wilske et al. 1992). Die Osp-Proteine kommen in genetisch unterschiedlichen Varianten vor, so dass der OspA Serotyp 1 *B. burgdorferi sensu stricto*, der OspA Serotyp 2 *B. afzelii* und die übrigen OspA Serotypen 3-7 *B. garinii* entsprechen (Wilske et al. 1993a). Möglicherweise sind die Unterschiede in der Virulenz und im Organotropismus der OspA Serovare die Erklärung für die unterschiedliche Klinik und Schwere der Infektion.

Wie OspA gilt auch OspC als wichtiges Antigen für eine Impfung (Preac-Mursic et al. 1992), wobei dieses Protein noch einer weit größeren Heterogenität unterliegt als OspA (Wilske et al. 1993b).

1.3 Epidemiologie

Nur die drei Stämme *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii* und *B. garinii* der zehn bisher beschriebenen gelten als humanpathogen. In Europa ist jeder dieser Stämme zu finden, wogegen in den USA nur *B. burgdorferi sensu stricto* nachgewiesen wird.

In Europa wird die Lyme-Borreliose hauptsächlich durch Zecken der Gattung *Ixodes ricinus*, in den USA durch die Gattung *Ixodes dammini* übertragen. Die Entwicklung der Zecke erfolgt in ein bis zwei Jahren, wobei drei Stadien durchlaufen werden. Diese drei Stadien - Larve - Nymphe - adulte Zecke - sind mit jeweils einer Blutmahlzeit verbunden. Zecken bevorzugen eine feuchte Umgebung und zeigen die höchste Stechaktivität bei 23°C-27°C. Das Infektionsrisiko mit *B. burgdorferi* steigt mit zunehmender Dauer des Saugaktes stetig an. Da die Durchseuchung der Zecken mit *B. burgdorferi* regional sehr unterschiedlich ist, ist demnach auch das Vorkommen der Lyme-Borreliose unregelmässig. Die Durchseuchung beträgt in manchen Regionen bis zu 30%, die geschätzte Serokonversion nach einem Stich durch eine infizierte Zecke jedoch nur 10-20%. Die Häufigkeit des Auftretens klinischer Manifestationen nach Serokonversion ist sehr gering, lediglich 2-4% der Patienten entwickeln klinische Symptome (DGPI 2003). Ein Durchseuchungstiter wird

bei Risikogruppen wie Waldarbeitern oder Jägern in bis zu 30% nachgewiesen. Die jahreszeitliche Verteilung der akuten Lyme-Borreliose (Erythema migrans, Lymphozytom, Neuroborreliose) ist aufgrund der höheren Stechaktivität der Zecken vor allem im Frühjahr und im Herbst zu beobachten, während die chronischen Formen (Arthritis, Acrodermatitis) zu jeder Jahreszeit auftreten.

1.4 Klinische Stadien

1.4.1 Stadium I - Erythema migrans

Das Erythema migrans ist mit 70-80% der Erkrankungsfälle mit Abstand das am häufigsten auftretende Symptom der Lyme-Borreliose. Es gilt als das lokale Leitsymptom im Frühstadium der Krankheit und tritt meist mit einer Latenz von ein bis drei Wochen auf. Typisch ist die scheibenförmige, bisweilen livide Rötung um den Zeckenstich, die sich zentrifugal ausbreitet und zentral abblasst. Die Rötung ist in der Regel weder schmerzhaft noch juckend. Aufgrund der anästhesierenden Wirkung des Zeckenspeichels bleiben Zeckenstiche häufig unbemerkt. Meist äußert sich das Erythema migrans monosymptomatisch, Allgemeinsymptome wie Fieber oder Kopfschmerzen treten selten auf. Während bei Erwachsenen hauptsächlich die unteren Extremitäten betroffen sind, tritt das Erythema migrans bei Kindern meist im Kopf, -und Halsbereich auf (Christen et al. 1993). Rezidive an der gleichen Körperstelle oder an anderen Bereichen sind ebenso wie Spontanremissionen beschrieben worden. Selten kommt es zur Ausbildung multipler Erythema migrans, die dann bereits zum Stadium II der Lyme-Borreliose gerechnet werden (Schwarzenbach und Djawari 1999).

1.4.2 Stadium II

Wird das Erythema migrans nicht adäquat behandelt oder übersehen, so kann sich nach einer Inkubationszeit von Tagen bis Wochen eine systemische Infektion entwickeln. Diese kann das Herz, die Haut oder das Nervensystem betreffen.

1.4.2.1 Borrelien-Lymphozytom

Eine wesentlich seltenere Hautmanifestation der Lyme-Borreliose als das Erythema migrans ist das Borrelien-Lymphozytom. Es entsteht als reaktives lymphozytäres Infiltrat und erscheint makroskopisch als gerötete derbe Hautverdickung an den Prädilektionsstellen Ohrläppchen oder Ohrmuschel, Mamille und Skrotum. Im Gegensatz zum Erythema migrans bildet sich das Borrelien-Lymphozytom trotz antibiotischer Therapie häufig nur sehr zögerlich über Wochen bis Monaten zurück. Bisweilen kann die Effluoreszenz juckend oder schmerzhaft sein, teilweise wird ein pelziges Gefühl beschrieben (Weber et al. 1985).

1.4.2.2 Neuroborreliose

Die neurologischen Manifestationen der akuten Lyme-Borreliose beinhalten vor allem die ein- oder beidseitige Fazialisparese (FP), die lymphozytäre Meningoradikulitis Bannwarth und die aseptische Meningitis. Für gewöhnlich treten diese Symptome einige Wochen nach der Infektion auf. Die häufigste Manifestation der Neuroborreliose im Kindesalter ist die akute periphere Fazialisparese mit einem Anteil von 55%, gefolgt von der aseptischen Meningitis mit 27%. Aufgrund der kurzen Inkubationszeit der Neuroborreliose tritt sie vorwiegend in den Sommer- und Herbstmonaten auf und nahezu jede zweite Erkrankung an einer akuten peripheren Fazialisparese im Kindesalter ist auf eine Infektion mit *B. burgdorferi* zurückzuführen. Die zweithäufigste Manifestation der Neuroborreliose im Kindesalter, die aseptische Meningitis, geht mit unspezifischen Allgemeinsymptomen, wie deutlich reduziertem Allgemeinbefinden, rezidivierenden Kopfschmerzen bei nur diskreter meningealer Reizsymptomatik und einer ausgeprägten Inappetenz einher. Fieber und Erbrechen als typische Meningitissymptome sind seltener anzutreffen als bei einer Meningitis viraler Genese, jedoch dennoch zu häufig, als dass sie differenzialdiagnostisch einen entscheidenden Hinweis geben würden (Christen et al. 1993). Im Gegensatz dazu ist das häufigste Erscheinungsbild der Neuroborreliose im Erwachsenenalter die lymphozytäre Meningoradikuloneuritis mit Beteiligung des peripheren Nervensystems (Bannwarth-Syndrom). Dieses Syndrom ist vor allem durch nächtliche, in die Extremitäten ausstrahlende, brennende Rückenschmerzen gekennzeichnet. Selten

kommt es zu isolierten Trochlearis, -Okulomotorius, -und Abduzenspareisen; auch das Guillain-Barré Syndrom, die akute Querschnittsmyelitis, die akute zerebelläre Ataxie und bleibende chronische Kopfschmerzen gehören zu den sehr seltenen Manifestationen der Neuroborreliose (Kaiser 1998a).

1.4.2.3 Lyme-Arthritis

Der typische Verlauf der Lyme-Arthritis im frühen Stadium ist durch eine akute Mon- oder Oligoarthritis mit intermittierendem Verlauf gekennzeichnet. Während schmerzhafteste Bewegungseinschränkungen eher gering ausgeprägt sind, kommt es doch zu einer deutlichen Schwellung und Ergussbildung vor allem der großen Gelenke. Das Kniegelenk ist dabei mit 70%, gefolgt von Knöchel mit 36% und Ellbogengelenk mit 28% weitaus am häufigsten betroffen (Williams et al. 1990). Im Gegensatz zu den USA, wo sich die Lyme-Borreliose zu 60% als Lyme-Arthritis äußert, erkranken in Europa lediglich 8% der Erwachsenen und 3-5% der infizierten Kinder (Herzer et al. 1986, Christen et al. 1993). Die Häufigkeit aus einer akuten Lyme-Arthritis eine chronische Arthritis zu entwickeln, wird mit 10% angegeben (Steere et al. 1979) und zieht dann immer wiederkehrende Gelenkschwellungen und Schmerzen mit teils irreversiblen Gelenkveränderungen nach sich.

1.4.2.4 Seltene Manifestationen der Lyme-Borreliose

Die im Vergleich zu anderen Organmanifestationen seltene Herzbeteiligung wird mit ca. 8% angegeben. Diese äußert sich vor allem in Herzrhythmusstörungen in Form von atrioventrikulären Reizleitungsstörungen. Aber auch über Perikarditiden und Myokarditiden wird berichtet (Steere et al. 1980). Selten wurde in Kasuistiken über ophthalmologische Manifestationen wie Uveitis, Optikusneuritis und Chorioretinitis berichtet. In Einzelfällen wurde eine Myositis als führendes Leitsymptom einer Lyme-Borreliose beobachtet (Christen et al. 1993).

1.4.3 Stadium III

Zum Stadium III der Lyme-Borreliose zählen die Acrodermatitis chronica atrophicans, die chronische Lyme-Arthritis, sowie die sehr seltene chronische Enzephalomyelitis. Die chronischen Verlaufsformen betreffen fast ausschließlich Erwachsene, bei Kindern werden die Spätmanifestationen sehr selten gesehen (Gerber et al. 1996).

1.4.3.1 Acrodermatitis chronica atrophicans

Klinisch imponieren vor allem an den Akren und an der Haut über den großen Gelenken nach einem initial infiltrativen Stadium die charakteristischen Veränderungen des atrophischen Stadiums: zigarettenpapierähnliche gefältelte Haut und bräunlich-livide Erytheme. Häufig ist die Acrodermatitis chronica atrophicans mit einer Polyneuropathie in Form einer Mononeuritis multiplex vergesellschaftet (Christen et al. 1993).

1.4.3.2 Chronische Lyme-Arthritis

Ungefähr 10% der akuten intermittierenden Arthritiden nach Infektion mit *B. burgdorferi* gehen in eine chronische Verlaufsform über (Steere et al. 1979). Diese ist durch immer wiederkehrende Gelenkentzündungen mit massiven Schwellungen und Ergußbildung über einen Zeitraum länger als ein Jahr definiert (Steere et al. 1987). Röntgenologisch lassen sich die Zeichen einer chronisch erosiven Arthritis mit Gelenkspaltverschmälerung, periartikulärer Osteoporose und Knochenerosionen nachweisen, die letztendlich zu wesentlichen funktionellen Defiziten führen können.

1.4.3.3 Chronische Neuroborreliose

Die chronisch progrediente Borrelienzephalomyelitis ist eine sehr seltene Manifestation der Lyme-Borreliose im Stadium III. Sie tritt mit einer Inkubationszeit von vielen Monaten bis Jahren auf und imponiert klinisch hauptsächlich durch spastische Para -und Tetraparesen. Sie kann in ihrer klinischen Verlaufsform der multiplen Sklerose sehr ähnlich sein, weshalb als Diagnosekriterium unbedingt der

Nachweis von erregerspezifischen Antikörpern gegen *B. burgdorferi* im Liquor erfolgen muss (Ackermann et al. 1985). Desweiteren ist der typische Liquorbefund durch eine deutliche Proteinerhöhung (>100mg/dl) bei mäßiggradiger Liquorzellzahlerhöhung (>100/3 Zellen/ μ l) gekennzeichnet.

1.5 Diagnostik

Die Diagnose der Lyme-Borreliose besteht vor allem aus dem klinischen Erscheinungsbild, dem Nachweis spezifischer Antikörper gegen *B. burgdorferi* und den anamnestischen Angaben des Patienten. Jedem der genannten Unterpunkte der Diagnostik wird je nach Früh -oder Spätmanifestation ein unterschiedlicher Stellenwert zugeordnet. So schließt beispielsweise eine negative Anamnese bezüglich eines Zeckenstiches eine Borreliose nicht aus. Auch ist ein negativer serologischer Befund beim Erythema migrans vorsichtig zu bewerten, denn nur bei 20-50% der Erythema migrans Patienten ist die Serologie positiv (Wilske et al. 1991). Da das klinische Erscheinungsbild der dermatologischen Manifestationen sehr charakteristisch ist, kann die Diagnose meistens klinisch gestellt werden. Dazu im Gegensatz stehen die neurologischen Symptome oder die Gelenkmanifestationen der Lyme-Borreliose, die sehr unspezifisch sind und deshalb eine erregerspezifische Diagnostik verlangen (Christen et al. 1993). Im Stadium II weisen 70-90% der Patienten Antikörper gegen *B. burgdorferi* auf, bei kurzer Krankheitsdauer überwiegen Antikörper vom IgM Typ, bei längerer Krankheitsdauer vom IgG Typ. Patienten im Stadium III der Lyme-Borreliose sind zu 90-100% seropositiv und haben in der Regel nur noch Antikörper vom IgG Typ. Ein isolierter IgM Befund spricht also gegen eine Lyme-Borreliose im Stadium III.

Der direkte mikroskopische und kulturelle Nachweis ist möglich, aber durch geringe Keimzahlen im Untersuchungsmaterial und durch die lange Generationszeit von *B. burgdorferi* für die Routinediagnostik ungeeignet, zumal es gerade bei Stadium I und II Manifestationen auf eine frühzeitige antibiotische Behandlung ankommt. In solchen Fällen bietet die PCR (polymerase-chain-reaction) eine zwar teure, aber schnelle erregerspezifische Diagnostik. So gelingt der Erregernachweis aus der Haut bei Erythema migrans oder Acrodermatitis chronica atrophicans mit Kultur oder PCR zu 50-70%, während bei Neuroborreliose Borrelien nur zu 10-20% mittels Kultur oder

PCR aus dem Liquor nachgewiesen werden können (Wilske et al. 1991, Christen et al. 1995). Bei einem Gelenkpunktat eines Patienten mit Lyme-Arthritis weist die PCR Erfolgsraten von 50-70% auf, die Kultur hingegen ist extrem selten positiv (Wilske et al. 1997).

Die Routinediagnostik der Lyme-Borreliose basiert auf dem Nachweis von spezifisch gegen *B. burgdorferi* gerichteten IgG und IgM Antikörpern. Die Antikörper vom IgM Typ beginnen ca. zwei bis vier Wochen nach der Primärinfektion anzusteigen und erreichen ihr Maximum nach sechs bis acht Wochen, die IgG Antikörper sind erst nach vier bis sechs Wochen nachweisbar (Christen et al. 1993). Antikörper können sowohl in Blut, Liquor als auch in Gelenkpunktat nachgewiesen werden. Dafür werden hauptsächlich der EIA, der Immunfluoreszenztest und der Immunoblot eingesetzt (Wilske et al. 1993c). Mittels des Immunoblots ist es möglich, spezifische Antikörper gegen verschiedene Proteine der Borrelien nachzuweisen. Jedoch sind die verschiedenen Verfahren in den unterschiedlichen Laboratorien nicht standardisiert und somit nicht vergleichbar. Ein weiteres Problem in der serologischen Diagnostik sind kreuzreagierende Antikörper im EIA, die z.B. sowohl bei akuten viralen Infektionen wie Epstein-Barr oder Varizella-Zoster Infektionen als auch bei *Treponema pallidum* auftreten. Ebenso können unspezifische Rheumafaktoren Kreuzreaktionen hervorrufen. Auch muß bei der Bewertung der serologischen Befunde die hohe Durchseuchungsrate mit *B. burgdorferi* von bis zu 30% bei Risikogruppen wie Waldarbeitern oder Jägern, und bis zu 5% bei Schulkindern beachtet werden. Mit zunehmendem Alter steigt die Prävalenz borrelienspezifischer Antikörper an (Christen et al. 1993).

Einen besonderen Stellenwert bei der Neuroborreliose hat die Untersuchung des Liquors. Diagnostisch bedeutsam ist hier die Bestimmung des erregerspezifischen Liquor/Serum Index. Ein Faktor >2 spricht für eine intrathekale Borrelienspezifische Antikörperproduktion und ist beweisend für eine Neuroborreliose, gelingt jedoch nur in 50-70% der Fälle (Steere et al. 1990a, Wilske et al. 1991). Desweiteren ist der Liquor bei einer Neuroborreliose bis auf wenige Ausnahmen im Sinne einer lymphozytären Pleozytose entzündlich verändert, was jedoch keine Unterscheidung zu einer Meningitis viraler Genese erlaubt (Christen et al. 1993). Andere unspezifische Entzündungsparameter wie die Leukozytenzahl, das Differentialblutbild, die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit und das C-reaktive

Protein sind bei der Lyme-Borreliose nicht oder nur geringfügig pathologisch verändert.

1.6 Therapie

Grundsätzlich muß jede Manifestation der Lyme-Borreliose antibiotisch behandelt werden um Spätmanifestationen zu vermeiden. Dosierung, Dauer, Antibiotikum und Art der Applikation richten sich nach dem klinischen Bild und dem Stadium der Erkrankung. In der Pädiatrie wird entsprechend den Richtlinien der deutschen Gesellschaft für pädiatrische Infektiologie (Hobusch et al. 1999) und bei den Erwachsenen entsprechend der Konsensuskonferenz vom 19.3.1998 (Kaiser 1998b) therapiert.

1.7 Humorale Immunantwort auf *B. burgdorferi*

Als sehr wichtiges und interessantes Protein in der Serodiagnostik der Lyme-Borreliose gilt das kürzlich entdeckte variable Oberflächenprotein (VlsE) von *B. burgdorferi*, das von den Borrelien nur in vivo exprimiert wird. Das VlsE enthält eine invariable immunodominante Region, genannt IR₆ (Liang et al. 1999a), die sich während der verschiedenen Antigenvariationen nicht verändert (Zhang et al. 1997). Diese Sequenz ist sehr immunogen und ruft in experimentellen Tierversuchen mit infizierten Affen und Mäusen eine frühe, starke und anhaltende Antikörperantwort auf ein synthetisch hergestelltes Peptid namens C₆, das der IR₆ Sequenz des VlsE entspricht, hervor (Liang et al. 2000, Liang et al. 1999b). Dabei ergaben sich keine Unterschiede, ob die Tiere mit *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii* oder *B. garinii* Stämmen infiziert waren. Auch für humanes Serum konnten diese Angaben bestätigt werden: 83% der europäischen Patienten mit einem in der Kultur bestätigten Erythema migrans und 95% der europäischen Patienten mit einer histologisch gesicherten Acrodermatitis chronica atrophicans zeigten Antikörper gegen IR₆ (Liang et al. 2000). Der Nachweis von *Borrelia burgdorferi* bei diesen europäischen Patienten ergab, dass diese entweder mit *B. garinii* oder *B. afzelii* Stämmen infiziert waren (Liang et al. 2000). Dieselben Beobachtungen ergaben sich in Nordamerika, wo die Lyme-Borreliose fast ausnahmslos durch *B. burgdorferi sensu stricto*

hervorgerufen wird, so dass angenommen werden kann, dass die immunodominante IR₆ Sequenz von allen *B. burgdorferi* Stämmen exprimiert wird (Liang et al. 1999a, Liang et al. 1999b). Der IR₆ EIA zeigt keine Kreuzreaktionen mit anderen Borrelienproteinen wie den heat-shock Proteinen (Luft 1991) oder dem Flagellin, die auch bei anderen Spirochäten wie *B. hermsii* und *Treponema pallidum* nachgewiesen werden können (Barbour 1986), und einem unspezifischen 60-kDa Antigen, das viele Bakterien besitzen (Hansen 1988). Diese Beobachtung könnte ein einheitliches serologisches Testverfahren der Lyme-Borreliose basierend auf dem C₆ Peptid ermöglichen (Liang et al. 2000).

Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass der IR₆ Titer nach erfolgreicher Antibiotikatherapie signifikant sinkt, während er bei unbehandelten oder erfolglosen Therapien konstant bleibt. Daraus könnte ein Test entwickelt werden um den Therapieerfolg und die Heilung nach einer *B. burgdorferi* Infektion beurteilen zu können (Philipp et al. 2001).

Zu den weiteren wesentlichen immunodominanten Proteinen gehören die Oberflächenproteine OspA, OspB, OspC, Osp17 und das Membranprotein p39. *B. burgdorferi* verändert das Muster der Proteinexpression während der unterschiedlichen Entwicklungsphasen in der Zecke. So exprimiert *B. burgdorferi* in der nüchternen Zecke ausschließlich OspA. Die Blutmahlzeit induziert die Expression von OspC und reguliert die Expression von OspA herunter (Fingerle et al. 1998, Schwan et al. 2000). Die Infektion erfolgt daher mit OspC exprimierenden Borrelien. Dieses Phänomen erklärt auch die Tatsache, dass die humorale Immunantwort im frühen Stadium der Lyme-Borreliose zunächst gegen OspC und nicht gegen OspA gerichtet ist (Fung et al. 1994, Hauser et al. 1997, Wilske et al. 1993c, Wilske et al. 1994). Im Gegensatz dazu wird unter Kulturbedingungen vorwiegend OspA exprimiert. Die direkte Injektion von solchen OspA exprimierenden *B. burgdorferi* Spirochäten in Versuchstiere erzeugt daher eine starke humorale Antwort gegen OspA (Gern et al. 1993, Roehrig et al. 1992). Das Oberflächenprotein Osp17 ist ein Antigen, gegen das fast ausschließlich im Stadium III, selten bereits im Stadium II der Lyme-Borreliose spezifische Antikörper nachgewiesen werden können (Hauser et al. 1997, Wilske et al. 1999). Es scheint sich also um ein Antigen zu handeln, das erst im Laufe der Infektion hochreguliert wird (Hauser et al. 1997, Pohl-Koppe et al. 2001). Ein weiteres wichtiges Antigen ist das Membranprotein p39, gegen das jedoch

auch erst in späteren Krankheitsstadien der Lyme-Borreliose Antikörper gebildet werden (Simpson et al. 1990).

1.8 Zelluläre Immunantwort

Obwohl in Tierversuchen der protektive Effekt von spezifisch gegen *B. burgdorferi* gerichteten Antikörpern bewiesen werden konnte (Barthold 1996, Schaible 1990), entwickeln sich trotz signifikant hoher Antikörpertiter systemische Manifestationen der Lyme-Borreliose. Dies spricht dafür, dass die zelluläre Immunantwort eine große Rolle bei der Entwicklung von chronischen Stadien der Lyme-Borreliose spielt.

1.8.1 T-Lymphozyten

Die Unterteilung der T-Lymphozyten erfolgt zum einen in zytotoxische T-Zellen und zum anderen in T-Helferzellen. Dabei steuert bei den T-Helferzellen der Korezeptor CD4 die Bindung des T-Zellrezeptors an den Komplex aus Antigenpeptid und MHC Klasse II Molekül, während bei den zytotoxischen T-Zellen das Oberflächenmolekül CD8 die Bindung an den Antigenpeptid -und MHC Klasse I Komplex ermöglicht. Die Aktivierung der T-Zelle nach Bindung des Antigenpeptid/MHC-Komplexes an den T-Zellrezeptor erfolgt schließlich durch den Molekülkomplex CD3 und weitere signalübertragende Moleküle. Ungefähr 65% der T-Zellen im peripheren Blut sind CD4+CD8- und 35% CD8+CD4-.

1.8.2 T-Helferzellen (Th-Zellen)

Die Differenzierung aus naiven T-Helferzellen (Th-0) in Th-1 bzw. Th-2 Zellen erfolgt durch Stimulation ihres T-Zellrezeptors und ist abhängig von kostimulatorischen Signalen und den sich in ihrer unmittelbaren Umgebung befindlichen Zytokinen (Kamogawa et al. 1993, Seder und Paul 1994). So fördert IL-12 die Bildung von Th-1 Zellen, während IL-4 die Bildung von Th-2 Zellen anregt. Die Th-Zellen sind desweiteren durch eine unterschiedliche Zytokinproduktion charakterisiert. So produzieren Th-0 Zellen IL-2, IFN- γ , IL-4 und IL-5, während Th-1 Zellen durch die

Produktion von den proinflammatorischen Zytokinen wie IFN- γ und Th-2 Zellen durch die Produktion von den antiinflammatorischen Zytokinen IL-4 und IL-5 charakterisiert sind. Demnach haben die Th-Subpopulationen auch unterschiedliche biologische Aktivitäten: So fördern die Th-1 Zellen über IFN- γ die Aktivierung von Makrophagen und über IL-2 die Synthese von IgM und IgG₂ durch B-Zellen. Th-2 Zellen fördern über IL-5 die Aktivität eosinophiler Granulozyten und stimulieren über IL-4 die IgG₁ und IgE Produktion durch Plasmazellen. Th-1 Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Abwehr viraler und bakterieller Infektionen, während Allergene und parasitäre Infektionen eine deutliche Th-2 Zytokinantwort hervorrufen (Kramer 1997).

1.8.3 Zelluläre Immunantwort auf *B. burgdorferi*

Da die zelluläre Immunantwort auf *B. burgdorferi* bei der Pathogenese der Lyme-Borreliose vermutlich eine große Rolle spielt, wurden von verschiedenen Autoren Untersuchungen zur Lymphoproliferation auf unterschiedliche Borrelienproteine gemacht. Dazu wurden die PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) mit unterschiedlichen Borrelienantigenen fünf Tage stimuliert und anschließend die Proliferation anhand der ³H-Thymidininkorporation bestimmt (Yoshinari et al. 1991, Dressler et al. 1991, Dattwyler et al. 1988). Eine erhöhte zelluläre Reaktivität gegenüber ganzen *B. burgdorferi* Spirochäten gemessen an der Lymphoproliferation oder an der Reaktivität von T-Zelllinien wurde bei erwachsenen Patienten mit unterschiedlichen Hautmanifestationen, Neuroborreliose oder Lyme-Arthritis (Buchner et al. 1987, Buchner et al. 1995, Pohl-Koppe et al. 1998, Yoshinari et al. 1991), wie auch bei Kindern mit Lyme-Arthritis (Huppertz et al. 1996) beschrieben. Jedoch konnte auch besonders bei erwachsenen seronegativen Kontrollpatienten teilweise eine schwache Lymphoproliferation auf die Lysatantigene nachgewiesen werden (Pohl-Koppe et al. 2001, Roessner et al. 1994, Zoschke et al. 1991). Dies könnte durch die Verwendung von ganzen oder sonifizierten Borrelienspirochäten erklärt werden, die bestimmte Antigene wie z.B. heat shock Proteine enthalten und somit eine Kreuzreaktivität mit den Antigenen anderer Bakterien hervorrufen können (Hansen et al. 1988).

Daraufhin wurden Untersuchungen zur Lymphoproliferation auf unterschiedliche einzelne Borrelienantigene wie OspA, OspB, p41, p55/58 und p66 bei erwachsenen

Patienten mit Lyme-Arthritis durchgeführt (Kamradt et al. 1996, Krause et al. 1992, Lengl-Janssen et al. 1994, Yoshinari et al. 1991). So wurde beschrieben, dass OspA und Flagellin zwar im Frühstadium der Lyme-Borreliose einen signifikanten Unterschied in der Lymphoproliferation gegenüber Kontrollgruppen zeigen, jedoch im Spätstadium der Erkrankung keine Unterschiede mehr festzustellen sind (Krause et al. 1992).

Auch wurden Untersuchungen zu den beiden rekombinanten Proteinen OspC und Osp17 bei Kindern mit akuter systemischer Lyme-Borreliose gemacht (Pohl-Koppe et al. 2001). Hierbei scheint das outer surface protein C (OspC) eine wichtige Rolle in der zellulären Abwehr zu spielen, denn selbst 75% der Lyme Patienten ohne nachgewiesene Antikörper gegen OspC zeigten eine signifikante Lymphoproliferation auf OspC. 91% der Patienten mit nachgewiesenen Antikörpern gegen OspC zeigten ebenfalls eine signifikante Lymphoproliferation (Pohl-Koppe et al. 2001). Die Lymphoproliferative Antwort auf Osp17 bei Kindern im Frühstadium der Lyme-Borreliose erwies sich als sehr schwach (Pohl-Koppe et al. 2001).

Versuche, die zelluläre Immunantwort auf bestimmte Borrelienproteine mit den unterschiedlichen Manifestationen der Lyme-Borreliose in Verbindung zu bringen haben bisher keine schlüssigen Ergebnisse erbracht. In welchem Ausmaß die zelluläre Immunantwort auf verschiedene Borrelienproteine in Korrelation zur humoralen Immunantwort gesetzt werden kann, wurde noch nicht ausreichend untersucht.

