

Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Borrelien

– Ultrastruktur und Immunzytologie –

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

vorgelegt von Birgit Röble
Juli 2001

eingereicht am: 26. Juli 2001

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Gerhard Wanner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Volker Müller

Sonderberichterstatter: PD Dr. Bettina Wilske

Tag der mündlichen Prüfung: 09. November 2001

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Publikation:

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

Kongreßbeitrag:

Posterpräsentation beim DGHM-Kongreß in Regensburg vom 11.-14- Oktober 1999 in Regensburg:

Röble, B., Wanner, G., Wilske, B. (1999) Ultrastrukturelle Untersuchungen an Borrelien

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen	III
I Einleitung	1
II Material	15
II.1 Borrelienstämme und Klone	15
II.2 Zelllinie.....	15
II.3 Chemikalien für die Kultur und Zubehör	15
II.4 Chemikalien und Geräte für die Proteinbestimmung, Gelelektrophorese und Westernblot	16
II.5 Chemikalien und Geräte für die Antikörperreinigung	17
II.6 Chemikalien und Zubehör für die Elektronenmikroskopie	17
II.7 Chemikalien und Zubehör für die Lichtmikroskopie.....	18
II.8 Mikroskope	19
II.9 Zentrifugen und Zubehör.....	19
II.10 Chemikalien und Geräte für die Filmentwicklung.....	19
II.11 Programme für die digitale Bildverarbeitung	20
III Methoden	21
III.1 Kultur der Borrelien	21
III.2 Kultur der Astrozyten.....	22
III.3 Koinkubation von humanen Astrozyten und Borrelien	23
III.4 Proteinbestimmung	24
III.5 Affinitätschromatographische Reinigung der monoklonalen Antikörper	24
III.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	25
III.6.1 Vorbereitung der Proteinproben	25
III.6.2 Herstellung der SDS-Polyacrylamid-Gele und Gelelektrophorese.....	26
III.6.3 Färben der Proteinbanden	27
III.7 Westernblot.....	28
III.7.1 Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran	28
III.7.2 Färben der Nitrocellulosemembran.....	29
III.7.3 Blockieren unspezifischer Bindungsstellen.....	29
III.7.4 Nachweis der Proteine auf der Nitrocellulosemembran.....	30
III.8 Erzeugen von kokkoiden Morphotypen bei Borrelien.....	31
III.9 Lichtmikroskopische Methoden	31
III.9.1 DAPI-Färbung.....	31
III.9.2 Vitalfärbung.....	32
III.9.3 Immunfluoreszenztest (IFT)	32
III.9.4 Färbung humaner Astrozyten mit „DiO“	34
III.10 Elektronenmikroskopische Methoden.....	34
III.10.1 Fixieren, <i>en bloc</i> -Kontrastieren und Entwässern	34
III.10.2 Gefrierbruch von kokkoiden Morphotypen	37
III.10.3 Kritisch-Punkt-Trocknung (KPT), Montieren, Besputtern bzw. Bedampfen der Proben.....	37
III.10.4 Einbetten in Kunstharz	38

III.10.5 Befilmen von Trägernetzchen.....	38
III.10.6 Bedampfen und Beglimmen der Trägernetzchen.....	39
III.10.7 Negativkontrastierung	39
III.10.8 Schneiden.....	39
III.10.9 Nachkontrastieren	40
III.10.10 Immun-Gold-Markierung für die Rasterelektronenmikroskopie.....	40
IV Ergebnisse.....	43
IV.1 Reinigung der MAK und Bestimmung der Proteinkonzentration.....	43
IV.2 Ultrastrukturelle Untersuchungen an <i>Borrelia afzelii</i> Stamm PKo.....	46
IV.3 Untersuchungen des Einflusses von Hypotonie auf die Ultrastruktur der Borrelienzelle.....	60
IV.4 Subzelluläre Lokalisation immunologisch wichtiger Borrelienproteine	71
IV.4.1 Optimierung der Immun-Gold-Markierung für REM.....	71
IV.4.2 Einfluß der Gold-Kolloidgröße des Konjugats auf die Markierungsdichte	72
IV.4.3 Untersuchung der Lokalisation des Proteins p17	73
IV.4.4 Untersuchung der Lokalisation des Proteins p35	74
IV.4.5 Untersuchung der Lokalisation des Proteins p58	75
IV.5 Subzelluläre Lokalisation von Epitopen für typspezifische und breitreaktive MAK der Proteine OspA und OspC	82
IV.5.1 Lokalisation von Epitopen für typspezifisch und breitreaktive MAK des Proteins OspA	82
IV.5.2 Lokalisation von Epitopen für typspezifisch und breitreaktive MAK des Proteins OspC	86
IV.6 Untersuchung der Lokalisation ausgewählter immunologisch wichtiger Oberflächenproteine an kokkoiden Mprphotypen	99
IV.7 Interaktion von Borrelien mit humanen Astrozyten (Zelllinie 1321N1)	102
V Diskussion	119
V.1 Ultrastrukturelle Charakterisierung der Borrelienzelle aus der <i>in vitro</i> Kultur.....	119
V.2 Lokalisation von immundominanten Proteinen.....	122
V.2.1 Diskussion der verwendeten Markierungsmethoden	122
V.2.2 Diskussion der Markierungsergebnisse.....	124
V.3 Ultrastrukturelle Charakterisierung der kokkoiden Morphotypen	129
V.4 Interaktion von Borrelien mit humanen Astrozyten	132
VI Zusammenfassung.....	135
VII Literaturverzeichnis	138
Danksagung	150
Lebenslauf.....	151

Abkürzungen

AK	A ntikörper
APS	A moniumpersulfat
BSA	B ovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
BSE	b ack scattered electron (Rückstreuelektronen)
DAPI	D iamino- P henylindol Dihydrochlorid Hydrat
dbp	D ecorin b indendes P rotein
dest.	d estilliert
DMEM	D ulbecco's m odified E agle's M edium
DMSO	D imethylsulfoxid
FKS	F ötale K älberserum
Std.	S tunde
IFT	I mmunfluoreszenztest
KPT	K ritisch- P unkt- T rocknung
LM	L icht m ikroskop
MAK	m onoklonale A ntikörper
MKP-Medium	m odifiziertes K elly-Medium nach P reac-Mursic
Osp	o uter surface p rotein (Oberflächenprotein)
OT	O bjektträger
PBS	p hosphate b uffered s aline
PWS	P hosphorwolframsäure
REM	R asterelektronen m ikroskop
RT	R aum t emperatur
SE	S ekundärelektronen
SDS	S odium- d odecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)
sek.	s ekundär
TEM	T ransmissionselektronen m ikroskop
TEMED	T etramethylethylend i amin
Tris	T ris-Hydroxymethyl-Aminomethan
Upm	U mdrehungen p ro M inute

I Einleitung

Die Lyme Borreliose ist die häufigste durch Zecken übertragene Infektionskrankheit in der nördlichen Hemisphäre. Auf der Grundlage regionaler epidemiologischer Studien wird in Deutschland die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen mit Lyme Borreliose auf 50.000–80.000 Fälle geschätzt (HUPPERTZ et al., 1999). Diese Erkrankung zählt somit zu den häufigsten Infektionskrankheiten in Deutschland. Konservative Schätzungen gehen davon aus, daß allein die Lyme-Serologie jährlich Kosten in Höhe von 80 Mio. DM verursacht. Insgesamt werden für Diagnose und Therapie der Lyme Borreliose mindestens 150 Mio. DM pro Jahr ausgegeben.

Die Entdeckung der Lyme Borreliose

In den Jahren 1972–1976 kam es in der Gegend um Lyme, Connecticut (USA) zu einer ungewöhnlichen Häufung von Arthritisfällen (STEERE, 1976). Eine detaillierte Untersuchung dieser zunächst als „Lyme-Arthritis“ bezeichneten Krankheit führte schließlich zur Entdeckung der Lyme Borreliose. Eine genaue Untersuchung der Arthritisfälle zeigte, daß bei etwa einem Viertel der Patienten mehrere Wochen vor dem Einsetzen der Arthritisattacken eine ringförmig sich ausbreitende Hautrötung aufgetreten war. Auf Grund der lokalen Häufung in dünn besiedelten, dicht bewaldeten Gegenden, und der Häufung der Krankheitsfälle in den Sommermonaten wurde bereits zu diesem Zeitpunkt eine Übertragung durch Arthropoden vermutet (STEERE et al., 1977 b). Auch die Ähnlichkeit der auftretenden Hautmanifestation mit dem von LIPSCHÜTZ (1913) und AFZELIUS (1921) aus Europa beschriebenen Erythema chronicum migrans, von dem vermutet wurde, daß es von Zecken der Art *Ixodes ricinus* übertragen wird, ließ die Idee eines Arthropodenvektors plausibel erscheinen. Das Erythema chronicum migrans wurde schon bald zum diagnostischen Leitsymptom der neuen Krankheit, da es mit größerer Sicherheit eindeutig zu diagnostizieren war, als das arthritische Erscheinungsbild (STEERE et al., 1977 a). Eine detaillierte Studie im Jahre 1977, die versuchte alle Patienten mit „Lyme-Arthritis“, Erythema chronicum migrans oder beidem zu erfassen zeigte, daß etwa die Hälfte der Patienten mit Erythema chronicum migrans in der Folge multiple Erythemen entwickelten. Außerdem konnte man eine Vielzahl von Begleitsymptomen, wie Fieber, Kopfschmerzen, Müdigkeit oder Muskelschmerzen beobachten, die mit dem Auftreten des Erythema chronicum migrans einher gingen (STEERE et al., 1977 a). Viele der Patienten entwickelten Wochen bis Monate nach dem Auftreten des Erythema chronicum migrans eine „Lyme-Arthritis“, die in einigen Fällen von einer lymphozytären

Meningitis, Gesichtsnervlähmungen, Sensibilitätsstörungen oder einer Myokarditis mit Reizleitungsstörungen begleitet war (STEERE et al., 1978). Das Auftreten dieser neurologischen Symptome wurden schon früher in Europa in der Folge von Erythema chronicum migrans beschrieben, ohne daß ein Zusammenhang zwischen den Erkrankungen, oder der möglich Erreger gefunden werden konnte (GARIN und BUJADOUX, 1922; BANNWARTH, 1941; 1944). Über 20% der Patienten konnten sich an einen Zeckenstich im Bereich des Erythema chronicum migrans erinnern (STEERE et al., 1978). Allerdings konnte trotz serologischer Tests und verschiedener Kultivierungsversuche kein Erreger für die nun als „Lyme disease“ bezeichnete Krankheit gefunden werden (STEERE et al., 1977 a; b; 1978). Eine epidemiologische Studie zeigte deutlich, daß das geographische Verbreitungsgebiet der Krankheit in den USA mit dem Verbreitungsgebiet von *Ixodes dammini* bzw. *Ixodes pacificus* übereinstimmte, und diese beiden Spezies daher als Überträger in Frage kamen (STEERE und MALAWISTA, 1979). Erst 1981 entdeckte Willy Burgdorfer mittels Dunkelfeldmikroskopie im Mitteldarm einer auf Shelter Island, New York, gesammelten Zecke der Art *Ixodes dammini* bisher unbekannte Spirochäten. Diese konnten im Labor kultiviert werden. Es stellte sich heraus, daß hier erstmalig die Isolierung des Erregers der „Lyme disease“ gelang. Im indirekten Immunfluoreszenztest ließen sich im Serum von Patienten mit „Lyme disease“ Antikörper gegen die neu entdeckte Spirochäte nachweisen (BURGDORFER et al., 1982). In der Folgezeit konnte der Erreger in den USA aus Hautbiopsien, Serum und Liquor von Patienten isoliert werden (BENACH et al., 1983; STEERE et al., 1983). Auf Grund serologischer Untersuchungen wurden Spirochäten auch als Ursache von Erythema chronicum migrans und Meningopolyneuritis in Europa beschrieben (ACKERMAN, 1983; RYBERG et al., 1983). Angeregt durch die Erfolge in den USA gelang die Isolierung des Erregers aus Haut und Liquor von Patienten mit „Lyme disease“ auch in Europa (ACKERMANN et al., 1984 a; b; ÅSBRINK et al., 1984; PREAC-MURSIC et al., 1984 a; b; 1985). Außerdem konnte man mit Hilfe eines indirekten Immunfluoreszenztests Spirochäten in *Ixodes ricinus* nachweisen (ACKERMANN, 1983) und aus dem Mitteldarm der Zecken isolieren (BARBOUR et al., 1983). Der Erreger der „Lyme disease“ wurde 1984 als neue Spezies *Borrelia burgdorferi* beschrieben (JOHNSON et al., 1984 b).

Auf Grund der Entdeckung des Erregers und der dadurch möglich gewordenen serologischen Untersuchungen, konnten viele, früher als selbständige Krankheiten beschriebene, Manifestationen dem Krankheitsbild der Lyme Borreliose zugeordnet werden. Eine dieser Erscheinungsformen, die Acrodermatitis chronica atrophicans, die bereits 1883 von BUCHWALD beschrieben wurde, gilt heute als die früheste Beschreibung einer Spätmanifestation der Lyme Borreliose.

Die Übertragung der Lyme Borreliose

Die Lyme Borreliose wird durch Zecken der Gattung *Ixodes* (BURGDORFER, 1984) übertragen. Sie stellt die häufigste durch Zecken übertragene Infektionskrankheit der nördlichen Hemisphäre dar. Während in den USA die beiden Zeckenarten *Ixodes dammini* und *Ixodes pacificus* für die Übertragung des Erregers von Bedeutung sind, spielt in Europa vor allem *Ixodes ricinus* eine entscheidende Rolle als Vektor für den Erreger. Das Vorkommen der Lyme Borreliose deckt sich in Europa weitgehend mit dem Verbreitungsgebiet dieser Zeckenart. Während die Krankheit in den USA lokal gehäuft auftritt, sind in Europa keine Endemiegebiete zu erkennen (STANEK et al., 1993). Die Durchseuchungsraten mit *B. burgdorferi* sensu lato (s. l.) für *Ixodes ricinus* liegen bei 1% für Larven, 10% für Nymphen und 20% für adulte Zecken (WILSKE et al., 1987; FINGERLE et al., 1994). Eine transovarielle Weitergabe der Borrelien auf die nächste Zeckengeneration ist sehr selten und scheint nicht von größerer ökologischer Bedeutung zu sein (BURGDORFER und HAYES, 1989). Vielmehr infiziert sich jede Zeckengeneration im Laufe ihres Lebens während einer Blutmahlzeit neu. Eine vorhandene Infektion mit Borrelien wird jedoch an die folgenden Entwicklungsstadien der Zecke weitergegeben. Dies spiegelt sich auch in der Verteilung der Durchseuchungsraten wider (**Abb. 1**). Die Wahrscheinlichkeit, nach einem Zeckenstich an Lyme Borreliose zu erkranken, liegt in Europa bei 2,5–4% (PAUL et al., 1986; SCHMUTZHARD et al., 1988).

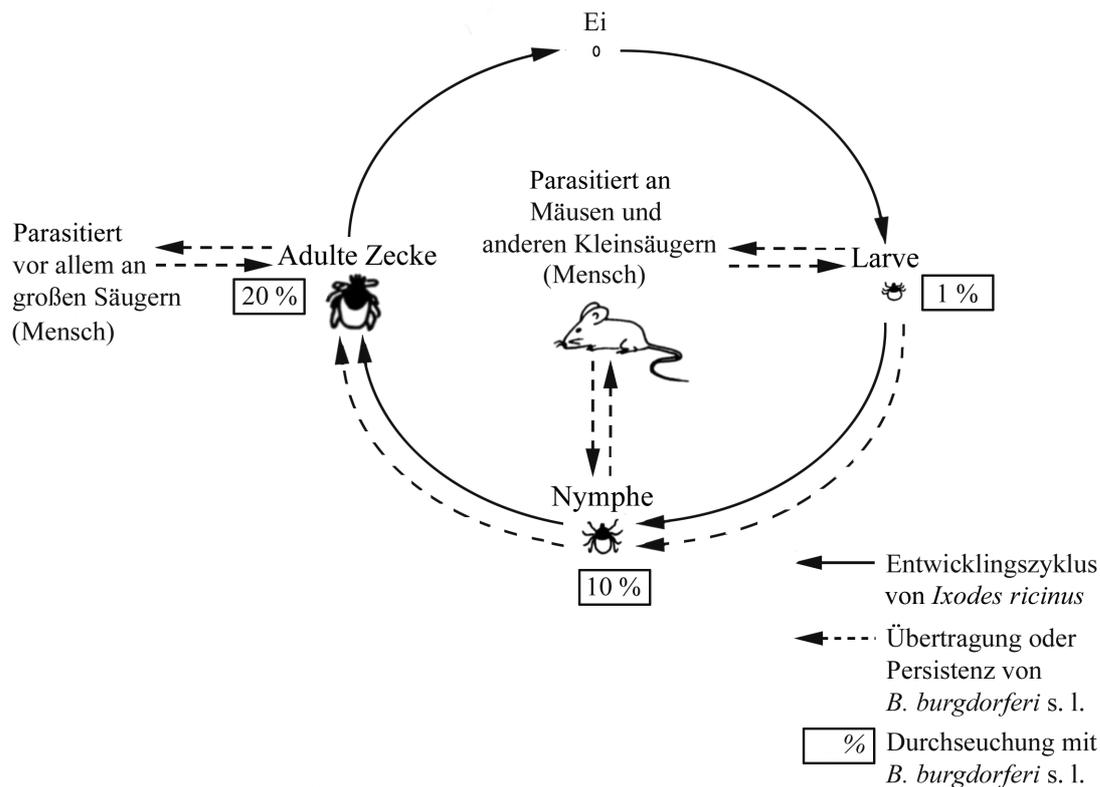


Abb. 1 Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus von *Ixodes ricinus* und möglicher Übertragungswege von *Borrelia burgdorferi* s. l. (verändert nach SCHAIBLE et al., 1992).

Das Krankheitsbild der Lyme Borreliose

Die Lyme Borreliose zeichnet sich durch eine Vielzahl verschiedener Symptome aus, die sowohl isoliert, als auch in unterschiedlichen Kombinationen auftreten können. Das bisher bekannte Spektrum umfaßt im wesentlichen Erkrankungen der Haut, der Gelenke, des Nervensystems und des Herzens, wobei jedoch auch andere Erkrankungen auftreten können (ÅSRINK et al., 1993; HERZER, 1993; PFISTER et al., 1993; STANEK, 1985; STEERE et al., 1977 a; 1978). Die Lyme Borreliose wird anhand der verschiedenen Symptome, die in einer bestimmten zeitlichen Abfolge nach dem Zeckenstich auftreten können, in Frühstadien (Stadium I–II) und ein Spätstadium (Stadium III) unterteilt (STEERE, 1989).

Stadium I:

Als Leitsymptom und frühestes Krankheitszeichen der Lyme Borreliose gilt das Erythema (chronicum) migrans, das auch als Wanderröte bekannt ist. Es tritt Tage bis Wochen nach dem Zeckenstich in der Region der Stichstelle auf. Typischer Weise ist zunächst die Einstichstelle gerötet, wobei sich im weiteren Verlauf ein peripher wandernder roter Ring bildet, der im

Zentrum verblaßt (STEERE et al., 1977 a; WEBER et al., 1993 b). Das Erythema (chronicum) migrans kann von grippeähnlichen Allgemeinsymptomen begleitet werden. Außerdem kann es in Ausdehnung, Färbung und Dauer stark variieren. Im Zusammenhang mit der hämatogenen Verbreitung des Erregers kann es zum Auftreten multipler Erythemen kommen. Es handelt sich dabei um ringförmige Hautrötungen, die am gesamten Körper auftreten können und im keinem räumlichen Zusammenhang mit der ursprünglichen Einstichstelle der Zecke stehen. Dieses Erscheinungsbild wird in den USA jedoch häufiger beobachtet als in Europa (WILSKE et al., 1988 a).

Stadium II:

Als typische Manifestationen des Stadiums II gelten neurologische Krankheitsbilder, die Wochen bis Monate nach dem Zeckenstich auftreten können. Die lymphozytäre Meningoradikulitis ist die häufigste Erscheinungsform in diesem Stadium. Leitsymptome dieser Erkrankung sind starke, brennende Schmerzen, die sich nachts verstärken, sowie Hirnnervenparesen, die sich vor allem in einer Lähmung der Gesichtsnerven äußern. Seltener kommt es zum Auftreten von Extremitäten- oder Rumpfparesen (PFISTER et al., 1993). Auch die Lyme Karditis, die sich vor allem durch das Auftreten von Herzrhythmusstörungen klinisch äußert, ist diesem Stadium zuzurechnen. Diese Manifestation kann in seltenen Fällen tödlich verlaufen (DURAY und STEERE, 1986; VAN DER LINDE und BALLMER, 1993). Eine besondere Hautmanifestation, die in diesem Stadium auftritt, ist das Borrelien-Lymphozytom, das als blau-rötlich gefärbter Tumor typischerweise an Ohrläppchen, Mamille oder Skrotum auftritt (WEBER et al., 1985).

Stadium III:

Monate bis Jahre nach dem Zeckenstich kommt es zu den als Spätmanifestationen bezeichneten Erscheinungsformen. In diesem Stadium sind die Lyme-Arthritis, die auch zur Entdeckung der Krankheit führte (HERZER, 1993; STEERE et al., 1977 a; b) und die Acrodermatitis chronica atrophicans, eine Hautmanifestation (ÅSBRINK et al., 1993), die typischen Krankheitsbilder. Die Lyme-Arthritis zeichnet sich durch akute, schmerzhafte Schwellungen verschiedener Gelenke aus, wobei in erster Linie das Kniegelenk betroffen ist. Diese Form der Krankheit kann an einem oder mehreren Gelenken gleichzeitig auftreten, spontan verschwinden und nach einiger Zeit am gleichen oder an anderen Gelenken wieder auftreten. Neben langwierigen Verläufen kommt es auch immer wieder zu Spontanremissionen. Die Acrodermatitis chronica atrophicans zeigt charakteristische klinische Merkmale, die auf Grund der Atrophie der Haut und des subkutanen Fettgewebes entstehen. Die Haut ist blau-rötlich verfärbt und zigarettenpapierartig gefältelt.

Dabei treten die Gefäße plastisch hervor (ASBRINK et al. 1993). In seltenen Fällen tritt im Stadium III die chronische Borrelien-Enzephalomyelitis auf (ACKERMANN et al., 1985). Hiervon ist im wesentlichen das Zentralnervensystem betroffen. Das klinische Bild ist durch Sensibilitätsstörungen, spastische Lähmungen und isolierte Hirnnervenausfälle, sowie durch psychische Störungen gekennzeichnet.

Therapie der Lyme Borreliose

Die Therapie der Lyme Borreliose erfolgt mittels Antibiotika. Durch die effektive Therapie zu einem möglichst frühen Zeitpunkt kann das Auftreten von Spätmanifestationen verhindert werden. Die Wahl des Antibiotikums, die Dauer der Therapie, deren Dosierung und die Art der Applikation richten sich nach dem klinischen Bild und dem Stadium der Erkrankung. Für die Therapie der Frühstadien ist eine orale Antibiotikagabe über 14 Tage meist ausreichend. Die Behandlung des Spätstadiums erfordert eine 3–4 wöchige intravenöse Antibiotikagabe (PREACMURSIC et al., 1986; 1987; WEBER et al., 1988; WILSKE et al., 1988 a; WILSKE und FINGERLE, 2000).

Prophylaxe der Lyme Borreliose

In den USA steht seit 1999 ein Impfstoff auf der Basis des Oberflächenproteins (Osp) A als Prophylaxe der Lyme Borreliose zur Verfügung. Dieser Impfstoff führt zur Eliminierung der Borrelien im Darm der Zecke, wenn diese während des Saugaktes an einer geimpften Person die Antikörper aufnimmt. Auf diese Weise kann eine Infektion verhindert werden. Da Borrelien OspA im Patienten nicht oder nur in sehr geringem Umfang exprimieren, kann dieser Impfstoff jedoch nicht zur Bekämpfung einer bereits vorhandenen Infektion eingesetzt werden. Für Europa steht bisher kein zugelassener Impfstoff zur Verfügung, da der Erreger hier eine weit größere antigenetische Heterogenität zeigt. Dies macht eine wesentlich komplexere Zusammensetzung des Impfstoffs für Europa erforderlich (EVANS, 2000; SIMON et al., 1999; WILSKE et al. 1996 b). Die wichtigste Maßnahme zur Prophylaxe der Lyme Borreliose in Europa ist daher die Vermeidung von Zeckenstichen. Dies kann durch das Tragen von geschlossener Kleidung beim Aufenthalt in Biotopen, die für Zecken geeignet sind erreicht werden. Anschließend sollten Körper und Kleidung gründlich nach Zecken abgesucht werden. Entdeckt man dabei bereits saugende Zecken, so kann man das Infektionsrisiko durch das sofortige Entfernen der Zecke deutlich reduzieren, da die Wahrscheinlichkeit für die Übertragung der Erreger mit der Saugdauer zunimmt

(KAHL et al., 1998; RIBEIRO et al., 1987). Für das Entfernen der Zecken verwendet man am Besten eine Pinzette oder eine Zeckenzange. Durch kontinuierlichen Zug kann man die Zecke leicht aus der Haut entfernen. Auf keinen Fall sollte man versuchen die Zecke durch Verwendung von Öl oder Klebstoff zum Loslassen zu bringen, da dadurch die Speichelsekretion angeregt wird und das Infektionsrisiko steigt (WEBER et al., 1993 a).

Systematische Einordnung des Erregers der Lyme Borreliose

Der Erreger der Lyme Borreliose wurde wegen seiner für Spirochäten typischen morphologischen Merkmale in die Ordnung der Spirochaetales eingeordnet. Diese bilden auf Grund von 16S rRNS Analysen eine separate Abteilung, die Division D, innerhalb der Eubakterien. Diese Ordnung enthält die beiden Familien Spirochaetaceae und Leptospiraceae (BARBOUR und HAYES, 1986). Vergleichende morphologische, physiologische und molekulargenetische Untersuchungen der Spirochäten, die Lyme Borreliose verursachen, mit bekannten Arten der Gattungen *Leptospira*, *Treponema* und *Borrelia* ermöglichten die Zuordnung der neu entdeckten Spirochäte zur Gattung *Borrelia* in der Familie Spirochaetaceae (BURGDORFER et al., 1982; JOHNSON et al., 1984 a; b). Auf der Grundlage weniger bis dahin bekannter Isolate aus den USA und eines Isolats aus Europa wurde der Erreger der Lyme Borreliose als neue Art *Borrelia burgdorferi* beschrieben (JOHNSON et al., 1984 b). Immunologische und molekulargenetische Analysen vieler verschiedener Stämme, die in der Folgezeit isoliert wurden, zeigten vor allem für die europäischen Stämme eine große Heterogenität auf (BARBOUR und SCHRUMPF, 1986; WILSKE et al., 1988 b; 1992 a). Dies führte zur Unterteilung der Spezies *B. burgdorferi* in 3 verschiedene humanpathogene Arten: *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (s. s.); *B. afzelii* und *B. garinii* (BARANTON et al., 1992; CANICA et al., 1993), die unter dem Namen *B. burgdorferi* s. l. zusammengefaßt werden.

***Borrelia burgdorferi* s. l.**

B. burgdorferi s. l. ist im Gegensatz zu einigen anderen humanpathogenen Spirochäten auf künstlichen Nährböden kultivierbar, gilt als mikroaerophil, kann aber auch anaerob wachsen (BARBOUR, 1984; PREAC-MURSIC et al., 1986). Temperaturen zwischen 30°C und 34°C bieten den Borrelien geeignete Wachstumsbedingungen, unter denen sie eine Generationszeit von 8–30 Std. erreichen können. Sie wachsen bis auf eine Zelldichte von 10^8 Zellen/ml Kulturmedium heran (PREAC-MURSIC und WILSKE, 1993). *B. burgdorferi* s. l. besitzt ein kleines lineares

Chromosom mit ca. 1000 kb und mehrere zirkuläre und lineare Plasmide (BARBOUR und GARON, 1987; BARBOUR, 1988; CASJEN et al., 1995; FERDOWS und BARBOUR, 1989). Die bereits erwähnte Heterogenität der verschiedenen Borrelienstämme zeigt sich vor allem in den auf Plasmiden kodierten Oberflächenproteinen. Besonders eingehend wurden das auf dem linearen 49 kb großen Plasmid kodierte OspA und das auf dem zirkulären 27 kb großen Plasmid kodierte OspC untersucht (BARBOUR und GARON, 1987; WILSKE et al., 1988 b; 1992 a; 1993 a; b). Ein Sero-typisierungsschema, das auf der Grundlage verschiedener gegen das OspA gerichteter monoklonaler Antikörper entwickelt wurde, zeigt 7 verschiedene Serotypen für *B. burgdorferi* s. l. auf. Während *B. burgdorferi* s. s. und *B. afzelii* jeweils einem einzelnen OspA-Serotyp (OspA-Serotyp 1 bzw. 2) angehören, sind verschiedene Stämme von *B. garinii* den 5 unterschiedlichen OspA-Serotypen 3–7 zuzuordnen (WILSKE et al., 1993 a). Einige dieser OspA-Serotypen sind bevorzugt in bestimmten Patienten- oder Zeckenisolaten zu finden (WILSKE et al., 1996 b). Vor allem *B. afzelii* ist eng mit dem Auftreten von Hautmanifestationen assoziiert und ist daher in über 80% der Hautisolate von Patienten zu finden. Die Verteilungsmuster der verschiedenen Serotypen in den Liquor- und Zeckenisolaten ist deutlich heterogener. In den Liquorisolaten können alle sieben OspA-Serotypen gefunden werden, wobei die Hälfte der Isolate OspA-Serotyp 4 oder 6 repräsentieren. OspA-Serotyp 6 findet sich auch bei etwa 50% der Zeckenisolate (Abb. 2). OspA-Serotyp 4 konnte bisher jedoch, trotz seines häufigen Vorkommens in Liquor-isolaten, nur einmal aus Zecken angezüchtet werden (HU et al., 2001).

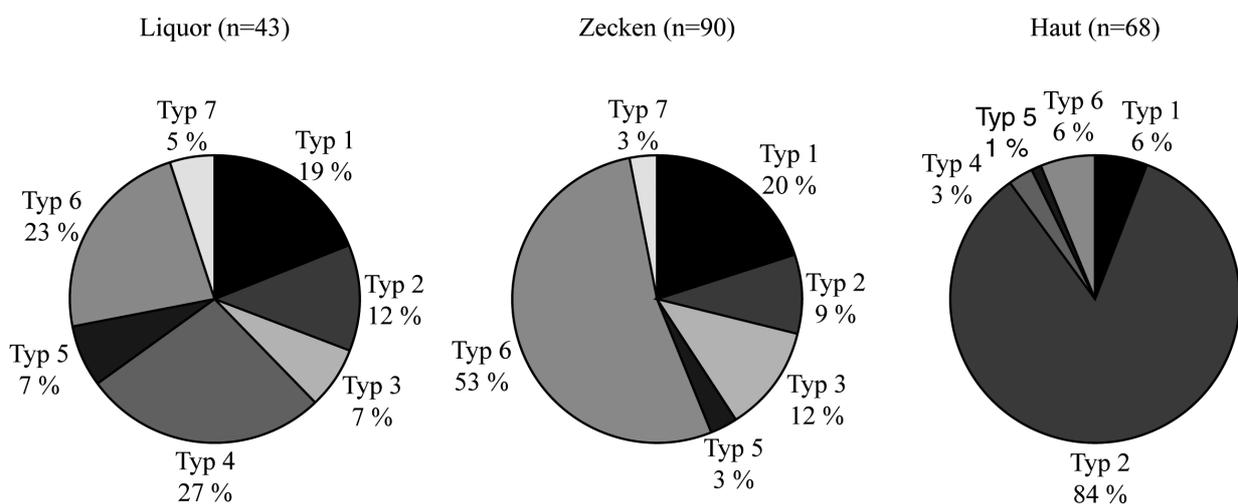


Abb. 2 Verteilung der sieben OspA-Serotypen bei europäischen *B. burgdorferi* s. l. – Isolaten aus Liquor, Zecken und Haut (nach WILSKE et al., 1996 b).

Bei den bisherigen Untersuchungen der Ultrastruktur von *B. burgdorferi* s. l. stand die Frage der Einordnung des Erregers der Lyme Borreliose in die Ordnung der Spirochaetales im Vordergrund (BURGDORFER et al., 1982). Aus diesem Grund gibt es vor allem vergleichende ultrastrukturelle Untersuchungen mit Vertretern anderer Gattungen aus der Ordnung der Spirochaetales, wobei die Aufmerksamkeit vor allem den für Spirochäten typischen Merkmalen galt (GOLDSTEIN et al., 1996; WILSKE et al., 1991). Alle Spirochäten zeichnen sich durch einen Protoplasmazyylinder aus, der durch Zellmembran und Zellwand begrenzt wird. Dieser Komplex wird durch eine zweite, äußere Membran umgeben. Eine Besonderheit der Spirochäten stellen die Endoflagellen dar, die zwischen der äußeren Membran und der Zellwand im periplasmatischen Raum liegen. Detaillierte Untersuchungen zur Ultrastruktur von *B. burgdorferi* s. l. fehlen vor allem für europäische Stämme weitgehend. Eine genaue Kenntnis der Ultrastruktur der Borrelienzelle ist die Grundlage für die Beurteilung der verschiedenen Formvarianten. *B. burgdorferi* s. l. bildet unter verschiedenen für sie ungünstigen Bedingungen Formvarianten, die als Cysten oder Sphäroplasten beschrieben wurden (BRORSON und BRORSON, 1997; KERSTEN et al., 1995; SCHALLER und NEUBERT, 1994). Besonders häufig wurden diese bei der Behandlung von Borrelien mit Antibiotika *in vitro* beschrieben (KERSTEN et al., 1995; SCHALLER und NEUBERT, 1994). Allerdings konnte auch bei Kultur der Borrelien in Mangelmedien, oder beim Kontakt mit Rückenmarksflüssigkeit die Bildung der cystischen Formen beobachtet werden (BRORSON und BRORSON, 1997; 1998). Besonders interessant ist die Tatsache, daß sphärische Formen der Borrelien auch aus Patienten nach Antibiotikatherapie isoliert werden können (PREAC-MURSIC et al., 1996). Dies spricht dafür, daß das Auftreten dieser Formvarianten nicht auf *in vitro* Bedingungen beschränkt ist. Vielmehr kann es auch *in vivo* im Patienten zum Auftreten der cystenartigen Borrelien kommen. Es wird daher spekuliert, daß diese Formvarianten eine Möglichkeit darstellen, wie Borrelien ungünstige Bedingungen überdauern können. Die detaillierte Untersuchung dieser Formvarianten wird vor allem durch die aufwendigen Prozeduren erschwert, die für ihre Generierung erforderlich sind.

Mikroskopische Methoden zur Untersuchung der Ultrastruktur der Borrelienzelle

Die lichtmikroskopischen Beobachtungen des Erregers, erstrecken sich vor allem auf die Beurteilung des Wachstums in Kultur und der Beweglichkeit der Borrelien. Hierfür eignen sich vor allem Phasenkontrast- und Dunkelfeldmikroskopie. Für eine detaillierte Untersuchung von *B. burgdorferi* s. l. stehen nur elektronenmikroskopische Methoden zur Verfügung. Dies liegt vor allem an der Größe des Bakteriums, das mit einem Zelldurchmesser von 0,2–0,3 µm an der

Grenze des Auflösungsvermögens des Lichtmikroskops liegt. Bei der Untersuchung der Spirochäten wurde wiederholt die Negativkontrastierung angewandt. Mit dieser Methode ist es möglich die gesamte Borrelienzelle zu erfassen und gleichzeitig in begrenztem Maße innere Strukturen zu untersuchen. Außerdem erfordert diese Methode nur einen relativ geringen präparativen Aufwand und wird daher häufig für die Untersuchung bestimmter ultrastruktureller Merkmale, wie z. B. die Flagellenanordnung, Zelllänge und Zelldurchmesser eingesetzt (BARBOUR et al., 1983 a; PILLOT und RYTER, 1965).

Rasterelektronenmikroskopische Methoden ermöglichen dagegen eine genaue Untersuchung der Oberfläche und der dreidimensionalen Gestalt von biologischen Präparaten. Um mögliche strukturelle Veränderungen des Untersuchungsobjekts durch den Trocknungsvorgang, der wegen der Untersuchung im Hochvakuum nötig ist, weitgehend auszuschließen, werden die wichtigsten formgebenden Bestandteile wie Lipide und Proteine vor der weiteren Präparation fixiert. Dadurch bleibt die natürliche Form der Präparate erhalten. Für die Fixierung von Proteinen haben sich vor allem Aldehyde, wie Formaldehyd und Glutaraldehyd durchgesetzt (SABATINI et al., 1963). Daneben wird die Fixierung mit Hilfe von Schwermetallen eingesetzt, die vor allem zu einer Stabilisierung von Lipiden und anderen Molekülen mit Doppelbindungen führen.

Die Transmissionselektronenmikroskopie erlaubt die Untersuchung des inneren Aufbaus eines Objekts an Ultradünnschnitten. Hierbei ist es nötig das Objekt bei möglichst gutem Erhalt der Struktur in eine schneidbare Form zu bringen. Die Präparate werden daher nach der Fixierung in ein Kunstharz eingebettet, das einerseits die Herstellung von Ultradünnschnitten ermöglicht und andererseits den Schnitten die nötige Stabilität gibt um den Beschuß mit Elektronen im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) zu überstehen. Die Ultradünnschnitte stellen aber immer nur die strukturellen Verhältnisse einer sehr dünnen Schicht des gesamten Objekts dar. Um eine dreidimensionale Vorstellung vom inneren Aufbau eines Präparats zu erhalten ist es deshalb häufig nötig mehrere aufeinanderfolgende Ultradünnschnitte (Serienultradünnschnitte) zu untersuchen.

Neben der Aufklärung rein struktureller Fragestellungen bietet die Elektronenmikroskopie die Möglichkeit Fragen zur Lokalisation verschiedener Proteine im Verhältnis zu den beobachteten Strukturen zu beantworten. Eine der wichtigsten Methoden zum Nachweis der Lokalisation von Molekülen mit antigenen Eigenschaften stellt die Immun-Markierung dar. Hierbei werden die Antigene mit Hilfe von Antikörpern markiert, die direkt oder indirekt mit einem elektronenmi-

kroskopisch sichtbaren Marker nachgewiesen werden. Eine der wichtigsten Voraussetzungen für eine Immun-Lokalisation ist eine hohe Spezifität des verwendeten primären Antikörpers, die mit Hilfe begleitender immunologischer Tests (z. B. Western-Blots) sichergestellt werden muß.