2 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Da die Infektion mit *B. burgdorferi* trotz einer ausgeprägten humoralen Immunantwort zu schweren chronischen Verläufen führen kann, scheint die zelluläre Immunantwort bei der Pathogenese der Lyme-Borreliose eine große Rolle zu spielen. Im Gegensatz zu anderen Infektionen kann jedoch, besonders bei frühzeitiger antibiotischer Therapie die humorale Immunantwort auch ausbleiben. Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand das variable Oberflächenprotein VlsE, ein kürzlich identifiziertes, stark immundominantes Protein auf der Borrelienoberfläche, das sowohl eine starke B-Zell als auch eine starke T-Zell Reaktion hervorruft. Ziel dieser Arbeit war es sowohl die zelluläre als auch die humorale Immunantwort auf VlsE im Vergleich zu bereits beschriebenen Oberflächenproteinen wie OspC und Osp17 bei pädiatrischen und adulten Patienten mit Lyme-Borreliose in allen Stadien der Erkrankung zu charakterisieren. Zu diesem Zwecke wurden sowohl serologische als auch Untersuchungen zur Lymphoproliferation bezüglich der unterschiedlichen Oberflächenproteine von *B. burgdorferi* durchgeführt. Da es Hinweise gibt, dass an der chronischen Borrelieninfektion sowohl proinflammatorische als auch antiinflammatorische Zytokine beteiligt sind, wurden Untersuchungen mittels Durchflusszytometrie etabliert, um die T-zelluläre Immunreaktion - sowohl in Frühstadien als auch in Spätstadien der Lyme-Borreliose - funktionell zu charakterisieren.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Materialien

Für alle Versuche wurde heparinisieretes Vollblut verwendet.

3.1.1 Antigene

Die rekombinanten Proteine OspC, Osp17, p39 und VlsE, sowie sonifiziertes Bakterienlysat von ganzen *B. burgdorferi* Bakterien, Spezies *B. afzelii*, Stamm PKo, und *B. garinii*, Stamm PBi, wurden freundlicherweise von Frau Prof. Dr. B. Wilske, Max-von-Pettenkofer-Institut, München, zur Verfügung gestellt. Die rekombinanten Proteine wurden alle aus *B. afzelii* vom Stamm pKo hergestellt, waren endotoxinfrei und wurden in folgenden Konzentrationen verwendet: OspC (Klon 1207) 1,47 mg/ml bzw. 2 mg/ml und 3 mg/ml, Osp17 (Klon 1107) 1,48 mg/ml bzw. 2,8 mg/ml, p39 (Klon 1611) 0,75 mg/ml und VlsE zu 3 mg/ml. Desweiteren stand OspC auch aus *B. garinii* (Stamm pBi) generiert (Klon 3206) in einer Konzentration von 2 mg/ml bzw. 3,1mg/ml zur Verfügung. Tetanustoxoid (TT) wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Hungerer, Firma Chiron-Behring, Marburg, in einer Konzentration von 2.050 bzw. 3.950 LF/ml zur Verfügung gestellt.

3.1.2 Patienten und Kontrollgruppen

Im Zeitraum von 1995 bis 2003 wurden 59 Patienten mit Lyme-Borreliose, die im Dr. von Haunerschen Kinderspital der Ludwig-Maximilians-Universität München behandelt wurden, in die Studie eingeschlossen. Im Rahmen der Blutentnahme für diagnostische Zwecke wurde -bei den Kindern nach Einwilligung der Eltern- zusätzlich zwischen drei und zehn ml heparinisieretes Vollblut zur Untersuchung der zellulären Immunreaktion gegen *B. burgdorferi* entnommen. Desweiteren wurden acht adulte Patienten mit chronischer Lyme-Borreliose untersucht. Die Blutproben der erwachsenen Patienten wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Herzer, niedergelassener Rheumatologe in München, zur Verfügung gestellt.

Ein- bzw. Ausschlusskriterien

Stadium I: Die Diagnose eines Erythema migrans wurde aufgrund des klinischen Erscheinungsbildes gestellt. Positive IgM und/oder IgG Titer im Serum konnten vorhanden sein, waren jedoch für die Diagnosestellung nicht notwendig.

Stadium II: Wie beim Erythema migrans war auch beim Borrelien-Lymphozytom die klinische Diagnose ausreichend. Die Diagnose einer Neuroborreliose wurde gestellt, wenn neben der typischen klinischen Symptomatik eine Liquorpleozytose (>4 Zellen/ μ l) kombiniert mit einer intrathekalen borrelienspezifischen IgM oder IgG Antikörpersynthese und/oder borrelienspezifischen IgM Antikörpern im Serum vorlag. Als wahrscheinlich galt die Diagnose einer Neuroborreliose, wenn zwar keine Liquorpleozytose, jedoch borrelienspezifische Antikörper im Liquor nachgewiesen werden konnten. Bei einem unauffälligen Liquorbefund und positiven borrelienspezifischen IgG und/oder IgM Antikörpern galt die Diagnose einer Neuroborreliose als möglich.

Stadium III: Für die Diagnose einer Acrodermatitis chronica atrophicans oder einer Lyme-Arthritis war neben der typischen klinischen Symptomatik das Vorhandensein von borrelienspezifischen IgG Antikörpern die Voraussetzung.

Die Tabellen 1a-d enthalten die Diagnose, Begleitsymptome, serologische Befunde und im Falle einer Neuroborreliose die Liquorbefunde. Diese Tabellen und die Tabellen 2 bis 4 finden sich im Anhang (siehe 8 Anhang Tabellen).

Gruppeneinteilung

Gruppe I: pädiatrische Patienten

Es wurden an einem Gesamtkollektiv von 59 pädiatrischen Patienten mit Lyme-Borreliose die humorale und zelluläre Immunität gegen *B. burgdorferi* untersucht (NB: n= 43, LA: n= 7; BL: n= 2; Erythema migrans: n=7). Das Durchschnittsalter betrug 8,4 Jahre. 38 der Patienten waren männlich, 21 weiblich (Tab. 1a-d).

Gruppe II: adulte Patienten

Im selben Zeitraum wurde die humorale und zelluläre Immunantwort bei acht erwachsenen Patienten untersucht (ACA: n=5; LA: n=3). Das Durchschnittsalter betrug 50,8 Jahre. Fünf der Patienten waren weiblich, drei männlich (Tab. 2).

Gruppe III: pädiatrische Kontrollen

Als pädiatrische Kontrollgruppe dienten neun Kinder, von denen vier an einer idiopathischen Fazialisparese litten. Eine Neuroborreliose konnte durch unauffällige Liquorbefunde ausgeschlossen werden. Weitere zwei Kinder hatten eine unklare Arthritis, die Lyme-Arthritis wurde durch negative Lyme-Serologie ausgeschlossen. Die restlichen drei Kinder waren gesund. Das Durchschnittsalter betrug 11,2 Jahre. Sechs der Kinder waren männlich, drei weiblich (Tab. 3).

Gruppe IV: adulte Kontrollen

Als adulte Kontrollen dienten 14 gesunde Erwachsene. Das Durchschnittsalter betrug 35 Jahre. Sieben der adulten Kontrollen waren männlich, sieben weiblich (Tab. 4).

3.2 Methoden**3.2.1 Serologie**

Das Serum jedes bearbeiteten Blutes wurde zur Lyme-Borreliose Routinediagnostik an das Max-von-Pettenkofer-Institut, München verschickt. Dort wurde zunächst ein EIA (enzyme-linked immunosorbent assay) als Suchtest auf IgG und IgM Antikörper gegen *B. burgdorferi* verwendet. Um einen positiven Befund im EIA zu bestätigen wurde der Immunfluoreszenztest und der Immunoblot durchgeführt. Im Immunoblot wurde die Antikörperantwort auf folgende rekombinante Proteine getestet: Osp17, Osp C, p39, p41, p58, p100 und VlsE. In den lymphoproliferativen Assays wurden die rekombinanten Proteine Osp17, OspC, VlsE und die Lysatantigene von *B. afzelii* und *B. garinii* eingesetzt. Alle Patienten wiesen *B. burgdorferi* spezifische IgM und/oder IgG Antikörper im EIA auf.

3.2.2 Lymphoproliferations Assays

Die Lymphoproliferations Assays wurden mit venösem heparinisierten Vollblut durchgeführt, das höchstens 24 Stunden bei Raumtemperatur gelagert wurde.

Zu Beginn des Assays wurde das Vollblut zunächst zehn Minuten bei 3000 rpm (rounds per minute) bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Das so gewonnene Serum wurde abgesaugt und anschließend bei 56°C 30 Minuten im Wasserbad hitzeinaktiviert. Darauf wurde es nochmals zehn Minuten bei 3000 rpm abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und im Verhältnis 1:10 mit RPMI 1640 verdünnt. Das so hergestellte autologe Serum diente dann als Medium für die T - Zell Kulturen. Das im ersten Schritt abzentrifugierte Vollblut wurde daraufhin im Verhältnis 1:1 mit MEM (Minimal Essential Medium) verdünnt und im Verhältnis 2:1 auf Ficoll - Hypaque gegeben. Durch Dichtezentrifugation bei 2000 rpm für 20 Minuten wurden schließlich die PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) isoliert und abgesaugt. Darauf folgte ein Waschgang mit MEM und anschließender Zentrifugation bei 1500 rpm für 10 Minuten. Nach dreimaliger Wiederholung dieses Waschganges wurden die PBMCs in einem Milliliter autologem Medium resuspendiert und nach Anfärbung mit Trypanblau in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Es wurden jeweils 250000 Zellen mit der vorher durch Antigentitration berechneten optimalen Konzentration an Antigen stimuliert. Die Differenz auf einen Milliliter wurde durch das autologe Serum aufgefüllt. Zur Stimulation wurden die Lysatantigene von *B. afzelii* (Stamm PKo) und *B. garinii* (Stamm PBi) in einer Konzentration von 10 µg/ml verwendet, die rekombinanten Antigene OspC, Osp17, p39 und VlsE in einer Konzentration von 50 µg/ml. Als Positivkontrolle diente Tetanus-Toxoid in einer Konzentration von 12,5 Lf/ml, als Negativkontrolle wurde je ein unstimulierter Ansatz durchgeführt. Anschließend wurden jeweils vier Ansätze des selben Antigens zu je 200µl in einer 96-well Platte ausplattiert und für fünf Tage in einem Zellkulturinkubator mit 5% CO₂ bei 37°C inkubiert. Nach dieser fünftägigen Stimulationsdauer wurden die Zellen in jedem well mit 20µl ³H-Thymidin in einer Endkonzentration von 5% markiert. Anhand der Thymidininkorporation der stimulierten PBMCs konnte so die Proliferation bestimmt werden. Dazu wurden die radioaktiv markierten Zellen 18 bis 24 Stunden nach der Markierung auf einen Filter gesaugt, dieser getrocknet und anschließend mit Szintillationsflüssigkeit versehen. Die Radioaktivität der Plättchen dieses Filters konnte daraufhin in einem Betacounter gemessen werden. Eine signifikante Lymphoproliferation wurde durch einen Stimulationsindex (cpm in der Antigenkondition/cpm in der Kontrollkondition) größer als zwei definiert.

3.2.3 IFN- γ Bestimmung nach Isolierung von PBMCs und Restimulation mit CD3 und CD28/CD49d

Für die IFN- γ Bestimmung nach der Isolierung aus PBMCs wurde der kommerziell erhältliche Cytokine Detection Kit IFN- γ der Firma Becton/Dickinson verwendet.

Wie bei den Versuchen zur Lymphoproliferation wurden zunächst die PBMCs über Ficoll isoliert. Jeweils 10^6 Zellen wurden zu Beginn des Ansatzes entweder mit den rekombinanten Antigenen, den Lysatantigenen der Borrelien oder mit Tetanustoxoid stimuliert. Das Tetanustoxoid wurde als Positivkontrolle verwendet und ein unstimulierter Ansatz als Negativkontrolle. Schließlich wurden die antigenstimulierten Zellen in einem Milliliter autologem Serum resuspendiert und in einer 24 well Platte ausplattiert. Darauf folgte eine Inkubationszeit von sechs Tagen im Brutschrank bei 37°C. Für die Herstellung des Mediums an Tag sechs wurde RPMI 1640 und 10% PHS (pooled human serum) verwendet. Das PHS wurde dazu zunächst 30 Minuten im Wasserbad bei 56°C hitzeinaktiviert und dann bei 3000 rpm abzentrifugiert. Anschließend wurde die erforderliche Menge aus PHS und RPMI 1640 im Verhältnis 1:10 hergestellt.

Darauf wurde die 24 well Platte abgesaugt und der Inhalt eines jeden wells in je ein Falcon tube gegeben. Anschließend wurden die tubes gründlich mit drei Milliliter Medium durchmischt und bei 1700 rpm bei Raumtemperatur fünf Minuten zentrifugiert. Nach zweimaliger Wiederholung dieses Waschvorganges wurde der Überstand abgesaugt und in 250 μ l Medium resuspendiert.

Anschließend erfolgte die Restimulation mit einem ungefärbten CD3 Antikörper in einer Konzentration von 1 μ g/ml und dem Kostimulator CD28/CD49d. Gleichzeitig wurde Brefeldin A, ein Inhibitor der Zytokinsekretion aus der Zelle, zugegeben. Dieses Gemisch wurde anschließend bei 37°C sechs Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach der sechsstündigen Inkubationszeit wurde EDTA zugegeben, zum einen um die Aktivierung der Lymphozyten zu beenden und zum anderen die nicht gebrauchsfähigen Zellen zu binden. Anschließend wurde bei Raumtemperatur 15 Minuten inkubiert. Aus jedem Röhrchen wurden daraufhin je 100 μ l für die Isotypenkontrolle und 100 μ l für die IFN- γ Bestimmung in je ein Polystyren Röhrchen pipettiert. Dieser Schritt wurde gefolgt von der Lysierung der Erythrozyten und der Fixierung der Lymphozyten mit einer Lysierlösung. Darauf wurde erneut für zehn

Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Waschpuffer gewaschen und bei Raumtemperatur bei 1500 rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Dann erfolgte die Permeabilisierung der Zellen mit einer Permeabilisierungslösung und eine erneute Inkubation für zehn Minuten bei Raumtemperatur. Nachdem die Lymphozyten wiederum gewaschen und für fünf Minuten bei 1500 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert wurden, wurden die Röhren mit der Isotypenkontrolle mit den Maus Antikörpern γ_{2a} FITC, γ_1 PE und dem Oberflächenmarker CD4 PerCP-Cy5.5 gefärbt und die Röhren zur Bestimmung der IFN- γ Sekretion mit den Antikörpern IFN- γ FITC, CD69 PE und CD4 PerCP-Cy5.5 angefärbt. Um die IFN- γ Sekretion nur der CD4 positiven Lymphozyten beurteilen zu können, wurden die Zellen mit dem CD4 Antikörper gefärbt. Danach wurden sie für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach anschließendem Waschen der Zellen und fünfminütiger Zentrifugation bei 1500 rpm bei Raumtemperatur wurde der Überstand abgegossen und die Zellen mit der 1%igen Paraformaldehydlösung fixiert. Die Zellen wurden dann bei 4°C im Dunkeln gelagert und die Zytokinsekretion innerhalb 24 Stunden in einem Durchflusszytometer der Firma Becton/Dickinson gemessen. Eine signifikante IFN- γ Sekretion wurde durch mehr als 1% definiert.

3.2.4 Zytokinbestimmung nach Isolierung von PBMCs und Restimulation mit PMA/Ionomycin

Für die Bestimmung der Zytokinsekretion aus PBMCs wurden zunächst die PBMCs über Ficoll - Paque wie zur Bestimmung der Lymphoproliferation isoliert und mit der optimalen austitrierten Konzentration an Antigen für fünf Tage stimuliert. Pro Ansatz wurden jeweils 10^6 Zellen verwendet und in einer 24 well Platte ausplattiert. Als Negativkontrolle lief jeweils ein Ansatz ohne Stimulation mit und als Positivkontrolle eine Stimulation mit Tetanustoxoid. Nach der fünftägigen Stimulationsdauer wurden die wells gründlich abgesaugt und mit drei Millilitern Medium -bestehend aus RPMI 1640 + 10% FCS (fetales Kälberserum) + 1,6mM L-Glutamin- gewaschen und bei 1700 rpm fünf Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach zweimaliger Wiederholung dieses Waschvorganges wurden die Zellen mit PMA in einer Konzentration von 10ng/ml und mit Ionomycin in einer Konzentration von 0,75 μ g/ml restimuliert. Als Inhibitor der Zytokinsekretion wurde Monensin in einer Konzentration

von 2,5µmol/l dazugegeben. Anschließend wurden die Zellen fünf Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nachdem jeweils ein well mit einem Milliliter Zellsuspension in jeweils ein Röhrchen gefüllt wurde, wurden die Zellen zweimal mit dem Waschpuffer gewaschen und bei 1250 rpm bei 4°C fünf Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden die Lymphozyten mit einer Lymphozytenfixationslösung fixiert und zehn Minuten bei 4°C inkubiert. Darauf folgte ein zweimaliger Waschgang, wiederum mit dem Waschpuffer und anschließender Zentrifugation mit 1250 rpm bei 4°C für fünf Minuten. Danach wurden die Zellen permeabilisiert, indem sie mit dem Permeabilisierungspuffer gewaschen und mit 1250 rpm bei 4°C für fünf Minuten zentrifugiert wurden. Nach einer Inkubationszeit von zehn Minuten im Kühlschrank bei 4°C wurden sie erneut mit dem Permeabilisierungspuffer gewaschen und bei 1250 rpm bei 4°C für fünf Minuten zentrifugiert.

Als nächster Schritt folgte die Färbung zum einen mit dem Oberflächenmarker CD4 PerCP oder CD8 PerCP und zum anderen mit dem Aktivierungsmarker CD69 FITC. Die Zytokinfärbung erfolgte mit den von Th-2 Zellen produzierten Zytokinen IL-10 PE und IL-4 PE und dem von Th-1 Zellen produzierten Zytokin IFN-γ PE. Danach wurde für 25 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach der 25-minütigen Inkubation wurden die Zellen nochmals dreimal mit dem Permeabilisierungspuffer gewaschen und bei 1250 rpm bei 4°C fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und anschließend mit einer 4%igen Formaldehydlösung fixiert. Darauf folgte die Messung der Zytokinsekretion in einem Durchflusszytometer der Firma Becton/Dickinson. Auch hier wurde eine signifikante Zytokinsekretion ab größer 1% angenommen.

3.2.5 Statistische Analyse

Alle statistischen Berechnungen wurden mit SPSS 10.0 (SPSS Software GmbH, München) durchgeführt. Angewendet wurde der Student's t-Test, dabei wurde die statistische Signifikanz bei $p < 0,050$ angenommen.

3.2.6 Ethikvotum und Probandeneinwilligung

Diese Studie wurde von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität zugelassen. Von den Eltern der teilnehmenden Kinder lag nach ausführlicher Aufklärung das schriftliche Einverständnis zur Studienteilnahme vor, ebenso von älteren Kindern sowie den erwachsenen Teilnehmern.

4 ERGEBNISSE

4.1 Serologische Untersuchungen zu *B. burgdorferi* bei Kindern mit Neuroborreliose und Lyme-Arthritis

Im Zeitraum zwischen 1995 und 2001 wurde bei 40 Kindern mit Neuroborreliose (FP: n=32; AP: n=1; MP: n=1; Bannwarth: n=2; Aseptische Meningitis: n=4) und bei fünf Kindern mit Lyme-Arthritis die humorale Immunantwort auf *B. burgdorferi* mittels EIA und Immunoblot untersucht.

4.1.1 EIA-Titer bei Kindern mit Neuroborreliose und Lyme-Arthritis bei Diagnosestellung und im Verlauf

Die Verteilung der EIA-Titer im Serum dieser beiden Patientengruppen zeigte in der Gruppe der Neuroborreliosen hauptsächlich einen signifikanten Anstieg der IgM-Titer, während in der Gruppe der Lyme-Arthritiden vor allem die IgG Titer erhöht waren (Abb. 1). Von den Kindern mit Neuroborreliose waren 34/40 (85%) bei Diagnosestellung im IgM EIA im Serum positiv. Bei den sechs Kindern mit initial negativen EIA IgM Titern im Serum wurde die Diagnose Neuroborreliose verifiziert durch Pleozytose und positive Antikörper im Liquor (3/6) oder Pleozytose und positive IgG Antikörper im Serum (2/6). Bei 1/6 war der IgM EIA bei Diagnosestellung negativ und wurde im Verlauf positiv. Nur 15/40 (38%) der Kinder mit Neuroborreliose hatten bei Diagnosestellung auch positive IgG-Antikörper-Titer im EIA, zwei weitere Kinder zeigten im Verlauf eine IgG Serokonversion.

Von den 40 Kindern mit Neuroborreliose wurden 21 im Verlauf von sechs Jahren untersucht. 17/21 Kindern waren initial im Serum IgM positiv. Bei 10/17 (59%) Kindern wurde der IgM EIA nach erfolgter antibiotischer Therapie (durchschnittlich nach 6,4 Monaten) negativ. Auffällig war zudem, dass 11/21 (52%) der Patienten mit Neuroborreliose, also einer systemischen Form der Erkrankung im Verlauf keine Serokonversion aufwiesen.

Die fünf Kinder mit Lyme-Arthritis wurden alle im Verlauf untersucht und zeigten während allen Untersuchungen einen positiven IgG EIA, während der IgM EIA bei

drei Kindern bereits bei Diagnosestellung negativ war und bei zwei Kindern im Verlauf ebenfalls negativ wurde.

Zusammenfassend konnte beobachtet werden, dass die überwiegende Anzahl von Patienten mit Neuroborreliose (34/40) bei Diagnosestellung im Serum Borrelien IgM positiv war, während Patienten mit Lyme-Arthritis vorwiegend IgG Antikörper aufwiesen (Tab. 5).

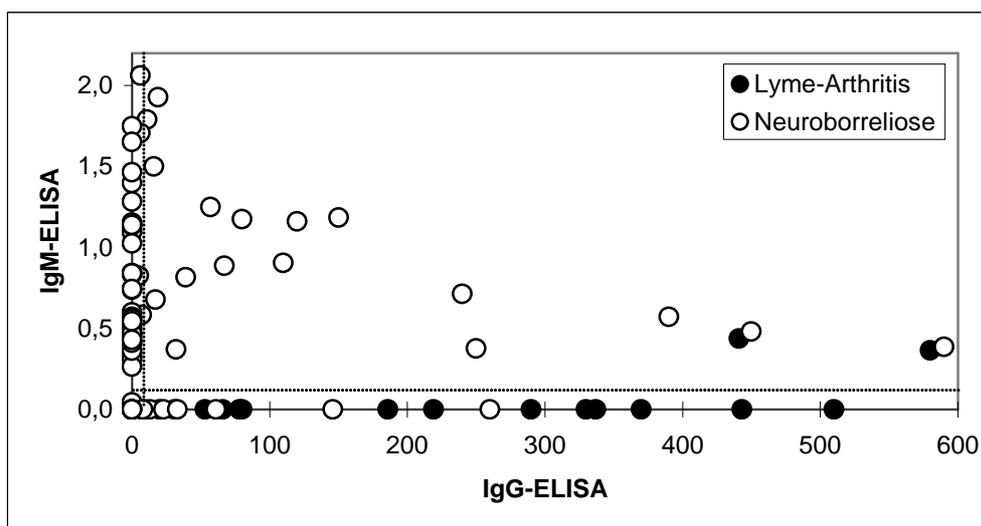


Abbildung 1: EIA-Titer bei Patienten mit Neuroborreliose und Lyme-Arthritis

Dargestellt sind 91 serologische Befunde von 40 Kindern mit Neuroborreliose und fünf Kindern mit Lyme-Arthritis, die zwischen 1995 und 2001 teils mehrfach untersucht wurden.

Tabelle 5: Verteilung der IgM/IgG Antikörper bei Kindern mit Neuroborreliose und Lyme-Arthritis

	NB	LA
	76 Seren von 40 Kindern	15 Seren von 5 Kindern
nur IgM AK	31/76 (41%)	0/15
nur IgG AK	11/76 (14%)	13/15 (87%)
IgM/IgG AK	21/76 (28%)	2/15 (13%)

4.1.2 Rekombinanter IgM und IgG Immunoblot bei Kindern mit Neuroborreliose und Lyme-Arthritis bei Diagnosestellung

Um die EIA Befunde zu spezifizieren wurde bei 32/34 Kindern mit Neuroborreliose ein Immunoblot durchgeführt. Dabei wurden im IgM Blot Antikörper gegen die Proteine p41i, OspC, p39, p100 und im IgG Blot Antikörper gegen VlsE, Osp17, OspC, p39, p58 und p100 untersucht. Von den 32 Kindern mit Neuroborreliose, die im Immunoblot getestet wurden und bei Erstdiagnose im IgM EIA positiv waren,

waren 28/32 (88%) im IgM und/oder IgG Immunoblot ebenfalls positiv. Vier der Kinder waren im IgG/IgM Immunoblot negativ. Sechs Patienten mit Neuroborreliose waren bei Erstdiagnose im IgM EIA negativ, davon waren im IgG und/oder IgM Immunoblot zwei Patienten positiv, einer negativ und bei den restlichen drei wurde der Immunoblot nicht durchgeführt.

Drei der Patienten mit Lyme-Arthritis waren bei Diagnosestellung im IgM EIA negativ, zwei positiv. Im IgG und/oder IgM Immunoblot waren alle Patienten positiv.

Das im IgM-Immunoblot am häufigsten erkannte Protein bei Kindern mit Neuroborreliose unabhängig vom Untersuchungszeitpunkt war das Flagellenprotein p41i (bei 29/37 Kindern (78%)), das zweithäufigste das OspC (18/37 (49%)). Eine nur geringe Reaktivität war sowohl auf p39 (9/40 (23%)) als auch auf p100 (7%) zu beobachten.

Von den 2/5 bei Diagnosestellung im IgM Immunoblot positiven Kindern mit Lyme-Arthritis zeigte eines der Kinder eine Reaktivität auf p41i im IgM-Immunoblot (Abb. 2).

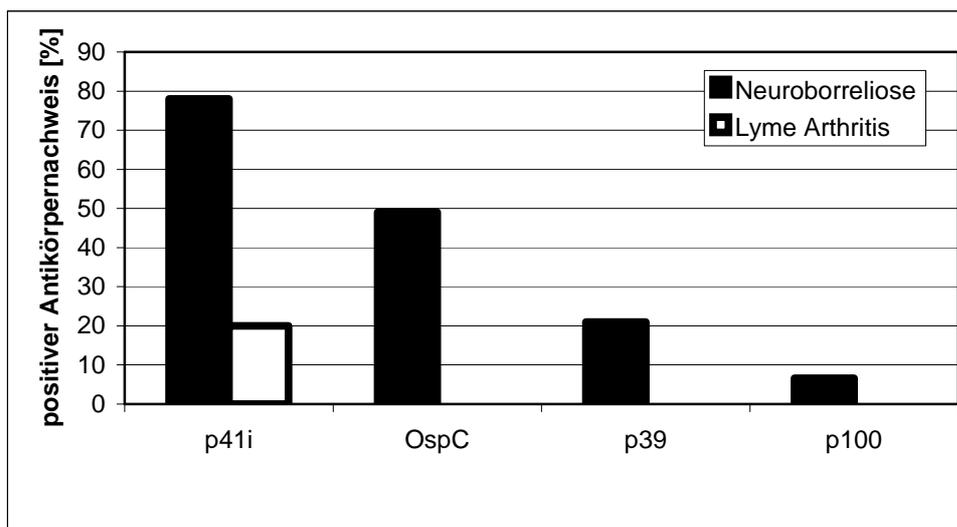


Abbildung 2: Nachweis von IgM-Antikörpern im Immunoblot

Das Verteilungsmuster der im IgM Immunoblot gebildeten Antikörper gegen die unterschiedlichen Borrelienproteine wurde bei 32 Kindern mit Neuroborreliose und bei fünf Kindern mit Lyme-Arthritis untersucht.

15/40 (38%) der Kinder mit Neuroborreliose waren sowohl im IgG EIA als auch im Immunoblot positiv. Von den restlichen 25 im IgG EIA negativen Kindern waren drei Kinder auch im Immunoblot negativ. 15 der Kinder waren im Immunoblot positiv. Die an einer Lyme-Arthritis erkrankten Kinder waren alle sowohl im IgG EIA als auch im Immunoblot positiv. Im IgG-Immunoblot war bei den Kindern mit Neuroborreliose das

VlsE das am häufigsten erkannte Protein (59%). Gegen die Borrelienproteine p58, p41, Osp17, p100, p39 und OspC konnten nur zwischen 9,4 und 21,2% IgG Antikörper im Immunoblot nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnten jedoch in den Serumproben der Kinder mit Lyme-Arthritis bis auf OspC in 60-100% der Fälle Antikörper gegen die restlichen Borrelienproteine nachgewiesen werden (Abb. 3). **Zusammenfassend** konnte beobachtet werden, dass verschiedene klinische Manifestationen wie Neuroborreliose oder Lyme-Arthritis mit einer humoralen Immunantwort gegen unterschiedliche Borrelienproteine assoziiert sind.

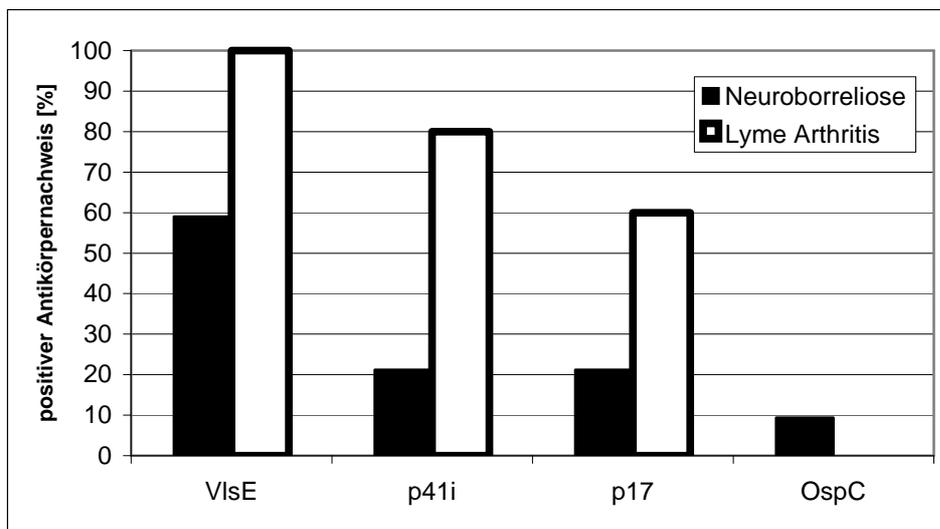


Abbildung 3: Nachweis von IgG-Antikörpern im Immunoblot

Das Verteilungsmuster der im IgG Immunoblot gebildeten Antikörper gegen die unterschiedlichen Borrelienproteine wurde bei 32 Kindern mit Neuroborreliose und bei fünf Kindern mit Lyme-Arthritis untersucht.

4.1.3 Verlaufsbeobachtung der IgM Immunoblotbefunde für p41 und OspC bei Kindern mit Neuroborreliose

Um zu untersuchen, ob es nach einer antibiotischen Therapie zur Persistenz borrelienspezifischer Antikörper kommt, wurden neun Patienten mit initial positiven Immunoblotbefunden im Verlauf beobachtet. Alle Patienten wurden mindestens einmal kontrolliert. Der durchschnittliche Zeitraum zwischen Erstdiagnose und abgeschlossener letzter Kontrolluntersuchung betrug 8,3 Monate. Bei 4/9 (44%) Kindern war sowohl bei der Erstdiagnose als auch bei den Kontrolluntersuchung p41 nachweisbar. Weitere 3/9 (33%) zeigten bei Erstdiagnose Antikörper gegen p41,

diese verschwanden jedoch im Laufe der Kontrolluntersuchungen. 2/9 (22%) Patienten bildeten weder bei Erstdiagnose noch in den Folgeuntersuchungen Antikörper gegen p41. Insgesamt zeigten 7/9 (78%) Kindern bei Erstdiagnose eine Immunantwort gegen p41, welche im Verlauf bei der Hälfte der Patienten negativ wurde. Die Immunreaktion auf OspC war deutlich geringer ausgeprägt. Lediglich 3/9 (33%) zeigten bei Erstdiagnose eine Immunreaktion gegen OspC. Bei diesen drei Patienten persistierte die Immunantwort gegen OspC im Verlauf. 6/9 (67%) der Patienten mit Neuroborreliose zeigten keine Immunreaktion auf OspC. Ein Patient wies bei Erstdiagnose keine Antikörper gegen OspC auf, entwickelte diese jedoch bei Folgeuntersuchungen (Tab. 6). Die EIA IgM Titer fielen tendenziell im Verlauf ab oder wurden negativ (6/9), bei zwei Patienten blieben sie gleich, bei einem Patienten waren sie bei Diagnosestellung negativ. Im Gegensatz dazu konnte über einen Zeitraum von maximal 24 Wochen eine Persistenz der einzelnen borrelienspezifischen Antikörper in der Mehrzahl der Fälle beobachtet werden.

Tabelle 6: IgM IB für p41 und OspC im Vergleich zu den EIA IgM-Titern im Verlauf. Es wurden neun pädiatrische Patienten mit Neuroborreliose im Verlauf untersucht.

Patient	Erstuntersuchung			1. Kontrolle (nach ~ 8,7 Wochen)			2. Kontrolle (nach ~ 5 Monaten)			3. Kontrolle (nach ~ 20 Monaten)		
	IgM- EIA	p41 IB	OspC IB	IgM- EIA	p41 IB	OspC IB	IgM- EIA	p41 IB	OspC IB	IgM- EIA	p41 IB	OspC IB
NB-2	0,551	pos	neg	1,095	pos	neg	0,417	pos	neg	0,474	pos	neg
NB-7	0,887	pos	neg	neg	neg	neg	nd	nd	nd	nd	nd	nd
NB-10	2,062	pos	pos	1,701	nd	nd	1,136	pos	pos	nd	nd	nd
NB-14	1,748	pos	pos	0,833	pos	pos	neg	nd	nd	nd	nd	nd
NB-15	0,739	pos	neg	neg	neg	neg	neg	nd	nd	nd	nd	nd
NB-19	0,841	pos	neg	0,583	pos	neg	nd	nd	nd	nd	nd	nd
NB-28	0,377	pos	neg	0,387	neg	neg	0,481	neg	neg	0,571	neg	neg
NB-33	1,154	neg	pos	0,363	neg	pos	nd	nd	nd	nd	nd	nd
NB-37	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg	pos	nd	nd	nd

4.1.4 Humorale Immunantwort auf das rekombinante Borrelienprotein VlsE im zeitlichen Verlauf

Da VlsE das im IgG-Immunoblot am häufigsten erkannte Protein war, wurde der zeitliche Verlauf der VlsE-spezifischen Antikörper näher untersucht. Die Antikörperantwort auf das rekombinante Protein VlsE wurde bei insgesamt 16 Kindern mit Neuroborreliose und fünf Kindern mit Lyme-Arthritis im Abstand von vier Wochen bis zu mehreren Jahren nachuntersucht. Bei 9/16 Kindern (56%) mit einer Neuroborreliose waren bei der Erstuntersuchung VlsE-spezifische Antikörper nachweisbar. Bei weiteren zwei Kindern waren die Immunoblot Banden für VlsE schwach positiv. Die erste Kontrolle erfolgte zwischen einem und drei Monaten, hier waren bei 5/9 Kindern (66%) noch VlsE-spezifische Antikörper nachweisbar. Bei einer weiteren Kontrolle nach vier bis zwölf Monaten bei vier von fünf Kindern waren nur noch bei zwei Kindern VlsE-spezifische Antikörper nachweisbar (Tab. 7, Abb. 4). Bei 6/9 Kindern (67%) war im Laufe der ersten Monate nach antibiotischer Therapie ein Absinken bzw. Verschwinden der VlsE-spezifischen Antikörper zu beobachten (Tab. 7). Dieses Phänomen konnte jedoch bei den anderen Borrelien-spezifischen Antikörpern genauso beobachtet werden. Von sieben Kindern, die initial keine VlsE-spezifischen Antikörper aufwiesen, zeigte eines im Verlauf eine Serokonversion (Patient NB-12). Im Gegensatz dazu waren bei allen fünf Kindern mit erfolgreich behandelter Lyme-Arthritis sowohl bei der Erstuntersuchung als auch bei allen Folgeuntersuchungen VlsE-spezifische Antikörper nachweisbar (Tab. 7). In Analogie zu VlsE persistierten auch die anderen Borrelien-spezifischen Antikörper.

Ähnlich verhielt es sich bei der Verteilung der IgG EIA Titer: alle Patienten mit Lyme-Arthritis hatten einen positiven IgG EIA (drei stark positiv, zwei schwach positiv), während in der Gruppe der Neuroborreliosen lediglich ein Patient (NB-1) einen stark positiven IgG EIA zeigte. Vier weitere Patienten waren schwach positiv, elf hatten einen negativen IgG EIA.

Zusammenfassend konnte bei Patienten mit Lyme-Arthritis eine Persistenz der VlsE Antikörper Titer im Verlauf von mehreren Monaten beobachtet werden, während es bei Patienten mit Neuroborreliose zu einem Absinken der Antikörper Titer kam (Abb. 4).

Tabelle 7: IgG-Antikörper gegen *B. burgdorferi* im EIA und gegen VlsE im IB. Es wurden 21 pädiatrische Patienten (NB: n=16; LA: n=5) im Verlauf untersucht.

Patient	Erstuntersuchung		1. Kontrolle nach 1 - 3 Monaten		2. Kontrolle nach 4 - 12 Monaten		3. Kontrolle nach > 1 Jahr	
	EIA [U/ml]	IB*	EIA [U/ml]	IB*	EIA [U/ml]	IB*	EIA [U/ml]	IB*
NB-28	>590	3	>450	3	390	2	260	2
NB-26	57	2	39	2	8	1	nd	nd
NB-37	31	2	23	1	33	0	nd	nd
NB-3	neg	2	neg	1	nd	nd	nd	nd
NB-14	neg	0	neg	1	neg	0	nd	nd
NB-9	neg	2	neg	0.5	nd	nd	nd	nd
NB-7	67	2	13	0.5	nd	nd	nd	nd
NB-10	6	1	6	0.5	neg	0	nd	nd
NB-38	neg	1	neg	0.5	nd	nd	nd	nd
NB-17	neg	0.5	neg	0.5	nd	nd	nd	nd
NB-19	neg	0.5	7	0	nd	nd	nd	nd
NB-31	neg	0	12	2	nd	nd	nd	nd
NB-1	neg	0	9	0.5	7	0.5	nd	nd
NB-15	neg	0	neg	0	nd	nd	nd	nd
NB-21	neg	0	neg	0	neg	nd	nd	nd
NB-39	neg	0	neg	0	nd	nd	nd	nd
LA-4	>441	3	>337	2	>186	3	nd	nd
LA-2	>290	3	370	2	78	2	nd	nd
LA-1	66	2	80	2	53	2	nd	nd
LA-5	>580	1	>1400	2	510	2	330	2
LA-3	>443	1	>219	2	nd	nd	nd	nd

* alle Zahlen geben die semiquantitative Auswertung des Immunoblots wieder: 0 = negativ, 0.5 = grenzwertig, 1 = positiv, 2 = deutlich positiv, 3 = stark positiv, nd = nicht durchgeführt

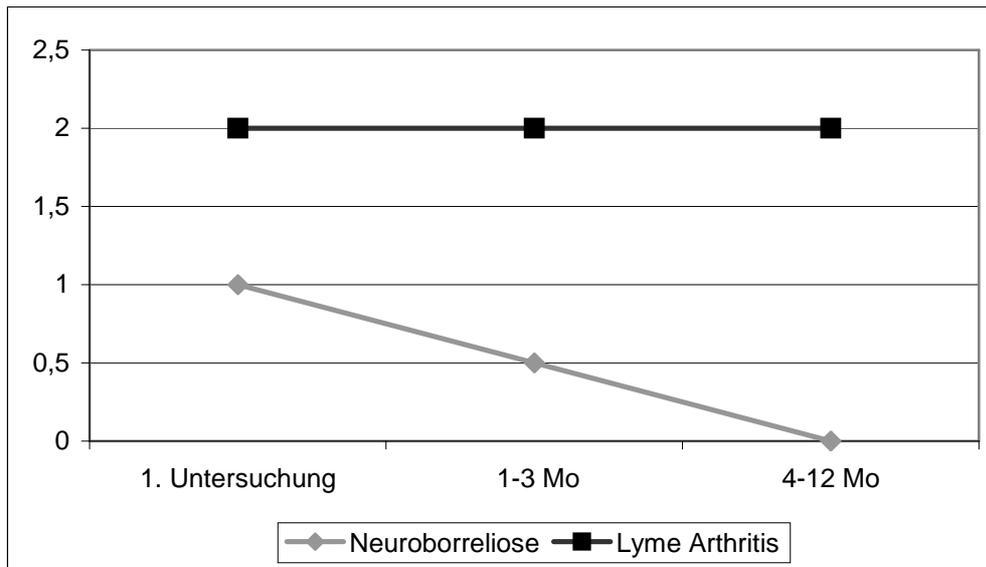


Abbildung 4: Verlauf der VlsE IgG-Antikörper bei fünf Patienten mit Lyme-Arthritis und 16 Patienten mit Neuroborreliose im Median; alle Zahlen beziehen sich auf die semiquantitative Auswertung des Immunoblots: 0 = negativ, 0.5 = grenzwertig, 1 = positiv, 2 = deutlich positiv, 3 = stark positiv

4.2 Humorale und zelluläre Immunantwort auf *B. burgdorferi* und Tetanustoxoid im Kindes -und Erwachsenenalter

4.2.1 Humorale und zelluläre Immunantwort auf *B. burgdorferi* und die rekombinanten Proteine VlsE, OspC und Osp17 im Kindesalter

Im Weiteren wurde bei Kindern in unterschiedlichen Stadien der Lyme-Borreliose sowohl die Lymphoproliferation auf die Lysatantigene *B. garinii* und *B. afzelii* als auch auf unterschiedliche rekombinante Borrelien-Proteine gemessen und anschließend mit der humoralen Immunantwort verglichen. Dazu wurden die PBMCs sechs Tage mit den entsprechenden Antigenen stimuliert und anschließend der radioaktive Uptake von H^3 -Thymidin bestimmt. Die Lymphoproliferation auf die Lysatantigene *B. garinii* und *B. afzelii* unterschied sich dabei signifikant von den altersentsprechenden Kontrollen. So ergab die Untersuchung von 22 durch *B. garinii* stimulierten Blutproben von 16 Kindern eine durchschnittliche Lymphoproliferation (gemessen in Δ cpm) von 5247 ± 6954 (Standardabweichung) im Vergleich zu 356 ± 562 bei den neun Kontrollen ($p=0,0042$). Die durchschnittliche Lymphoproliferation der durch *B.*

afzelii stimulierten 20 Blutproben von 15 Kindern betrug 11860 ± 13211 , die der Kontrollen 2858 ± 2413 ($p=0,01$) (Tab. 8, Abb. 5, Abb. 6).

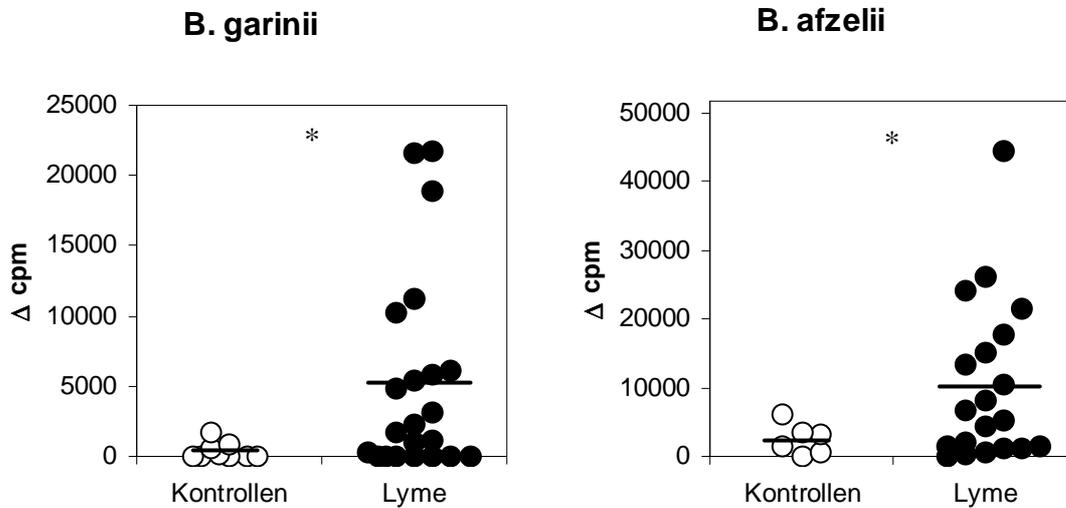


Abbildung 5/Abbildung 6: Lymphoproliferation auf *B. garinii* und *B. afzelii* bei pädiatrischen Patienten mit Lyme-Borreliose (schwarze Kreise) im Vergleich zu seronegativen altersentsprechenden Kontrollen (weisse Kreise). Die mit * versehenen Grafiken kennzeichnen einen signifikanten Unterschied im Mittelwert in der Lymphoproliferation der Lyme-Patienten im Vergleich zur seronegativen Kontrolle

Im Weiteren wurde die Immunantwort auf einzelne immunrelevante Borrelienproteine untersucht. Auch die durchschnittliche Lymphoproliferation auf die rekombinanten Borrelien-Proteine war bei den Kindern mit einer Lyme-Borreliose gegenüber den Kontrollen deutlich erhöht.

4.2.1.1 VlsE

Insgesamt wurden 12 Blutproben von neun Kindern mit Lyme-Borreliose auf eine zelluläre Immunreaktion gegen VlsE untersucht (NB: n=3, multiples EM: n=1, BL: n=2, LA: n=2, EM: n=1). Im Durchschnitt ließ sich hier eine signifikant erhöhte Proliferation auf VlsE messen (10154 ± 8176 Δcpm). Die der fünf Kontrollen betrug 3497 ± 2923 Δcpm ($p=0,03$) (Tab. 8). 6/12 Proben (50%) wiesen im Immunoblot VlsE-spezifische Antikörper auf, fünf dieser sechs Proben (83,3%) zeigten auch eine deutliche Lymphoproliferation auf VlsE. Obwohl bei sechs weiteren Blutproben im Immunoblot keine VlsE Antikörper nachgewiesen werden konnten, ließ sich in 4/6 Fällen eine deutliche lymphoproliferative Immunantwort auf VlsE beobachten. Lediglich zwei Proben (EM, NB) hatten weder eine humorale noch eine zelluläre

Immunreaktion auf VlsE. Insgesamt konnte so bei 9/12 Blutproben (75%) eine deutliche lymphoproliferative Reaktion auf VlsE nachgewiesen werden (Abb. 7a, Tab. 9).

Die durchschnittliche Lymphoproliferation VlsE Antikörper positiver und VlsE Antikörper negativer Patienten unterschied sich nicht signifikant voneinander ($p=0,46$) (Abb. 7b).

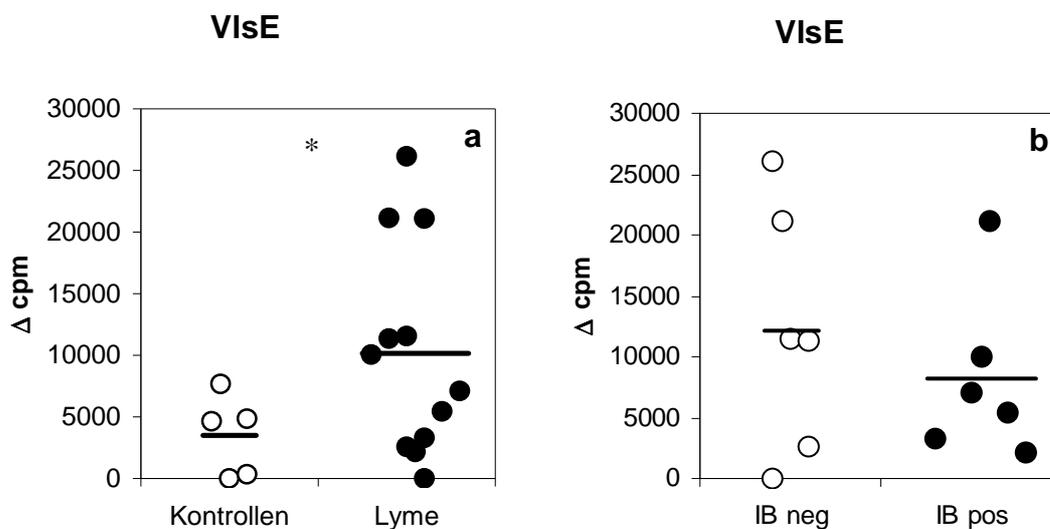


Abbildung 7a: Lymphoproliferation auf rekombinantes VlsE im Kindesalter bei Patienten mit Lyme-Borreliose (schwarze Kreise) und altersentsprechenden Kontrollen (weisse Kreise)

Abbildung 7b: Lymphoproliferation bei VlsE AK - (weisse Kreise) und AK + Kindern (schwarze Kreise) mit Lyme-Borreliose

4.2.1.2 OspC

Ähnlich verhielt sich die Lymphoproliferation auf das Oberflächenprotein OspC. Auch dort ließ sich eine signifikant erhöhte Proliferation bei 20 Blutproben von 15 Kindern mit Lyme-Borreliose (EM: n=2, BL: n=2, NB: n=6, LA: n=4, multiples EM: n=1) von $5866 \pm 8234 \Delta\text{cpm}$ messen. Die der neun seronegativen Kontrollen betrug $1165 \pm 1871 \Delta\text{cpm}$ ($p=0,027$) (Tab. 8, Abb. 8a). 6/20 (30%) Blutproben von fünf Lyme-Kindern wiesen OspC-spezifische Antikörper auf, fünf von diesen sechs Blutproben (83,3%) proliferierten auch auf OspC. Bei den OspC- Antikörper negativen Patienten zeigten 6/14 (43%) eine zelluläre Reaktion auf OspC. Insgesamt war im Vergleich zu

VlsE sowohl die durchschnittliche Lymphoproliferation auf OspC etwas schwächer ausgeprägt (5866 vs. 10154 Δ cpm) als auch die Anzahl der reaktiven Proben: 55% (11/20) Blutproben zeigten eine lymphoproliferative Reaktion auf OspC versus 75% (9/12) Blutproben auf VlsE (Tab. 9).

Ähnlich wie bei VlsE unterschied sich die durchschnittliche Lymphoproliferation der im Immunoblot OspC Antikörper negativen Patienten nicht von denen die im Immunoblot Antikörper gegen OspC aufwiesen ($p=0,52$) (Abb. 8b). Die durchschnittliche Proliferation auf OspC war bei den Antikörper-positiven Patienten tendenziell höher als bei den OspC-Antikörper negativen Proben (7681 \pm 6990 bzw. 5088 \pm 8596 Δ cpm).

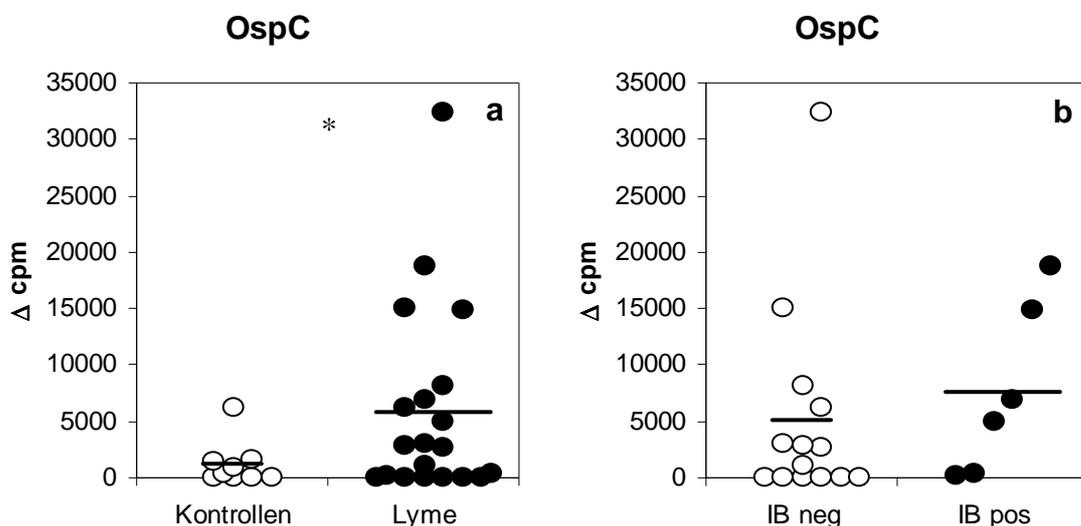


Abbildung 8a: Lymphoproliferation auf rekombinantes OspC im Kindesalter bei Patienten mit Lyme-Borreliose (schwarze Kreise) und altersentsprechenden Kontrollen (weisse Kreise)

Abbildung 8b: Lymphoproliferation bei OspC AK - (weisse Kreise) und AK + Kindern (schwarze Kreise) mit Lyme-Borreliose

4.2.1.3 Osp17

Es wurden insgesamt 19 Blutproben von 15 Kindern mit Lyme-Borreliose untersucht (EM: n=1; NB: n=6; BL: n=2; LA: n=5, multiples EM: n=1). Die durchschnittliche Lymphoproliferation unterschied sich nicht signifikant von den sieben Kontrollen (406 \pm 547 bzw. 56 \pm 86; $p=0,09$), (Tab. 8, Abb. 9), es zeigten insgesamt 4/19 (21%) Proben eine zelluläre Reaktion. Davon wies ein Patient sowohl eine zelluläre als

auch eine humorale Immunantwort gegen Osp17 im Immunoblot auf. Drei Patienten zeigten nur eine zelluläre Reaktion. Bei weiteren 8/19 (42%) Proben –ausschließlich in systemischen Stadien der Lyme-Borreliose waren nur Osp17 spezifische Antikörper im Immunoblot nachweisbar. 7/19 (37%) Proben zeigten weder eine zelluläre noch eine humorale Immunantwort auf Osp17 (Tab. 9).

Im Gegensatz zu den anderen Proteinen war die Reaktivität auf Osp17 deutlich schwächer ausgeprägt. Es konnte eine erhöhte Lymphoproliferation bei den Lyme Patienten gegenüber der seronegativen Kontrollen gesehen werden (56 vs. 406 Δ cpm), jedoch war der Unterschied nicht signifikant. Es ergab sich kein Zusammenhang zwischen der durchschnittlichen Lymphoproliferation auf Osp17 und dem im Immunoblot getesteten Serostatus auf Osp17.

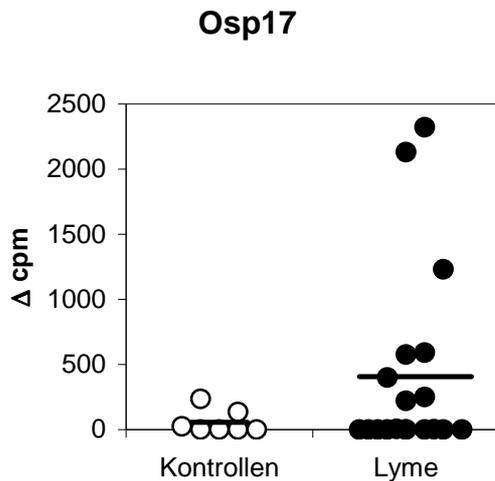


Abbildung 9: Lymphoproliferation auf rekombinantes Osp17 im Kindesalter bei Patienten mit Lyme-Borreliose (schwarze Kreise) und altersentsprechenden Kontrollen (weisse Kreise)

Tabelle 8: zelluläre Immunantwort auf einzelne rekombinante Borrelienproteine bei Kindern. Die zelluläre Immunantwort wurde bei insgesamt 24 Kindern mit Lyme-Borreliose untersucht.

Antigen	Lyme-Borreliose		Kontrollen		Durchschnittliche Lymphoproliferation		p
	Patienten [n]	Blutproben [n]	Patienten [n]	Blutproben [n]	Lyme-Borreliose [Δ cpm \pm stdev]	Kontrollen [Δ cpm \pm stdev]	
B. garinii	16	22	9	9	5247 \pm 6954	356 \pm 562	0,004
B. afzelii	15	20	7	7	11860 \pm 13211	2858 \pm 2413	0,01
VisE	9	12	5	5	10154 \pm 8176	3497 \pm 2923	0,03
AK+	6	6	5	5	8195 \pm 6333	3497 \pm 2923	0,18
AK-	5	6	5	5	12113 \pm 9269	3497 \pm 2923	0,09
OspC	15	20	9	9	5866 \pm 8234	1165 \pm 1871	0,027
AK+	5	6	9	9	7681 \pm 6990	1165 \pm 1871	0,09
AK-	10	14	9	9	5088 \pm 8596	1165 \pm 1871	0,13
Osp17	15	19	7	7	406 \pm 547	56 \pm 86	0,09
AK+	6	9	7	7	468 \pm 786	56 \pm 86	0,15
AK-	9	10	7	7	492 \pm 720	56 \pm 86	0,1
TT	16	24	14	14	19527 \pm 25436	23940 \pm 25600	0,62

Tabelle 9: Vergleich der humoralen und zellulären Immunantwort auf die rekombinanten Borrelien-Proteine VisE, OspC und Osp17 im Kindesalter. Die humorale und zelluläre Immunantwort wurde bei insgesamt 24 Kindern mit Lyme-Borreliose untersucht.