Für die Immun-Markierung stehen im wesentlichen zwei Präparationsmethoden zur Verfügung, deren Einsatz von der vermuteten Lokalisation des Proteins, auf der Oberfläche oder innerhalb der Zelle, abhängt. Für den Nachweis von Proteinen, die auf der Oberfläche von Zellen vermutet werden, wird das „*preembedding*“ Verfahren, oder eine Immun-Markierung für die Rasterelektronenmikroskopie eingesetzt. Hier erfolgt die Markierung entweder vor der Fixierung mit Aldehyden oder direkt im Anschluß daran vor der weiteren Präparation der Proben. Welche der beiden Möglichkeiten eingesetzt wird hängt vor allem von der Reaktion der Epitope auf das Fixans ab. Häufig werden diese durch die Fixierung so verändert, daß die Reaktion mit dem Antikörper behindert wird oder völlig unterbleibt. Außerdem besteht die Gefahr, daß das Fixans, trotz der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen, mit den eingesetzten Antikörpern reagiert. Es ist daher erforderlich zu jeder Markierung Kontrollversuche durchzuführen. Andererseits muß bei der Markierung unfixierter Präparate häufig mit einer schlechteren Strukturerhaltung gerechnet werden. Für die Lokalisation intrazellulärer Proteine wird das „*postembedding*“ Verfahren angewandt. Die Markierung erfolgt hier immer nach Fixierung und Einbettung der Proben am Schnitt. Hierbei kommt es neben den bereits erwähnten Problemen zu einer Vielzahl weiterer Schwierigkeiten, die den Nachweis der Lokalisation erschweren.

Bei den Immun-Markierungsverfahren für die Elektronenmikroskopie erfolgt die Detektion des gebundenen Antikörpers üblicherweise mit Hilfe von Goldkolloiden. Bei der direkten Markierungsmethode ist der spezifische Antikörper mit dem Goldkolloid konjugiert. Allerdings sind nur in seltenen Fällen goldkonjugierte Antikörper mit der benötigten Spezifität kommerziell erhältlich. Häufig erfolgt daher ein indirekter Nachweis, bei dem das Goldkolloid an ein Protein gebunden ist, das spezifisch mit dem primären Antikörper reagiert. Hierbei handelt es sich entweder um das von *Staphylococcus aureus* isolierte Protein A, oder um einen sekundären Antikörper. Protein A reagiert mit der Fc-Kette von IgG Molekülen, was einen Einsatz unabhängig von der Herkunft der primären Antikörpers möglich macht. Eine größere Spezifität besitzt der Nachweis mit einem sekundären goldkonjugierten Antikörper an Stelle von Protein A. Dieser sekundäre Antikörper bindet spezifischer als Protein A an den primären Antikörper. Außerdem können zwei sekundäre Antikörper an einen primären Antikörper binden, wodurch die Signalintensität verstärkt wird.

Zur Bildentstehung im REM dienen die Sekundärelektronen (SE). Durch den Beschuß des Präparats mit den Elektronen des Elektronenstrahls (Primärelektronen) werden aus der Präparatoberfläche Elektronen niedrigerer Energie, die SE herausgeschlagen. Diese werden vom SE-Detektor „abgesaugt“ und über Szintillator, Photodiode und einen Signalverstärker in Graustufen umgewandelt. Der Nachweis des Goldkolloids erfolgt durch die Detektion der Rückstreuielektronen (back scattered electrons, BSE). Diese entstehen wenn die Primärelektronen vom Präparat zurückgestreut werden. Das geschieht um so häufiger je höher die Ordnungszahl des Elements ist auf das die Primärelektronen treffen. Je mehr BSE an einer Stelle entstehen, desto heller erscheint diese Stelle im entstehenden BSE-Gesamtbild. Da ein biologisches Präparat überwiegend aus Elementen niedriger Ordnungszahl (H, C, N, O) besteht ist der Unterschied in der Ordnungszahl gegenüber dem Goldkolloid sehr deutlich. Die Goldkolloide treten als hell leuchtende Punkte auf dem mittel-, bis dunkelgrauen Präparat deutlich hervor.

Mit Hilfe von Immun-Gold-Markierungen konnte bereits die Lokalisation einiger wichtiger Borrelienproteine, wie OspA und OspC, aufgeklärt werden (BARBOUR et al., 1983 b; WILSKE et al., 1993 b). Die Kenntnis der subzellulären Lokalisation der verschiedenen immundominanten Proteine ist als Grundlage für die Entwicklung einer Vakzine von großer Bedeutung, da als Impfantigen vor allem solche Proteine in Frage kommen, die auf der Oberfläche des Erregers exprimiert werden. Der in den USA zugelassene Impfstoff auf der Basis des OspA ist wegen der größeren Stammheterogenität für den europäischen Raum nicht geeignet. Diese Heterogenität ist auch bei OspC, dem zweiten wesentlichen Kandidaten für die Vakzineentwicklung zu beobachten (PREAC-MURSIC et al. 1992; WILSKE et al. 1993 b). Deshalb ist es von großem Interesse, ob OspA und OspC auch konservierte Epitope besitzen, die auf der Oberfläche der Borrelienzellen exprimiert werden. Darüber hinaus spielen die variabel exprimierten Oberflächenproteine vermutlich eine wesentliche Rolle bei der Infektion der verschiedenen Wirte sowie bei der Dissemination in die verschiedenen Organe (FINGERLE et al., 1995; FUCHS et al., 1994; WILSKE und PFISTER, 1995). Die Kenntnis der Lokalisation der verschiedenen immundominanten Proteine kann daher zu einem besseren Verständnis der Pathogenität und der Interaktionen zwischen Borrelien und Wirt beitragen.

Interaktionen von Borrelien mit Eukaryontenzellen

Einen wesentlichen Faktor für die Pathogenität von Mikroorganismen, und somit auch für Borrelien, stellt ihre Fähigkeit dar mit Wirtszellen in Kontakt zu treten. Hierbei wurde vor allem untersucht auf welche Weise die verschiedenen Zellen des menschlichen Immunsystems, wie Makrophagen, Leukozyten oder Monozyten, mit den Borrelien interagieren und zu deren Eliminierung beitragen (RITTIG et al., 1994). Durch die Immunantwort werden Entzündungsreaktionen in Gang gesetzt, die mehrere der beobachteten Symptome, wie Erythema (chronicum) migrans oder auch die entzündlichen Gelenksreaktionen der Lyme-Arthritis verursachen. Dies konnte vor allem an Tiermodellen untersucht werden (BENACH et al., 1984; DUCHATEAU et al., 1999). Daneben spielt jedoch auch die direkte Interaktion der Borrelien mit Wirtszellen, die nicht dem Immunsystem angehören, eine entscheidende Bedeutung für die Pathogenität. In *in vitro* Versuchen wurde festgestellt, daß Borrelien mit verschiedenen Eukaryontenzellen in Kontakt treten können. Für Zellen aus dem Gehirn neugeborener Ratten konnte gezeigt werden, daß dieser Kontakt zu einer Schädigung der Zellen führt (GARCIA-MONCO et al., 1991). In einigen Fällen führt der Kontakt zwischen Borrelien und Eukaryontenzellen zu einer Aufnahme der Borrelien ins Cytoplasma der Zelle. Dadurch haben Borrelien die Möglichkeit auf intrazellulärem Weg Zellschichten aus Nabelschnurzellen zu durchwandern (COMSTOCK und THOMAS, 1989). Darüber hinaus stellt die intrazelluläre Persistenz für die Borrelien eine Möglichkeit dar, der Immunantwort ebenso wie einer Antibiotikatherapie auszuweichen (GIRSCHICK et al., 1996; KLEMPNER et al., 1993). Bisher liegen jedoch keine Untersuchungen vor, die sich mit der Interaktion von Borrelien mit Gehirnzellen humanen Ursprungs auseinandersetzen. Gerade die Tatsache, daß bei den neurologischen Manifestationen immer wieder chronische Verlaufsformen zu beobachten sind, macht eine solche Untersuchung interessant.

Ziele der Arbeit

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit ist die detaillierte ultrastrukturelle Untersuchung des zellulären Aufbaus von *Borrelia afzelii* am Beispiel des Stammes PKo, eines Isolats aus einer Hautbiopsie eines Patienten aus Europa.

Ein weiteres Untersuchungsziel ist die Aufklärung der subzellulären Lokalisation von p17, p35 und p58 drei wichtigen immundominanten Borrelienproteinen (HAUSER et al. 1997), mit Hilfe der Immun-Gold-Markierung. Darüber hinaus soll untersucht werden, ob die beiden

Oberflächenproteine OspA und OspC, die in Europa eine deutliche Heterogenität aufweisen, neben typspezifischen Epitopen auch konservierte Epitope auf der Oberfläche der Borrelienzelle besitzen.

Ausgehend vom Stamm PKo soll eine Methode entwickelt werden, mit deren Hilfe cystische Formvarianten der Borrelienzelle in großer Zahl und unter standardisierbaren Bedingungen herzustellen sind. Dadurch sollen die ultrastrukturelle Untersuchung dieser Formvarianten, und deren Vergleich mit der Borrelienzelle ermöglicht werden. Außerdem soll untersucht werden, ob bekannte Oberflächenproteine der Borrelien auch bei den Formvarianten auf der Oberfläche lokalisiert sind.

Am Beispiel von zwei Isolaten, aus der Haut (*B. afzelii* Stamm PKo) bzw. dem Liquor (*B. garinii* Stamm PBi) von Patienten mit Lyme Borreliose soll untersucht werden, ob und in welcher Form es *in vitro* zu einer Interaktion zwischen Borrelien und humanen Astrozyten – Gliazellen des Zentralnervensystems – kommt.

II Material

II.1 Borrelienstämme und Klone

- Borrelia afzelii* Stamm PKo: OspA Serotyp 2; Hautisolat (WILSKE et al., 1993 a)
Borrelia afzelii Stamm PGau: OspA Serotyp 2; Hautisolat (WILSKE et al., 1993 a)
Borrelia afzelii Klon PKo345 II-2-3 (FINGERLE et al., 2000)
Borrelia afzelii Klon PKo97 K37 (FINGERLE et al., 2000)
Borrelia garinii Stamm PBi: OspA Serotyp 4; Liquorisolat (WILSKE et al., 1993 a)

II.2 Zelllinie

1321N1: humane Astrozytomzelllinie

II.3 Chemikalien für die Kultur und Zubehör

Modifiziertes Kelly-Medium nach Preac-Mursic (MKP) II-Medium für Borrelien (PREAC-MURSIC et al., 1986)

Neopepton	Difco
Hepes	Sigma
Natriumcitrat	Sigma
Glucose	Sigma
Natriumpyruvat	Sigma
N-Acetylglucosamin	Sigma
Natriumbicarbonat	Sigma
Gelatine	Merck
Kaninchenserum (steril; partial hämolysiert)	Gibco
Rinderserumalbumin	Sigma
CMRL-1066	Gibco

Gefriermedium für Borrelien

MKP II	
Glycerin, p.a.	Merck

Gefäße und Zubehör für Borrelienkultur

Glasflaschen mit Schraubverschluß (100 ml)	Schott
Glasröhrchen (7 ml)	Schott
Sterilfilter (Bottletop) 0,45 µm Porendurchmesser	Sigma
Gefrieröhrchen	Schultheiß

Kulturmedium für Astrozyten

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Sigma
FKS (Fötales Kälberserum); inaktiv	Biochrom
L-Glutamin	Gibco
Penicillin/Streptomycin	Gibco

Gefriermedium für Astrozyten

Kulturmedium
DMSO (Dimethylsulfoxid) Sigma

Gefäße und Zubehör für Zellkultur

Zellkulturflaschen Becton-Dickinson
Multiwell-Gewebekulturplatten (24 well) Becton-Dickinson
Runde Deckgläschen Ø 12 mm Langenbrinck
Gefrieröhrchen NUNC™ Nalge Nunc International
Nalgene™ Cryo 1°C Freezing Container Nalgene
Melinexfolie Agar Scientific Ltd.
Neubauer-Zählkammer

Sonstige Chemikalien

Trypsin/EDTA Sigma
Magnesiumchlorid (MgCl₂), p.a. Merck
Isopropanol p.a. Merck

II.4 Chemikalien und Geräte für Proteinbestimmung, Gelelektrophorese und Westernblot

Chemikalien und Zubehör

Tris (Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan) Sigma
SDS (Natriumdodecylsulfat) Merck
Acrylamid Biozym
Bisacrylamid Biozym
APS (Amoniumpersulfat) BioRad
TEMED (Tetramethylethylendiamin) Serva
Salzsäure (konz.) Merck
Coomassiblau (Brilliant Blue R) Sigma
Essigsäure (96%) Merck
Ethanol, p.a. Merck
Glycin, p.a. Serva
Glycerin, p.a. Schwarz/Mann
Dithiothreitol Biomol
Bromphenolblau BioRad
PonceauS Solution Serva
Methanol, p.a. Merck
Amino-Caprinsäure Sigma
Blottingpapier Schleicher & Schüll
Protran[®] Nitrocellulose Transfer Membrane (0,45 µm) Schleicher & Schüll
Tween[®] 20 Serva
Magermilchpulver Glücksklee
Natriumchlorid, p. a. Merck
Peroxidasekonjugat; Anti Maus (polyvalent) DAKO
Diaminobenzidin Sigma
Wasserstoffperoxid (30%) Merck

Schwefelsäure (rauchend)	Merck
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	BioRad
Proteinstandard (Bovine Plasma γ -Globulin)	BioRad
Längenstandard SDS-Molekularstandard „High“	Gibco
Trichloressigsäure	Merck

Geräte

Protean II Elektrophoresekammer	BioRad
Model 543 Gel Dryer	BioRad
Blottingapparatur Semi-Dry Trans Blot Transfer Cell	BioRad
Ultrospec 3000 UV/Visible Spectrophotometer	Pharmacia Biotech

II.5 Chemikalien und Geräte für die Antikörperreinigung

Monoklonale Antikörper

L17 G2	anti Osp17; (JAURIS-HEIPKE et al. 1999)
L22 1F8	anti OspC; breitreaktiv; (WILSKE et al. 1993 b)
L22 1F10	anti OspC; spezifisch für OspA Serotyp 2; (WILSKE et al. 1993 b)
L32 1G3	anti OspA; spezifisch für OspA Serotyp 4; (WILSKE et al. 1993 a) für Negativkontrolle bei Serotyp 2
L32 14G7	anti OspA; spezifisch für OspA Serotyp 2; (WILSKE et al. 1996 a)
L32 1F11	anti OspA; breitreaktiv; (WILSKE et al. 1992 b)
L35 1F4	anti p35; (HAUSER et al. 1997)
L41 1C11	anti Flagellin; breitreaktiv (WILSKE et al. 1990)
L58 L6	anti p58; (unveröffentlicht)

Chemikalien

Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4), p.a.	Merck
Natrium-di-Hydrogenphosphat (NaH_2PO_4), p.a.	Merck
Glycin, p.a.	Serva
Salzsäure (konz.)	Merck
Tris	Sigma
Natriumazid (NaN_3)	Merck

Geräte

Sterilfilter (Steritop) 0,22 μm Porendurchmesser	Millipore
ProteinG-Säule HiTrap	Pharmacia
Pump P-1	Pharmacia/LKB

II.6 Chemikalien und Zubehör für die Elektronenmikroskopie

Chemikalien

Cacodylat (Dimethylarsinsäure, Natriumsalz, Trihydrat), p.a.	Merck
Magnesiumchlorid (MgCl_2), p.a.	Merck
Glutaraldehyd (25% solution), EM Grade	SCI Science Services

Aceton, p.a.	Roth
Spurr (Einbett-Harz)	Plano
Collodium	BioRad
n-Butylacetat, p.a.	Merck
Ampuwa [®] (pyrogenfreies <i>Aqua dest.</i>)	Fresenius
Osmiumtetroxid, p.a.	SCI Science Services
Uranylacetat, p.a.	Merck
Tween [®] 20	Sigma
Gelatine, gepulvert	Merck
BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma
Natriumchlorid (NaCl), p.a.	Merck
Kaliumchlorid (KCl), p.a.	Merck
Di-Natriumphosphat (Na_2HPO_4), p.a.	Merck
Kalium-di-Hydrogenphosphat (KH_2PO_4), p.a.	Merck
Bleinitrat, p.a.	Merck
Tri-Natriumcitrat, Dihydrat, p.a.	Merck
Natriumhydroxid p.a.; Plätzchen	Merck
Phosphorwolframsäure, Hydrat	Sigma Aldrich
Natriumazid	Sigma
D-Glucose; rein	Riedel-DeHaën

Zubehör

Cu- und Ni-Netzchen (150-300 „Mesh Square“; 100 “Parallel Bar”)	SCI Science Services
Ultramikrotom Ultracut E	Reichert-Jung
Pyramitome [®] 11800	Pharmazia/LKB
Fräse TM 60	Reichert-Jung
Knifemaker 7800	Pharmazia/LKB
Sputtercoater E5000M	Baltec
Bedampfungsgerät Balzers BaE 121	Balzers
Diamantmesser	Drukker bzw. Diatome
Glasstäbe für Messer	Labtec
geformte Kohlestäbe; 6,15 mm Ø; 55 mm Länge	Plano
Kritisch-Punkt-Trocknung E3000	Fisons Instruments

II.7 Chemikalien und Zubehör für die Lichtmikroskopie

DAPI (Diamino-Phenylindol Dihydrochlorid Hydrat)	Sigma
Live/Death Stain [®] BacLight [™] Bacterial Viability Kit	Molecular Probes
Vybrant [™] DiO Cell-Labeling Solution	Molecular Probes
Merckoglas [®] (Flüssiges Deckglas)	Merck
Vectashield [®] Mounting-Medium	Vector Laboratories
Anti-Maus AK Cy3 konjugiert	Dianova
Anti-Maus AK mit 6 nm bzw. 12 nm Gold-Konjugat	Dianova
12-well Multitest slides	ICN Biomedicals

II.8 Mikroskope

DM IRB inverses Lichtmikroskop; mit Phasenkontrast; Okulare: Plan 10x; Objektive: Plan 5x/0,12; 20x/0,4; 40x/0,55	Leica
Dialux 22 Lichtmikroskop mit Phasenkontrast und Dunkelfeld Okulare: Periplan 12,5x; Objektive: PL Fluotar 10x/0,3; 40x/0,7	Leitz
Axioplan Lichtmikroskop mit Phasenkontrast; Fluoreszenzeinrichtung mit Quecksilberhochdruckdampfampe HBO100W mit den Filtereinsätzen: UV G 365/395/397; Blau BP 485/450-490/546 und Grün BP 546/580/590 Okulare: PL 10x; Objektive: Plan Neofluar 10x/0,3; 16x/0,5; 40x/0,75; Plan Aplanachromat 63x/1,4 mit CCD-Kamera-System CE200A	Zeiss Photometrics
Axiophot Lichtmikroskop mit Phasenkontrast und Differential- Interferenz-Kontrast; Okulare: PL 10x; Objektive: Plan Neofluar 10x/0,3; 40x/0,75; 100x/1,3; Optovar: 1,25; 1,6 und 2,0 mit Kamaraadapter Digitale Kamera DCS 460	Zeiss Kodak
Transmissionselektronenmikroskop EM 109	Zeiss
Feldemissionsrasterelektronenmikroskop S-4100 mit BSE-Detektor (YAG-Typ, ATRATA) und digitalem Bildaufnahmesystem Digiscan und Digital Micrograph	Hitachi Plano Gatan
Transmissionselektronenmikroskop EM 912 mit „Omega“ Energiefilter	Leo

II.9 Zentrifugen und Zubehör

Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge	DuPont Instruments
Sorvall Instruments SS34 Rotor	DuPont Instruments
Rotanta/RP	Hettrich
Tischzentrifuge EBA 12	Hettrich
Falcon [®] -Röhrchen	Becton Dickinson Labware

II.10 Chemikalien und Geräte für die Filmentwicklung

Chemikalien

Rodinal B&W Film Developer	AGFA
Multikontrast Developer	AGFA
Schnellfixierer Hypam	Ilford
Netzmittel Mirasol 2000 Antistatic	Tetenal
Essigsäure	Roth

Filme und Fotopapier

AgfaOrtho	AGFA
AgfaPan APX 25	AGFA
Electron Image Film	Kodak
Fotopapier Multicontrast Premium	AGFA

Geräte

Vergrößerer: Tempomat 912VC	Kienzle
-----------------------------	---------

II.11 Programme für die digitale Bildverarbeitung

Digital Micrograph
Adobe Photoshop™
Quark-X-Press®

III Methoden

III.1 Kultur der Borrelien

Borrelienkultur

Die Borrelien werden in MKP-Medium (PREAC-MURSIC et al., 1986) in Glasröhrchen kultiviert. Dazu werden routinemäßig etwa 0,5 ml einer dicht bewachsenen Borrelien-Kultur zu 6,5 ml Kulturmedium pipettiert. Die Kulturen werden bei 33°C im Brutschrank inkubiert. Für größere Versuchsansätze werden 7 ml einer dicht bewachsenen Borrelienkultur in 100 ml MKP-Medium angeimpft. Die Kulturen werden alle 5–8 Tage überimpft, spätestens jedoch, wenn der im Medium befindliche Indikator durch einen Farbumschlag von rot nach gelb eine Ansäuerung des Mediums anzeigt. Die Kontrolle der Kulturen auf Verunreinigung, sowie Beweglichkeit und Anzahl der Borrelien erfolgt mittels Dunkelfeldmikroskopie. Für alle Versuch werden frühe oder mittlere Passagen der Borrelien (Passage 10–25) verwendet.