Antigen	Antikörper positiv ¹				Antikörper negativ ¹			
	Proliferation ²				Proliferation ²			
	positiv	(%)	negativ	(%)	positiv	(%)	negativ	(%)
VisE	5/6	(83,3)	1/6	(16,6)	4/6	(66,7)	2/6	(33,3)
OspC	5/6	(83,3)	1/6	(16,6)	6/14	(43,0)	8/14	(57,0)
Osp17	1/9	(11,1)	8/9	(88,9)	3/10	(30,0)	7/10	(70,0)

¹ Antikörper gegen die jeweiligen rekombinanten Proteine wurden im Immunoblot getestet.

² Die Lymphoproliferation wurde nach 6-tägiger antigenen Stimulation von PBMC mittels ³H-Thymidin-Inkorporation gemessen.

Zusammenfassend konnte eine signifikant erhöhte Lymphoproliferation auf die rekombinanten Proteine VisE und OspC gegenüber der seronegativen Kontrollgruppe gezeigt werden. Die Lymphoproliferation der Lyme-Patienten auf Osp17 war im Vergleich zu den seronegativen Kontrollpatienten deutlich, jedoch nicht signifikant erhöht. Es konnte in 75% der Fälle eine zelluläre Reaktion auf VisE

(9/12) beobachtet werden, eine humorale nur in 50% (6/12). Im Gegensatz zu Osp17 konnte auch auf rekombinantes OspC ein Überwiegen der zellulären im Vergleich zur humoralen (55% vs. 30%) Immunantwort beobachtet werden.

4.2.2 Humorale und zelluläre Immunantwort auf *B. burgdorferi* und die rekombinanten Proteine VlsE, OspC und Osp17 im Erwachsenenalter

Um zu untersuchen, inwieweit sich die lymphoproliferative Immunantwort im Vergleich zur humoralen Immunantwort in späten Stadien der Lyme-Borreliose verhält, wurden erwachsene Patienten mit Lyme-Borreliose im Stadium III untersucht. Es wurde sowohl die Lymphoproliferation auf die Lysatantigene *B. garinii* und *B. afzelii* als auch auf die rekombinanten Proteine getestet und anschließend mit der humoralen Immunantwort verglichen.

Anders als bei den pädiatrischen Patienten, bei denen sich seropositive Patienten und seronegative altersentsprechende Kontrollen deutlich unterschieden, ergab sich für die lymphoproliferative Reaktion auf die Lysatantigene kein signifikanter Unterschied zu den seronegativen Kontrollen (Abb. 10a/10b, Tab. 10). Im Vergleich zu den pädiatrischen seronegativen Kontrollen konnte bei den seronegativen erwachsenen Kontrollen eine weitaus höhere Lymphoproliferation auf die unterschiedlichen Borrelien-Proteine beobachtet werden (Abb. 11a/b, 13b, 14b). So unterschied sich die durchschnittliche Lymphoproliferation auf *B. afzelii* bei den erwachsenen seronegativen Kontrollen signifikant von den seronegativen pädiatrischen Kontrollen (13463 ± 10693 bzw. 2858 ± 2413 cpm; $p=0,002$). Auch die zelluläre Immunreaktion auf *B. garinii* war im Vergleich zu den pädiatrischen Kontrollen bei den erwachsenen Kontrollen deutlich stärker ausgeprägt (3303 ± 6418 bzw. 356 ± 305 cpm; $p=0,097$), (Abb. 11a/b). Bei den Lyme-Patienten verhielt es sich umgekehrt: Im Durchschnitt proliferierten die pädiatrischen Lyme-Patienten sowohl auf *B. garinii* als auch auf *B. afzelii* tendenziell höher als die erwachsenen Lyme-Patienten (*B. garinii*: 5247 ± 6954 vs. 3598 ± 3542 Δ cpm; $p=0,42$; *B. afzelii*: 11860 ± 13211 vs. 7749 ± 8479 Δ cpm; $p=0,38$).

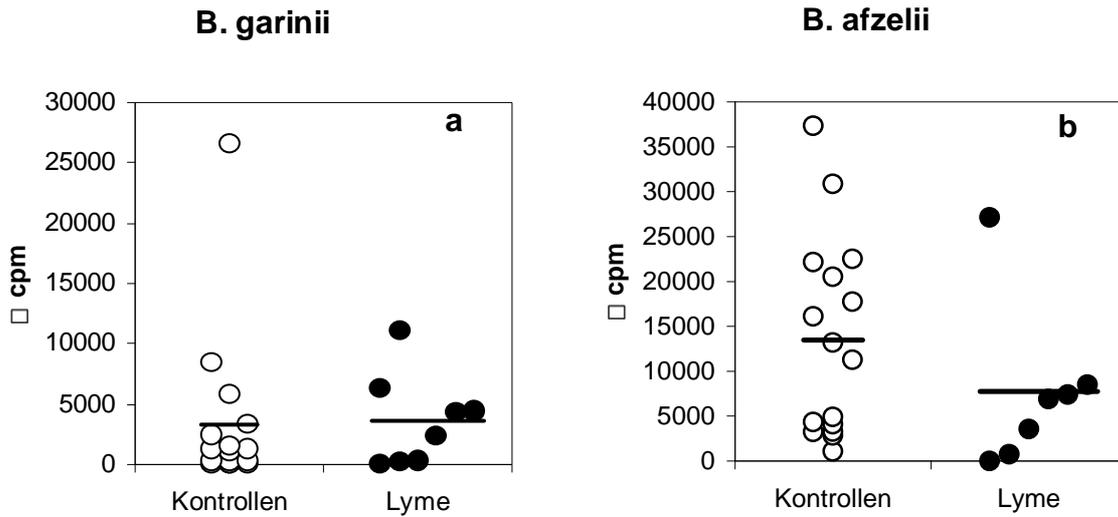


Abbildung 10a/b: Lymphoproliferation auf B. garinii und B. afzelii bei erwachsenen Patienten mit chronischer Lyme-Borreliose (schwarze Kreise) und altersentsprechenden Kontrollen (weisse Kreise)

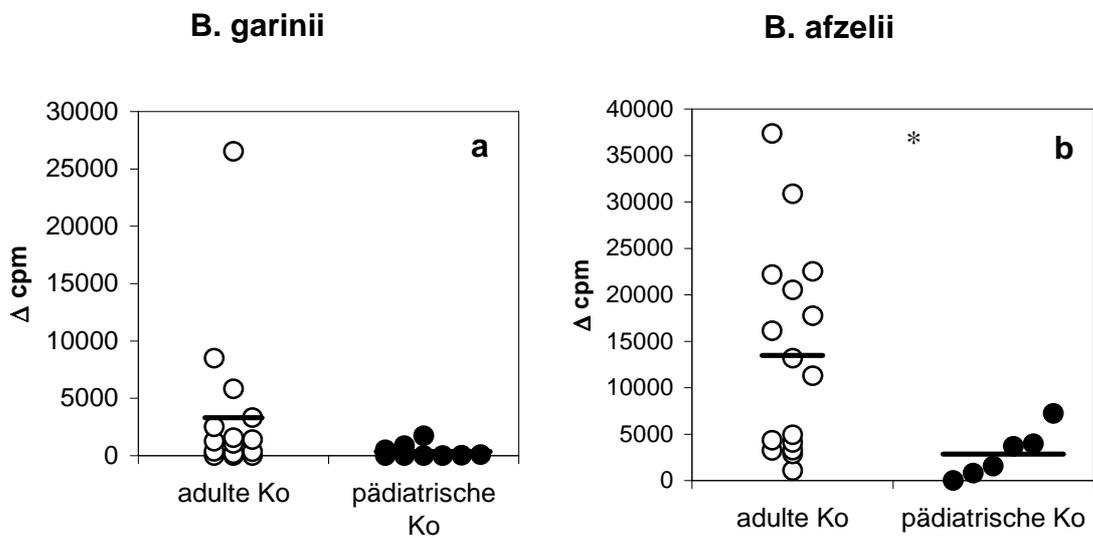


Abbildung 11a/b: Vergleich der Lymphoproliferation auf die Lysatantigene B. garinii und B. afzelii bei seronegativen erwachsenen Kontrollpatienten (weisse Kreise) und seronegativen pädiatrischen Kontrollpatienten (schwarze Kreise).

4.2.2.1 VlsE

Bei den fünf auf VlsE getesteten Patienten hatten vier Patienten eine Acrodermatitis chronica atrophicans und ein Patient eine Lyme-Arthritis. Es fiel auf, dass alle im Immunoblot getesteten Patienten IgG-Antikörper gegen VlsE entwickelt hatten und alle dieser positiv getesteten Patienten auf VlsE auch eine zelluläre Immunreaktion zeigten (Tab. 11).

Die Lymphoproliferation der Lyme-Patienten auf VlsE unterschied sich nicht signifikant von der seronegativen Kontrollgruppe (6008 ± 3691 bzw. 5815 ± 4310 Δ cpm, $p=0,97$), (Tab. 5, Abb. 12). Die durchschnittliche Lymphoproliferation der seronegativen erwachsenen Kontrollpatienten gegenüber den seronegativen pädiatrischen Kontrollpatienten war leicht erhöht (5815 ± 4310 bzw. 3497 ± 2923 Δ cpm; $p=0,69$). Im Gegensatz dazu war bei den Lyme-Patienten bei den pädiatrischen Patienten eine deutlich höhere Lymphoproliferation auf VlsE im Vergleich zu den erwachsenen Lyme-Patienten zu sehen (10154 ± 8176 vs. 6008 ± 3691 Δ cpm; $p=0,2$).

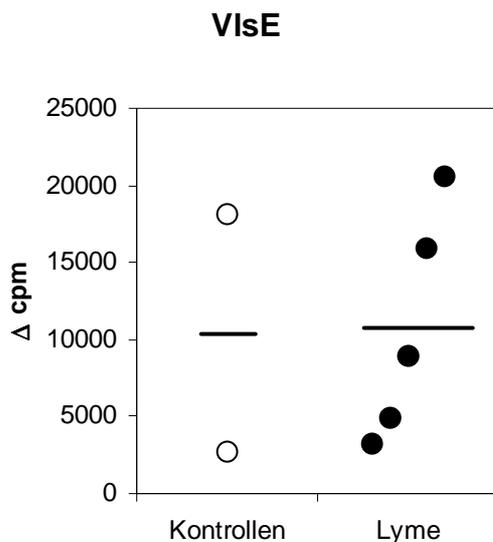


Abbildung 12: Durchschnittliche Lymphoproliferation auf rekombinantes VlsE bei Lyme-Patienten (schwarze Kreise) und seronegativen Kontrollpatienten (weisse Kreise).

4.2.2.2 OspC

Sechs der sieben untersuchten Patienten hatten eine Acrodermatitis chronica atrophicans und ein Patient eine Lyme-Arthritis. Insgesamt zeigten fünf der sieben getesteten Patienten ein zelluläre Immunreaktion auf OspC (71,4%). Vier der sieben Patienten wiesen im Immunoblot Antikörper gegen OspC auf, 3/4 dieser Patienten

proliferierten auch auf OspC (75%). Ebenso zeigten zwei der restlichen drei Antikörper negativen Patienten eine zelluläre Immunreaktion gegen OspC (67%). Ein Patient (LBA-3) mit einer Acrodermatitis chronica atrophicans zeigte weder eine humorale noch eine zelluläre Immunreaktion (Tab. 11). Die Lymphoproliferation auf OspC war nicht vom Serostatus der Lyme-Patienten abhängig, es gab keine signifikanten Unterschiede der im Immunoblot negativ bzw. positiv auf OspC getesteten Patienten im Vergleich zu den seronegativen Kontrollpatienten ($p=0,55$ bzw. $p=0,75$; Tab. 10).

Die durchschnittliche Lymphoproliferation der Lyme-Patienten auf das rekombinante Borrelien-Protein OspC unterschied sich ebenfalls nicht signifikant von den seronegativen Kontrollpatienten (3859 ± 2818 bzw. 2833 ± 4798 Δ cpm; $p=0,55$), (Abb. 13a, Tab. 10). Die seronegativen erwachsenen Kontrollpatienten zeigten wieder eine leicht erhöhte zelluläre Immunreaktion gegenüber den seronegativen pädiatrischen Kontrollpatienten auf OspC (2833 ± 4798 bzw. 1165 ± 623 ; $p=0,25$) (Abb. 13b). Auch hier verhielt sich die Lymphoproliferation der Lyme-Patienten umgekehrt: die pädiatrischen Lyme-Patienten proliferierten deutlich höher als die erwachsenen Lyme-Patienten (5866 ± 8234 vs. 3859 ± 2818 Δ cpm; $p=0,37$).

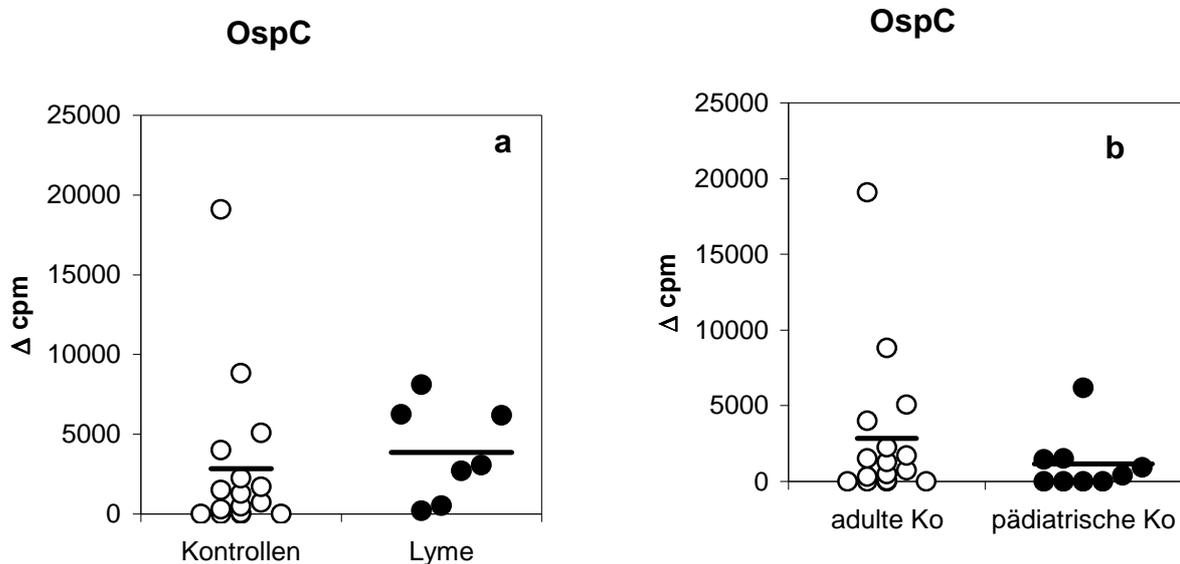


Abbildung 13a: Durchschnittliche Lymphoproliferation auf rekombinantes OspC bei Lyme-Patienten (schwarze Kreise) und seronegativen Kontrollpatienten (weisse Kreise).

Abbildung 13b: Durchschnittliche Lymphoproliferation auf OspC bei seronegativen erwachsenen Kontrollpatienten (weisse Kreise) im Vergleich zu seronegativen pädiatrischen Kontrollpatienten (schwarze Kreise).

4.2.2.3 Osp17

Es wurden insgesamt fünf Lyme-Patienten auf das rekombinante Borrelien-Protein Osp17 untersucht (ACA: n=4; LA: n=1). Alle der fünf getesteten Lyme-Patienten wiesen im Immunoblot Antikörper gegen Osp17 auf, eine signifikante zelluläre Reaktion zeigten jedoch nur drei der Patienten (60%) (Tab. 11).

Die Lymphoproliferation auf Osp17 unterschied sich wie auch bei den anderen Proteinen nicht signifikant von den seronegativen Kontrollpatienten (2617 ± 5295 bzw. 158 ± 265 Δ cpm; $p=0,34$), (Abb. 14a, Tab. 10). Die durchschnittliche Lymphoproliferation der seronegativen erwachsenen Kontrollpatienten war -wie auch bei den anderen Proteinen- im Vergleich zu den seronegativen pädiatrischen Kontrollpatienten leicht erhöht, zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied ($p=0,28$), (Abb. 14b). Im Gegensatz zu den anderen Proteinen war auf Osp17 bei den erwachsenen Lyme-Patienten eine deutlich höhere Lymphoproliferation gegenüber den pädiatrischen Patienten zu beobachten (3140 ± 5617 vs. 406 ± 547 Δ cpm; $p=0,39$).

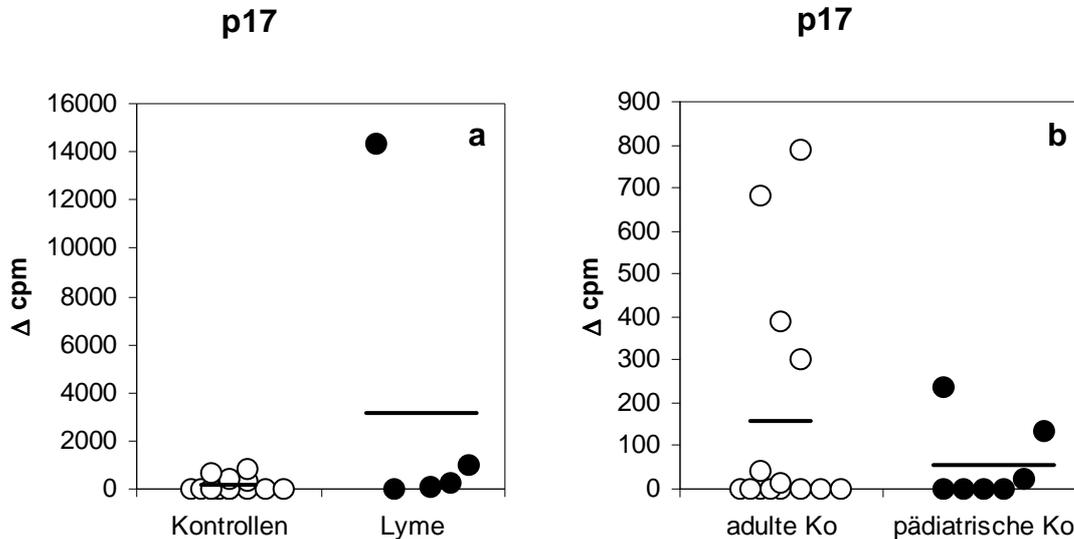


Abbildung 14a: Durchschnittliche Lymphoproliferation auf rekombinantes Osp17 bei Lyme-Patienten (schwarze Kreise) und seronegativen Kontrollpatienten (weisse Kreise).

Abbildung 14b: Durchschnittliche Lymphoproliferation auf Osp17 bei seronegativen erwachsenen Kontrollpatienten (weisse Kreise) im Vergleich zu seronegativen pädiatrischen Kontrollpatienten (schwarze Kreise).

Tabelle 10: zelluläre Immunantwort auf einzelne rekombinante Borrelienproteine bei Erwachsenen. Die zelluläre Immunantwort wurde bei insgesamt neun Erwachsenen mit Lyme-Borreliose im Stadium III untersucht.

Antigen	Lyme-Borreliose		Kontrollen		Durchschnittliche Lymphoproliferation		p
	Patienten [n]	Blutproben [n]	Patienten [n]	Blutproben [n]	Lyme-Borreliose [Δ cpm \pm stdev]	Kontrollen [Δ cpm \pm stdev]	
B. garinii	8	8	14	16	3598 \pm 3542	3303 \pm 6418	0,89
B. afzelii	7	7	14	16	7749 \pm 8479	13463 \pm 10693	0,22
VisE	5	5	2	2	6008 \pm 3691	5815 \pm 4310	0,97
AK+	5	5	2	2	6008 \pm 3691	5815 \pm 4310	0,97
AK-	--	--	--	--	--	--	--
OspC	6	6	16	16	3859 \pm 2818	2833 \pm 4798	0,55
AK+	4	4	16	16	3516 \pm 2867	2833 \pm 4798	0,75
AK-	3	3	16	16	4317 \pm 2685	2833 \pm 4798	0,55
Osp17	5	5	12	12	3140 \pm 5617	158 \pm 265	0,35
AK+	5	5	12	12	3140 \pm 5617	158 \pm 265	0,35
AK-	--	--	--	--	--	--	--
TT	8	8	16	16	32007 \pm 34214	26553 \pm 23883	0,71

Tabelle 11: Vergleich der humoralen und zellulären Immunantwort auf einzelne rekombinante Borrelienproteine im Erwachsenenalter. Die humorale und zelluläre Immunantwort wurde bei insgesamt neun Erwachsenen mit Lyme-Borreliose im Stadium III untersucht.

Antigen	Antikörper positiv ¹				Antikörper negativ ¹			
	Proliferation ²		Proliferation ²		Proliferation ²		Proliferation ²	
	positiv	(%)	negativ	(%)	positiv	(%)	negativ	(%)
VisE	5/5	(100)	-	-	-	-	-	-
OspC	3/4	(75,0)	1/4	(25,0)	2/3	(67,0)	1/3	(33,0)
Osp17	2/5	(40,0)	3/5	(60,0)	-	-	-	-

¹ Antikörper gegen die jeweiligen rekombinanten Proteine wurden im Immunoblot getestet.

² Die Lymphoproliferation wurde nach 6-tägiger antigenen Stimulation von PBMC mittels ³H-Thymidin-Inkorporation gemessen.

Zusammenfassend wurde beobachtet, dass bei den erwachsenen Lyme Patienten in Stadium III eine 100% ige Übereinstimmung der humoralen und zellulären Immunantwort bezüglich des rekombinanten Proteins VisE besteht. Bei den

pädiatrischen Patienten konnte in 75% der Fälle eine zelluläre Reaktion auf VlsE (9/12) beobachtet werden, eine humorale Immunantwort nur in 50% (6/12). Auch auf rekombinantes OspC konnte sowohl bei den pädiatrischen als auch bei den erwachsenen Patienten ein Überwiegen der zellulären Reaktion im Vergleich zur humoralen beobachtet werden. Bei Osp17 verhielt sich das ganze umgekehrt: trotz Antikörperbildung auf Osp17 (47% der pädiatrischen Patienten und 100 % der erwachsenen Patienten) zeigten nur 21% der pädiatrischen und 40% der erwachsenen Patienten eine Lymphoproliferation auf Osp17.

Desweiteren zeigen diese Ergebnisse, dass die erwachsenen seronegativen Kontrollpatienten signifikant höher proliferierten als die seronegativen pädiatrischen Kontrollpatienten. Bei den Lyme-Patienten verhielt es sich umgekehrt: bis auf Osp17 konnte auf die Lysatantigene, VlsE und OspC eine tendenziell höhere Lymphoproliferation bei den pädiatrischen Patienten gegenüber den erwachsenen Lyme-Patienten gesehen werden.

Diese Beobachtungen belegen deutlich, dass die Untersuchungen zur zellulären Immunität mittels bulk-culture assays bei Erwachsenen aufgrund der bereits deutlich erhöhten Lymphoproliferation der gesunden seronegativen Kontrollpatienten nicht zu diagnostischen Zwecken geeignet sind.

4.2.3 Vergleich der Lymphoproliferation auf Tetanustoxoid zwischen Kindern und Erwachsenen

Sowohl bei den Kindern als auch bei den erwachsenen Patienten wurde das Recall-Antigen Tetanustoxoid als Positivkontrolle bei der Messung der Lymphoproliferationen verwendet. Alle untersuchten Patienten waren gegen Tetanus geimpft. Bei den pädiatrischen Patienten wurde die Lymphoproliferation auf Tetanustoxoid in 24 Blutproben von 16 Kindern untersucht ($19527 \pm 25436 \Delta\text{cpm}$), sie unterschied sich nicht signifikant von den 14 Kontrollpatienten ($23940 \pm 25600 \Delta\text{cpm}$), $p=0,62$ (Tab. 8, Abb. 15b). Genauso verhielt es sich bei den acht erwachsenen Patienten: Die durchschnittliche Lymphoproliferation auf Tetanustoxoid betrug $32007 \pm 34214 \Delta\text{cpm}$, die der 14 gesunden Kontrollpatienten 26553 ± 23883 , $p=0,71$, (Tab. 10, Abb. 15a).

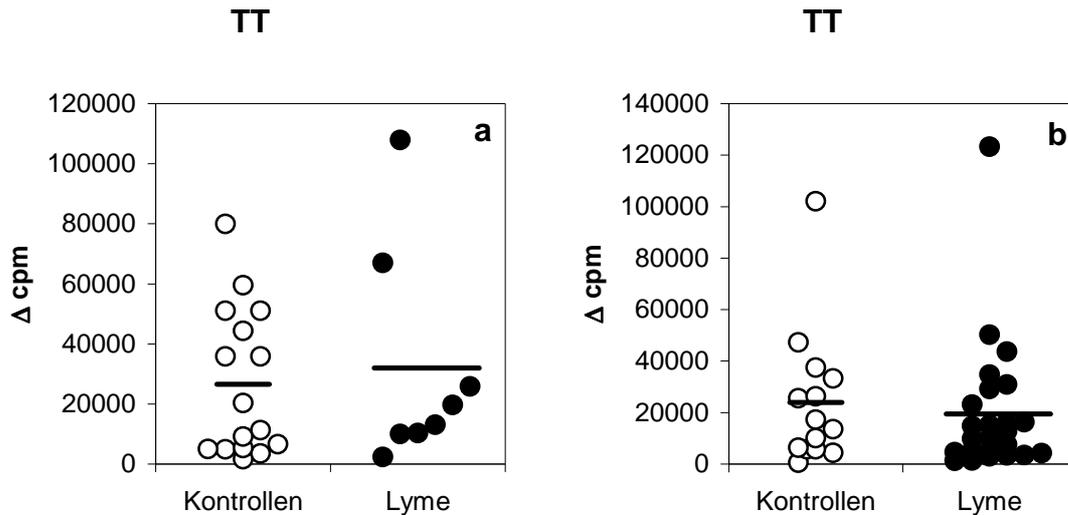


Abb. 15a/15b: Lymphoproliferation auf Tetanustoxoid bei erwachsenen (a) und pädiatrischen (b) Patienten mit Lyme-Borreliose (schwarze Kreise) und gesunden Kontrollen (weisse Kreise).

4.3 Verlaufsuntersuchungen zur humoralen und zellulären Immunantwort auf *B. burgdorferi*, die rekombinanten Proteine VlsE, OspC, Osp17 und Tetanustoxoid im Kindes- und Erwachsenenalter

4.3.1 Verlaufsuntersuchungen zur humoralen und zellulären Immunantwort auf *B. burgdorferi* und Tetanustoxoid im Kindesalter

Im Weiteren sollte die zelluläre Immunantwort im Verlauf der Erkrankung untersucht werden und mit der humoralen Immunantwort verglichen werden. Von insgesamt sechs Kindern (BL: n=2; LA: n=1; NB: n=3) konnte die Lymphoproliferation auf *B. afzelii*, *B. garinii* und Tetanustoxoid zu Erkrankungsbeginn und nach vier Wochen bis zu acht Monaten nach Therapie untersucht werden. Vor antibiotischer Therapie waren sowohl 4/6 (67%) Kinder im IgM als auch im IgG EIA positiv (Tab. 12). Nach antibiotischer Therapie konnte nur bei einem Kind ein positiver IgM EIA beobachtet werden. Bei der Kontrolle persistierte der initial positive IgG EIA Titer nur bei drei von vier Kindern (Tab. 12).

Die zwei Kinder, die initial negative IgG EIA Titer aufwiesen, zeigten bei der Kontrolle keine Serokonversion. Im Gegensatz dazu war die Lymphoproliferation auf *B. afzelii* und *B. garinii* (mit einer Ausnahme) auch nach antibiotischer Behandlung erhalten

geblieben. Die Lymphoproliferation auf Tetanustoxoid zeigte keine relevanten Unterschiede vor und nach antibiotischer Therapie.

Tabelle 7: EIA Befunde vor und nach antibiotischer Therapie

Patient	vor Therapie		nach Therapie	
	IgM-EIA [OD]	IgG-EIA [U/ml]	IgM-EIA [OD]	IgG-EIA [U/ml]
1 (NB-42)	0,548	negativ	negativ	negativ
2 (NB-1)	negativ	9 U/ml	negativ	7 U/ml
3 (NB-41)	0,553	91 U/ml	negativ	41 U/ml
4 (BL-1)	0,378	6 U/ml	negativ	negativ
5 (LA-4)	negativ	> 337 U/ml	negativ	>265 U/ml
6 (BL-2)	1,224	negativ	0,563	negativ

4.3.2 Verlaufsuntersuchungen zur humoralen und zellulären Immunantwort auf die rekombinanten Borrelien-Proteine VlsE, OspC und Osp17 im Kindesalter

Im Weiteren wurden insgesamt 16 Blutproben von acht Kindern im Verlauf einer Borrelieninfektion untersucht. Es sollte getestet werden ob es zu einer Persistenz der Lymphoproliferation auf VlsE, OspC und Osp17 kommt. Vier Kinder waren an einer Neuroborreliose erkrankt, zwei hatten ein Borrelien-Lymphozytom, zwei Kinder erkrankten an einer Lyme-Arthritis. Bei allen acht Kindern waren bei der Kontrolluntersuchung noch borrelienspezifische Antikörper im EIA nachweisbar.

4.3.2.1 VlsE

Vier Patienten wurden auf das rekombinante Protein VlsE zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht. Der durchschnittliche Zeitpunkt der Kontrolluntersuchungen lag bei acht Monaten. Der Patient LA-7 zeigte sowohl bei der Erstuntersuchung als auch bei der Kontrolluntersuchung im Immunoblot VlsE spezifische Antikörper. Auch BL-2 und NB-43 hatten bereits bei der Erstuntersuchung Antikörper gegen VlsE entwickelt. Bei diesen beiden Patienten waren die VlsE Antikörper acht (BL-2) bzw. vier (NB-43) Monate nach der Erstinfektion und erfolgter antibiotischer Therapie nicht

mehr nachweisbar. Lediglich ein Patient (NB-42) entwickelte keine VIsE spezifischen Antikörper. Dieser Patient zeigte jedoch eine relevante Lymphoproliferation auf VIsE bei der Untersuchung bei Erstmanifestation. Diese war jedoch acht Monate später bereits negativ geworden. Auch der Patient LA-7 zeigte bei der Erstuntersuchung eine VIsE spezifische Lymphoproliferation, die dann vier Monate später nicht mehr nachweisbar war. Die restlichen zwei Patienten (BL-2, NB-43) zeigten bei der Erstuntersuchung eine relevante VIsE spezifische Lymphoproliferation, die bei der Kontrolluntersuchung acht (BL-2) bzw. vier (NB-43) Monate nach der Primärinfektion noch nachweisbar war (Tab. 13).

Tabelle 13: Vergleich von serologischen und lymphoproliferativen Befunden vor/nach antibiotischer Therapie bezüglich VIsE

Patient	vor Therapie				nach Therapie			
	EIA-IgM [OD]	EIA-IgG [U/ml]	IgG-IB VIsE	SI* VIsE	EIA-IgM [OD]	EIA-IgG [U/ml]	IgG-IB VIsE	SI* VIsE
1 LA-7	0,794	>292	+++	pos	0,590	>237	+++	neg
2 BL-2	1,224	neg	++	pos	0,563	neg	neg	pos
3 NB-43	1,040	12	+	neg	neg	6	neg	pos
4 NB-42	0,548	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg

* SI = Stimulationsindex (siehe Material und Methodenteil)

4.3.2.2 OspC

Die Reaktivität auf OspC wurde vor und nach Therapie bei fünf Patienten untersucht. Im Durchschnitt wurde die Kontrolle nach sieben Monaten durchgeführt. Lediglich (BL-2) hatte OspC spezifische Antikörper entwickelt, die bei der Kontrolluntersuchung auch noch nachweisbar waren. Alle anderen auf OspC getesteten Patienten (NB-1, BL-1, NB-42, NB-43) hatten weder bei der ersten noch bei der zweiten Untersuchung OspC spezifische Antikörper. Nur Patient (BL-2) zeigte sowohl bei der ersten als auch bei der Kontrolluntersuchung eine deutliche Lymphoproliferation auf OspC. Bei den Patienten (BL-1) und (NB-43) konnte initial keine OspC spezifische Lymphoproliferation gemessen werden, jedoch fünf (BL-1) bzw. vier (NB-43) Monate nach der Erstinfektion war eine deutliche zelluläre Immunreaktion auf OspC nachweisbar. Eine bei Primärinfektion signifikante Lymphoproliferation auf OspC konnte bei den Patienten (NB-1) und (NB-42) festgestellt werden. Diese war jedoch bei der Kontrolluntersuchung einen Monat später bei dem Patienten NB-42 bereits

nicht mehr signifikant. Der Patient NB-1 zeigte fünf Monate nach der Primärinfektion eine relevante Lymphoproliferation auf Osp C, die jedoch bei einer weiteren Kontrolluntersuchung zehn Monate nach der Primärinfektion nicht mehr nachweisbar war (Tab. 14).

Tabelle 14: Vergleich von serologischen und lymphoproliferativen Befunden vor/nach antibiotischer Therapie bezüglich OspC

Patient	vor Therapie				nach Therapie			
	EIA-IgM [OD]	EIA-IgG [U/ml]	IgM-IB OspC	SI* OspC	EIA-IgM [OD]	EIA-IgG [U/ml]	IgM-IB OspC	SI* OspC
1 BL-1	0,378	6	neg	neg	neg	neg	neg	pos
2 BL-2	1,224	neg	+	pos	0,563	neg	+	pos
3 NB-43	1,040	12	neg	neg	neg	6	neg	pos
4 NB-42	0,548	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg
5 NB-1	neg	9	neg	pos	neg	7	neg	neg

* SI = Stimulationsindex

4.3.2.3 Osp 17

Drei pädiatrische Patienten (LA-4, NB-1, NB-41) wurden insgesamt zweimal zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf das rekombinante Oberflächenprotein Osp17 untersucht (durchschnittlicher Zeitabstand 12 Monate). Sowohl der Patient LA-4 als auch der Patient NB-41 wiesen bei der Erstuntersuchung als auch bei der Kontrolluntersuchung nach zwei Jahren (LA-4) bzw. nach drei Monaten (NB-41) im Immunoblot Osp17 spezifische Antikörper auf. Lediglich der Patient NB-1 wies zu keinem Zeitpunkt Osp17 spezifische Antikörper auf. Es ließ sich eine deutlich erhöhte lymphoproliferative Immunantwort auf Osp17 gegenüber der seronegativen Kontrollpatienten nachweisen, diese war jedoch nicht signifikant (Tab. 15).

Tabelle 15: Vergleich von serologischen und lymphoproliferativen Befunden vor/nach antibiotischer Therapie bezüglich Osp17

Patient	vor Therapie				nach Therapie			
	EIA-IgM [OD]	EIA-IgG [U/ml]	IgG-IB Osp17	SI* Osp17	EIA-IgM [OD]	EIA-IgG [U/ml]	IgG-IB Osp17	SI* Osp17
1 LA-4	neg	> 337	++	neg	neg	> 265	neg	neg
2 NB-41	0,553	91	+	neg	neg	41	+	neg
3 NB-1	neg	9	neg	neg	neg	7	neg	neg

4.3.3 Erhaltene Lymphoproliferation bei ausbleibender Serokonversion im Verlauf der Erkrankung bei einem Kind mit Neuroborreliose

Fallbericht:

Im Verlauf wurde ein acht Jahre alter Patient (NB-42) mit einem Bannwarth Syndrom vor antibiotischer Therapie und sechs Wochen nach antibiotischer Therapie mit Ceftriaxon untersucht. Die Diagnose Bannwarth Syndrom wurde über die Anamnese, den klinischen Befund sowie über einen positiven borrelienspezifischen IgM EIA (0,548) im Serum und einen positiven Liquorbefund mit Pleozytose (440/3 Zellen/ μ l) und reaktivem borrelienspezifischem IgM EIA gestellt. Der IgG EIA und der Immunoblot waren sowohl im Serum als auch im Liquor negativ. Der Patient wurde ab dem 2. Erkrankungstag mit Ceftriaxon für 14 Tage i.v. behandelt. Die Stimulationsindices waren zu Beginn der Therapie für das Lysatantigen pKo und die rekombinanten Proteine OspC und VlsE positiv, für das Lysatantigen pBi negativ. Nach der antibiotischen Therapie waren alle serologischen Befunde negativ (IgM/IgG EIA). Die Lymphoproliferation auf die Lysatantigene war auch nach antibiotischer Therapie erhalten geblieben, die Lymphoproliferation auf die rekombinanten Proteine OspC und VlsE war jedoch nicht mehr nachweisbar.

So konnte zusammenfassend beobachtet werden, dass trotz gesicherter systemischer Lyme-Borreliose im Sinne einer Neuroborreliose keine Serokonversion stattgefunden hat, während die Lymphoproliferation auf *B. afzelii* und *B. garinii* erhalten geblieben war. Eine lymphoproliferative Immunantwort auf die rekombinanten Antigene VlsE und OspC war nicht mehr nachweisbar.

4.3.4 Verlaufsuntersuchungen zur Lymphoproliferation auf *B. burgdorferi* und die rekombinanten Borrelien-Proteine bei seronegativen pädiatrischen Patienten mit Erythema migrans

Bei drei Kindern wurde die klinische Diagnose eines Erythema migrans gestellt ohne dass diese Kinder Borrelien spezifische Antikörper im EIA und im Immunoblot aufwiesen. Eine signifikant erhöhte Lymphoproliferation konnte bei allen drei Erythema migrans Patienten auf das Lysatantigen *B. afzelii* festgestellt werden ($p=0,004$). Auf alle anderen getesteten borrelienspezifischen Proteine konnten im

Vergleich zu den seronegativen Kontrollen keine signifikanten Unterschiede in der Lymphoproliferation beobachtet werden (Tab. 16). Eine Patientin wurde am Zeitpunkt der Diagnosestellung und nochmals vier Monate später untersucht: Die Lymphoproliferation auf die Lysantigene war erheblich angestiegen, während die zelluläre Reaktion auf OspC deutlich zurückgegangen war. **Zusammenfassend** konnte nur auf *B. afzelii* eine signifikant erhöhte Lymphoproliferation bei seronegativen pädiatrischen Patienten mit Erythema migrans beobachtet werden.

Tabelle 16: Durchschnittliche Lymphoproliferation auf die Lysantigene, OspC und Tetanustoxoid bei drei seronegativen Patienten mit Erythema migrans und neun seronegativen Kontrollen

Antigene	Erythema migrans [Δcpm]	Kontrollen [Δcpm]	p
B. afzelii	12332 ± 1697	2800 ± 1435	0,004
B. garinii	5906 ± 9054	1165 ± 1871	0,43
OspC	1071 ± 1135	1505 ± 2367	0,76
TT	23156 ± 12809	14430 ± 10237	0,37

4.3.5 Verlaufsuntersuchungen zur humoralen und zellulären Immunantwort auf *B. burgdorferi*, die rekombinanten Proteine VlsE, OspC und Osp17 und Tetanustoxoid im Erwachsenenalter

Fallbericht:

Im Verlauf wurde eine 58-jährige Patientin (LBA-4) mit einer Acrodermatitis chronica atrophicans zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und nach einer 4-wöchigen Therapie mit Doxycyclin 200 mg p.o. untersucht. Der IgG EIA war bei beiden Untersuchungen positiv (> 287 U/ml). Gegen VlsE wies die Patientin bei beiden Untersuchungen Antikörper im Immunoblot auf, ebenso gegen Osp17. Im Immunoblot ließen sich sowohl bei der Erstuntersuchung als auch bei der Kontrolluntersuchung keine Antikörper gegen OspC nachweisen. Zu beiden Zeitpunkten konnte eine signifikante Lymphoproliferation auf OspC und VlsE festgestellt werden. Auf das Lysantigen *B. garinii* war die Lymphoproliferation negativ. Im Gegensatz dazu war eine Lymphoproliferation auf *B. afzelii* bei beiden Untersuchungen nachweisbar. Auch die zelluläre Reaktivität auf Tetanustoxoid war bei der geimpften Patientin immer gleich stark ausgeprägt.

Tabelle 17: EIA Werte der Patientin LBA-4 vor und nach antibiotischer Therapie

LBA-4	vor Therapie	nach Therapie
EIA-IgM	neg	neg
EIA-IgG	> 287	>287

Tabelle 18: Immunreaktion der Patientin LBA-4 auf rekombinante Proteine vor/nach antibiotischer Therapie

	vor Therapie		nach Therapie	
LBA-4	IgG-IB	SI*	IgG-IB	SI*
OspC	neg	pos	neg	pos
VisE	+++	pos	+++	pos
Osp17	+++	nd	+++	neg

* SI = Stimulationsindex

Zusammenfassend konnte beobachtet werden, dass in chronischen Stadien der Lyme-Borreliose (Kinder mit LA, Erwachsene mit ACA) keine signifikanten Unterschiede bezüglich der humoralen und der zellulären Immunantwort vor und nach antibiotischer Therapie gesehen werden. So ist die Persistenz der Immunantwort unabhängig von der antibiotischen Therapie. In akuten systemischen Stadien der Lyme-Borreliose (NB, BL, EM) fällt die Immunantwort unterschiedlich aus. Tendenziell konnte beobachtet werden, dass die serologischen Titer sinken und eine IgG Serokonversion häufig ausbleibt. Trotzdem kann die Lymphoproliferation auch nach Absinken der serologischen Titer noch nachgewiesen werden.

4.4 Funktionelle Charakterisierung von borrelienreaktiven T-Zellen mittels Durchflusszytometrie (FACS)

In früheren Studien konnte beobachtet werden, dass borrelienreaktive T-Lymphozyten von erwachsenen Patienten mit Lyme-Borreliose im Stadium III die Zytokine IFN- γ und IL-10 sezernieren. Dies ist insbesondere deshalb bemerkenswert, da es sich um das gleichzeitige Vorhandensein eines pro- und eines antiinflammatorischen Zytokins handelt. Um der Frage nachzugehen, ob diese Zellen auch bei Kindern mit Lyme-Borreliose nachzuweisen sind, wurde das Zytokinprofil auf *B. burgdorferi* und auf einzelne rekombinante Borrelienproteine untersucht. Da methodisch bedingt - vor allem aufgrund geringer Blutmengen - bei unseren

pädiatrischen Patienten keine T-Zell Klone generiert werden konnten, wurden Assays für die intrazelluläre Zytokinmessung auf single cell level mittels FACS-Analyse etabliert und durchgeführt.

4.4.1 Zytokinsekretion nach Isolierung von PBMCs und Restimulation mit CD3 und CD28/CD49d

Um den Nachweis einer INF- γ Ausschüttung zu führen, wurden folgende Testansätze durchgeführt. Jeweils 10^6 PBMCs wurden entweder mit rekombinantem VlsE und Borrelienlysantigen stimuliert. Tetanustoxoid diente als Positivkontrolle und ein unstimulierter Ansatz wurde als Negativkontrolle verwendet. Nach einer sechstägigen Inkubationszeit wurden die Zellen mit anti-CD3 Antikörpern und als Kostimulation mit anti-CD28/CD49d Antikörpern restimuliert. Nach weiteren sechs Stunden erfolgte die INF- γ Bestimmung mittels FACS Analyse.

Es wurde ein Patient mit seropositivem Erythema migrans (EIA IgG neg; EIA IgM 1,044; IB IgG neg, IB IgM p41/pBi+, p41/pKo+) und eine altersentsprechende seronegative Kontrolle untersucht. Bei dem Patienten konnte auf das Borrelienlysat eine signifikante Zytokinausschüttung (2,64%) gemessen werden, die Stimulation mit VlsE und Tetanustoxoid führte zu einer nachweisbaren, wenngleich geringeren INF- γ Sekretion (Abb. 16/17a-c). Die seronegative Kontrolle hingegen zeigte auf keines der Borrelienantigene oder Tetanustoxoid eine messbare INF- γ Sekretion (Tab. 19).

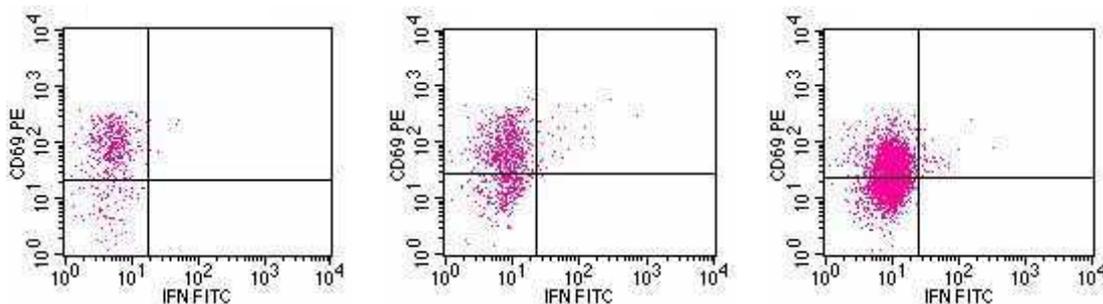


Abbildung 16a-c: INF- γ Sekretion auf Stimulation mit VlsE, Borrelienlysantigen, TT, Patient EM-3

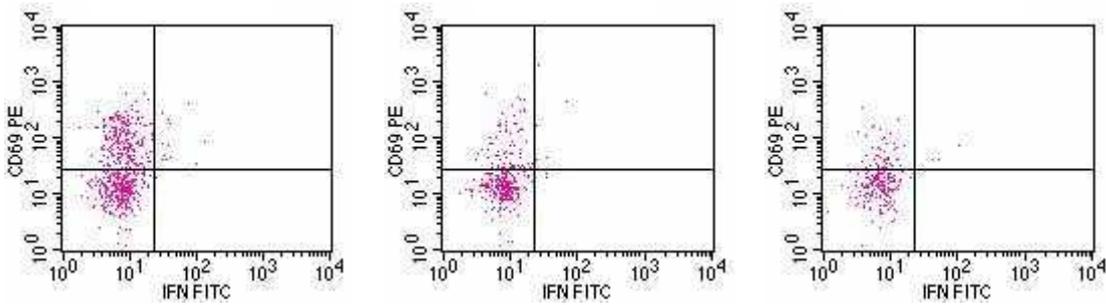


Abbildung 17a-c: INF- γ Sekretion auf Stimulation mit VisE, pBi, TT, seronegative Kontrolle

Tabelle 19: FACS Daten eines Patienten mit Erythema migrans und einer seronegativen Kontrolle

FACS (%)	Patient (EM-3)	Kontrolle
Medium	0,86	0,25
VisE	1,45	1,19
Lysatantigen	2,64	0
Tetanustoxoid	1,08	0,35

4.4.2 Zytokinsekretion nach Isolierung von PBMCs und Restimulation mit PMA/Ionomycin

Da in dem unter 4.4.1 beschriebenen Ansatz eine borrelienspezifische Sekretion von IFN- γ bei dem Patienten mit Lyme-Borreliose nachgewiesen werden konnte, wurde im weiteren ein Assay zur Messung von IFN- γ , IL-4 und IL-10 nach antigenspezifischer Stimulation etabliert.

Es wurde ein pädiatrischer Patient (LA-4, 10 Jahre, Tab. 20) mit einer Lyme-Arthritis des rechten Knies untersucht. Zunächst wurden die PBMCs für eine Woche mit den borrelienspezifischen Antigenen stimuliert. Als Positivkontrolle diente Tetanustoxoid, als Negativkontrolle unstimuliertes Medium. Nach sechs Tagen erfolgte eine unspezifische Restimulation mit PMA/Ionomycin für fünf Stunden. Anschließend erfolgte eine Färbung der T-Lymphozyten mit anti CD4/CD8 Antikörpern und CD69 Antikörpern (aktivierte T-Zellen). Die intrazellulären Zytokine wurden mit anti-IFN- γ Antikörpern, anti-IL10 Antikörpern und anti-IL4 Antikörpern markiert. Ein Prozentanteil > 1 der gegateten Zellen wurde als signifikant gewertet.

Tabelle 20: Patient LA-4: serologische Befunde

Serologie	April 2001	Mai 2001	Oktober 2001
IgG EIA IgM EIA	>441 U/ml 0,438	>337 U/ml negativ	>186 U/ml negativ
IgG Immunoblot	p100++ p58+++ p39+ Osp17+++ VlsE+++	p100+++ p58+++ p39++ Osp17+++ VlsE++	p100+++ p58++ p39++ Osp17+++ p41i/pKo+ VlsE+++
IgM Immunoblot	negativ	negativ	negativ

Nach primärer Antigenstimulation mit Borrelienlysate, OspC und sekundärer Stimulation mit PMA/Ionomycin ließ sich eine deutliche IFN- γ Sekretion im Sinne einer Th-1 Antwort nachweisen, wohingegen die antiinflammatorischen Th-2 Zytokine IL-4 und IL-10 nicht oder nur in sehr geringen Mengen nachweisbar war. (Tab. 21/22/23, Abb. 18-20). Die stärkste Zytokinantwort war auf das Borrelienlysate nachweisbar, 6,97 % der CD4+ Zellen sezernierten IFN- γ , ebenso wie 10,2% der CD8+ Zellen. Die IL-10 Ausschüttung war in keinem Fall signifikant. Obwohl im Immunoblot keine Antikörper gegen OspC nachweisbar waren, induzierte die Stimulation mit OspC eine deutliche IFN- γ Sekretion. Auch nach Stimulation mit rekombinantem OspC war der IFN- γ Nachweis hoch: 4,38% der CD4+ Zellen sezernierten IFN- γ und 6,27% der CD8+ Zellen. Im Gegensatz zu dem vorherigen Testansatz konnte in diesem Assay eine relevante IFN- γ Sekretion auf Tetanustoxoid beobachtet werden. Das Zytokinmuster der T-Zellen nach Stimulation mit Tetanustoxoid unterschied sich somit nicht von dem durch borrelienstimulierter T-Zellen: 4,6% der CD4+ Zellen und 7,53% der CD8+ Zellen sezernierten IFN- γ .

Zusammenfassend konnte bei zwei Patienten mit akuten Manifestationen einer Lyme-Borreliose mittels intrazellulärer Zytokinfärbung ein signifikanter IFN- γ Nachweis nach Stimulation mit Borrelienantigenen geführt werden. Relevante Konzentrationen von IL-4 oder IL-10 konnten nicht nachgewiesen werden.

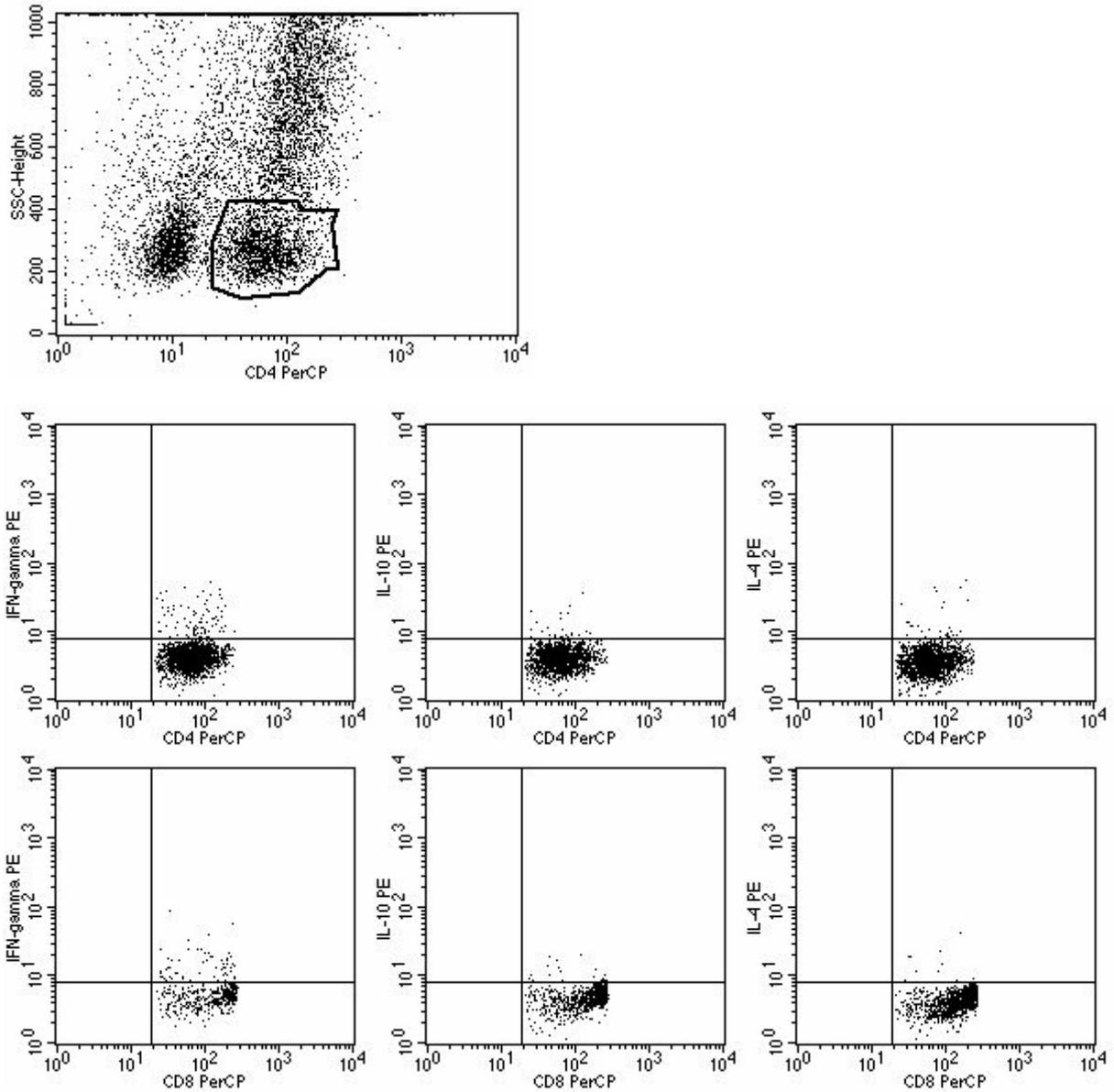


Abbildung 18: Intrazelluläre Zytokinfärbung nach Stimulation mit Borrelienlysate, Dargestellt sind die Ergebnisse eines Patienten mit Lyme-Arthritis; (LA-4)

Tabelle 21: IFN- γ , IL-10 und IL-4 Sekretion nach Stimulation mit Borrelienlysate, Patient LA-4

% of gated cells			
	IFN- γ	IL-10	IL-4
CD 4	6,97	0,92	1,36
CD 8	10,20	1,05	0,61

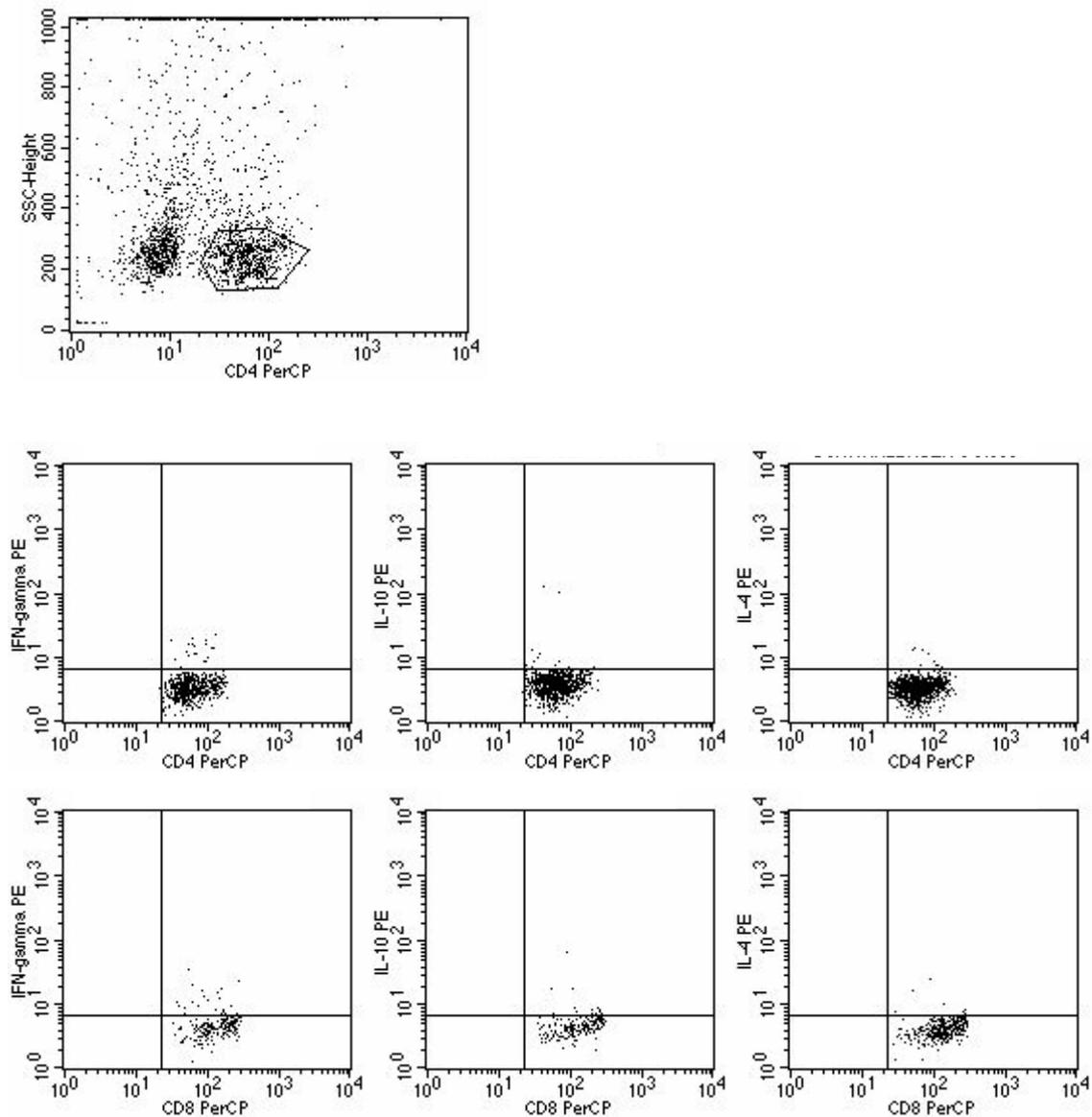


Abbildung 19: Intrazelluläre Zytokinfärbung nach Stimulation mit OspC, Dargestellt sind die Ergebnisse eines Patienten mit Lyme-Arthritis; (LA-4)