Bestimmung der Borrelienzahl

Zur Bestimmung der Borrelienzahl wird eine am Max von Pettenkofer Institut entwickelte Methode verwendet. Dazu werden 13 µl Borrelienkultur auf einen Objektträger (OT) pipettiert und mit einem Deckglas (24 x 60 mm) luftblasenfrei bedeckt. Anschließend wird bei 400-facher Vergrößerung die Anzahl der Borrelien in 20–50 Objektfeldern mittels Dunkelfeldmikroskopie ausgezählt.

Die Anzahl der Borrelien/ml wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Borrelien/ml} = \frac{\text{gezählte Borrelien} \times 3500 \times 1000}{\text{gezählte Objektfelder} \times 3 \mu\text{l}}$$

(3500: errechnete Anzahl der Objektfelder; 3 µl: errechnetes Objektfeldvolumen;

1000: Umrechnung der µl in ml)

Die Ergebnisse dieser Methode stimmen mit der Zellzahlbestimmung mit der Petroff-Hauser-Zählkammer überein.

Wachstumskurven

Zur Erstellung der Wachstumskurven wird eine bestimmte Menge an Borrelien in Kulturröhrchen angeimpft. Die Anzahl der Borrelien wird während der ersten 5 Tage täglich, dann bis zum 12 Tag jeden zweiten Tag nach der oben beschriebenen Methode bestimmt. Zur Absicherung der Ergebnisse wurden die Versuche zweimal in je drei Parallelen durchgeführt.

Einfrieren und Auftauen der Borrelienkulturen

1 ml einer dicht bewachsenen Borrelienkultur wird zu 1 ml Glycerin pipettiert und gut gemischt. Die Borrelien werden bei -70°C eingefroren und gelagert.

Die gefrorenen Kulturen werden bei Raumtemperatur (RT) aufgetaut und in ca. 6,5 ml Kulturmedium angeimpft.

III.2 Kultur der Astrozyten

Zellkultur

Die Astrozyten werden in Zellkulturmedium in einem Brutschrank bei 37°C und einer Atmosphäre mit 5% CO_2 kultiviert.

Zellkulturmedium:

DMEM

10% FKS

2 mM L-Glutamin

Es werden $1-2 \times 10^4$ Zellen/ml Kulturmedium angeimpft. Das Medium wird ca. alle 4 Tage gewechselt. Hat sich ein weitgehend lückenloser Zellrasen gebildet, werden die Zellen „gesplittet“. Dazu wird das Medium abpipettiert und die Zellen werden mit Trypsin/EDTA überschichtet und für 3 min bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die Zellen mit DMEM vom Kulturgefäß ab gespült und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen werden bei 800 upm (Rotanta/RP) für 8 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Im Anschluß daran werden die Zellen in Kulturmedium resuspendiert, auf die gewünschte Zellzahl eingestellt und in Zellkulturflaschen überführt.

Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl/ml wird mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Es wird ein Großquadrat (= $0,1\text{mm}^3$) ausgezählt.

$$\text{Zellen/ml} = n \times 10^4$$

n = gezählte Zellen/Großquadrat

Einfrieren und Auftauen der Zellkulturen

5 ml Zellsuspension werden in einem Gefrier Röhrchen auf Eis mit 1 ml FKS gemischt und mit 10% DMSO versehen. Anschließend werden die befüllten Gefrier Röhren in den, mit Isopropanol gefüllten, Gefriercontainer gestellt und bei -70°C eingefroren.

Die Zellkultur wird im Wasserbad bei 37°C so weit angetaut, daß sich die noch gefrorene Kultur vom Gefrier Röhrchen löst. Sie wird sofort in Zellkulturmedium, das mit Penicillin und Streptomycin versetzt wurde, überführt und in Zellkulturflaschen gefüllt.

III.3 Koinkubation von humanen Astrozyten und Borrelien

Für die Adhärenzversuche der Borrelien an Astrozyten werden die Astrozyten in Multiwell Gewebekulturplatten mit antibiotikafreiem Medium kultiviert. Je nach Untersuchungsmethode werden sie

- auf Deckgläschen, für die Licht- und Rasterelektronenmikroskopie, bzw.
- auf Melinexfolie oder Deckgläschen für die Transmissionselektronenmikroskopie

kultiviert. Nach 24 Std. Kulturdauer auf Deckgläschen bzw. 48–72 Std. auf Melinexfolie bildet sich ein weitgehend geschlossener Zellrasen. Nachdem sich ein Zellrasen ausgebildet hat, wird das Kulturmedium entfernt. Borrelien aus Kulturen, die sich in der log-Phase befinden, werden aus dem MKP-Medium abzentrifugiert (20 min bei 2500 upm; Rotanta/RP) und in Zellkulturmedium resuspendiert. Die gewünschte Borrelienzahl wird mit Zellkulturmedium ohne Antibiotika eingestellt. Das Zahlen-Verhältnis von eingesetzten Borrelien zu eingesetzten Astrozyten beträgt 10:1. Die Borreliensuspension wird zur Koinkubation auf die Astrozyten pipettiert und nach verschiedenen Zeitintervallen wieder abpipettiert. Die Zellen werden 2 x mit Cacodylatpuffer gewaschen. Anschließend können die Proben entweder für die Raster- oder die Transmissionselektronenmikroskopie präpariert (siehe III.10; S. 34) oder im Lichtmikroskop (LM) ausgezählt

werden. Für die Transmissionselektronenmikroskopie werden die auf Deckgläschen gewachsenen Zellschichten der Astrozyten nach der Osmiumfixierung mit einer Pinzette abgezogen. Erfolgt die Kultur auf Melinexfolie, so werden die Zellen zusammen mit der Folie präpariert und geschnitten. Die Auszählung der adhärennten Borrelien erfolgt im Fluoreszenzmikroskop. Die Zellen werden dazu mit dem Fluoreszenzfarbstoff Vybrant[®] DiO Cell-Labeling Solution gefärbt (siehe III 9.4; S. 34). Die Färbung der Borrelien erfolgt mittels Immunfluoreszenzmarkierung (siehe III.9.3; S. 32) mit dem gegen das Flagellenprotein gerichteten monoklonalen Antikörper (MAK) L41 1C11 und einem mit Cy3 gekoppelten sekundären Antikörper (AK). Es wurden die an 100 Astrozyten adhärierenden Borrelien pro Zeiteinheit ausgezählt.

Astrozyten, die nicht mit Borrelien koinkubiert werden (Kontrollversuche), werden bis zum Ende der Koinkubationsdauer im Zellkulturmedium auf Deckgläschen bzw. Melinexfolie kultiviert und im Anschluß daran wie die Koinkubationspräparate behandelt.

III.4 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentrationen der gereinigten MAK und des Borrelienproteins wurden nach der Methode von BRADFORD (1976) mit Bovine Plasma γ -Globulin (BioRad) als Proteinkonzentrationsstandard bestimmt.

III.5 Affinitätschromatographische Reinigung der monoklonalen Antikörper

Startpuffer: 20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7

Natriumphosphatlösungen: 0,2 M Na_2HPO_4 , pH 9 und 0,2 M NaH_2PO_4 , pH 4

Elutionspuffer: 0,1 M Glycin/HCl Puffer, pH 2,7

Neutralisationspuffer: Tris/HCl-Puffer, pH 8

Lagerungspuffer für die Säule: 20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7 mit 0,1% NaN_3

Für die Reinigung der MAK wird der Überstand (50 ml) der Hybridoma-Zellkulturen sterilfiltriert und mit der entsprechenden Natriumphosphatlösung auf pH 7 eingestellt. Die Protein G-Säule wird mit Startpuffer gespült. Anschließend werden die Antikörper mittels einer Pumpe auf die Protein G-Säule aufgetragen (Flußrate ca. 60 ml/h). Die Antikörper werden dabei reversibel an das Protein G der Säule gebunden. Mit dem Elutionspuffer werden die Antikörper, bedingt durch den pH-Wechsel, von der Säule gewaschen und in Eppendorfgefäßen mit 100 μl Neutrali-

sationspuffer aufgefangen. Die Protein G-Säule wird mit Startpuffer gespült und in Lagerpuffer aufbewahrt. Die gereinigten Antikörper können bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden.

Um festzustellen welche Fraktionen die Antikörper enthalten, wird von jeder zweiten bzw. dritten Fraktion ein Western-Blot angefertigt.

III.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach LAEMMLI (1970) wurde zur Auftrennung des Borrelienzelllysats als Grundlage für den Westernblot durchgeführt. Außerdem wurde sie zur Überprüfung der antikörperhaltigen Fraktionen nach der Säulenchromatographie eingesetzt (siehe III.5; S. 24).

III.6.1 Vorbereitung der Proteinproben

20-fach konzentrierte PBS Stammlösung:

78,85 g NaCl

34,25 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$

3,9 g KH_2PO_4

in 500 ml *Aqua dest.* lösen.

Dieser Puffer wird zur Anwendung auf einfache Konzentration verdünnt und mit HCl auf pH 7,4 eingestellt.

Waschpuffer:

PBS, pH 7,4 mit 5 mM MgCl_2

Reduzierender Probenpuffer für Borrelienproteine:

1 ml 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8

0,8 ml Glycerin

1,6 ml 10% (w/v) SDS

0,8 g Dithiothreitol

0,05% (w/v) Bromphenolblau

in 4,6 ml *Aqua dest.* lösen.

Nicht-reduzierender Probenpuffer für MAK:

1 ml 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8

0,8 ml Glycerin

1,6 ml 10% (w/v) SDS

0,05% (w/v) Bromphenolblau

in 4,6 ml *Aqua dest.* lösen.

Dicht bewachsene Borrelienkulturen (Zellzahl $\sim 10^7$ /ml) werden aus dem Kulturmedium abzentrifugiert (20 min bei 10000 upm, Sorvall RC-5B; 15°C). Der Überstand wird verworfen und das Sediment 4 x mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wird das Sediment in Waschpuffer resuspendiert und es wird eine Proteinbestimmung (siehe III.4; S. 24) durchgeführt. Danach wird die Borreliensuspension auf eine Proteinkonzentration von 2000–5000 µg/ml eingestellt. Die Borreliensuspension wird 1:2 mit dem reduzierenden Probenpuffer verdünnt und 5 min bei 100°C denaturiert. Nun ist die Probe bei -20°C lagerbar.

Die Fraktionen der Antikörperreinigung werden mit nicht-reduzierendem Probenpuffer verdünnt (1:2) und bei 100°C denaturiert.

III.6.2 Herstellung der SDS-Polyacrylamid-Gele und Gelelektrophorese

Trenngel 12,5% (für Borrelienproteine):

5,63 ml *Aqua dest.*

6,0 ml 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8

240 µl 10 % (w/v) SDS-Lösung

12,0 ml 25 % (w/v) Bis-/Acrylamid

120 µl 10% (w/v) APS

12 µl TEMED

Trenngel 7,5% (für MAK):

10,43 ml *Aqua dest.*

6,0 ml 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8

240 µl 10 % (w/v) SDS-Lösung

7,2 ml 25 % (w/v) Bis-/Acrylamid

120 µl 10% (w/v) APS

12 µl TEMED

Sammelgel 3,9 %:

5,78 ml *Aqua dest.*

2,5 ml 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8

100 µl 10 % (w/v) SDS-Lösung

1,56 ml 25 % (w/v) Bis-/Acrylamid

50 µl 10% (w/v) APS

10 µl TEMED

10 x Elektrophoresepuffer:

30 g Tris

144 g Glycin

10 g SDS

in *Aqua dest.* lösen und auf 1 l auffüllen.

Die Gießplatten und der Gießstand werden mit 0,75 mm Abstandshaltern zusammengebaut. Der Ansatz für das Trenngel wird vorbereitet und vorsichtig zwischen die Platten gefüllt. Nun wird das Gel mit Wasser überschichtet. Nach 1 Stunde ist das Gel bei Raumtemperatur vollständig auspolymerisiert. Das Wasser wird abgekippt und der Zwischenraum mit Filterpapier getrocknet. Die Lösung für das Sammelgel wird vorsichtig auf das Trenngel gegossen und in das noch flüssige Gel wird ein Kamm mit 10–12 Ladetaschen gesteckt. Nach 45 min ist das Sammelgel vollständig polymerisiert und der Kamm wird entfernt. Das Gel wird in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt und der Behälter mit 1 x Elektrophoresepuffer gefüllt. Das vorbereitete Borrelien-
gesamtprotein oder Proben aus jeder zweiten Reinigungsfraktion der MAK werden in die Ladetaschen pipettiert (3–5 µg Protein/Spur; max. 15 µl/Spur). Die Elektrophorese wird mit 200 V durchgeführt und dauert ca. 1 Std. Die Elektrophorese ist beendet, wenn die Bromphenolblau-Front fast unten angekommen ist.

III.6.3 Färbung der Proteine

Fixierlösung:

100 ml Essigsäure

300 ml Ethanol

600 ml *Aqua dest.*

Färbelösung:

0,75 g Coomassie Brilliant Blue R

500 ml Methanol

100 ml Essigsäure

400 ml *Aqua dest.*

Lösung zum Entfärben des Hintergrunds:

100 ml Essigsäure

250 ml Methanol

650 ml *Aqua dest.*

Nach beendeter Elektrophorese wird das Sammelgel vom Trenngel entfernt und das Trenngel wird für 15 min fixiert. Anschließend wird das Trenngel für 30 min gefärbt. Zur Differenzierung der Banden wird das Trenngel für 30–60 min entfärbt. Der Vorgang ist beendet, wenn sich die Proteinbanden deutlich vom Hintergrund abheben. Das Gel wird zwischen 2 Stücken Cellophan in einer Gel-Trocknungs-Apparatur getrocknet.

III.7 Westernblot

Der Proteintransfer von den SDS-Polyacrylamidgelen auf die Nitrocellulosemembran erfolgte nach der „Semi-dry-blotting-Methode“ von KYHSE-ANDERSEN (1984).

III.7.1 Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran

Anodenlösung I, pH 10,5:

36,3 g Tris

200 ml Methanol

in *Aqua dest.* lösen und auf 1 l auffüllen.

Anodenlösung II, pH 10,4:

3,03 g Tris

200 ml Methanol

in *Aqua dest.* lösen und auf 1 l auffüllen.

Kathodenlösung, pH 7,5:

5,2 g ϵ -Amino-Caprone

200 ml Methanol

in *Aqua dest.* lösen und auf 1 l auffüllen.

18 Filterpapiere werden auf Gelgröße zugeschnitten. 6 Filterpapiere werden mit Anodenlösung I und 3 Filterpapiere mit Anodenlösung II angefeuchtet. Ein in der gleichen Größe zugeschnittenes Stück Nitrocellulosemembran wird ebenfalls mit Anodenlösung II angefeuchtet. Filterpapiere und Nitrocellulosemembran werden in der oben beschriebenen Reihenfolge übereinander auf die Anode der „Blotting“-Apparatur gelegt.

Nach Beendigung der Gelelektrophorese wird das Sammelgel vorsichtig vom Trenngel gelöst, das Trenngel mit Kathodenlösung angefeuchtet und auf die Nitrocellulosemembran gelegt. Die restlichen 9 Filterpapiere werden mit Kathodenlösung angefeuchtet und übereinander auf das Gel gelegt. Die Kathode wird angebracht, die „Blotting“-Apparatur geschlossen und die Proteine werden bei einer Spannung von 15 V und 60 mA Stromstärke für ca. 1 Std. vom Trenngel auf die Nitrocellulosemembran transferiert.

III.7.2 Färben der Nitrocellulosemembran

Ponceau S Lösung:

0,2% Ponceau S Lösung in 3% Trichloressigsäure

Nach beendetem Transfer wird die Nitrocellulosemembran zur Darstellung der Proteinbanden ca. 5 min mit Ponceau S Lösung gefärbt. Die gefärbte Membran wird zur Dokumentation fotografiert und anschließend mit *Aqua dest.* entfärbt.

III.7.3 Blockieren unspezifischer Bindungsstellen

Blockierungspuffer, pH 7,4:

3,95 g Tris

5,85 g NaCl

0,5 ml Tween[®] 20

25 g Magermilchpulver

in *Aqua dest.* lösen, mit HCl den pH-Wert einstellen und auf 500 ml auffüllen.

Die Membran wird für 1 Stunde bei 37°C oder über Nacht bei 4°C zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen geblockt. Anschließend kann die Membran getrocknet und im Kühlschrank aufbewahrt, oder sofort weiterverwendet werden.

III.7.4 Nachweis der Proteine auf der Nitrocellulosemembran

Waschpuffer:

20 ml 1 M Tris/HCl, pH 7,4

18 g NaCl

4 ml Tween[®] 20

in *Aqua dest.* lösen und auf 2 l auffüllen.

Verdünnungspuffer für Seren und Konjugat:

500 ml Waschpuffer

5 g Magermilchpulver

Substratlösung für die enzymatische Farbreaktion:

50 mg Diaminobenzidin

5 ml 1 M Tris/HCl, pH 7,4

in *Aqua dest.* lösen und auf 100 ml auffüllen.

Kurz vor der Verwendung werden 50 µl 30% H₂O₂ zugeben.

Die MAK werden mit dem Verdünnungspuffer für Seren je nach Konzentration und Reaktivität der einzelnen MAK verdünnt. Die Inkubation der Nitrocellulosemembran mit den MAK erfolgt über Nacht bei RT auf dem Schüttler. Anschließend werden die MAK abpipettiert und die Membran 4 x je 10 min mit Waschpuffer gewaschen.

Bei der Kontrolle der Reinigungsfraktionen werden die MAK direkt auf die Nitrocellulosemembran transferiert und können anschließend direkt mit Hilfe des Konjugats nachgewiesen werden.

Das Peroxidase-Konjugat wird 1:1000 mit Verdünnungspuffer verdünnt und die Membran für 2 Std. bei RT auf dem Schüttler darin inkubiert.

Anschließend wird die Membran 4 x je 10 min mit Waschpuffer gewaschen.

Zur Darstellung des gebundenen Konjugats wird die Membran ca. 5 min mit Substratlösung inkubiert. Die Färbelösung wird abgenommen und die Farbreaktion durch Zugabe von 1 N H₂SO₄ gestoppt. Anschließend wird mit *Aqua dest.* gespült und die Membran 1–2 Std. zwischen Filterpapier getrocknet.

III.8 Erzeugen von kokkoiden Morphotypen bei Borrelien

Die Borrelien werden aus dem MKP-Medium abzentrifugiert (20 min bei 2500 upm; Sorvall RC-5B) und für 5 min in 50 mM Cacodylatpuffer, oder in autoklaviertem *Aqua dest.* inkubiert. In beiden Fällen kommt es zur Bildung der kokkoiden Morphotypen.

Zur Untersuchung der Kultivierbarkeit der kokkoiden Morphotypen werden die in sterilem *Aqua dest.* gebildeten kokkoiden Morphotypen nach bestimmten Zeitintervallen wieder in MKP-Medium angeimpft und bei 33°C inkubiert. Als Kontrollversuch, ob die Bildung der kokkoiden Morphotypen alle Borrelienzellen umfaßt, wird ein Teil der Suspension über einen Filter mit 0,45 µm Porengröße gefiltert. Diesen Filter können nur schraubenförmige Borrelienzellen passieren. Anschließend wird versucht aus dem Filtrat ebenfalls Borrelien in MKP-Medium zu kultivieren.

Die Kontrolle der Veränderungen während der Inkubation in hypotonen Medien erfolgt lichtmikroskopisch im Dunkelfeld oder Phasenkontrast. Zur Verlaufskontrolle der Kultur der kokkoiden Morphotypen wird diese jeden zweiten Tag mikroskopiert. Die Kontrolle der Kultur des Filtrats erfolgt während der ersten Woche alle zwei Tage, anschließend nur noch einmal wöchentlich, bis zu einer Kulturdauer von 4 Wochen.

III.9 Lichtmikroskopische Methoden

III.9.1 DAPI-Färbung

DAPI-Stammlösung:

1 mg DAPI in 1 ml *Aqua dest.* lösen.

Die kokkoiden Morphotypen werden mit DAPI gefärbt um das Vorhandensein von DNA zu überprüfen. Die DAPI-Färbung wird auch angewandt, um die Astrozyten auf eine mögliche

Kontamination mit Mycoplasmen hin zu untersuchen. Dazu wird das Präparat mit der verdünnten DAPI-Lösung (0,1 µg/ml) versetzt. Durch die Komplexbildung mit der DNA des Präparats entwickelt sich nach ca. 10–30 min eine blaue Fluoreszenz (454 nm), die durch eine Anregung im UV-Bereich (364 nm) im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden kann. Der DAPI-DNA Komplex fluoresziert um ein vielfaches stärker als die DAPI-Lösung allein, daher kann auf das Waschen des Präparats im Anschluß an die Färbung verzichtet werden.

III.9.2 Vitalfärbung

Zur Überprüfung der Vitalität der kokkoiden Morphotypen wurde der Live/Death Stain[®] BacLight[™] (Molecular Probes) für Bakterien verwendet. Zunächst wurde überprüft, ob sich dieser Test unter Verwendung des vom Hersteller angegebenen Protokolls für Borrelien eignet. Nachdem die Eignung des Färbeverfahrens bestätigt werden konnte, wurde der Test nach den Angaben des Herstellers für die Färbung der kokkoiden Morphotypen eingesetzt.

III.9.3 Immunfluoreszenztest (IFT)

Der IFT ermöglicht den lichtmikroskopischen Nachweis der Expression eines bestimmten Proteins für einzelne Borrelienzellen. Zur spezifischen Markierung von Proteinen, die auf der Oberfläche der Borrelienzelle exprimiert werden, wird die Fluoreszenzmarkierung an lebenden, unfixierten Borrelien durchgeführt. Zum Nachweis der Proteinexpression unabhängig von der Lokalisation werden im konventionellen IFT luftgetrocknete und methanolfixierte Borrelien verwendet.

Durchführung der Markierung

PBS, pH 7,4:

8 g NaCl

0,2 g KCl

1,5 g Na₂HPO₄

0,2 g KH₂PO₄

in *Aqua dest.* lösen, pH-Wert mit HCl einstellen und auf 1 l auffüllen.

Waschpuffer:

PBS mit 5 mM MgCl₂; pH 7,4

Verdünnungspuffer (Block):

PBS mit 2,15% BSA; pH 7,4

IFT an lebenden Borrelien

Die Borrelien werden aus gut bewachsenen log-Phase Kulturen abzentrifugiert (20 min bei 2500 upm; Rotanta/RP) und in einer verdünnten Lösung des jeweiligen MAK resuspendiert.

Inkubationsschema:

Präparationsschritt	Zeit
Inkubation mit MAK	30 min bei 37°C
Waschen mit Verdünnungspuffer	3 x je 10 min
Inkubation mit Cy3 gekoppeltem sek. AK	30 min bei 37°C
Waschen mit PBS	3 x je 10 min

Anschließend werden die Borrelien auf „Multitest-Slides“ pipettiert. Die Präparate werden über Nacht im Dunkeln getrocknet und mit Vectashield[®] und einem Deckglas bedeckt. Zur Herstellung von Dauerpräparaten wird das Deckglas mit Merckoglas[®] umrandet. Anschließend werden die Präparate bei einer Anregungswellenlänge von 546 nm im Fluoreszenzmikroskop mikroskopiert.

Konventioneller IFT

Die Borrelien werden aus dicht bewachsenen Kulturen, die sich in der log-Phase befinden, abzentrifugiert (20 min bei 2500 upm; Rotanta/RP) und 5 x mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend werden sie auf „Multitest-Slides“ pipettiert und über Nacht getrocknet. Die Borrelien werden durch kurzes Eintauchen in kaltes Methanol (-20°C) fixiert. Anschließend werden die fixierten Borrelien nach obigem Inkubationsschema markiert und mit Vectashield[®] und einem Deckglas bedeckt. Zur Herstellung von Dauerpräparaten wird das Deckglas mit Merckoglas[®] umrandet. Die Borrelien werden im Fluoreszenzmikroskop bei einer Anregungswellenlänge von 546 nm mikroskopiert.

Alle Borrelien in einem Objektfeld wurden zuerst im Phasenkontrast und anschließend bei Fluoreszenzanregung ausgezählt, um die Anzahl markierter Borrelien im Verhältnis zu unmarkierten Borrelien zu bestimmen. Pro Versuchsansatz wurden 100 Borrelien im Phasenkontrast ausgezählt dieser Wert gleich 100% gesetzt, und mit der Anzahl der markierten Borrelien in Relation gebracht.

III.9.4 Färbung humaner Astrozyten mit „DiO“

Färbelösung:

5 µl DiO + 1 ml PBS

Von den adhärent auf Deckgläschen in Multiwell-Gewebekulturplatten gewachsenen Astrozyten wird das Kulturmedium abpipettiert. Anschließend wird die Zellschicht mit 100 µl Färbelösung pro Deckgläschen für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen werden 3 x mit PBS gewaschen. Die Deckgläschen mit den Astrozyten werden auf einen OT gelegt, mit Vectashield[®] und einem Deckglas bedeckt und mit Merckoglas[®] umrandet. Die Präparate werden im Fluoreszenzmikroskop bei einer Anregungswellenlänge von 450–490 nm mikroskopiert.

III.10 Elektronenmikroskopische Methoden

III.10.1 Fixieren, *en bloc*-Kontrastieren und Entwässern

In der Elektronenmikroskopie werden vor allem Glutaraldehyd und Formaldehyd als chemische Fixantien für biologische Präparate eingesetzt. Sie dienen der Fixierung von Proteinen durch Quervernetzung und tragen so zum Strukturerehalt der Präparate bei. Die Verwendung von Glutaraldehyd führt, wegen der stärkeren Quervernetzung der Proteine, zu einem besseren Strukturerehalt, wobei die Proteine ihre antigenen Eigenschaften verlieren können (SCHIMMEL und VOGELL, 1975).

Zur Fixierung der Lipide wird OsO₄ verwendet. Es reagiert mit den Doppelbindungen in ungesättigten Fettsäuren, wobei die Fixierung der Membranen von besonderer Bedeutung ist. Osmium führt zusätzlich auf Grund seiner hohen Ordnungszahl zu einer Kontrastierung der Präparate, wie sie für die Transmissionselektronenmikroskopie erwünscht ist (SCHIMMEL und VOGELL, 1975).

Eine Kontrastierung und Stabilisierung von DNA und RNA kann mit Uranylacetat erzielt werden, da das Uranylion mit den Phosphatgruppen der Nucleinsäuren reagiert (KELLENBERGER et al., 1958).

Im Anschluß an die Fixierung werden die Präparate in einer Acetonreihe steigender Konzentration schrittweise entwässert.

Standardpräparation für die Rasterelektronenmikroskopie

Fixierungspuffer; pH 7,0:

100 mM Cacodylat

2 mM MgCl₂

Der pH-Wert wird mit HCl eingestellt.

Fixans:

2,5% Glutaraldehyd in Fixierungspuffer

OsO₄-Lösung:

4% OsO₄ in Ampuwa[®]

Diese Lösung wird vor Verwendung mit Fixanspuffer auf eine 1%-ige Lösung verdünnt.

Fixierungsschema:

Präparationsschritt	Zeit
Abzentrifugieren der Borrelien aus dem Medium 6000 upm (Sorvall RC-5B)	20 min
Inkubation in Fixans	1 Std.

Die Borrelien werden nun mit Hilfe einer Kryo-Präparationstechnik auf gereinigte, markierte OT aufgebracht. Dazu wird die fixierte Borreliensuspension auf den OT pipettiert, mit einem Deckglas bedeckt und in flüssigen Stickstoff getaucht. Anschließend wird das Deckglas sofort mit einer Rasierklinge abgesprengt und der OT mit den Borrelien wird nochmals für 30 min nachfixiert. Das Fixans wird ausgewaschen und die Proben nach folgendem Schema schrittweise entwässert.

Präparationsschritt	Zeit
Waschen mit Fixierungspuffer (3 x)	5 min, 15 min, 30 min
Fixieren mit 1% OsO ₄ Lösung	30 min
Waschen mit <i>Aqua dest.</i> (3 x)	5 min, 15 min, 30 min
10% Aceton	15 min
20% Aceton	15 min
40% Aceton	15 min
60% Aceton	15 min
80% Aceton	15 min
100% Aceton (3 x)	5 min, 15 min, 30 min

Die Astrozyten werden nach der Kultur auf Deckgläschen mit bzw. ohne anschließender Koinkubation mit Borrelien (siehe III.3; S. 23) weitgehend nach dem gleichen Zeitschema präpariert. Die Zellen verbleiben auf den Deckgläschen, daher entfallen die Zentrifugationsschritte ebenso wie die Nachfixierung mit Glutaraldehyd. Abweichend von obigem Protokoll beträgt die Inkubationszeit in Fixans 2 Std., die in 1%-iger OsO₄-Lösung 1 Std..

Standardpräparation für die Transmissionselektronenmikroskopie

4% (w/v) Uranylacetatlösung:

2 g Uranylacetat

50 ml Ampuwa[®]

Diese Lösung wird mit *Aqua dest.* und Aceton auf 1% Uranylacetat in 20% Aceton eingestellt.

Die Präparation für die Transmissionselektronenmikroskopie folgt weitgehend dem oben angegebenen Zeitschema. Allerdings werden alle Schritte der Borrelienpräparation im Eppendorfgesäß durchgeführt, die Borrelien werden nicht auf OT aufgebracht. Dadurch entfällt auch die Nachfixierung mit Glutaraldehyd. Außerdem erfolgt während des Entwässerungsschritts in 20% Aceton die Kontrastierung mit Uranylacetat. Dieser Schritt ist deshalb auf 30 min verlängert.

Die Astrozyten verbleiben während der gesamten Präparation für die Transmissionselektronenmikroskopie auf der Melinexfolie. Erfolgte die Kultur der Astrozyten auf Deckgläschen, so wird nach dem Waschen mit *Aqua dest.* die Zellschicht vom Deckgläschen abgezogen und zerteilt.

Die weitere Präparation wird im Rollrandglas durchgeführt. Die Inkubationszeiten entsprechen den für die Rasterelektronenmikroskopie angegebenen Werten.

III.10.2 Gefrierbruch von kokkoiden Morphotypen (verändert nach TANAKA und NAGURO, 1981; TANAKA und MITSUSHIMA, 1984)

Die kokkoiden Morphotypen der Borrelien werden nach der Standardpräparation für die Rasterelektronenmikroskopie (siehe III.10.1; S. 34) präpariert, jedoch ohne auf OT aufgebracht zu werden. Nach dem zweiten Entwässerungsschritt in 100% Aceton werden die kokkoiden Morphotypen im Eppendorfgeläß mit flüssigem N₂ tiefgefroren und mit einem in flüssigem N₂ gekühlten Metallstab zerstoßen. Nach dem Auftauen werden die Proben ein drittes Mal mit 100% Aceton entwässert.

III.10.3 Kritisch-Punkt-Trocknung (KPT), Montieren, Besputtern bzw. Bedampfen der Proben

Kritisch-Punkt-Trocknung

Zur vollständigen Trocknung werden die Proben für die Rasterelektronenmikroskopie nach dem Entwässern mit Aceton nach dem KPT-Verfahren behandelt. Dazu werden die Präparate in 100% Aceton in die Druckkammer der KPT-Apparatur gebracht. Hier wird das Aceton in mehreren Schritten gegen flüssiges CO₂ ausgetauscht. Anschließend wird das flüssige CO₂ in der Druckkammer auf ca. 34°C erwärmt, wodurch gleichzeitig der Druck ansteigt. Beim Überschreiten des Kritischen Punkts (für CO₂ bei 32°C und 73,8 bar) geht das CO₂ ohne Änderung des Volumens (Druckkammer) vom flüssigen in den gasförmigen Aggregatzustand über. Über ein Ventil wird das CO₂ langsam aus dem Druckbehälter abgelassen. Ist der Umgebungsdruck erreicht können die Proben entnommen und bis zur weiteren Verwendung im Exsikkator aufbewahrt werden. Durch dieses Verfahren werden trocknungsbedingte Strukturveränderungen, wie z. B. Schrumpfungen weitgehend vermieden.

Montieren, Besputtern und Bedampfen

Die nach der KPT-Methode getrockneten Proben werden auf Probenhalter (Stubs) aufmontiert. Proben zur Untersuchung der Ultrastruktur werden mit einer 2–3 nm dicken Platinschicht „besputtert“. Gold-markierte Proben (siehe III.10.10; S. 40) werden mit Kohle bedampft, bis eine leichte Graufärbung des Präparats zu erkennen ist.

III.10.4 Einbetten in Kunstharz

Für die Transmissionselektronenmikroskopie werden die Proben nach dem Entwässern in Aceton in Kunstharz eingebettet. Hierfür wird routinemäßig das von SPURR (1969) entwickelte Epoxidharz verwendet. Die Proben werden schrittweise mit dem Epoxidharz infiltriert.

Präparationsschritte	Zeit
Harz : Aceton 1:2	3 Std.
Harz : Aceton 2:1	Über Nacht
100% Harz (2 x)	2 Std., 4 Std.

Anschließend werden die mit Epoxidharz infiltrierten Proben in Einbettformen überführt, mit Harz bedeckt und bei 68°C über Nacht polymerisiert.

III.10.5 Befilmen von Trägernetzchen

Collodiumlösung (PLATTNER und ZINGSHEIM, 1987):

440 mg Collodium (getrocknet)

100 ml n-Butylacetat

In der Transmissionselektronenmikroskopie werden Netzchen, meist aus Kupfer oder Nickel als Träger für die Ultradünnschnitte verwendet. In Abhängigkeit von Präparat (Zellgröße, Gewebeverband) und Methode (Serienschnitte, Negativkontrastierung) werden unterschiedliche Trägernetzchen verwendet. Trägernetzchen mit großer Maschenweite, oder mit Parallelstegen müssen mit einer dünnen Folie aus Nitrocellulose (Handelsname: Collodium) beschichtet werden, die als eigentlicher Träger für die Ultradünnschnitte dient. Für die Beschichtung der Netzchen mit Collodium werden Glasobjektträger gründlich gereinigt und anschließend mit Aceton gespült

und getrocknet. Diese OT werden kurz in die Collodiumlösung getaucht und stehend getrocknet. Die getrocknete Collodiumfolie wird mit einer Rasierklinge an den Kanten des OT angeritzt und faltenfrei auf eine Wasseroberfläche (Ampuwa[®]) abgeschwemmt. Die Netzchen werden vorsichtig auf die Folie gelegt. Mit Hilfe eines Filterpapiers werden die Netzchen mit der Folie von der Wasseroberfläche gehoben und getrocknet.

III.10.6 Bedampfen und Beglimmen der Trägernetzchen

Für die Negativkontrastierung werden die befilmten Trägernetzchen mit Kohle bedampft, um sie elektrisch leitend zu machen. Da die entstehende Kohleschicht hydrophob ist, werden durch Beglimmen Sauerstoffgruppen angebracht. Dadurch ist eine Benetzung der Trägerfolie mit der Probe, die sich in einer wäßrigen Lösung befindet, möglich.

III.10.7 Negativkontrastierung

Kontrastierungslösung; pH 6,9:

2 g PWS

0,02 g Natriumazid

0,2 g Glucose

lösen und mit *Aqua dest.* auf 200 ml auffüllen.

Für die Negativkontrastierung werden die mit Glutaraldehyd fixierten Borrelien mit *Aqua dest.* gewaschen. Ein Tropfen der Borreliensuspension wird auf die vorbereiteten (siehe III.10.5; S. 38 und III.10.6; S. 39) Trägernetzchen pipettiert und nach 1 min mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgenommen. Nach kurzem Antrocknen der Probe wird die Kontrastierungslösung auf das Netzchen pipettiert und nach 1 min mit Ampuwa[®] abgespült. Die Probe kann nach dem vollständigen Trocknen direkt im TEM mikroskopiert werden.

III.10.8 Schneiden

Für die Anfertigung von Ultradünnschnitten für die Transmissionselektronenmikroskopie werden die Epoxidharzblöckchen mit den Proben zunächst am Pyramitome[®] oder mit einer Fräse angespitzt, so daß eine trapezförmige Schnittfläche (ca. 1 mm Kantenlänge) entsteht. Für die Anfertigung von Serienultradünnschnitten werden die Blöckchen prismenförmig getrimmt. Die

entstehenden Kanten werden mit einem Diamantmesser geglättet, um einen besseren Zusammenhalt der Einzelschnitte im Schnittband zu erzielen.

Die Ultradünnschnitte werden mit Diamantmessern im Ultramikrotom angefertigt. Die Schnitt-
dicke wird mittels Interferenz der Schnitte im Licht bestimmt und liegt zwischen 80 nm (gold-
farbig) und 50 nm (silbrig). Die Schnitte schwimmen auf dem wassergefüllten (Ampuwa[®]) Mes-
sertrog und werden durch Chloroformdämpfe gestreckt und geglättet. Anschließend werden die
Schnitte mit Hilfe eines, an einem Zahnstocher befestigten, Katzenhaars vorsichtig auf die Trä-
gernetzchen aufgenommen.

Bei der Herstellung von Serienultradünnschnitten ist es erforderlich, daß die Schnitte aneinander
haften bleiben und ein Band bilden. Dieses darf beim Strecken der Schnitte und beim Aufneh-
men auf die Netzchen nicht zerreißen. Außerdem ist darauf zu achten, daß das Schnittband par-
allel zu den Stegen des Trägernetzchens zu liegen kommt.

III.10.9 Nachkontrastieren

Bleicitratlösung nach REYNOLDS (1963)

Die Bleicitratlösung wird luftblasenfrei in Spritzen abgefüllt. Diese werden mit Parafilm luft-
dicht verschlossen.

Die *en bloc* Kontrastierung (siehe III.10.1; S. 34) kann durch eine zusätzliche Schnittkon-
trastierung verstärkt werden. Dazu werden die Trägernetzchen mit den Schnitten mit einem
Tropfen Bleicitratlösung 1 min inkubiert. Das Bleicitrat wird anschließend mit Ampuwa[®]
gründlich abgespült.

III.10.10 Immun-Gold-Markierung für die Rasterelektronenmikroskopie

PBS: (siehe III.9.3; S. 32)

Block:

0,5 % BSA

0,05% Gelatine

0,01% Tween[®]

in PBS lösen.