Tabelle 22: IFN- γ , IL-10 und IL-4 Sekretion nach Stimulation mit rekombinantem OspC, Patient LA-4

% of gated cells			
	IFN- γ	IL-10	IL-4
CD 4	4,38	1,00	0,64
CD 8	6,27	1,84	0,77

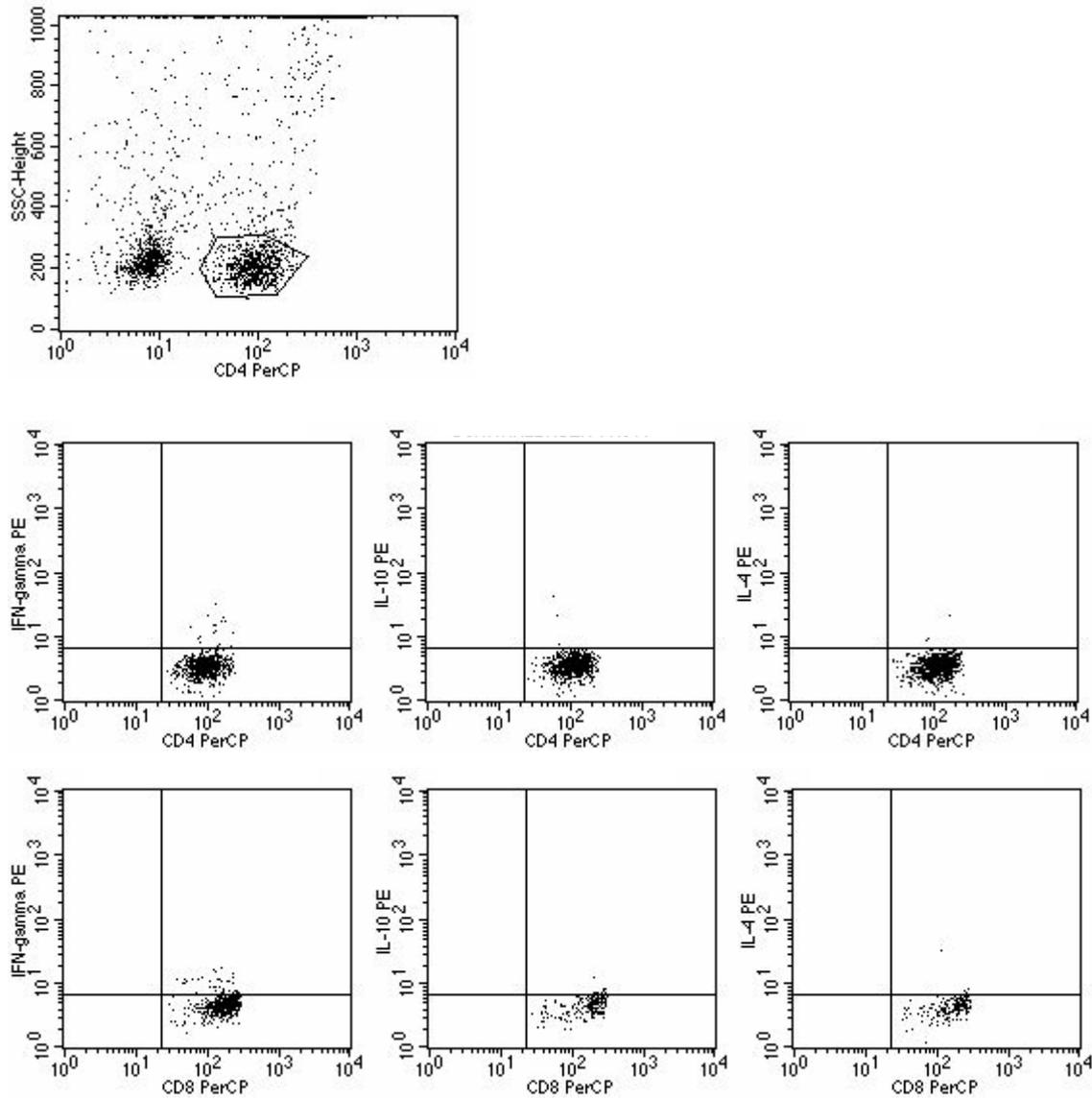


Abbildung 20: Intrazelluläre Zytokinfärbung nach Stimulation mit TT, Dargestellt sind die Ergebnisse eines Patienten mit Lyme-Arthritis; (LA-4)

Tabelle 23: IFN- γ , IL-10 und IL-4 Sekretion nach Stimulation mit TT, Patient LA-4

% of gated cells			
	IFN- γ	IL-10	IL-4
CD 4	4,60	0,69	0,60
CD 8	7,53	1,31	0,70

5 DISKUSSION

Obwohl das Wissen über die Virulenzfaktoren von *B. burgdorferi* und die immunologischen Abwehrmechanismen des Wirtes ständig zunimmt, sind immer noch viele Aspekte der Pathogenese der Lyme-Borreliose ungeklärt. Relativ unverstanden ist die Tatsache, dass immunkompetente, an einer Lyme-Borreliose erkrankte Patienten, trotz einer fulminanten humoralen Immunantwort einen chronischen Verlauf einer Lyme-Borreliose entwickeln können. Eine der beiden momentan diskutierten Hypothesen ist die Persistenz des Erregers, der in einem nicht generativen Zustand verharrt oder in die nicht von Antibiotika erreichten Gebiete abwandert. Die andere Hypothese besagt, dass infektionsbedingte autoimmunpathologische Mechanismen für die Chronifizierung z.B. der Lyme-Arthritis verantwortlich sein könnten (Gross et al. 1998, Kamradt 2002, Priem et al. 1998). Zu einer Persistenz des Erregers kann es kommen, wenn der Erreger die für die Abwehr bedeutsamen Oberflächenproteine häufig verändert (Malawista et al. 2000) oder durch die Vielzahl an unterschiedlichen Adhäsionsmechanismen in abgelegene, dem Immunsystem nicht zugreifbare Körperregionen abwandert (Shapiro et al. 2000, Steere et al. 2001). Zudem kann *B. burgdorferi* als fakultativ intrazelluläres Bakterium in menschlichen Synovialzellen über Wochen trotz ausreichender Antibiotikatherapie überleben (Gierschick et al. 1996). Auch andere immunpathologische Mechanismen wie z.B. Hypersensitivitätsreaktionen auf schwer abbaubare Erregerbestandteile oder die starke Aktivierung des unspezifischen Immunsystems mit der Induktion proinflammatorischer Zytokine durch die Oberflächenproteine können zu einer chronischen Entzündung führen (Infante-Duarte et al. 2000). Zusammenfassend ist es wahrscheinlich, dass die antigenunspezifische Aktivierung des Immunsystems zusammen mit antigenspezifischen Mechanismen zur therapieresistenten chronischen Lyme-Borreliose führt (Steere 2001, Kamradt et al. 2001). In der Annahme, dass sowohl die zelluläre als auch die humorale Immunreaktion bei der Ausprägung des Krankheitsbildes der Lyme-Borreliose eine große Rolle spielen, sollten diese in der vorliegenden Arbeit näher charakterisiert werden. Besonderes Interesse galt dem erst kürzlich entdeckten immunodominanten variablen Oberflächenprotein VlsE, das ein ausgesprochen starker Stimulus sowohl der humoralen als auch der zellulären Immunantwort zu sein scheint.

5.1 Serologische Untersuchungen zu *B. burgdorferi* bei Kindern mit Neuroborreliose und Lyme-Arthritis

Die serologische Diagnostik der Lyme-Borreliose erfolgt bei klinischem Verdacht und läuft in einem zwei-Stufen Schema ab. Zunächst wird der EIA als Suchtest für borrelienspezifische Antigene verwendet. Ist dieser positiv, nutzt man den Immunoblot als Bestätigungstest (Steere 1996, Sigal 1998, Anon 1990). Um die Sensitivität und Standardisierung solcher Tests zu verbessern, werden rekombinante Antigene anstatt Ganzkeim-Lysaten verwendet werden, so dass die reaktiven Banden klar identifiziert werden können (Wilske 2003, Heikkila et al. 2003). Zu beachten ist, dass *B. burgdorferi* spezifische IgM Antikörper in der Regel erst drei bis vier Wochen nach einer Erstinfektion nachweisbar sind, einen Höchstwert nach sechs bis acht Wochen erreichen und dann eine Serokonversion zu IgG Antikörpern stattfindet. Diese IgG-Antikörper sind im Allgemeinen auch nach einer antibiotischen Therapie Jahre später nachweisbar (Steere 2001). Die vergleichsweise lange Latenzzeit bis zum Auftreten von IgM-Antikörpern erklärt, warum beim Erythema migrans, das eine relativ kurze Inkubationszeit (10-14 Tage) hat, häufig keine Antikörper nachzuweisen sind. Eine Studie von Wilske et al. ergab eine Häufigkeit der Antikörperprävalenz von 20-50% (50-90% IgM, 10-50% IgG) bei Patienten mit Erythema migrans (Stadium I), von 70-90% (15-70% IgM, 50-100% IgG) in Stadium II und von 90-100% (3-7% IgM, 90-100% IgG) in Stadium III (Wilske et al. 1993c).

5.1.1 EIA Titer und rekombinanter IgM und IgG Immunoblot bei Kindern mit Neuroborreliose und Lyme-Arthritis

In der vorliegenden Studie ergaben die Untersuchungen zur humoralen Immunantwort auf unterschiedliche Oberflächenproteine von *B. burgdorferi* eine vornehmliche IgM-Antwort bei Kindern mit Neuroborreliose (IgM 85% vs. IgG 38%), während die Kinder mit Lyme-Arthritis vor allem borrelienspezifische IgG Antikörper aufwiesen (IgM 40% vs. IgG 100%). Die Proteine, die in den verschiedenen Immunglobulinklassen erkannt wurden, waren interessanterweise unterschiedlich. So wurden im IgM Bereich bei den Patienten mit Neuroborreliose vor allem p41 und OspC erkannt, während im IgG Bereich das VlsE das am häufigsten erkannte Protein

war. Die Patienten mit Lyme-Arthritis zeigten im IgM Bereich lediglich eine schwach ausgeprägte Reaktion auf p41. Im IgG Bereich konnte auf alle getesteten Proteine bis auf OspC eine humorale Immunantwort beobachtet werden.

Im Tiermodell wurde bereits gezeigt, dass OspC als ein vielversprechender Vakzinekandidat gilt (Preac-Mursic et al. 1992) und dass eine passive Immunisierung von SCID-Mäusen mit Lyme-Arthritis gegen OspC einen positiven Effekt auf die Rückbildung der Arthritis hat (Zhong et al. 1997). Ein Impfstoff basierend auf rekombinantem OspC wird derzeit entwickelt. Da während der Blutmahlzeit der Zecke OspA herunter- und OspC hochreguliert wird, infizieren die OspC exprimierenden Spirochäten den Wirt (Fingerle et al. 1998, Schwan et al. 1995). Dies führt zunächst zu einer humoralen Immunantwort, die gegen OspC gerichtet ist (Fung et al. 1994, Hauser et al. 1997, Wilske et al. 1993c, Wilske et al. 1994).

Die Tatsache, dass bei den Neuroborreliosen im IgM Bereich vor allem OspC (49%) erkannt wurde, zeigt auch eine Studie von Fung et al., in der OspC vor allem in der Frühphase der Infektion eine signifikante humorale Immunantwort mit Synthese von IgM Antikörpern induziert (Fung et al. 1994). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung von rekombinantem OspC im Vergleich zu ganzen Borreliabakterien in der Serodiagnostik im EIA eine höhere Sensitivität (46% versus 28%) und eine identische Spezifität (98% versus 100%) erreicht wurde (Gerber et al. 1995). In unserer Studie wurde das OspC im IgM Immunoblot von 49% der Kinder mit Neuroborreliose erkannt. Im IgG Immunoblot wiesen lediglich 9,4% der pädiatrischen Patienten Antikörper gegen OspC auf. Die an einer Lyme-Arthritis erkrankten pädiatrischen Patienten unserer Studie zeigten weder im IgM noch im IgG Immunoblot Antikörper gegen OspC. Im Vergleich zu unseren Beobachtungen zeigte eine Studie an erwachsenen Patienten mit akuter Neuroborreliose eine etwas geringere Antikörperbildung auf OspC im IgM Bereich (27%) und eine etwas höhere Antikörperbildung im IgG Bereich gegen OspC (17%) (Hauser et al. 1997). Im Gegensatz dazu wiesen erwachsenen Patienten im Stadium III keine OspC-spezifischen IgM-Antikörper, jedoch in 20% der Fälle OspC-spezifische IgG-Antikörper auf (Hauser et al. 1997). Das in unserer Studie am häufigsten erkannte Protein im IgM Immunoblot war das Flagellenprotein p41i (75%). Auch dieses wurde bereits als ein sehr immundominantes Protein in der Frühphase einer Borrelieninfektion beschrieben (Hauser et al. 1997). In 11/21 (52%) Kindern mit

Neuroborreliose trat keine Serokonversion auf. Dies ist wahrscheinlich auf den frühen Beginn einer antibiotischen Therapie zurückzuführen.

5.1.2 Humorale Immunantwort auf das rekombinante Borrelienprotein VlsE im zeitlichen Verlauf

Einen besonderen Stellenwert scheint das Strukturprotein VlsE in der Pathogenese und Diagnostik der Lyme-Borreliose zu haben. Das VlsE ist ein kürzlich identifiziertes, stark immundominantes Protein auf der Borrelienoberfläche, das sowohl eine starke B-Zell als auch eine starke T-Zell Reaktion hervorruft. So war es in unserer Studie bei den Patienten mit Neuroborreliose und Lyme-Arthritis das am häufigsten gebildete Protein im IgG Bereich (59% der Neuroborreliosen, 100% der Lyme-Arthritiden). Dies belegte ebenfalls eine Studie von Schulte-Spechtel et al. (2003) in der der herkömmliche Western Blot um die Proteine VlsE, DbpA und OspC Homologe erweitert wurde. Dabei wurden Seren von 36 erwachsenen Neuroborreliosepatienten und 67 seronegativen Kontrollpatienten untersucht. Die diagnostische Sensitivität dieses Testes war signifikant erhöht (86,1% vs. 52,7%) ohne an Spezifität zu verlieren. In einer Studie von Philipp et al. wurde ein Zusammenhang zwischen Krankheitsaktivität und dem Vorhandensein von anti-IR₆ Antikörpern (Antikörper, die gegen IR₆, eine immundominante Region von VlsE, gerichtet sind) beobachtet. Rhesusaffen und Hunde, die an einer Lyme-Arthritis erkrankt waren und mit einem raschen Anstieg anti-IR₆-spezifischer Antikörper reagierten, zeigten nach erfolgreicher antibiotischer Therapie einen schnellen Abfall dieser Antikörper. Dieser Verlauf konnte nur für die anti-IR₆-Antikörper, nicht aber für Borrelienproteine anderer Spezifität beobachtet werden. Bei den nicht antibiotisch behandelten Tieren persistierten die anti-IR₆-spezifischen Antikörper. Auch bei Patienten mit Therapie-resistenter Lyme-Arthritis war eine Persistenz der anti-IR₆-Antikörper zu beobachten (Philipp et al. 2001). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass anti-IR₆-spezifische Antikörper mit Krankheitsaktivität assoziiert sind und somit möglicherweise von grosser diagnostischer Wichtigkeit sind. In unserer Studie konnten wir bei Patienten mit Neuroborreliose nach antibiotischer Therapie ein Absinken der VlsE-Titer im Verlauf weniger Monate zeigen, dies war von einem Absinken anderer Borrelien-spezifischer Antikörper im Immunoblot und von sinkenden EIA-Titern begleitet. Im Gegensatz dazu konnte bei Patienten mit

erfolgreich behandelter Lyme-Arthritis eine Persistenz sowohl der VlsE-Antikörpertiter als auch der anderen Borrelien-spezifischen Antikörper und der EIA-Titer beobachtet werden. Diese Ergebnisse wurden auch von anderen Autoren bestätigt, so ergab eine Arbeit von Peltomaa et al. (2003) ebenfalls eine Persistenz der VlsE spezifischen Antikörperantwort nach einer erfolgreichen antibiotischen Therapie bei erwachsenen Patienten sowohl in frühen als auch in Spätstadien der Lyme-Borreliose. Eine finnische Arbeitsgruppe (Heikkila et al. 2003) untersuchte die spezifische Antikörperantwort auf BBK32, DbpA, DbpB und IR (6) an 52 Kindern mit serologisch und klinisch bestätigter Lyme-Arthritis. Aber auch hier waren keine signifikanten Unterschiede in der spezifischen Immunantwort vor und nach antibiotischer Therapie nachweisbar. Zusammenfassend hat VlsE einen wichtigen Stellenwert in der Diagnostik der Lyme-Borreliose, die Ergebnisse unserer Studie weisen jedoch darauf hin, dass der Nachweis von VlsE-Antikörpern nicht mit der Krankheitsaktivität korreliert.

5.2 Humorale und zelluläre Immunantwort auf *B. burgdorferi* im Kindes- und Erwachsenenalter

5.2.1 Humorale und zelluläre Immunreaktion auf *B. burgdorferi* und die rekombinanten Proteine VlsE, OspC und Osp17 im Kindesalter

In der vorliegenden Studie wurden 22 Blutproben von 16 Kindern auf das Lysatantigen *B. garinii* und 20 Blutproben von 15 Kindern auf das Lysatantigen *B. afzelii* untersucht. Als seronegative Kontrollgruppe dienten neun bzw. sieben gesunde Kinder. Die Diagnose der Lyme-Borreliose wurde durch positive borrelienspezifische IgG und/oder IgM Antikörper im EIA bzw. im Immunoblot gesichert. Da *B. garinii* und *B. afzelii* am häufigsten im Max-von-Pettenkofer-Institut aus Patientenmaterial isoliert wurden, wurden diese beiden Lysate gewählt (Wilske et al. 1996). Wie auch in anderen Studien wurde in der vorliegenden Arbeit eine signifikant erhöhte Lymphoproliferation auf die Lysatantigene bei den an Lyme-Borreliose erkrankten pädiatrischen Patienten im Vergleich zu den altersentsprechenden gesunden seronegativen Kontrollpatienten festgestellt. Dies traf für Kinder in Stadium I (Erythema migrans), Stadium II (Neuroborreliose) und

Stadium III (Lyme-Arthritis) der Lyme-Borreliose unabhängig vom serologischen Befund zu. Auch bei pädiatrischen Patienten mit Lyme-Arthritis konnte eine signifikant erhöhte Lymphoproliferation im Vergleich zu den gesunden seronegativen Kontrollpatienten beobachtet werden (Huppertz et al. 1996). Die T-zelluläre Immunantwort korrelierte sowohl in unserer Studie als auch in anderen Studien nicht mit der Krankheitsaktivität (Bauer et al. 2001, Horowitz et al. 1994) und blieb in den meisten Fällen über lange Zeit bestehen (Dattwyler et al. 1986). Ähnliche Ergebnisse wurden auch von einer anderen Studie beobachtet, die vor allem erwachsene Patienten mit Lyme-Borreliose untersuchte (Krause et al. 1991).

5.2.1.1 VlsE

Das VlsE gilt als eines der sensitivsten Antigene im IgG und IgM Bereich, so zeigte eine Studie von Goettner et al. (2005), dass die Erweiterung des herkömmlichen Western Blots um die Proteine VlsE und DbpA eine signifikant erhöhte Sensitivität erbrachte (84,7% vs. 70,6% im IgG Bereich und 73,8% vs. 40% im IgM Bereich). Bisherige Studien zur humoralen Immunität gegen VlsE wurden ausschliesslich bei Erwachsenen durchgeführt. Untersuchungen zur zellulären Immunantwort auf VlsE wurden bisher noch nicht durchgeführt. Daher war die Beobachtung der humoralen und zellulären Immunantwort auf VlsE im zentralen Interesse der vorliegenden Studie. In unserer pädiatrischen Studiengruppe war die zelluläre Reaktion auf VlsE stark ausgeprägt: insgesamt zeigten 9/12 Blutproben (75%) eine zelluläre Reaktion auf VlsE. Eine humorale Immunantwort auf VlsE zeigten 6/12 der pädiatrischen Patienten. Lediglich zwei Patienten hatten weder eine humorale noch eine zelluläre Immunreaktion auf VlsE. Obwohl VlsE sowohl eine starke zelluläre als auch humorale Immunantwort induzierte, konnte nicht immer eine Konkordanz der Ergebnisse beobachtet werden. Dies könnte z.B. an der unterschiedlichen Sensitivität der angewandten Testsysteme liegen. Möglicherweise könnte dieses Phänomen auch durch im zeitlichen Ablauf unterschiedliches Auftreten von humoraler und zellulärer Immunantwort erklärt sein.

5.2.1.2 OspC

In unserer Studie wiesen insgesamt 6/20 (30%) Blutproben von fünf Kindern OspC spezifische IgG oder/und IgM Antikörper auf. 1/20 (5%) hatte sowohl IgG als auch

IgM Antikörper, alle anderen 5/20 (25%) hatten lediglich IgM Antikörper. Ein vermehrtes Auftreten von IgM Antikörpern im Gegensatz zu IgG Antikörpern wurde bereits in Studien sowohl bei erwachsenen als auch bei pädiatrischen Patienten mit Neuroborreliose gezeigt (Pohl-Koppe et al. 2001, Hauser et al. 1997). Die zelluläre Immunreaktion auf OspC war etwas stärker ausgeprägt als die humorale Immunantwort: 83,3% der Kinder mit OspC spezifischen Antikörpern und 43% der Antikörper negativen Kinder zeigten auch eine relevante Lymphoproliferation auf OspC. Diese Ergebnisse gleichen denen in einer Studie von Pohl-Koppe et al., in der 91% der pädiatrischen Patienten mit OspC spezifischen Antikörpern und 75% ohne OspC spezifische Antikörper eine signifikante Lymphoproliferation auf OspC zeigen (Pohl-Koppe et al. 2001).

5.2.1.3 Osp17

Im Gegensatz zu OspC tritt eine humorale Immunantwort auf Osp17 in frühen Stadien der Infektion nur selten auf (Hauser et al. 1997, Wilske et al. 1999). In einer Studie von Hauser et al. hatten lediglich 27% der erwachsenen Patienten mit Lyme-Borreliose in Stadium II, 95% dagegen mit Lyme-Borreliose in Stadium III Osp17 spezifische Antikörper im konventionellen Immunoblot entwickelt. Ähnliche Daten wurden in Untersuchungen mit einem rekombinanten Immunoblot für Osp17 erhoben (Wilske et al. 1999). Diese Ergebnisse glichen denen einer Studie von Pohl-Koppe et al., in der 24% der pädiatrischen Patienten mit Lyme-Borreliose im Stadium II Osp17 spezifische Antikörper entwickelt hatten (Pohl-Koppe et al. 2001). Aufgrund der Beobachtung, dass gegen Osp17 vorwiegend in den späten Stadien der Lyme-Borreliose Antikörper auftreten, ist anzunehmen, dass Osp17 erst während der Infektion hochreguliert wird. In Studie von Pohl-Koppe zeigte zudem, dass Osp17 ein nur sehr schwacher Stimulus der T-Zell Proliferation ist. Lediglich 12% der untersuchten Kinder zeigten eine signifikante Lymphoproliferation auf Osp17 (Pohl-Koppe et al. 2001). Diese Ergebnisse gleichen annähernd denen unserer Studie: 8/20 Blutproben von 16 Kindern -ausschliesslich in systemischen Stadien der Lyme-Borreliose- zeigten eine humorale Immunantwort auf Osp17, eine zelluläre Reaktivität war nur in Ausnahmefällen nachweisbar.

5.2.2 Humorale und zelluläre Immunreaktion auf *B. burgdorferi* und die rekombinanten Proteine VlsE, OspC und Osp17 im Erwachsenenalter

Da die zelluläre Immunantwort auf *B. burgdorferi* bei der Ausprägung des Krankheitsbildes eine herausragende Rolle zu spielen scheint, war sie bereits Gegenstand früherer Untersuchungen. So wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen eine signifikant erhöhte Lymphoproliferation auf *B. burgdorferi* bei erwachsenen Lyme-Patienten in frühen Stadien der Krankheit im Vergleich zu seronegativen Kontrollpatienten beobachtet. Dabei ging die zelluläre Immunantwort der humoralen häufig voraus (Dattwyler et al. 1988b, Dattwyler et al. 1988a, Dressler et al. 1991, Häupl et al. 1993).

In unserer Studie wurden acht erwachsene Patienten - ausschließlich in chronischen Stadien der Lyme-Borreliose - im Vergleich zu 14 seronegativen gesunden Kontrollpatienten untersucht. Im Gegensatz zu den pädiatrischen Patienten unterschieden sich erwachsene Patienten und Kontrollen bezüglich der Lymphoproliferation nicht signifikant voneinander, da erwachsene seronegative Kontrollen eine deutlich erhöhte Lymphoproliferation auf Borrelien-Lysat Antigen aufwiesen. Dies wurde auch durch andere Studien bestätigt, die sowohl bei erwachsenen als auch bei pädiatrischen seronegativen gesunden Kontrollpatienten eine erhöhte T-zelluläre Immunantwort ergaben (Zoschke et al. 1991, Huppertz et al. 1996, Roessner et al. 1994). In unserer Studie wurde im Kindesalter eine relevante Lymphoproliferation auf Borrelienantigen bei den gesunden seronegativen Kontrollpatienten nur in Einzelfällen und nur bei Kindern über zehn Jahren beobachtet. Die Tatsache, dass bei Erwachsenen keine signifikanten Unterschiede in der Lymphoproliferation auf die Lysat-Antigene zu sehen war, könnte auf die Verwendung von ganzen sonifizierten Borrelien-Proteinen zurückzuführen sein. Diese enthalten einige Antigene wie z.B. heat shock Proteine, die mit ähnlichen Antigenen anderer Organismen kreuzreagieren und somit eine Immunantwort - beim weitaus ausgereifterem immunologischen Gedächtnis eines Erwachsenen - provozieren (Hansen et al. 1988).

5.2.2.1 VlsE

Bei den erwachsenen Patienten - ausschließlich in chronischen Stadien der Lyme-Borreliose - fiel auf, dass alle fünf getesteten Patienten sowohl eine humorale als auch eine zelluläre Immunantwort auf VlsE zeigten. Jedoch unterschied sich die Lymphoproliferation auf VlsE der erkrankten Patienten nur tendenziell und nicht signifikant von der seronegativen Kontrollgruppe. Dies könnte in der sowieso etwas erhöhten Lymphoproliferation erwachsener seronegativer Kontrollen gegenüber den pädiatrischen Kontrollen begründet sein. Auch diese Daten zeigen, dass das VlsE als kürzlich identifiziertes immunodominantes Oberflächenantigen der Borrelien ein starker Stimulus sowohl der T-zellulären als auch der B-zellulären Immunantwort ist. In Studien konnte gezeigt werden, dass das VlsE als eines der sensitivsten Proteine im IgG Bereich gilt (Schulte-Spechtel et al. 2003, Goettner et al. 2005). Dies könnte auch die Tatsache erklären, dass alle adulten Patienten in ausschliesslich chronischen Stadien der Lyme-Borreliose Antikörper gegen VlsE gebildet haben.

5.2.2.2 OspC

Von den sieben erwachsenen Patienten zeigten fünf eine zelluläre Immunreaktion (71,4%). Drei Patienten wiesen im Immunoblot OspC spezifische Antikörper auf, zwei dieser drei Patienten proliferierten auch auf OspC. Auch drei der vier OspC Antikörper negativen Patienten (75%) proliferierten signifikant auf OspC. Diese Ergebnisse charakterisieren OspC als einen potenten Stimulus sowohl der B- als auch der T-zellulären Immunantwort.

5.2.2.3 Osp17

Von den fünf untersuchten erwachsenen Patienten mit systemischen Formen der Lyme-Borreliose wiesen alle Osp17 spezifische Antikörper auf, 3/5 (60%) zeigten auch eine zelluläre Immunantwort auf Osp17. In einer Studie von Schulte-Spechtel et al. wurde kürzlich beschrieben, dass Osp17 identisch mit dem Decorin-bindenden Protein A (DbpA) ist. Das spielt insofern eine Rolle, da Decorin ein bindegewebe-assoziiertes Proteoglykan und somit ein Hauptbestandteil des Kollagengewebes in den Gelenken ist und somit ein wichtiger Faktor in der Pathogenese der Lyme-Arthritis sein könnte (Schulte-Spechtel et al. 2003). Dies konnte in einer weiteren Studie dadurch belegt werden, dass Decorin-defiziente Mäuse nach einer Infektion

mit *B. burgdorferi* signifikant seltener Borrelien in den Gelenken aufwiesen (Brown et al. 2001). Auch in unserer Studie zeigten 6/7 (86%) der pädiatrischen Patienten mit Lyme-Arthritis Osp17 spezifische Antikörper. Von den erwachsenen Patienten mit Lyme-Arthritis entwickelten 2/3 (67%) Antikörper gegen Osp17.

5.2.3 Lymphoproliferation auf *B. burgdorferi* und auf rekombinante Borrelien-Proteine bei seronegativen pädiatrischen Patienten mit Erythema migrans

Für die frühe Involvierung der T-zellulären Immunantwort spricht auch die Tatsache, dass in Biopsien von seronegativen Erythema migrans Patienten borrelienspezifische T-Zellen nachweisbar waren (Büchner et al. 1987). In unserer Studie konnte bei pädiatrischen Patienten mit klinisch diagnostiziertem Erythema migrans trotz negativer Borrelien-Antikörper im Serum eine signifikant erhöhte Lymphoproliferation auf *B. afzelii* nachgewiesen werden. Dies ist analog zu der Tatsache, dass in der Mehrzahl der Fälle aus Erythema migrans Biopsaten *B. afzelii* nachgewiesen werden konnte (Zore et al. 2002).

5.3 Verlaufsuntersuchungen zur humoralen und zellulären Immunantwort auf *B. burgdorferi*, die rekombinanten Proteine VlsE, OspC und Osp17 im Kindes- und Erwachsenenalter

Bei acht Kindern wurde sowohl die zelluläre als auch die humorale Immunantwort im Lauf der Infektion untersucht. Drei dieser Kinder wiesen ungewöhnliche Titerverläufe auf. So persistierten bei einem Kind die IgM-Antikörper, während eine IgG Serokonversion ausblieb. Eine lange Persistenz von IgM Antikörpern, die nach ca. zwei bis vier Woche ansteigen, um dann dann sechs bis acht Wochen ihr Maximum zu erreichen, wurde bereits von anderen Autoren beschrieben (Christen et al. 1993). Bei einem weiteren Kind kam es trotz initial positiver IgM Titer zu einem Verschwinden dieser Antikörper. Auch hier blieb die IgG Serokonversion aus. Ein komplettes Verschwinden sowohl der IgG als auch der IgM Antikörper fiel bei einem weiteren Patienten auf. Möglicherweise könnte dies durch eine frühzeitige

Antibiotikatherapie bedingt sein, die zum Ausbleiben einer humoralen Immunreaktion oder zu einer fehlenden IgG Serokonversion führt (Dattwyler et al. 1988a, Christen et al. 1993). Es wird vermutet, dass diese Patienten aufgrund der fehlenden protektiven humoralen Immunität für Reinfektionen empfänglich sind. Allerdings wurde ebenfalls beschrieben, dass sich auch nach erfolgter antibiotischer Therapie noch *B. burgdorferi* spezifische Antikörper bilden können (Wilske, Preac-Mursic 1993b).

Im Gegensatz zur humoralen Immunantwort scheint die zelluläre Immunantwort unabhängig von einer antibiotischen Therapie zu sein (Dressler et al. 1991). Bei zwei von vier Kindern, die wiederholt auf das borrelienspezifische Protein VlsE untersucht wurden, blieb die Lymphoproliferation konstant, während bei den anderen beiden Patienten die Lymphoproliferation auf VlsE nicht mehr nachweisbar war. Von den Kindern, die wiederholt auf OspC untersucht wurden, zeigte lediglich eines sowohl bei der Erstuntersuchung als auch bei der Folgeuntersuchung eine signifikante Proliferation auf OspC. Bei zwei weiteren Kindern war die zelluläre Immunreaktion bei der Kontrolluntersuchung bereits nicht mehr signifikant, während wiederum zwei weitere Kinder bei der Erstuntersuchung keine signifikante OspC spezifische Lymphoproliferation aufwiesen, bei der Folgeuntersuchung jedoch signifikant auf OspC proliferierten. Dieses Phänomen, dass eine initial negative T-zelluläre Reaktion nach antibiotischer Therapie noch positiv werden kann, wurde bereits von Huppertz et al. (1996) beobachtet. Im Gegensatz dazu beschrieben andere Studiengruppen (Krause et al. 1991, Horowitz et al. 1994), dass es nach der antibiotischen Therapie zu einem signifikanten Abfall der zellulären Immunreaktion kommen kann.

In unserer Studie wurde eine erwachsene Patientin mit einer Acrodermatitis chronica atrophicans im Verlauf untersucht. Gegen VlsE und Osp17 waren bei beiden Untersuchungen Antikörper nachweisbar, gegen OspC waren keine Antikörper nachweisbar. Dies bestätigt die Tatsache, dass OspC ein Protein ist, das in der Frühphase der Infektion exprimiert wird, jedoch nicht mehr in späten Stadien, wohingegen Osp17 in den chronischen späten Stadien der Lyme-Borreliose exprimiert wird. In der Lymphoproliferation war eine Reaktion auf das Lysatantigen *B. afzelii* nachweisbar, was mit der Tatsache übereinstimmt, dass in Hautbiopsaten bei Acrodermatitis chronica atrophicans fast ausschließlich *B. afzelii* nachgewiesen werden kann. Eine signifikante Lymphoproliferation konnte desweiteren auf OspC und VlsE, jedoch nicht auf Osp17 gezeigt werden.

5.4 Funktionelle Charakterisierung von borrelienreaktiven T-Zellen mittels Durchflusszytometrie (FACS)

Das Subset an aktivierten CD4+ T-Helferzellen während einer Infektion beeinflusst die Effektivität mit der der Wirt eine protektive Immunantwort aufbauen kann. Dies wird durch die Produktion charakteristischer Zytokinprofile erreicht (Mosmann et al. 1989, Scott et al. 1991). Th-1 Zellen, fähig IL-2, Lymphotoxin und IFN- γ zu sezernieren, rufen eine proinflammatorische Immunantwort hervor und regulieren so die Immunität gegenüber intrazellulären Erregern und Viren. Th-2 Zellen dagegen produzieren IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 und vermitteln die humorale Immunität, jedoch inhibieren sie zellvermittelte Entzündungsreaktionen (Mosmann et al. 1986, Sher et al. 1992). Da die Pathogenese - besonders der chronischen Formen der Lyme-Borreliose - trotz einer fulminanten humoralen Immunantwort weitgehend ungeklärt ist, sollten in der folgenden Arbeit die Zytokinmuster nach Stimulation mit borrelienspezifischen Antigenen mittels FACS bei Patienten mit Lyme-Borreliose untersucht werden.

Zur IFN- γ Bestimmung wurden PBMCs mit Borrelienlysate (pKo) bzw. rekombinantem VlsE stimuliert und mit CD3 und CD28/CD49d restimuliert. Es wurden zwei Kinder untersucht: ein Patient mit Erythema migrans und eine seronegative Kontrolle. Der Patient zeigte auf das Lysatantigen eine signifikante IFN- γ Sekretion, auf das rekombinante Protein VlsE war keine IFN- γ Sekretion messbar. Die Kontrollperson zeigte keine relevante IFN- γ Sekretion. Eine höhere Zytokinausschüttung auf Lysatantigenen im Vergleich zu den rekombinanten Borrelienantigenen ist aufgrund möglicher Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen denkbar. Um auszuschließen, dass die ausbleibende IFN- γ Sekretion auf VlsE an einer zu geringen Restimulation mit CD3 und CD28/49d lag, wurde ein Ansatz mit stärkerer Restimulation mit PMA/Ionomycin gewählt.

Nach primärer Antigenstimulation und sekundärer Stimulation mit PMA/Ionomycin ließ sich bei einem Patienten mit akuter Lyme-Arthritis eine deutliche IFN- γ Sekretion im Sinne einer Th-1 Antwort nachweisen. Kaum nachweisbar dagegen waren die antiinflammatorisch wirksamen Th-2 Zytokine IL-4 und IL-10.

Zusammenfassend konnte bei zwei Patienten mit akuter Lyme-Borreliose eine deutliche proinflammatorische Zytokinantwort beobachtet werden. Ähnliche Ergebnisse ergab auch eine Studie einer Arbeitsgruppe, die Patienten im Stadium II

und III der Lyme-Borreliose untersucht hatten: nach Stimulation mit borrelienspezifischen Antigenen war in der Patientengruppe eine deutlich erhöhte IFN- γ Sekretion im Zellkulturüberstand mittels EIA im Vergleich zur Kontrollgruppe messbar. IL-4 war bei den gesunden seronegativen Patienten höher nachweisbar als bei den an Lyme-Borreliose erkrankten Patienten (Oksi et al. 1996).

Gross et al. konnten ebenfalls in einer Studie zur Messung der Th-1 bzw. der Th-2 gesteuerten Immunantwort bei Patienten mit aktiver Arthritis (Lyme-Arthritis, rheumatoide Arthritis) eine ausgeprägte Th-1 Antwort bei allen Patienten in der Synovialflüssigkeit nachweisen. Die Schwere der Erkrankung war zudem durch die Höhe der Th-2 Antwort charakterisiert: je weniger ausgeprägt die antiinflammatorische Th-2 Antwort war, desto therapieresistenter verhielt sich die Arthritis (Gross et al. 1998). Auch entspricht das den Ergebnissen einer schwedischen Arbeitsgruppe, die Patienten mit chronischer/nicht chronischer Neuroborreliose und Patienten mit Acrodermatitis chronica atrophicans versus gesunde seronegative Kontrollpatienten untersucht haben. Diese Studie ergab mittels ELISPOT, dass eine initiale IFN- γ Antwort, gefolgt von einer IL-4 Hochregulation mit nichtchronifizierenden Verläufen assoziiert ist, während eine persistierende IFN- γ Sekretion mit nachfolgend ausbleibender Th-2 Antwort zu einer Chronifizierung der Erkrankung führen kann (Widhe et al. 2004).

Die Rolle von IL-10 wird in der Pathogenese der Lyme-Borreliose kontrovers diskutiert. Ein T-Zell subset, das IFN- γ mit IL-10 sezerniert, wurde bei Patienten mit Stadium III Manifestationen nachgewiesen, was dafür sprechen würde, dass diese T-Zellen eine Rolle in der Unterhaltung der chronischen Borrelien Infektion spielt (Pohl-Koppe et al. 1998).

In einer Pilotstudie wurde das Zytokinprofil von *B. burgdorferi* reaktiven PBMCs bei Kindern vor und drei Monate nach antibiotischer Therapie untersucht. Dabei wurden die Zytokine IFN- γ , IL-4 und IL-10 nach Stimulation mit *B. burgdorferi* Lysat, OspC und Tetanustoxoid mittels EIA im Zellkulturüberstand gemessen. Eine deutliche IFN- γ Sekretion war zu jedem Zeitpunkt nachweisbar, IL-10 konnte jedoch nur vor der antibiotischen Therapie nachgewiesen werden. Unser Patient mit Lyme-Arthritis wurde erst nach erfolgter antibiotischer Therapie untersucht. Um relevante Aussagen zur Zytokinsekretion auf single-cell level treffen zu können ist es notwendig, weitere Untersuchungen durchzuführen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit sollte die humorale und zelluläre Immunantwort gegen das Oberflächenprotein VlsE im Vergleich zu den Oberflächenproteinen OspC und Osp17 bei akuter und chronischer Lyme-Borreliose charakterisiert werden. Dazu wurden 59 Kinder sowohl mit lokalen als auch mit systemischen Formen der Lyme-Borreliose und acht erwachsenen Patienten mit chronischer Lyme-Borreliose untersucht.

EIA-Titer bei Kindern mit Neuroborreliose und Lyme-Arthritis bei Diagnosestellung und im Verlauf

Die Verteilung der EIA Titer bei den Neuroborreliosen ergab bei 76 untersuchten Seren von 40 Kindern, dass 41% der Patienten nur borrelienspezifische IgM-Antikörper, 14% der Patienten nur borrelienspezifische IgG-Antikörper und 28% der Patienten sowohl borrelienspezifische IgM als auch IgG Antikörper aufwiesen. Von den 15 untersuchten Seren von fünf Kindern mit Lyme-Arthritis hatten 87% nur borrelienspezifische IgG-Antikörper, die restlichen 13% sowohl borrelienspezifische IgM als auch IgG- Antikörper im EIA.

Rekombinanter IgM und IgG Immunoblot bei Kindern mit Neuroborreliose und Lyme-Arthritis bei Diagnosestellung

Um die EIA Befunde zu spezifizieren wurde ein Immunoblot durchgeführt. Im IgM Blot wurden Antikörper gegen die Proteine p41i, OspC, p39 und p100, im IgG Blot gegen die Proteine VlsE, Osp17, OspC, p39, p58 und p100 untersucht. Das im IgM-Immunoblot am häufigsten erkannte Protein bei Kindern mit Neuroborreliose war das Flagellenprotein p41i (78% bei 29 von 37 Kindern), das zweithäufigste das OspC (49% bei 18/37). Im IgG-Immunoblot war bei den Kindern mit Neuroborreliose das VlsE das am häufigsten erkannte Protein (59%). Die Kinder mit Lyme-Arthritis zeigten in 20% der Fälle eine Reaktion auf p41 im IgM Blot, gegen die restlichen Proteine konnten im IgM Blot keine Antikörper nachgewiesen werden. Auch hier war das VlsE das am häufigsten erkannte Protein (100%) im IgG Blot, gegen p41 waren in 80% der Fälle Antikörper nachweisbar, gegen p17 in 60%. Kein Patient mit Lyme-Arthritis zeigte im IgG Blot Antikörper gegen OspC. So konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche klinische Manifestationen wie Lyme-Arthritis oder Neuroborreliose mit einer humoralen Immunantwort gegen unterschiedliche Borrelienproteine assoziiert sind.

Verlaufsbeobachtung der Immunoblotbefunde für p41, OspC und VlsE bei Kindern mit Neuroborreliose und Lyme-Arthritis

Da im IgM Immunoblot das p41 und das OspC die am häufigsten erkannten Proteine bei Neuroborreliose waren, wurden bei neun Patienten Verlaufsuntersuchungen bezüglich der Persistenz dieser Antikörper durchgeführt. 78% zeigten bei Erstdiagnose Antikörper gegen p41, die im Verlauf bei der Hälfte der Patienten negativ wurden. Nur drei dieser neun Patienten zeigten eine humorale Immunantwort auf OspC, die im Verlauf erhalten blieb. Im IgG Immunoblot war sowohl bei den Neuroborreliosen wie auch den Lyme-Arthritiden das VlsE das am häufigsten erkannte Protein. Es konnte im Verlauf bei den Kindern mit Neuroborreliose bei 87% ein Absinken bzw. Verschwinden der VlsE spezifischen Antikörper nach antibiotischer Therapie beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wiesen alle Kinder mit Lyme-Arthritis nach erfolgreicher antibiotischer Therapie weiterhin VlsE-spezifische Antikörper auf.

Humorale und zelluläre Immunantwort auf B. burgdorferi und Tetanustoxoid im Kindes- und Erwachsenenalter

Im Weiteren sollte die zelluläre Immunantwort näher charakterisiert werden. Es konnte bei den pädiatrischen Patienten eine signifikant erhöhte Lymphoproliferation auf die rekombinanten Proteine VlsE und OspC gegenüber der seronegativen Kontrollgruppe gezeigt werden. Die Lymphoproliferation der Lyme-Patienten auf Osp17 war im Vergleich zu den seronegativen Kontrollpatienten deutlich, jedoch nicht signifikant erhöht. Es konnte in 75% der Fälle eine zelluläre Reaktion auf VlsE (9/12) beobachtet werden, eine humorale in 50% (6/12). Im Gegensatz zu Osp17 konnte auch auf rekombinantes OspC ein Überwiegen der zellulären im Vergleich zur humoralen (55% vs. 30%) Immunantwort beobachtet werden.

Bei den erwachsenen Lyme Patienten bestand in Stadium III eine 100% ige Übereinstimmung der humoralen und zellulären Immunantwort bezüglich des rekombinanten Proteins VlsE. Auch auf rekombinantes OspC konnte bei den erwachsenen Patienten ein Überwiegen der zellulären Reaktion im Vergleich zur humoralen beobachtet werden. Bei Osp17 verhielt sich das ganze umgekehrt: trotz Antikörperbildung auf Osp17 (47% der pädiatrischen Patienten und 100 % der erwachsenen Patienten) zeigten nur 21% der pädiatrischen und 40% der erwachsenen Patienten eine Lymphoproliferation auf Osp17. Desweiteren konnte

beobachtet werden, dass die erwachsenen seronegativen Kontrollpatienten signifikant höher proliferierten als die seronegativen pädiatrischen Kontrollpatienten.

Verlaufsuntersuchungen zur humoralen und zellulären Immunantwort auf *B. burgdorferi*, die rekombinanten Proteine VlsE, OspC, Osp17 und Tetanustoxoid im Kindes- und Erwachsenenalter

In chronischen Stadien der Lyme-Borreliose (Kinder mit LA, Erwachsene mit ACA) konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der humoralen und der zellulären Immunantwort vor und nach antibiotischer Therapie gesehen werden. So scheint die Persistenz der Immunantwort in diesen Stadien unabhängig von der antibiotischen Therapie zu sein. In akuten systemischen Stadien der Lyme-Borreliose (NB, BL, EM) fiel die Immunantwort unterschiedlich aus. Tendenziell konnte beobachtet werden, dass die serologischen Titer im Verlauf sanken und eine IgG Serokonversion häufig ausblieb. Trotzdem konnte in der Regel die Lymphoproliferation auch nach Absinken der serologischen Titer noch nachgewiesen werden.

Funktionelle Charakterisierung von borrelienreaktiven T-Zellen mittels Durchflusszytometrie (FACS)

Da beschrieben wurde, dass die chronische Borrelieninfektion mit der Sekretion pro- und antiinflammatorischer Zytokine einhergeht, wurde die zelluläre Immunantwort auf single-cell level untersucht. Ein signifikanter IFN- γ Nachweis nach Stimulation mit Borrelienantigenen konnte bei zwei Patienten mit akuten Manifestationen einer Lyme-Borreliose geführt werden. Relevante Konzentrationen von IL-4 oder IL-10 konnten nicht nachgewiesen werden.

Insgesamt haben unsere Daten dazu beigetragen, die humorale sowie die zelluläre Immunantwort auf *B. burgdorferi* besser zu verstehen. Dies gilt insbesondere für das erst kürzlich entdeckte immundominante Oberflächenprotein VlsE, das besonders in akuten Stadien der Lyme-Borreliose bei Kindern sowohl eine ausgeprägte zelluläre als auch humorale Immunantwort hervorruft.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Ackermann R, Gollmer E, Rehse-Kupper B (1985) Progressive Borrelia encephalomyelitis. Chronic manifestation of erythema chronicum migrans disease of the nervous system. *Dtsch Med Wochenschr* 110:1039-1042

Adam T, Gassmann GS, Rasiyah C, Göbel UB (1991) Phenotypic and genotypic analysis of Borrelia burgdorferi isolates from various sources. *Infect Immun* 59:2579-2585

Afzelius A (1910) Verhandlungen der dermatologischen Gesellschaft zu Stockholm. Sitzung vom 28. Oktober 1909. *Arch Derm Syph (Berlin)* 101:104

Anon (1990) Case definitions for public health surveillance. Lyme disease. *Morbidity and Mortality Weekly Reports* 39:19-21

Bannwarth A (1941) Chronische lymphocytäre Meningitis, entzündliche Polyneuritis und "Rheumatismus". Ein Beitrag zum Problem "Allergie und Nervensystem" in zwei Teilen. *Arch Psychiatr Nervenkr* 113:284-376

Barbour AG (1984) Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. *Yale J Biol Med* 57:521-525

Barbour AG, Hayes SF, Heiland RA, Schrupf ME (1986) A Borrelia genus-specific monoclonal antibody binds to a flagellar epitope. *Infect Immun* 52:549-554

Barbour AG, Hayes SF. Biology of Borrelia species. *Microbiol Rev* 1986 50:381-400

Barthold SW, Souza MS de, Feng S (1996) Serum-mediated resolution of Lyme arthritis in mice. *Lab Invest* 74:57-67

Bauer Y, Hofmann H, Jahraus O, Mytilineos J, Simon MM, Wallich R (2001) Prominent T cell response to a selectively in vivo expressed Borrelia burgdorferi outer surface protein (pG) in patients with Lyme disease. *Eur J Immunol* 31 (3):767-776

Brown EL, Wooten RM, Johnson BJ, Iozzo RV, Smith A, Dolan MC, Guo BP, Weis JJ, Hook M (2001) Resistance to Lyme disease in decorin-deficient mice. *J Clin Invest* 107:845-852

Buchner SA, Lautenschlager S, Itin O, Bircher A, Erb P (1995) Lymphoproliferative responses to *Borrelia burgdorferi* in patients with erythema migrans, acrodermatitis chronica atrophicans, lymphadenosis benigna cutis and morphea. *Arch Dermatol* 131:673-677

Buchner SA, Ruffli T (1987) Erythema chronicum migrans: evidence for cellular immune reaction in the skin lesion. *Dermatologica* 174:144-149

Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grunwaldt E, Davis JP (1982) Lyme Disease - a tick borne spirochetosis? *Science* 216:1317-1319

Christen HJ, Eiffert H, Ohlenbusch A, Hanefeld F (1995) Evaluation of the polymerase chain reaction for the detection of *Borrelia burgdorferi* in cerebrospinal fluid of children with acute peripheral facial palsy. *Eur J Ped* 154:374-377

Christen HJ, Hanefeld F, Eiffert H, Thomssen R (1993) Epidemiology and clinical manifestations of Lyme Borreliosis in childhood. A prospective multicenter study with special regard to neuroborreliosis. *Acta Paediatr Suppl* 386:S1-S76

Dattwyler RJ, Thomas JA, Benach JL, Golightly MG (1986) Cellular Immune Response in Lyme Disease: The Response to Mitogens, Live *Borrelia burgdorferi*, NK Cell Function and Lymphocyte Subsets. *Zbl Bakt Hyg A* 263, 151-159

Dattwyler RJ, Volkman DJ, Luft BJ, Halperin JJ, Thomas J, Golightly MG (1988a) Seronegative Lyme disease. Dissociation of specific T- and B-lymphocyte responses to *Borrelia burgdorferi*. *N Engl J Med* 319:1441-1446

Dattwyler RJ, Volkman DJ, Halperin JJ, Luft BJ, Thomas J, Golightly MB (1988b) Specific immune responses in Lyme borreliosis: characterization of T cell and B cell responses to *Borrelia burgdorferi*. *Ann NY Acad Sci* 539: 93-102

Deutsche Gesellschaft für pädiatrische Infektiologie (DGPI): Lyme-Borreliose. In: DGPI e.v. (Hrsg.) Handbuch 2003. Infektionen bei Kindern und Jugendlichen. 4. Aufl. Futuramed, München, pp. 477-484

Dressler F, Yoshinari NH, Steere AC (1991) The T-cell proliferative assay in the diagnosis of Lyme disease. *Ann Intern Med* 115:533-539

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 (Berlin)* 187:121-126

Fung BP, McHugh GL, Leong JM, Steere AC (1994) Humoral immune responses to outer surface protein C of *Borrelia burgdorferi* in Lyme disease: role of the immunoglobulin M response in the serodiagnosis of early infection. *Infect Immun* 62:3213-3221

Garin C, Bujadoux (1922) Paralyse par les tiques. *J Med Lyon* 71:765-767

Gerber MA, Shapiro ED, Bell GL, Sampieri A, Padula SJ (1995) Recombinant outer surface protein C EIA for the diagnosis of early Lyme disease. *J Infect Dis* 171:724-727

Gerber MA, Shapiro ED, Burke GS, Parcels VJ, Bell GL (1996) Lyme disease in children in southeastern Connecticut. *N Engl J Med* 335:1270-1274

Gern L, Schaible UE, Simon MM (1993) Mode of inoculation of the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi* influences infection and immune responses in inbred strains of mice. *J Infect Dis* 167:971-975

Gierschick HJ, Huppertz HI, Rüssmann H, Krenn V, Karch H (1996) Intracellular persistence of *Borrelia burgdorferi* in human synovial cells. *Rheumatol Int* 16:125-132
Goettner G, Schulte-Spechtel U, Hillermann R, Liegl G, Wilske B, Fingerle V (2005) Improvement of Lyme borreliosis serodiagnosis by a newly developed recombinant immunoglobulin G (IgG) and IgM line immunoblot assay and addition of VlsE and DbpA homologues. *J Clin Microbiol* 43(8):3602-3609

Gross D, Steere A, Huber B (1998) T helper 1 response is dominant and localized to the synovial fluid in patients with Lyme-Arthritis. *J Immunol* 15;160(2):1022-1028

Gross DM, Forsthuber T, Tary-Lehmann M et al (1998) Identification of LFA-1 as a candidate autoantigen in treatment-resistant Lyme-Arthritis. *Science* 281:703-706

Hansen K, Bangsberg JM, Fjordvang H, Pedersen NS, Hindersson P (1988) Immunochemical characterization of and isolation of the gene for a *Borrelia burgdorferi* immunodominant 60-kilodalton antigen common to a wide range of bacteria. *Infect Immun* 56:2047-2053

Häupl T, Hahn G, Rittig M, Krause A, Schoerner C, Schönherr U, Kalden JR, Burmester GR (1993) Persistence of *Borrelia burgdorferi* in ligamentous tissue from a patient with chronic Lyme borreliosis. *Arthritis Rheum* 36:1621-1626

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

Heikkila T, Huppertz HI, Seppala I, Sillanpaa H, Saxen H, Lahdenne P (2003) Rekombinant or peptide antigens in the serology of Lyme arthritis in children. *J Infect Dis* 187 (12):1888-1894

Herzer P, Wilske B, Preac-Mursic V, Schierz G, Schattenkirchner M, Zollner M (1986) Lyme arthritis: clinical features, serological and radiographic findings of cases in Germany. *Klin Wochenschr* 64:206-215

Hobusch D, Christen HJ, Huppertz HI, Noack R (1999) Diagnostik und Therapie der Lyme-Borreliose im Kindesalter. Empfehlungen der deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Infektiologie. *Monatsschr Kinderheilkd* 147:800-805

Horowitz HW, Pavia CS, Bittker S, Forseter G, Cooper D, Nadelman RB, Byrne D, Johnson RC, Wormser GP (1994) Sustained cellular immune responses to *Borrelia burgdorferi*: lack of correlation with clinical presentation and serology. *Clin Diagn Lab Immunol* 1(4):373-378

Huppertz HI, Mösbauer S, Busch D, Karch H (1996) Lymphoproliferative responses to *Borrelia burgdorferi* in the diagnosis of Lyme arthritis in children and adolescents. *Eur J Pediatr* 155:297-302

Infante-Duarte C, Horton HF, Byrne MC, Kamradt T (2000) Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in T helper (Th) cells. *J Immunol* 165:6107-6115

Kaiser R (1998a) Neuroborreliosis. *J Neurol* 245:247-255

Kaiser R (1998b) Frühsommermeningoenzephalitis und Lyme-Borreliose - Prävention vor und nach Zeckenstich. *Dtsch Med Wschr* 123:847-853