Zur Untersuchung der Lokalisation bestimmter Borrelienproteine, bzw. Epitope wird ein indirektes Nachweisverfahren angewendet. Zunächst werden die Borrelien, oder die kokkoiden Morphotypen mit einem MAK, der gegen das zu untersuchende Protein gerichtet ist inkubiert. Anschließend werden die Borrelien mit einem sekundären Antikörper inkubiert. Dieser ist mit einem Goldkolloid konjugiert, das im REM ein Detektionssignal liefert. In Abhängigkeit von der Empfindlichkeit der zu untersuchenden Proteine gegen die Fixierung mit Glutaraldehyd und der damit verbundenen Veränderung der Antigenstruktur wurden zwei verschiedene Protokolle (mit oder ohne Vorfixierung der Proben mit Glutaraldehyd) zur Markierung der Borrelien entwickelt.

Markierungsprotokoll mit Vorfixierung

Zunächst werden die Borrelien wie unter III.10.1 (S. 34) beschrieben fixiert, auf OT aufgefroren und nachfixiert. Anschließend werden die Proben nach folgendem Protokoll markiert.

Präparationsschritt	Zeit
Waschen mit Cacodylatpuffer (2 x)	10 min, 20 min
Waschen mit <i>Aqua dest.</i> (2 x)	10 min, 20 min
Waschen mit PBS + 50 mM Glycin (2 x)	10 min, 20 min
Waschen mit Block (2 x)	15 min, 30 min
Inkubation mit dem MAK	3 Std.; 37°C
Waschen mit Block (3 x)	10 min, 20 min, 30 min
Inkubieren mit sek. AK mit 12 nm bzw. 6 nm Gold konjugiert	2 Std.; 37°C
Waschen mit PBS (2 x)	10 min, 20 min
Waschen mit <i>Aqua dest.</i> (2 x)	10 min, 20 min
Nachfixieren mit 2,5% Glutaraldehyd	Über Nacht

Anschließend werden die Proben entwässert (III.10.1; S. 34), nach der KPT-Methode getrocknet, montiert und mit Kohle bedampft (III.10.3; S. 37). Auf eine Nachfixierung mit OsO₄-Lösung wird verzichtet, da Osmium den Nachweis des Goldkolloids stören könnte.

Die Markierung der Endflagellen erfolgt wie oben beschrieben, allerdings werden hierbei die Borrelien ohne vorherige Fixierung mit Glutaraldehyd auf die OT aufgefroren.

Markierungsprotokoll ohne Vorfixierung

Die Borrelien werden aus dem MKP-Medium abzentrifugiert (20 min bei 2500 upm; Rotanta/RP) und anschließend nach folgendem Protokoll in Eppendorf-Gefäßen markiert.

Präparationsschritt	Zeit
Waschen mit Block (2 x)	15 min, 30 min
Inkubieren mit MAK	3 Std.; 37°C
Waschen mit Block (3 x)	10 min 20 min, 30 min
Inkubieren mit sek. AK mit 12 nm Gold konjugiert	2 Std.; 37°C
Waschen mit PBS (2 x)	10 min, 20 min

Anschließend werden die Borrelien fixiert, auf OT aufgefroren und entwässert (III.10.1; S. 34; ohne Nachfixierung mit OsO₄). Die Proben werden dann wie unter III.10.3 (S. 37) beschrieben präpariert.

Die Auszählung der Immun-Gold-Markierung erfolgt, abgesehen von der Markierung der Flagellen, für alle Markierungen einheitlich pro 0,3 µm² Borrelienoberfläche. In die Auszählung werden nur solche Borrelienzellen mit einbezogen, die grundsätzlich Goldsignale aufweisen.

IV Ergebnisse

IV.1 Reinigung der MAK und Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Immun-Gold-Markierungen ist es vorteilhaft die zur Markierung verwendeten MAK in definierten Proteinkonzentrationen einzusetzen. Dies ermöglicht zum einen die Standardisierung der Markierungsbedingungen. Zum anderen wird dadurch die Gefahr reduziert, daß andere in der Lösung enthaltene Proteine zu unspezifischen Reaktionen führen und so das Markierungsergebnis verfälschen können. Es ist daher erforderlich, die MAK von den übrigen Proteinen im Kulturmedium der Hybridoma-Zellkulturen zu trennen. Diese Reinigung der MAK ist allerdings nur möglich, wenn die Hybridoma-Zellen, welche die MAK produzieren in FKS-freiem Medium gewachsen sind. Die im FKS enthaltenen AK blockieren sonst die Bindungsstellen an der ProteinG-Säule. Im letzten Schritt der Reinigung wurden die MAK von der Säule eluiert und in verschiedenen Fraktionen aufgegangen. Mit Hilfe der Auftrennung in SDS-Polyacrylamidgelen mit anschließender Comassiefärbung bzw. im Westernblot wurden diese Fraktionen daraufhin getestet, ob sie die MAK in gereinigter Form enthalten. Es wurde nur jede zweite, bzw. dritte Fraktion getestet. Enthielt eine getestete Fraktion nach den Ergebnissen des Westernblots den MAK, so wurden die benachbarten, nicht getesteten Fraktionen auch als antikörperhaltig angesehen.

Die Banden auf den Gelen und auf den Nitrocellulosemembranen zeigen, daß bei der Reinigung des MAK L22 1F8 die Fraktionen 1–5 den MAK enthalten. Bei der Reinigung des MAK L32 1F11 sind es die Fraktionen 1–7 und bei der Reinigung des MAK L17 G2 die Fraktionen 2–7, die den gereinigten MAK enthalten (**Abb. 3**).

Die Fraktionen, die den jeweiligen MAK enthalten, wurden zusammengegeben und es wurde die Proteinkonzentration dieses Gesamteluats bestimmt. Dabei ergaben sich für die verschiedenen gereinigten MAK die in **Tab. 1** aufgeführten Konzentrationen.

MAK	Proteinkonzentration
L17 G2 anti p17	1,7 mg/ml
L32 1F11 anti OspA (breit)	10 mg/ml
L22 1F8 anti OspC (breit)	10 mg/ml

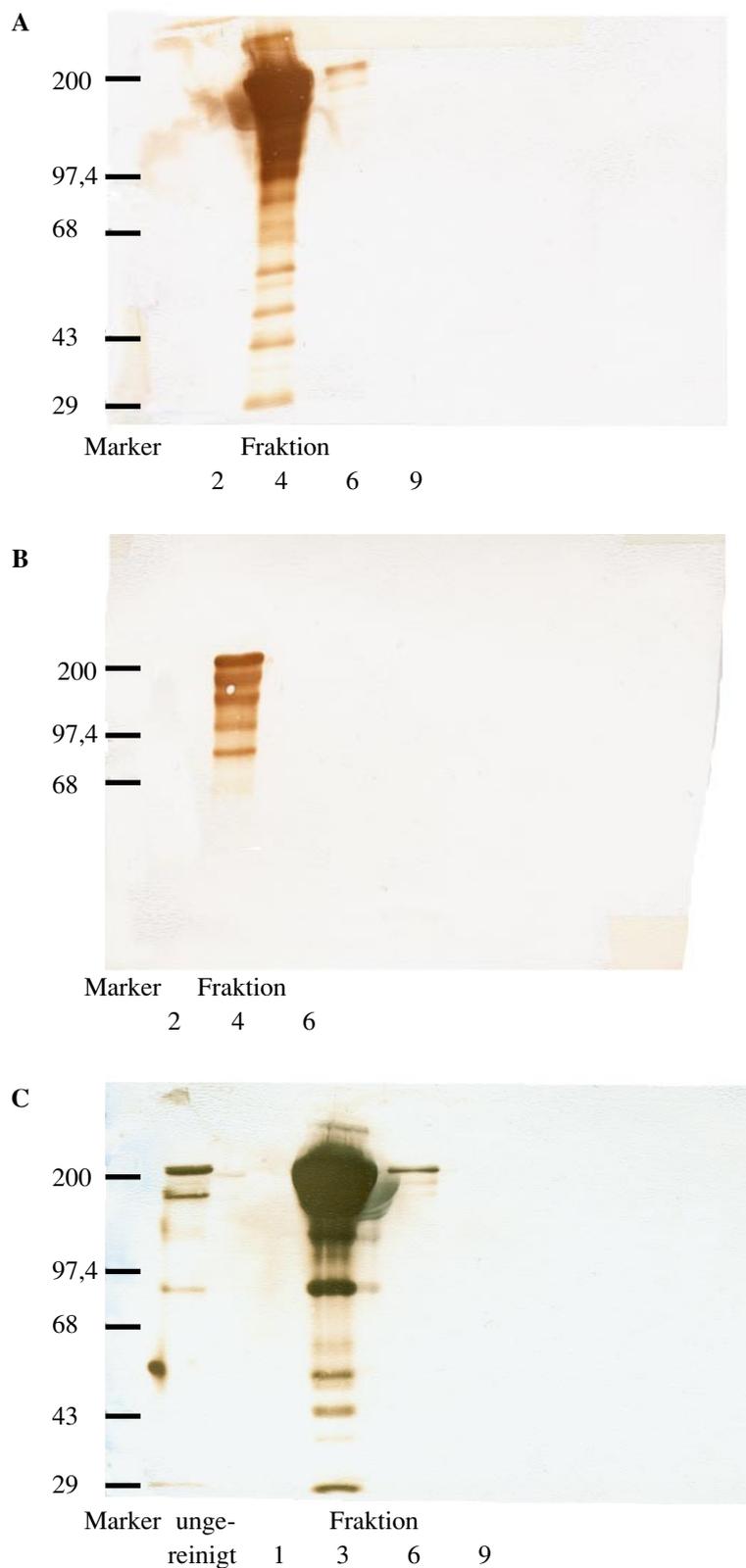
Tab. 1 Proteinkonzentrationen im Gesamteluat der verschiedenen gereinigten MAK.

Einige weitere MAK wurden bereits in gereinigter Form zur Verfügung gestellt. Hier wurde direkt die Bestimmung der Proteinkonzentration durchgeführt (**Tab. 2**).

MAK	Proteinkonzentration
L32 1G3 anti OspA (tyspez.)	794,9 µg/ml
L22 1F10 anti OspC (tyspez.)	2,35 µg/ml
L32 14G7 anti OspA (tyspez.)	107,2 µg/ml

Tab. 2 Proteinkonzentrationen der in gereinigter Form zur Verfügung gestellten MAK.

Die MAK L41 1C11, L35 1F4 und L58 L6 wurden in ungereinigter Form verwendet, da die Hybridoma-Zellen, die den entsprechenden MAK produzieren, in FKS-freiem Medium nicht wuchsen. Die Reinigung über die ProteinG-Säule war daher nicht möglich. Diese MAK wurden im ersten Immun-Markierungsversuch in den Verdünnungen eingesetzt, in denen sie auch im Westernblot verwendet werden. Auf Grund der daraus resultierenden Markierungsergebnisse wurde dann die jeweils geeignete Verdünnung ermittelt.

**Abb. 3**

Western-Blot der nach der Reinigung der MAK von der ProteinG-Säule eluierten Fraktionen; die Auftrennung der Proben erfolgte auf einem 7,5%-SDS Polyacrylamidgel; als Größenstandard wurde der HM-Marker der Firma Sigma verwendet; Die Größenangaben erfolgen in kDa.

A: MAK L32 1F11; B: MAK L22 1F8; C: MAK L17 G2.

IV.2 Ultrastrukturelle Untersuchungen an *Borrelia afzelii* Stamm PKo

Zunächst wurde eine Wachstumskurve des *B. afzelii* Stamms PKo unter Standard-Kulturbedingungen (siehe III.1; S. 21) mit log-Phase Borrelien als Impfkultur erstellt, um für die ultrastrukturellen Untersuchungen der Borrelienzelle in allen Versuchen Borrelien aus der log-Phase der Kultur zu verwenden. Die Anzahl der Borrelien/ml wurden zu den verschiedenen Zeitpunkten nach der im Max von Pettenkofer Institut entwickelten Methode bestimmt (**Tab. 3**). Die Mittelwerte der ermittelten Zellzahlen dienen zur Berechnung der Teilungsrate und der Generationszeit (**Abb. 4**).

Zeit	Zellzahl 1	Zellzahl 2	Zellzahl 3	Mittelwert
0 Std.	$5,1 \times 10^5$	$5,1 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	$4,5 \times 10^5$
24 Std.	$7,3 \times 10^5$	$1,2 \times 10^6$	$8,1 \times 10^5$	$9,1 \times 10^5$
48 Std.	$3,5 \times 10^6$	$3,6 \times 10^6$	$2,7 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$
72 Std.	$4,3 \times 10^6$	$5,1 \times 10^6$	$4,4 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$
96 Std.	$7,0 \times 10^6$	$6,5 \times 10^6$	$9,9 \times 10^6$	$7,8 \times 10^6$
168 Std. (7 Tage)	$4,5 \times 10^7$	$4,9 \times 10^7$	$5,9 \times 10^7$	$5,1 \times 10^7$
216 Std. (9 Tage)	$5,8 \times 10^7$	$7,9 \times 10^7$	$6,8 \times 10^7$	$6,8 \times 10^7$
264 Std. (11 Tage)	$6,2 \times 10^7$	$8,1 \times 10^7$	$7,5 \times 10^7$	$7,3 \times 10^7$

Tab. 3 Übersicht über die, nach der im Max von Pettenkofer Institut verwendete Methode, ermittelten Borrelienzahlen/ml des *B. afzelii* Stamms PKo zu den verschiedenen Zeiten.

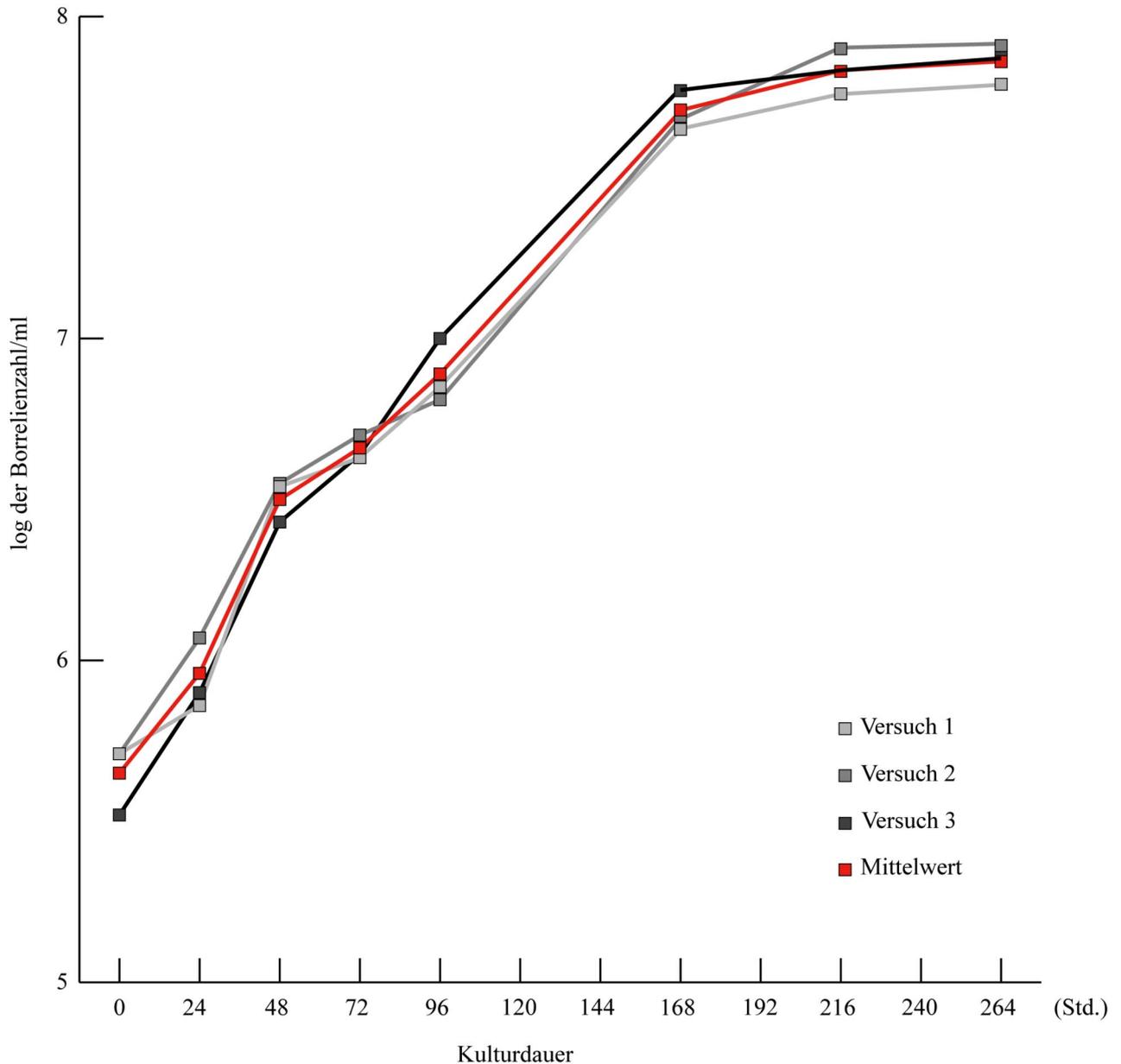


Abb. 4 Wachstumskurve von *B. afzelii* Stamm PKo unter Standard-Kulturbedingungen mit log-Phase Borrelien als Impfkultur.

Die Wachstumskurve zeigt keine lag-Phase. Die Kurve läßt jedoch deutlich erkennen, daß sich die Borrelien unter den gewählten Bedingungen bis zu einer Kulturdauer von 168 Std. (7 Tage) in der log-Phase befinden. Anschließend geht die Borrelienkultur allmählich in die stationäre Phase über.

Teilungsrate v (SCHLEGEL, 1985)

$$v = \frac{\lg N - \lg N_0}{\lg 2 (t - t_0)} ;$$

Während der log-Phase liegt die Teilungsrate der Borrelien im Mittel bei 0,04 Std.⁻¹.

Generationszeit g

$$g = \frac{1}{v} ;$$

Die mittlere Generationszeit von *B. afzelii* Stamm PKo liegt während der log-Phase unter Standard-Kulturbedingungen bei 25 Std.

Borrelien des *B. afzelii* Stamms PKo der frühen (48 Std.), mittleren (96 Std.), und späten (7 Tagen) log-Phase sowie der stationären Phase (11 Tagen) wurden im LM unter Verwendung des Phasenkontrasts untersucht und photographiert und in weiteren Versuchen für die Raster-elektronenmikroskopie präpariert. Dabei sollte untersucht werden, ob die Zellen mit zunehmendem Kulturalter strukturellen Veränderungen unterliegen.

Im LM zeigen die Borrelien zunächst (frühe bis mittlere log-Phase) eine schraubenförmige Gestalt und korkenzieherartig-rotierende Bewegungen. Gelegentlich lassen sich längere Borrelienzellen beobachten, die in der Zellmitte abknicken und sich um sich selber schlingen. Die Drehbewegung nimmt im Verlauf der späten log-Phase immer mehr ab und wird während der stationären Phase völlig eingestellt. Gleichzeitig werden die Borrelien länger und der Schraubendurchmesser nimmt ab (**Tafel 1**). Kulturen der späten stationären Phase bestehen nach den lichtmikroskopischen Beobachtungen nur noch aus unbeweglichen Borrelien. Nach dem Überimpfen in frisches Kulturmedium ist zu erkennen, daß diese Borrelien wieder anwachsen. Die Borrelienzellen dieser Kultur zeigen wieder ihre typische schraubenförmige Gestalt und korkenzieherartige Drehbewegungen. Dies zeigt, daß der Verlust der Bewegung nicht zeitgleich mit dem Absterben der Borrelien eintritt. Allerdings wachsen diese Borrelien nach dem Überimpfen in frisches Kulturmedium zunächst langsamer, als das beim Überimpfen von Borrelien aus der log-Phase einer Kultur der Fall ist.