Kamogawa Y, Minasi LE, Carding SR, Bottomly K, Flavell RA (1993) The relationship of IL-4 and IFN gamma producing T-cells studied by lineage ablation of IL-4 producing cells. *Cell* 75:985-995

Kamradt T (2002) Lyme disease and current aspects of immunization. *Arthritis Res* 4:20-29

Kamradt T, Lengel-Janssen B, Strauss A, Bansal G, Steere AC (1996) Dominant recognition of a *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A peptide by T helper cells in patients with treatment resistant Lyme arthritis. *Infect Immun* 64:1284-1289

Kamradt T, Mitchison NA (2001) Advances in immunology: tolerance and autoimmunity. *N Engl J Med* 344:655-664

Keane-Myers A, Maliszewski CR, Finkelman FD (1996) Recombinant IL-4 treatment augments resistance to *Borrelia burgdorferi* infections in both normal susceptible and antibody-deficient susceptible mice. *J Immunol* 156:2488-2494

Keane-Myers A, Nickell P (1995) Role of IL-4 and IFN- γ in modulation of immunity to *Borrelia burgdorferi* in mice. *J Immunol* 155:2020-2028

Kramer MD (1997) Immunologie und Immunpathologie. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart pp. 17-24; 61-62

Krause A, Brade V, Schoerner C, Solbach W, Kalden JR, Burmester GR (1991) T cell proliferation induced by *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme borreliosis. *Arthritis Rheum* 34:393-402

Krause A, Burmester GR, Rensing A, Schoerner C, Schaible UE, Simon MM, Herzer P, Kramer MD, Wallich R (1992) Cellular immune reactivity to recombinant OspA and flagellin from *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme borreliosis. *J Clin Invest* 90:1077-1084

Lengl-Janssen B, Strauss AF, Steere AC, Kamradt T (1994) The T helper cell response in Lyme arthritis: differential recognition of *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A in patients with treatment-resistant or treatment-responsive Lyme arthritis. *J Exp Med* 180:2069-2078

Liang FT, Aberer E, Cinco M, Gern L, Hu CM, Lobet YN, Ruscio M, Voet PE, Weynants VE, Philipp MT (2000) Antigenic Conservation of an Immunodominant Invariable Region of the VlsE Lipoprotein among European Pathogenic Genospecies of *Borrelia burgdorferi* SL. *J Infect Dis* 182:1455-1462

Liang FT, Alvarez AL, Gu Y, Nowling JM, Ramamoorthy R, Philipp MT (1999a) An immunodominant conserved region within the variable domain of VlsE, the variable surface antigen of *Borrelia burgdorferi*. *J Immunol* 163:5566-5573

Liang FT, Steere AC, Marques AR, Johnson BJB, Miller JN, Philipp MT (1999b) Sensitive and specific serodiagnosis of Lyme disease by enzyme-linked immunosorbent assay with a peptide based on an immunodominant conserved region of *Borrelia burgdorferi* VlsE. *J Clin Microbiol* 37: 3990-3996

Luft BJ, Gorevic PD, Jiang W, Munoz P, Dattwyler RJ (1991) Immunologic and structural characterization of the dominant 66- to 73- kDa antigens of *Borrelia burgdorferi*. *J Immunol* 146:2776-2783

Malawista SE, Montgomery RR, Wang XM et al. (2000) Geographic clustering of an outer surface protein A mutant of *Borrelia burgdorferi*: possible implications of multiple variants for Lyme disease persistence. *Rheumatology* 39:537-541

Matyniak JE, Reiner SL (1995) T helper phenotype and genetic susceptibility in experimental Lyme disease. *J Exp Med* 181:1251-1254

Oksi J, Savolainen J, Pène J, Bousquet J, Laippala P, Viljanen M (1996) Decreased Interleukin-4 and Increased Gamma Interferon Production by Peripheral Blood Mononuclear Cells of Patients with Lyme Borreliosis. *Infect Immun* 64:3620-3623

Peltomaa M, McHugh G, Steere AC (2003) Persistence of the antibody response to the VlsE sixth invariant region (IR6) peptide of *Borrelia burgdorferi* after successful antibiotic treatment of Lyme disease. *J Infect Dis* 187 (8):1178-1186

Philipp MT, Bowers LC, Fawcett PT, Jacobs MB, Liang FT, Marques AR, Mitchell PD, Purcell JE, Ratterree MS, Straubinger RK (2001) Antibody response to IR₆, a Conserved Immunodominant Region of the VlsE Lipoprotein, Wanes Rapidly after Antibiotic Treatment of *Borrelia burgdorferi* Infection in Experimental Animals and in Humans. *J Infect Dis* 184:870-878

Pohl-Koppe A, Balashov KE, Steere AC, Logigian EL, Hafler DA (1998) Identification of a T cell subset capable of both IFN-gamma and IL-10 secretion in patients with chronic *Borrelia burgdorferi* infection. *J Immunol* 160:1804-1810

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* 189:193-200

Preac-Mursic V, Wilske B, Patsouris E (1992) Active immunization with pC protein of *Borrelia burgdorferi* protects gerbils against *Borrelia burgdorferi* infection. *Infection* 20:342-349

Priem S, Burmester GR, Kamradt T, Wolbart K, Rittig MG, Krause A (1998) Detection of *Borrelia burgdorferi* by polymerase chain reaction in synovial membrane, but not in synovial fluid from patients with persisting Lyme arthritis after antibiotic therapy. *Ann Rheum Dis* 57:118-121

Roehrig JT, Piesman J, Hunt AR, Keen MG, Happ CM, Johnson BJ (1992) The hamster immune response to tick-transmitted *Borrelia burgdorferi* differs from the response to needle-inoculated, cultured organisms. *J Immunol* 149:3648-3653

Roessner K, Fikrig E, Russell JQ, Cooper SM, Flavell RA, Budd RC (1994) Prominent T lymphocyte response to *Borrelia burgdorferi* from peripheral blood of unexposed donors. *Eur J Immunol* 24:320-324

Schaible UE, Gay S, Museteanu C, Kramer MD, Zimmer G, Eichmann K, Museteanu U, Simon MM (1990) Lyme borreliosis in the severe combined immunodeficiency (SCID) mouse manifests predominantly in the joints, heart, and liver. *Am J Pathol* 137:811-820

Schulte-Spechtel U, Lehnert G, Liegl G, Fingerle V, Heimerl C, Johnson BJ, Wilske B (2003) Significant improvement of the *Borrelia*-specific immunoglobulin G immunoblot test by addition of VlsE and DbpA homologue derived from *Borrelia garinii* for diagnosis of early neuroborreliosis. *J Clin Microbiol* 41:1299-1303

Schwan TG, Piesman J (2000) temporal changes in outer surface proteins A and C of the Lyme disease-associated spirochete, *Borrelia burgdorferi*, during the chain of infection in ticks and mice. *J Clin Microbiol* 38:382-388

Schwan TG, Piesmann J, Golde WT, Dolan MC, Rosa PA (1995) Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:2909-2913

Schwarzenbach R, Djawari D (1999) Multiple Erythemata migrantia bei Borreliose im Stadium 2. *Monatsschr Kinderheilkd* 147:751-753

Seder RA, Paul WE (1994) Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T-cells. *Ann Rev Immunol* 12:635-673

Shapiro ED, Gerber MA (2000) Lyme disease. *Clin Infect Dis* 31:533-542

Sigal LH (1998) Musculoskeletal manifestations of Lyme arthritis. *Rheumatic Disease Clinics of North America* 24: 323-351

Simpson WJ, Schrupf ME, Schwan TG (1990) Reactivity of human Lyme borreliosis sera with a 39 kDa antigen specific to *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol* 28:1329-1337

Steere AC (2001) Lyme disease. *N Engl J Med* 345:115-125

Steere AC, Batsford WP, Weinberg M, Alexander J, Berger HJ, Wolfson S, Malawista SE (1980) Lyme carditis: cardiac abnormalities of Lyme disease. *Ann Intern Med* 93:8-16

Steere AC, Berardi VP, Weeks KE, Logigian EL, Ackermann R (1990a) Evaluation of the intrathecal antibody response to *Borrelia burgdorferi* as a diagnostic test for Lyme neuroborreliosis. *J Infect Dis* 161:1203-1209

Steere AC, Gibofski A, Patarroyo ME, Winchester RJ, Hardin JA, Malawista SE (1979) Chronic Lyme arthritis. Clinical and immunogenetic differentiation from rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med* 90:896-901

Steere AC, Gross D, Meyer AL et al. (2001) Autoimmune mechanisms in antibiotic treatment-resistant Lyme arthritis. *J Autoimmunity* 16:263-268

Steere AC, Malawista SE, Snyderman DR, Shope RE, Andiman WA (1976) A cluster of arthritis in children and adults in Lyme, Connecticut. *Arthritis Rheum* 19:824

Steere AC, Schoen RT, Taylor E 1987 The clinical evolution of Lyme arthritis. *Ann Intern Med* 107:725-731

Weber K, Schierz G, Wilske B, Preac-Mursic V (1985) Das Lymphozytom - eine Borreliose? *Z Hautkr* 15;60(20):1585-1598

Widhe M, Jarefors S, Ekerfelt C, Vrethem M, Bergstrom S, Forsberg P, Ernerudh J (2004) Borrelia-specific interferon-gamma and interleukin-4 secretion in cerebrospinal fluid and blood during Lyme borreliosis in humans: association with clinical outcome. *J Infect Dis* 189 (10):1881-1891

Williams CL, Strobino B, Lee A, Curran AS, Benach JL, Inamdar S, Christofaro R (1990) Lyme disease in childhood: clinical and epidemiologic features in ninety cases. *Ped Inf Dis J* 9:10-14

Wilske B (2003) Diagnosis of lyme borreliosis in europe. *Vector Borne Zoonotic Dis* 3 (4):215-227

Wilske B, Bader L, Pfister HW, Preac-Mursic V (1991) Diagnostik der Lyme-Neuroborreliose. *Fortschr Med* 22:441-446

Wilske B, Barbour AG, Bergström S, Burman N, B.I. R, Rosa PA, Schwan T, Soutschek E, Wallich R (1992) Antigenic variation and strain heterogeneity in *Borrelia* spp. *Res Microbiol* 143:583-596

Wilske B, Busch U, Fingerle V, Jauris-Heipke S, Preac-Mursic V, Roessler D, Will G (1996) Immunological and molecular variability of OspA and OspC. Implications for *Borrelia* vaccine development. *Infection* 24:208-212

Wilske B, Fingerle V, Hauser U, Rösler D (1997) Borrelien. *Diagnost Bibliothek* 48:1-12

Wilske B, Fingerle V, Herzer P (1993c) Recombinant immunoblot in the serodiagnosis of Lyme borreliosis. Comparison with indirect immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assay. *Med Microbiol Immunol* 182:255-270

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 (Berlin)* 183:43-59

Wilske B, Habermann C, Fingerle V, Hillenbrandt 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 (Berlin)* 188:139-144

Wilske B, Preac-Mursic V (1993c) Microbiological diagnosis of Lyme borreliosis. In: Weber K, Burgdorfer W (eds) *Aspects of Lyme borreliosis*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 267-300

Wilske B, Preac-Mursic V, Göbel UB, Graf B, Jauris S, Soutschek E, Schwab E, Zumstein G (1993a) An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis. *J Clin Microbiol* 31:340-350

Wilske B, Preac-Mursic V, Jauris S (1993b) Immunological and molecular polymorphisms of OspC, an immunodominant major outer surface protein of *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 61:2182-2191

Yoshinari NH, Reinhardt BN, Steere AC (1991) T cell responses to polypeptide fractions of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme arthritis. *Art Rheum* 34:707-713

Zeidner N, Dreitz M, Belasco D (1996) Suppression of acute *Ixodes scapularis*-induced *Borrelia burgdorferi* infection using tumor necrosis factor-alpha, interleukin-2, and interferon-gamma. *J Infect Dis* 173:187-95

Zhang JR, Hardham JM, Barbour AG, Norris SJ (1997) Antigenic variation in Lyme disease *Borreliae* by promiscuous recombination of VMP-like sequence cassettes. *Cell* 89:275-285

Zhong W, Stehle T, Museteanu C, Siebers A, Gern L, Kramer M, Wallich R, Simon MM (1997) Therapeutic passive vaccination against chronic Lyme disease in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:12533-12538

Zore A, Ruzic-Sabljić E, Maraspin V, Cimperman J, Lotric-Furlan S, Pikelj A, Jurca T, Logar M, Strle F (2002) Sensitivity of culture and polymerase chain reaction for the etiologic diagnosis of erythema migrans. *Wien Klin Wochenschr* 114 (13-14):606-609

Zoschke DC, Skemp AA, Defosse DL (1991) Lymphoproliferative responses to *Borrelia burgdorferi* in Lyme disease. *Ann Intern Med* 114:285-289

8 ANHANG TABELLEN

Tabelle 1a: Gruppe I: pädiatrische Patienten (NB-1 bis NB-14)

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	Sonstiges	EM	IgG-ELISA Serum	IgM-ELISA Serum	Zellen Liquor	IgM-ELISA Liquor	IgG-ELISA Liquor
NB-1 NB-1 NB-1	m	9	Meningitis	KS	li Wange	neg 9 7	neg neg neg	5	reaktiv	reaktiv
NB-2 NB-2 NB-2 NB-2	w	9	Meningitis	KS, Fieber	li Thorax	neg neg neg neg	0,551 1,095 0,417 0,474	570	reaktiv	neg
NB-3 NB-3	m	10	Fazialisparese	Nackensteif	re Wange	neg neg	neg 0,503	23	neg	neg
NB-4	w	12	Fazialisparese	KS	nein	11	1,79	453	reaktiv	reaktiv
NB-5 NB-5 NB-5 NB-5	w	11	Parese li Arm	KS	nein	150 120 240 20	1,185 1,162 0,713 neg	9	neg	reaktiv
NB-6	w	6	Fazialisparese	nicht bekannt	fragl li Backe	neg	1,398	6	neg	neg
NB-7 NB-7	m	7	Meningitis	KS, AV-Block I	nein	67 13	0,887 neg	0	reaktiv	reaktiv
NB-8 NB-8	w	5	Fazialisparese	AS	nein	61 146	neg neg	10	nicht bekannt	nicht bekannt
NB-9 NB-9	w	3	Fazialisparese	KS	nein	neg neg	0,342 neg	50	reaktiv	neg
NB-10 NB-10 NB-10	w	13	Meningitis	KS	nicht bekannt	6 6 neg	2,062 1,701 1,136..	erhöht	nicht bekannt	nicht bekannt
NB-11	m	9	Bannwarth	HWS-Schm	fragl. Nuchal	neg	neg	230	neg	reaktiv
NB-12	m	11	Fazialisparese	nicht bekannt	nein	neg	neg	270	reaktiv	neg
NB-13	w	10	Fazialisparese	KS	li Schulter	5	0,826	42	neg	neg
NB-14 NB-14 NB-14	m	10	Bannw, mEM	KS, RS	nicht bekannt	neg neg neg	1,748 0,833 neg	600	reaktiv	neg

Tabelle 1b: Gruppe I: pädiatrische Patienten (NB-15 bis NB-30)

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	Sonstiges	EM	IgG-ELISA Serum	IgM-ELISA Serum	Zellen Liquor	IgM-ELISA Liquor	IgG-ELISA Liquor
NB-15	m	9	Fazialisparese	KS, BS	nicht bekannt	neg	0,739	120	neg	neg
NB-15						neg	n			
NB-16	w	5	Fazialisparese	KS	nein	neg	0,443	292	reaktiv	reaktiv
NB-17	m	10	Fazialisparese	nicht bekannt	re Ohr	neg	0,314	300	neg	neg
NB-17						neg	neg			
NB-18	m	4	Fazialisparese	nicht bekannt	re Ohr	neg	1,026	38	neg	neg
NB-19						neg	0,841			
NB-19	m	8	Fazialisparese	KS	nicht bekannt	neg	0,583	nd	nd	nd
NB-20	w	5	Fazialisparese	nicht bekannt	nein	neg	1,465	17	neg	neg
NB-21	m	11	Fazialisparese	nicht bekannt	nein	neg	0,839	26	neg	neg
NB-21						neg	0,6			
NB-21						neg	neg			
NB-22	m	6	Fazialisparese	nicht bekannt	nein	110	0,905	28	reaktiv	reaktiv
NB-23	m	7	Fazialisparese	KS	nein	80	1,174	3	neg	reaktiv
NB-24	w	7	Fazialisparese	nicht bekannt	nicht bekannt	neg	0,744	52	reaktiv	neg
NB-25	w	8	Fazialisparese	KS	re Wange	17	0,679	75	neg	neg
NB-26	m	5	Fazialisparese	KS	nein	57	1,249	683	1,825	2,106
NB-26						39	0,817			
NB-26						8	neg			
NB-27	m	10	Fazialisparese	nicht bekannt	nicht bekannt	neg	1,652	220	reaktiv	neg
NB-28	w	10	Abducensparese	KS	nein	>250	0,377	9	reaktiv	reaktiv
NB-28						>590	0,387			
NB-28						>450	0,481			
NB-28						390	0,571			
NB-28						260	neg			
NB-29	m	8	Fazialisparese	nicht bekannt	nein	neg	0,462	0	neg	neg
NB-29						neg	0,571			
NB-29						neg	0,265		neg	neg
NB-30	w	4	Fazialisparese	rez Hörstürze	nein	neg	0,469	2	neg	neg

Tabelle 1c: Gruppe I: pädiatrische Patienten (NB-31 bis NB-43)

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	Sonstiges	EM	IgG-ELISA Serum	IgM-ELISA Serum	Zellen Liquor	IgM-ELISA Liquor	IgG-ELISA Liquor
NB-31	m	6	Fazialisparese			neg	0,560	54	neg	neg
NB-31			EM	Ohrenschm	re Wange	12	0,312			
NB-32	m	14	Fazialisparese	KS	nein	32	0,371	1	neg	neg
NB-33	m	7	Fazialisparese	KS, BS	nein	neg	1,154	500	reaktiv	neg
NB-33						neg	0,363			
NB-34	w	4	Fazialisparese	KS	multifokal	neg	1,139	10	reaktiv	neg
NB-35	m	13	Fazialisparese	nicht bekannt	multifokal	19	1,928	93	reaktiv	reaktiv
NB-36	w	11	Fazialisparese	nicht bekannt	multifokal	16	1.500	9	reaktiv	reaktiv
NB-37	m	10	Fazialisparese	nicht bekannt	nicht bekannt	31	neg			
NB-37						23	neg	0	neg	neg
NB-37						33	neg			
NB-38	w	8	Fazialisparese	nicht bekannt	nicht bekannt	neg	1,283	81	neg	neg
NB-38						neg	0,412			
NB-39	m	9	Fazialisparese	nicht bekannt	multifokal	neg	0,544	66	reaktiv	neg
NB-39						neg	neg			
NB-40	w	8	Fazialisparese	KS	nein	neg	0,429	0	reaktiv	neg
NB-41	m	8	asept Meningitis	KS	nicht bekannt	91	0,553	1	neg	0,339
NB-41						41	neg	nd	nd	nd
NB-42	m	8	Bannwarth-Syndrom	Beinschmerzen	nicht bekannt	neg	0,548	440/3		reaktiv
NB-42		8				neg	neg	nd	nd	nd
NB-43	m	9	aseptische Meningitis	KS	nicht bekannt	12	1,04	6.	unbekannt	unbekannt
NB-43						6	neg	nd	nd	nd

Tabelle 1d: Gruppe I: pädiatrische Patienten (BL-1 bis LA-7)

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	IgG-ELISA	IgM-ELISA
				Serum	Serum
BL-1	m	7	BL	6	0,378
BL-1			BL	neg	neg
BL-2	m	8	BL	neg	1,224
BL-2			BL	neg	0,563
EM-1	m	13	rez. EM	8	0,37
EM-2	m	10	Z.n. EM	neg	0,753
EM-3	m	12	EM	neg	1,044
EM-4	m	6	multiple EM	>29	1,811
EM-5	w	7	EM	neg	neg
EM-5			EM	neg	neg
EM-6	w	10	EM	neg	neg
EM-7	w	12	EM	neg	neg
LA-1	m	3	LA Knie li	66	neg
LA-1				80	neg
LA-1				53	neg
LA-2	m	10	LA Knie re	>290	neg
LA-2				370	neg
LA-2				78	neg
LA-3	m	7	LA Knie li	>443	neg
LA-3				>219	neg
LA-4	m	11	LA Knie re	>441	0.438
LA-4				>337	neg
LA-4				>186	neg
LA-5	m	9	LA Knie re	>580	0.365
LA-5				>1400	neg
LA-5				510	neg
LA-5				330	neg
LA-6	m	15	LA	181	neg
LA-7	m	18	rez. LA	>292	0,794
LA-7				>237	0,59

Tabelle 2: Gruppe II: adulte Patienten (LBA-1 bis LBA-8)

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	IgG-ELISA	IgM-ELISA	PCR Haut
				Serum	Serum	
LBA-1	m	44	LA	51	neg	nd
LBA-2	m	54	ACA	>172	0,402	pos
LBA-3	w	75	ACA	>155	neg	nd
LBA-4	w	54	ACA	>287	neg	nd
LBA-4			ACA	>287	neg	nd
LBA-5	w	59	ACA	>201	neg	nd
LBA-6	m	32	LA	>296	neg	nd
LBA-7	w	32	ACA	>323	1,415	nd
LBA-8	w	56	LA	>381	0,452	nd

Tabelle 3: Gruppe III: pädiatrische Kontrollen (KO-1 bis KO-9)

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	IgM-ELISA	IgG-ELISA
				Serum	Serum
KO-1	m	14	FP idiopathisch	neg	neg
KO-2	m	10	FP idiopathisch	neg	neg
KO-3	w	8	gesund	neg	neg
KO-4	m	10	Arthritis	neg	neg
KO-5	m	8	FP idiopathisch	neg	neg
KO-6	m	13	FP idiopathisch	neg	neg
KO-7	w	13	gesund	neg	neg
KO-8	m	14	gesund	neg	neg
KO-9	w	11	Arthritis	neg	neg

Tabelle 4: Gruppe IV: adulte Kontrollen (KO-1 bis KO-14)

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	IgM-ELISA	IgG-ELISA
				Serum	Serum
KO-1	w	64	gesund	neg	neg
KO-2	m	67	gesund	neg	neg
KO-3	w	27	gesund	neg	neg
KO-4	m	37	gesund	neg	neg
KO-5	m	29	gesund	neg	neg
KO-6	m	29	gesund	neg	neg
KO-7	w	26	gesund	neg	neg
KO-8	w	26	gesund	neg	neg
KO-9	m	28	gesund	neg	neg
KO-10	m	28	gesund	neg	neg
KO-11	w	27	gesund	neg	neg
KO-12	w	28	gesund	neg	neg
KO-13	m	33	gesund	neg	neg
KO-14	w	35	gesund	neg	neg

9 VERZEICHNISSE

9.1 Abkürzungen

ACA	Acrodermatitis chronica atrophicans
B. burgdorferi	Borrelia burgdorferi
BL	Borrelien-Lymphozytom
BS	Bauchschmerz
cpm	counts per minute
EIA	ELISA
EM	Erythema migrans
FP	Fazialisparese
IB	Immunoblot
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KS	Kopfschmerz
LA	Lyme-Arthritis
MEM	minimal essential medium
NB	Neuroborreliose
nd	nicht durchgeführt
neg	negativ
Osp	outer surface protein
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PCR	polymerase chain reaction
PHS	pooled human serum
pos	positiv
rpm	rounds per minute
SI	Stimulationsindex
TT	Tetanus Toxoid

9.2 Wichtige Lieferanten für den Laborbedarf

Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala Sweden

- Ficoll-Paque™ PLUS

Becton Dickinson Biosciences, San Jose, Kalifornien, USA

- BD FastImmune CD4 Intracellular Cytokine Detection Kit Anti-Hu-IFN γ
- Durchflusszytometer

Firma Biochrom

- Penicillin/Streptomycin 10000E/10000 μ g/ml
- fetales Kälberserum

Firma Chiron-Behring , Marburg

- Tetanustoxoid (TT)

GIBCO Life Technologies

- Minimum Essential Medium with Earle´s salts
- 1 molarer Hepes Puffer
- RPMI 1640 Medium

Max-von-Pettenkofer-Institut, München

- Rekombinante Proteine OspC, Osp17, p39 und VlsE
- sonifiziertes Bakterienlysate von ganzen B. burgdorferi Bakterien, Spezies B. afzelii, Stamm PKo, und B. garinii, Stamm PBi

Merck, Darmstadt

- BSA; Albumin Fraktion V (Rinderserum)
- Natriumazid
- Hepes Puffer

SIGMA, St. Louis, MO 63178 USA

- Phorbol 12-Myristat13-Azetat
- Ionomycin
- Monensin
- Saponin

10 DANKSAGUNG

Bei Frau PD Dr. A. Pohl-Koppe bedanke ich mich für die Überlassung des Themas und die hervorragende und kontinuierliche Betreuung zu allen Zeitpunkten der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. P. Herzer und seinem Praxisteam danke ich für die Bereitstellung der Seren der erwachsenen Lyme-Patienten.

Bei Frau Prof. Dr. B. Wilske und Herrn Dr. V. Fingerle, Referenzzentrum für Lyme-Borreliose in Deutschland, Max-von-Pettenkofer-Institut, möchte ich mich für die Durchführung der serologischen Tests bedanken.

Herrn Prof. Dr. B. Belohradsky, Abteilung für antimikrobielle Therapie und Infektionsimmunologie im Dr. von Haunerschen Kinderspital danke ich, dass er mir die Durchführung experimenteller Arbeiten in seinem Labor ermöglicht hat. Insbesondere möchte ich mich bei den engagierten technischen Assistentinnen der Abteilung für antimikrobielle Therapie und Infektionsimmunologie Frau Eckerlein, Frau Bieberle und Frau Hofmann bedanken.

Meiner Familie und meinem Freundeskreis danke ich für die Bereitstellung ihrer Seren als gesunde erwachsene Kontrollpersonen und die geduldige Unterstützung während der Entstehung dieser Arbeit.

11 VERÖFFENTLICHUNGEN

Teile dieser Arbeit wurden als Poster auf wissenschaftlichen Kongressen vorgestellt:

A. Pohl-Koppe, A. Kaunicnik, **F. Nagel**, B. Wilske. OspC, but not Osp17 induces a significant immune response in early disseminated Lyme disease in children. IXth International Conference on Lyme Borreliosis and other tick-borne diseases. New York, August 2002

A. Pohl-Koppe, **F. Nagel**, B. Wilske. "Overtreatment" bei akuter peripherer Fazialisparese durch Neuroborreliose. Deutsche Gesellschaft für Kinderheilkunde, Leipzig, September 2002. Kinder- und Jugendmedizin 2002; 2 (Abstracts): A36, PF4.3

A. Pohl-Koppe, **F. Nagel**, B. Wilske. Humorale und zelluläre Immunantwort auf VlsE bei Kindern mit Lyme-Borreliose. Deutsche Gesellschaft für Kinderheilkunde, Bonn, September 2003. Conference Proceedings, S. 75, KHF 12.04F

A. Pohl-Koppe, A. Kaunicnik, **F. Nagel**, B. Wilske. Untersuchungen zur ausbleibenden IgG-Serokonversion bei Kindern mit Neuroborreliose. Deutsche Gesellschaft für Kinderheilkunde, Bremen, September 2005, Monatsschrift Kinderheilkunde 2005, 153 (Suppl.2): K072.04P

12 LEBENSLAUF

Persönliche Daten:

Name: Nagel
 Vorname: Felicitas
 Geburtsdatum/-ort: 02.10.1976, München

Schulbildung:

1983-1987 Grundschohle in München
 1987-1996 Louise-Schroeder-Gymnasium,
 München

Freiwilliges soziales Jahr:

1996-1997 heilpädagogische Kindertagesstätte,
 München

Hochschulbildung:

1997-2003 Studium der Humanmedizin an der
 LMU, München

3/1999 **Physikum**

3/2000 **Erstes Staatsexamen**

8/2000 Beginn der **Doktorarbeit** bei PD Dr.
 Annette Pohl-Koppe, Dr. von
 Haunersches Kinderspital, München

3/2002 **Zweites Staatsexamen**

10/2002-12/2002 **Praktisches Jahr**
 University of Sydney, Australien,
 Innere Medizin

12/2002-09/2003 LMU München, Poliklinik Innenstadt,
 Innere Medizin

02/2003-06/2003 LMU München, Dr. von Haunersches
 Kinderspital, Pädiatrie

06/2003-09/2003 Krankenhaus München Schwabing,
 Chirurgie

10/03	Drittes Staatsexamen und ärztliche Teilapprobation
10/04	ärztliche Vollapprobation
seit 11/03	ÄiP/Assistenzärztin am Dr. von Haunerschen Kinderspital, Klinikum der LMU München