Nach schonender Präparation kann man im REM deutlich erkennen, daß Borrelien aus der frühen und mittleren log-Phase eine schraubenförmige Gestalt besitzen (**Tafel 2 A, B; 4 A, B**). Die Borrelien weisen in der frühen log-Phase 3–5 Schraubenwindungen auf. Borrelien der mittleren log-Phase sind etwas länger und bestehen aus 5–9 Schraubenwindungen. Gegen Ende der log-Phase nimmt der Durchmesser der Schrauben jedoch immer mehr ab, bis die Borrelien in der frühen stationären Phase fast völlig gestreckt sind (**Tafel 2 C, D**). Die Abnahme des Schraubendurchmessers bewirkt die im LM beobachtete Verlängerung der Zellen und setzt ungefähr zeitgleich mit dem im LM zu beobachtenden Rückgang der Bewegung ein.

Für die ultrastrukturellen Untersuchungen von Borrelienzellen wurde der *B. afzelii* Stamm PKo aus der mittleren log-Phase der Kultur in MKP-Medium verwendet. Die Borrelien werden nach der Fixierung mit Glutaraldehyd unter Verwendung von flüssigem N₂ auf OT aufgefroren. Durch diese schonende Präparationstechnik bleibt die dreidimensionale Form erhalten, und die Borrelien zeigen eine schraubenförmige Gestalt. Schraubendurchmesser und Ganghöhe sind im mittleren Bereich einer Borrelienzelle konstant. Die letzte Windung an jedem Zellende hat gelegentlich einen etwas geringeren Durchmesser (**Tafel 2 B**). Beim Vergleich mehrerer verschiedener Borrelienzellen schwankt die Ganghöhe von 2 µm bis 3 µm. Der Schraubendurchmesser liegt zwischen 0,5 µm und 1 µm. Besonders lange Borrelien mit mehr als 11 Windungen erwiesen sich bei der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung häufig als zwei mit ihren Enden aneinandergelagerte Borrelien. Vereinzelt sind zwei völlig parallel liegende, gleich lange und umeinander gewundene Borrelienzellen zu beobachten (**Tafel 3**). Diese sind an einem Zellende miteinander verbunden (**Tafel 3 B, C**). Die Zellenden der Borrelien sind stumpf und zeigen nur eine geringe Verjüngung, die etwa 500–800 nm vor dem Zellende beginnt (**Tafel 4 B**). Die Oberfläche der Borrelien ist weitgehend unstrukturiert und nur bei höherer Vergrößerung sind schwach ausgeprägten, unregelmäßigen Falten zu erkennen.

Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen an Querschnitten der Borrelienzelle zeigen, daß diese aus einem nahezu kreisrunden Protoplasmazyylinder bestehen. Dieser besitzt einen weitgehend konstanten Durchmesser von etwa 190 nm. Im Zytoplasma der Borrelienzelle sind kontrastreiche, feinkörnige Strukturen zu erkennen. Der Protoplasmazyylinder wird von einer 4 nm dünnen Zellmembran begrenzt. Auf die Zellmembran folgt im Abstand von 5 nm eine dünne Zellwand, die sich nur schwach kontrastieren läßt. Die gesamte Borrelienzelle ist von einer äußeren Membran umgeben, die den periplasmatischen Raum umschließt. Diese äußere

Membran ist mit 7 nm wesentlich dicker als die Zellmembran. Vor allem zur Außenseite hin ist diese Membran nur schwach kontrastiert und daher nur undeutlich gegen das umgebende Harz des Ultradünnschnitts abgegrenzt (**Tafel 4 C, D**). Außerdem ist am Querschnitt durch die Borrelienzelle zu erkennen, daß die äußere Membran an einer Stelle zu einem etwa 94 nm hohen Tunnel aufgewölbt ist, in dem 13–18, meist jedoch 15–18 Einzelflagellen liegen. Die Flagellen ordnen sich im Tunnel in zwei Reihen an. Während ein Teil der Flagellen entlang des Protoplasmazyllinders liegt, ordnen sich ein anderer Teil der Flagellen entlang der Aufwölbung der äußeren Membran an. Im übrigen Bereich der Borrelienzelle ist der periplasmatische Raum nur 8 nm breit. Abgesehen von den Flagellen können in diesem Raum keine weiteren Strukturen aufgelöst werden (**Tafel 4 D**). Mit Hilfe der Negativkontrastierung kann man den Verlauf der Endoflagellen darstellen. Es ist zu beobachten, daß die Ansatzstellen der Endoflagellen in einem etwa 1 µm langen Abschnitt liegen, der 500–700 nm von den beiden Zellenden entfernt ist. Die Ansatzstellen sind entlang der Längsachse der Zelle angeordnet und folgen der schraubigen Gestalt des Protoplasmazyllinders (**Tafel 5 C, D**). An jedem Zellende sind etwa 5–9 Ansatzstellen deutlich zu erkennen. Von diesen Ansatzstellen ausgehend winden sich die Flagellen als Bündel um die schraubenförmige Borrelienzelle. Im Negativkontrast sind in diesem Flagellenbündel 10–13 Flagellen zu unterscheiden (**Tafel 6**). An einem kurzen Tangentialschnitt, der mehr als eine Windung umfaßt, kann man erkennen, daß die Flagellen aus der Schnittebene auswandern und an anderer Stelle wieder deutlich sichtbar werden, während der Protoplasmazyllinder im gesamten Bereich deutlich zu erkennen ist (**Tafel 5 B**). Ultradünne Serienschnitte durch die Borrelienzelle geben keinen weiteren Aufschluß über die genaue Lage der Flagellen zueinander und zum Protoplasmazyllinder. Die schraubenförmige Gestalt der Borrelienzelle macht es unmöglich, diese über mehrere Schnitte hinweg genau im Querschnitt zu treffen. Dies wäre jedoch für eine genaue Untersuchung der Lage der Endoflagellen nötig. Im REM ist die tunnelförmige Aufwölbung der äußeren Membran ebenfalls sichtbar. Sie windet sich schraubenförmig um die Borrelienzelle und zeigt so die Lage der Endoflagellen an (**Tafel 5 A**). Im negativkontrastierten Präparat sind außerdem Borrelienzellen zu beobachten, die eine gemeinsame äußere Membran besitzen und mit den Enden des Protoplasmazyllinders aneinander stoßen. Beide der einander zugewandten Zellenden haben Flagellenansatzstellen. Die Flagellen erstrecken sich von diesen ausgehend entlang der beiden Einzelzellen, in die der Kontaktstelle entgegengesetzte Richtung (**Tafel 7**).

Mit Hilfe der verschiedenen mikroskopischen Untersuchungsmethoden konnten die mittleren Dimensionen der einzelnen Strukturen von *B. afzelii* Stamm PKo ermittelt werden. Alle Meßwerte wurden an Borrelien aus der mittleren log-Phase der *in vitro* Kultur bestimmt.

Struktur	Dimension
Dicke der äußeren Membran	7 nm
Breite des periplasmatischen Raums	8 nm
Dicke der Zellwand (ZW)	6 nm
Raum zwischen ZW und innerer Membran	5 nm
Dicke der inneren Membran	4 nm
Durchmesser des Protoplasmazyinders	186 nm
Höhe der Aufwölbung für Flagellen (Tunnel)	94 nm
Flagellendurchmesser	12 nm
Zelllänge	10–24 µm
Zelldurchmesser	265 nm
Windungshöhe (Ganghöhe)	2–3 µm
Windungsdurchmesser	0,5–1 µm
Theoretische Zelllänge (gestreckt, bei 7 Windungen und 21 µm gewundener Länge)	35 µm

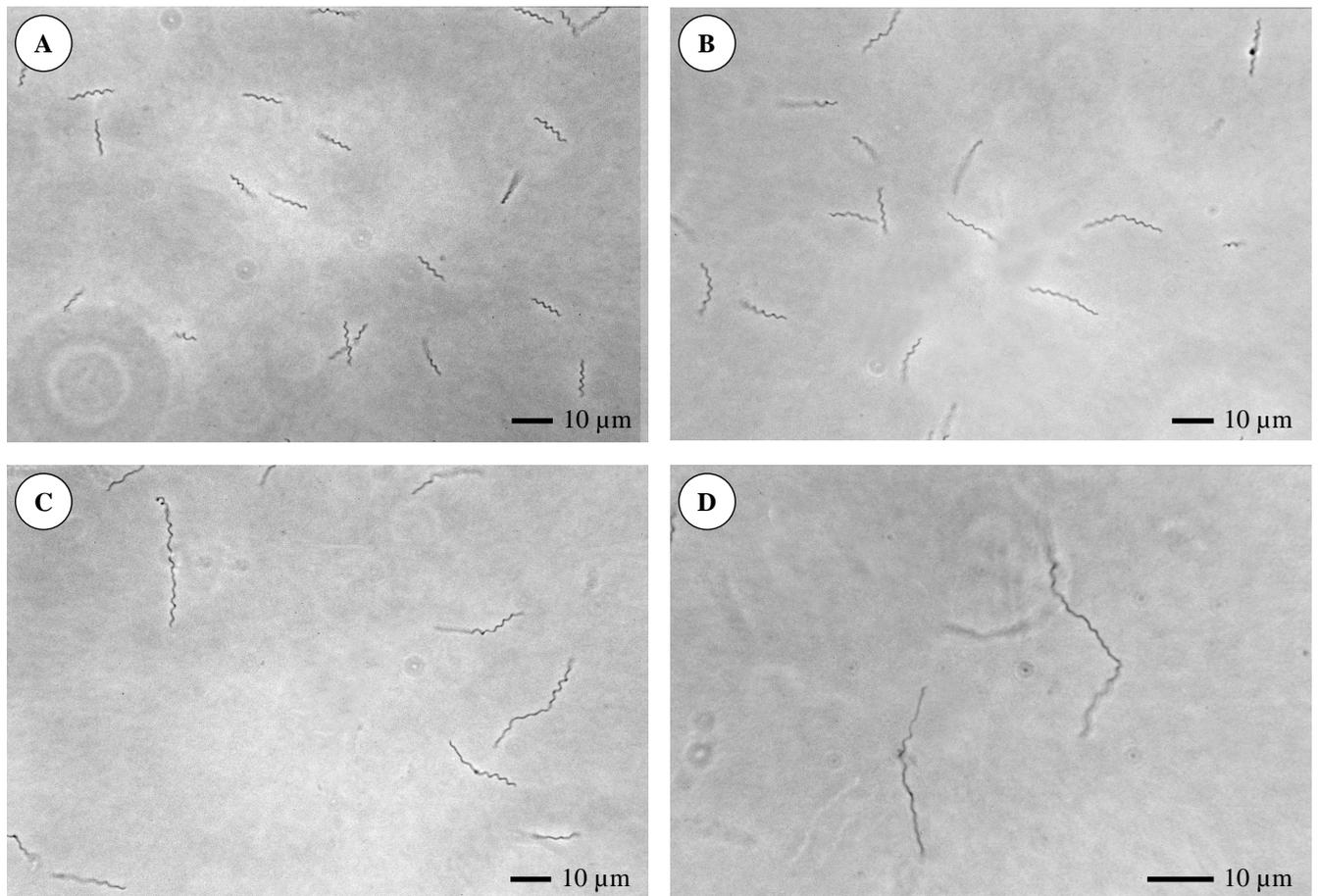
Tab. 4 Mittlere Dimensionen der verschiedenen Strukturen einer *B. afzelii* Zelle in der mittleren log-Phase unter Standard-Kulturbedingungen.

Aus den in der Tabelle angegebenen Mittelwerten können Oberfläche und Volumen einer Borrelienzelle errechnet werden, wenn man vereinfacht von einer zylinderförmigen Grundform für die gestreckte Borrelienzelle ausgeht. Die dazu nötige Gesamtlänge der gestreckten Borrelienzelle wurde mit Hilfe eines maßstabsgetreuen Modells rekonstruiert.

$$\text{Oberfläche (Zylinder): } 2r \pi (r + h) = 2 \times 0,13 \mu\text{m} \times 3,14 \times (0,13 \mu\text{m} + 35 \mu\text{m}) = 28,68 \mu\text{m}^2$$

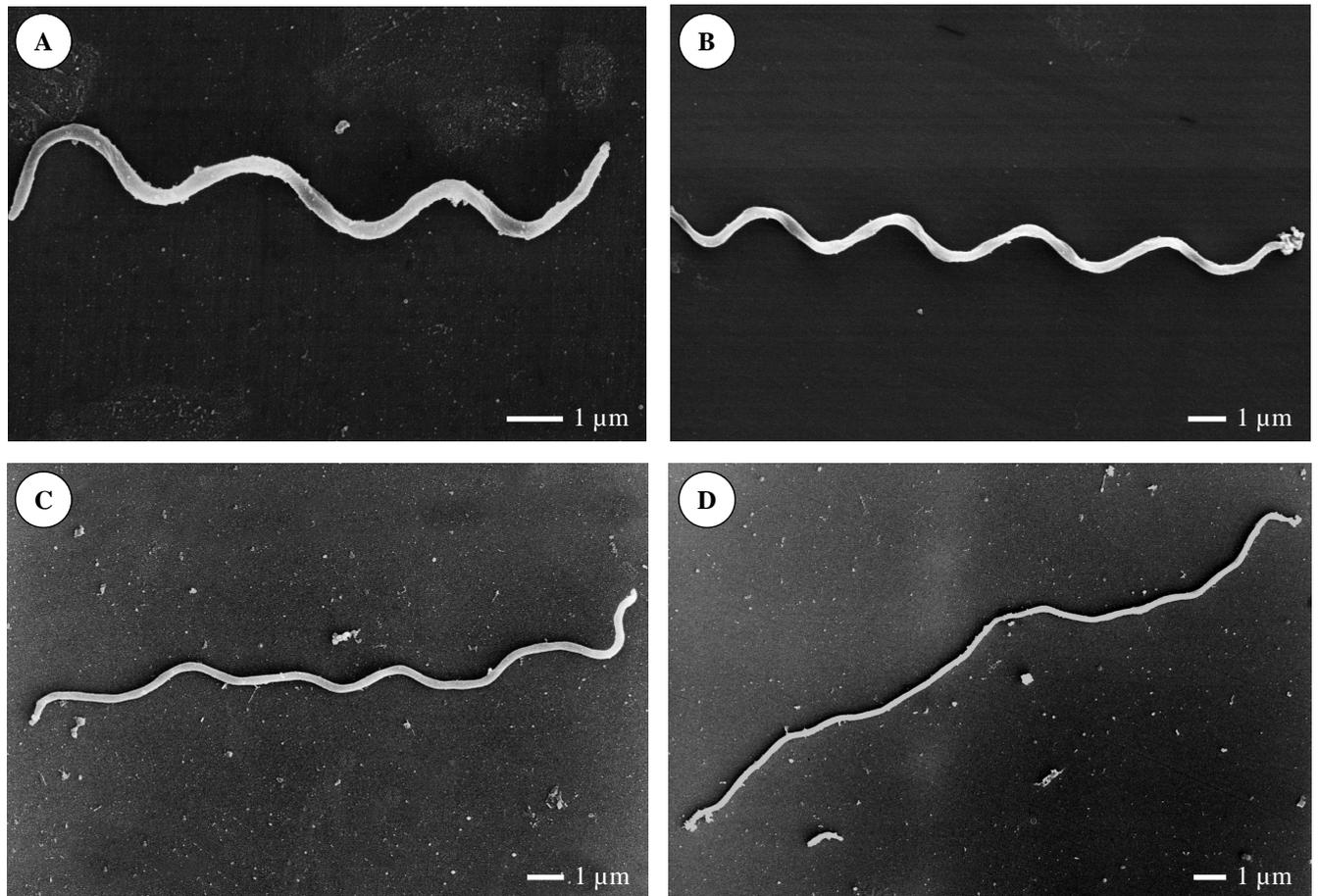
$$\text{Volumen (Zylinder): } r^2 \pi h = 0,13 \mu\text{m}^2 \times 3,14 \times 35 \mu\text{m} = 1,86 \mu\text{m}^3$$

Mit Hilfe der Mittelwerte der Strukturgrößen (**Tab. 4**) konnte erstmals ein detailliertes, maßstabsgetreues Modell einer *Borrelia afzelii* Zelle entwickelt werden (**Abb. 5**).

**Tafel 1**

Lichtmikroskopische Aufnahmen (Phasenkontrast) von *B. afzelii* aus verschiedenen Phasen der *in vitro*-Kultur.

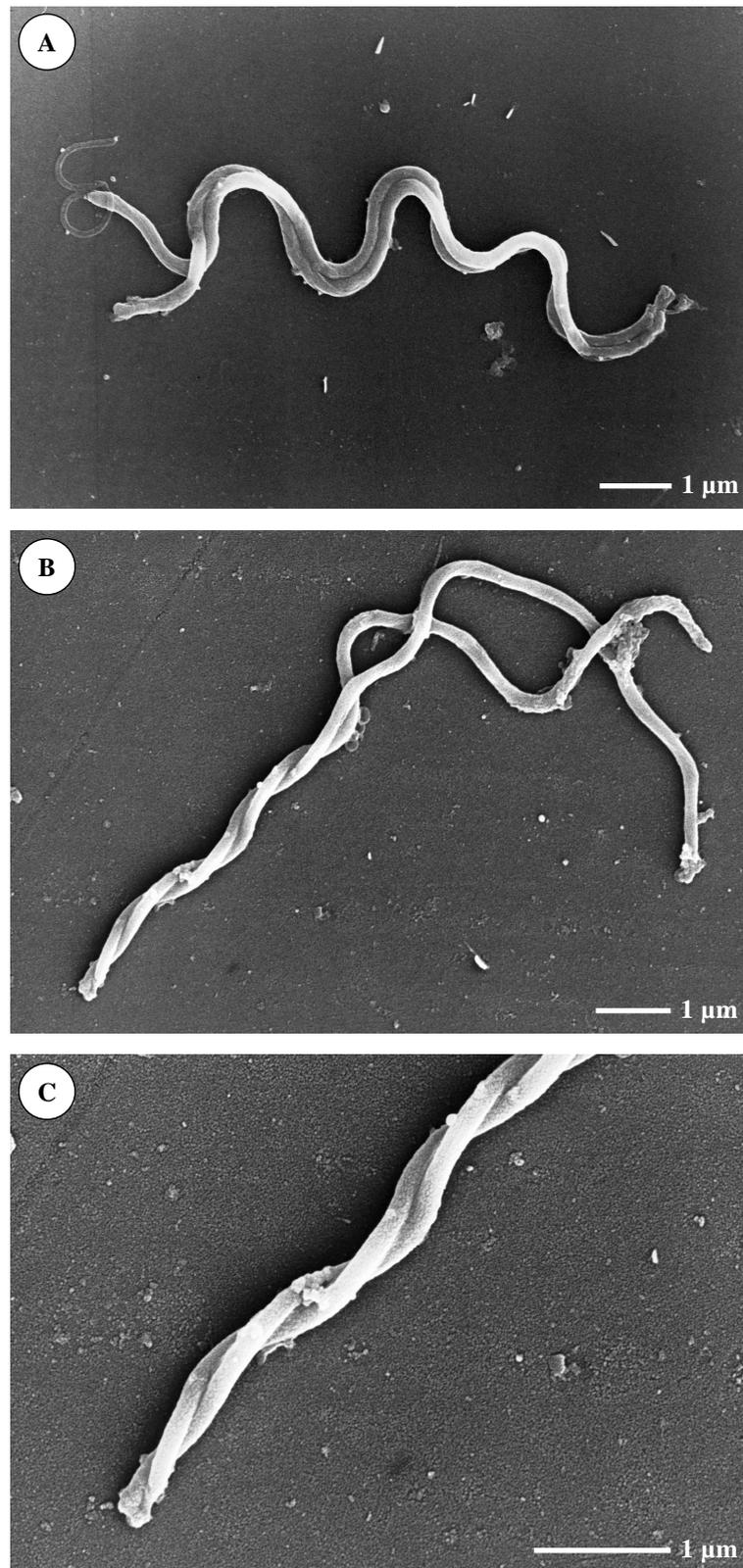
- A:** In der frühen log-Phase sind die Borrelienzellen etwa 10 µm lang; die gleichmäßigen Windungen sind deutlich zu erkennen;
- B:** In einer Borrelienkultur aus der mittleren log-Phase sind die Zellen länger als 10 µm;
- C:** Die Windungen der Borrelienzellen aus der späten log-Phase sind deutlich abgeflacht und unregelmäßig;
- D:** Während der stationären Phase haben mehrere Borrelienzellen ihre Schraubenform verloren.



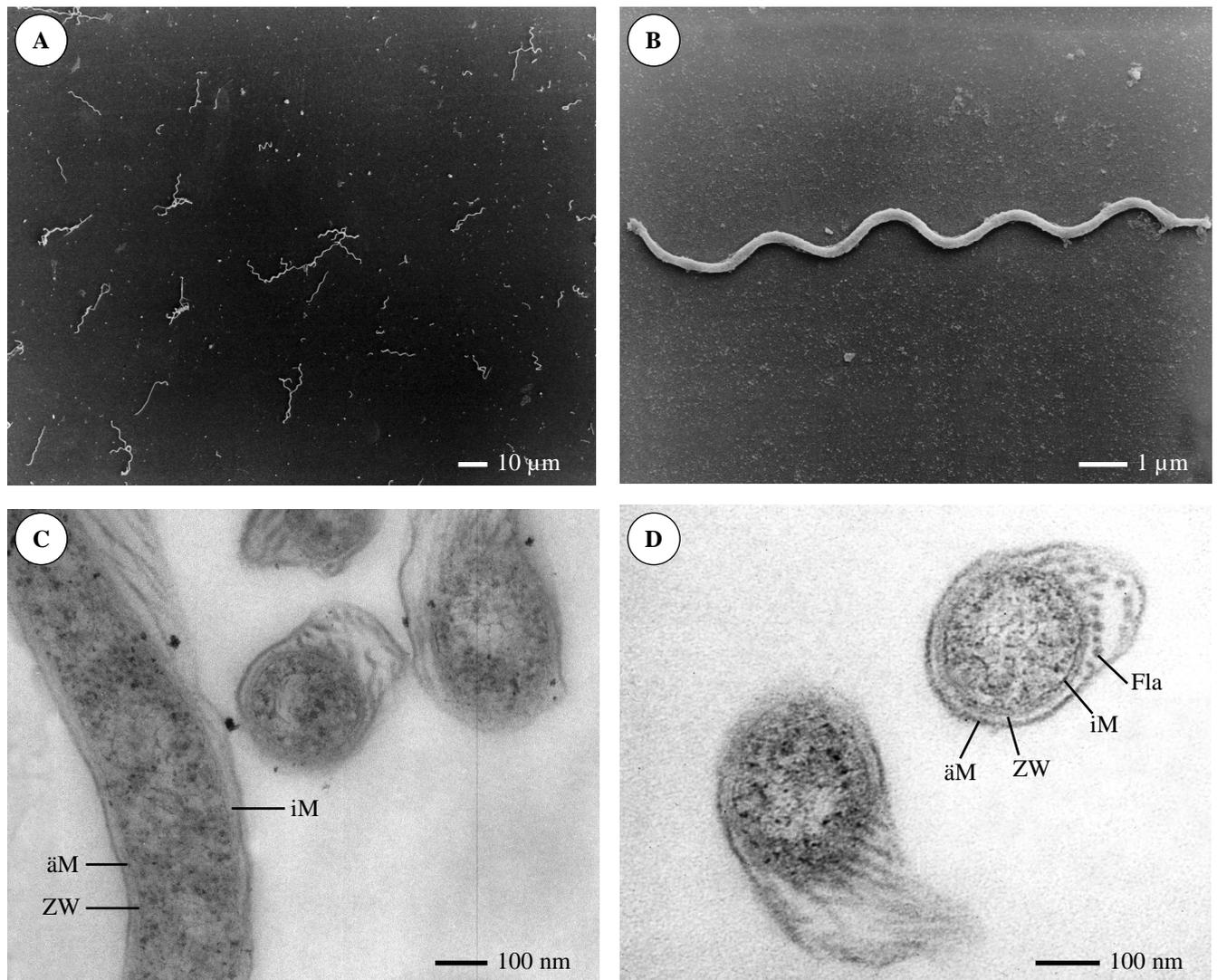
Tafel 2

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *B. afzelii* aus verschiedenen Phasen der *in vitro*-Kultur, nach Kryo-Präparation auf OT.

- A: In der frühen log-Phase ist die Borrelienzelle 10 µm lang und besitzt eine typische Schraubengestalt mit 3–4 Windungen;
- B: Die Borrelienzelle aus der mittleren log-Phase ist mit 16 µm deutlich länger und besitzt 5 Windungen;
- C: Die Windungen der Borrelienzelle aus der späten log-Phase sind stark abgeflacht und unregelmäßig;
- D: Die Borrelienzelle aus der stationären Phase ist gestreckt und hat die typische Schraubengestalt verloren.

**Tafel 3**

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *B. afzelii* Stamm PKo aus der log-Phase der Kultur. **A:** Zwei Borrelienzellen liegen fast völlig parallel nebeneinander; sie scheinen an einem Zellende miteinander verbunden zu sein; **B–C:** Zwei Borrelienzellen sind zur Hälfte umschlungen; bei höherer Vergrößerung ist zu erkennen, daß die beiden Borrelien an dem ineinandergeschlungenen Zellende miteinander verbunden sind; **B:** Übersicht; **C:** Detail aus B;



Tafel 4

A–B: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *Borrelia afzelii* Stamm PKo aus der log-Phase der Kultur nach Kryo-Präparation auf OT. Die Borrelienzellen zeigen eine schraubenförmige Gestalt mit 4–7 Windungen; diese besitzen innerhalb einer Zelle einen einheitlichen Durchmesser und eine einheitliche Ganghöhe; an beiden Zellenden ist eine leichte Verjüngung des Zelldurchmessers zu erkennen.

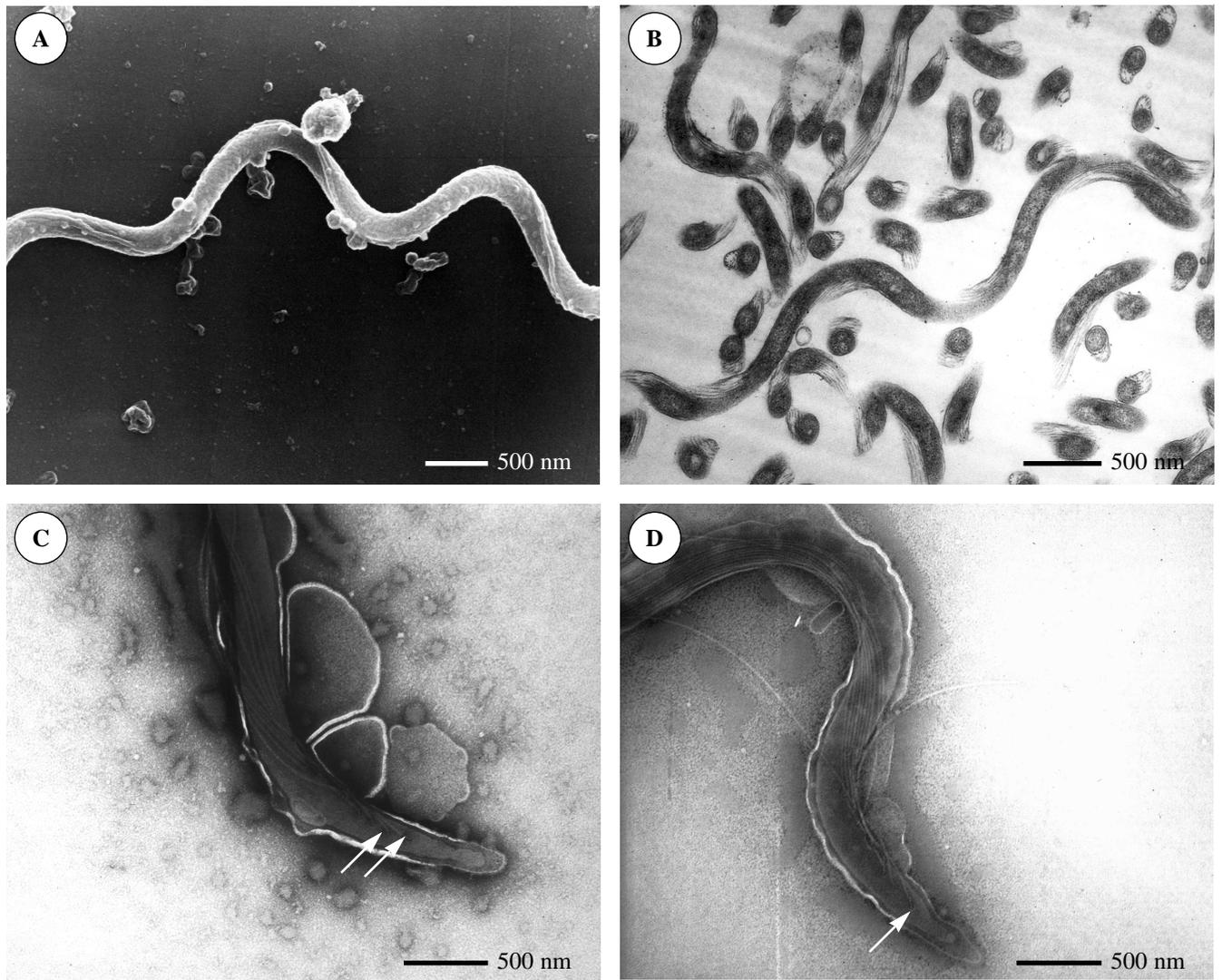
A: Übersicht;

B: Einzelzelle;

C–D: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von *B. afzelii* Stamm PKo aus der log-Phase der Kultur;

C: Ein kleiner Bereich einer Borrelienzelle ist längs geschnitten. Äußere Membran (äM), Zellwand (ZW) und innere Membran (iM) sind deutlich zu unterscheiden;

D: Am Querschnitt durch die Borrelienzelle sind deutlich die einzelnen Zellstrukturen zu erkennen. Der Protoplasmazyylinder wird von der inneren Membran (iM) und der Zellwand (ZW) begrenzt. Die äußere Membran (äM) umschließt den periplasmatischen Raum, in dem mehrere Endoflagellen (Fla) deutlich zu erkennen sind.

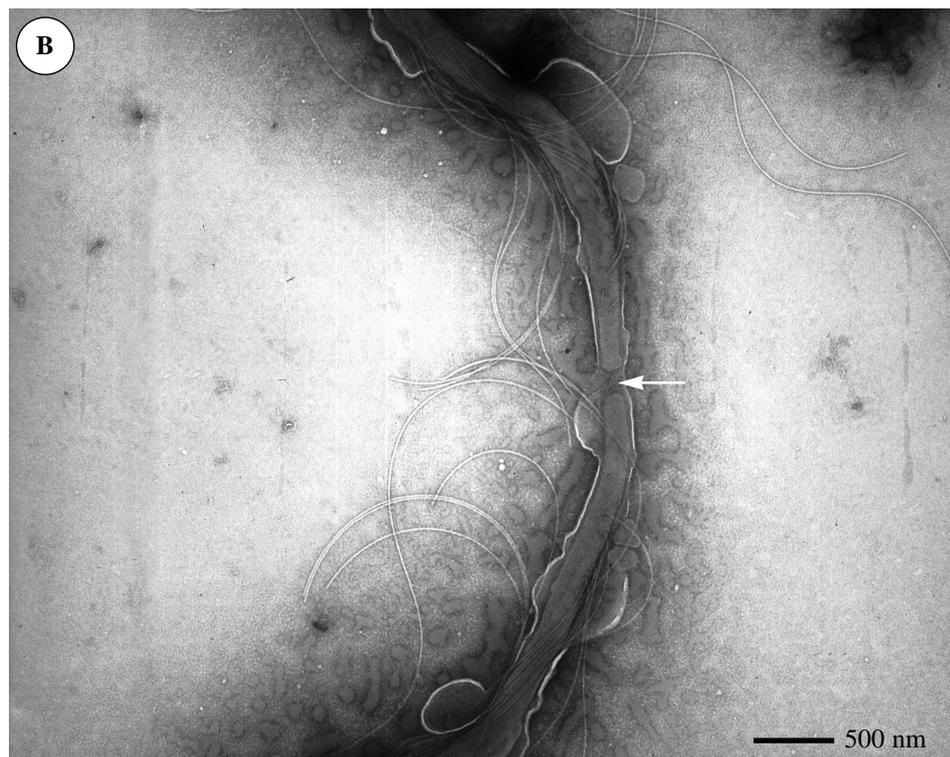
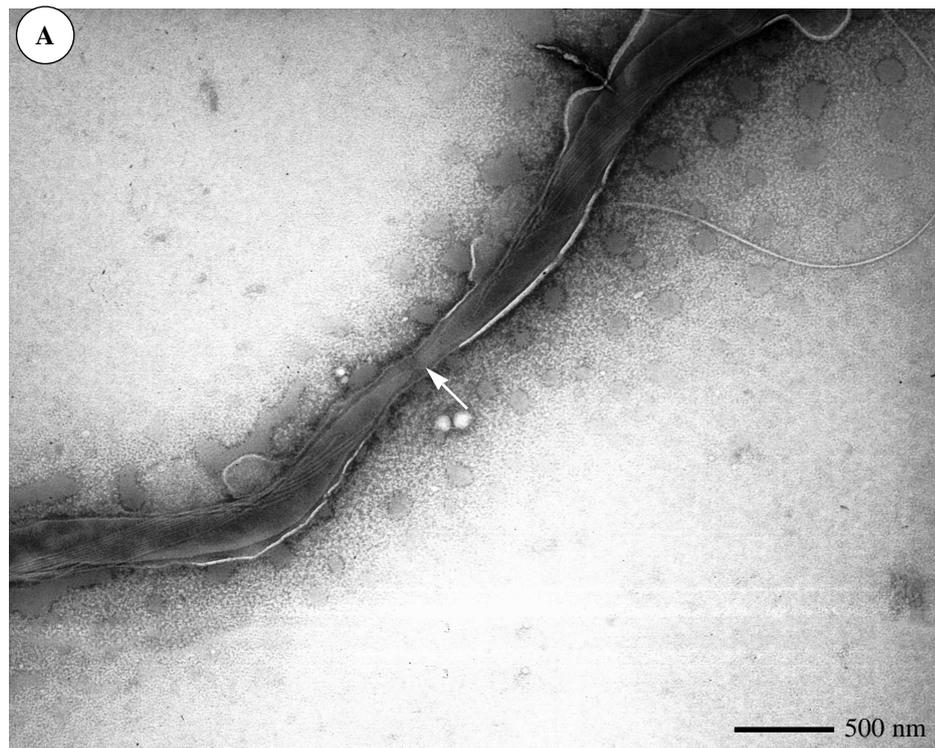


Tafel 5

- A:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Borrelienzelle; die Lage des Flagellenbündels ist an Hand der Aufwölbung der äußeren Membran deutlich zu erkennen; sie windet sich schraubenförmig um die Borrelienzelle;
- B:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer Borrelienzelle; zwei Windungen einer Borrelienzelle sind längs geschnitten; die Lage der Flagellen ist an mehreren Stellen deutlich zu erkennen;
- C–D:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der Enden der Borrelienzellen (Negativkontrast); die Ansatzstellen der Flagellen liegen in der Längsachse der Borrelienzelle angeordnet (Pfeile).

**Tafel 6**

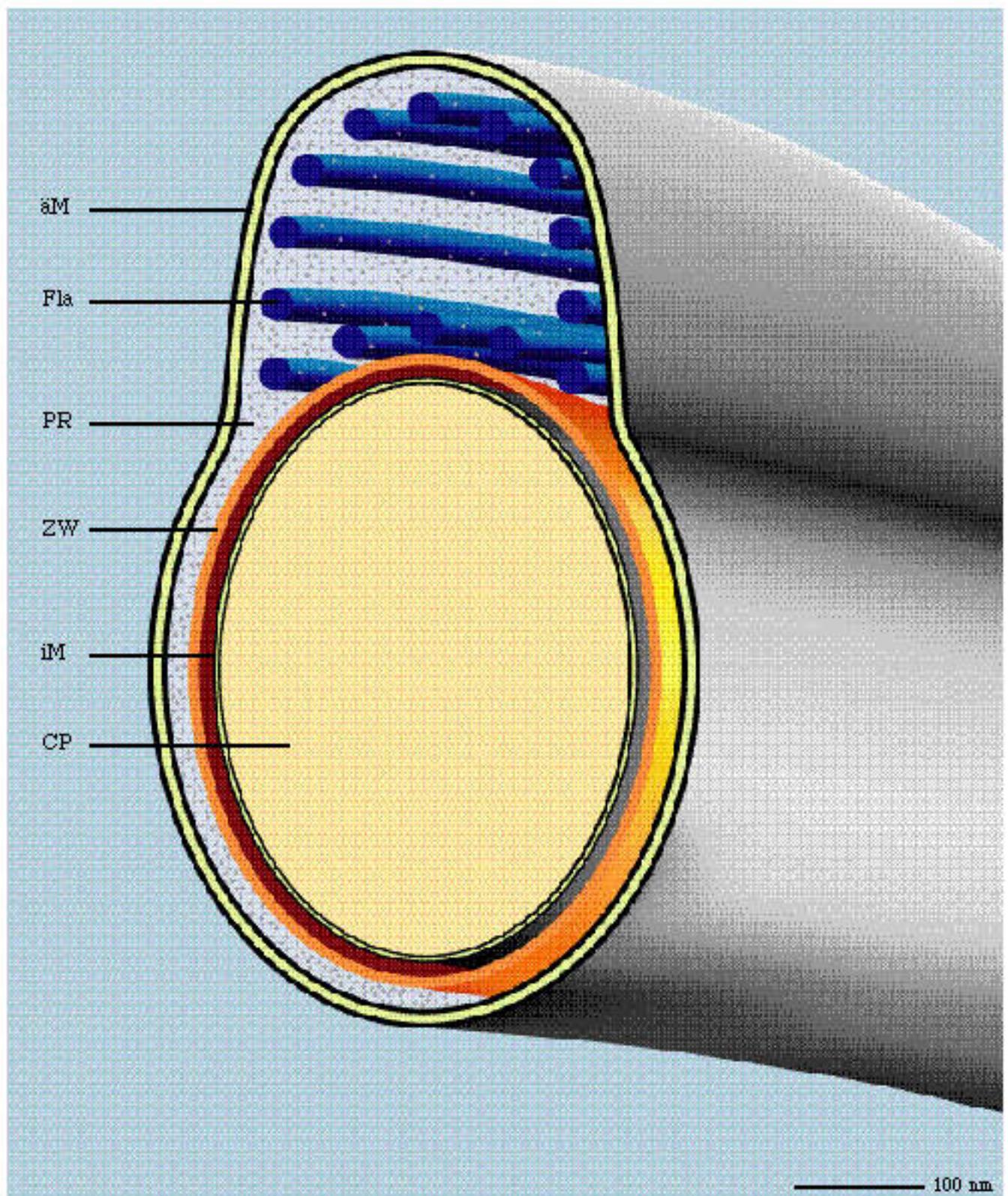
Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer Borrelienzelle (Negativkontrast). An beiden Zellenden sind die Ansatzstellen der Flagellen zu erkennen. Das Flagellenbündel erstreckt sich über die gesamte Zelle.

**Tafel 7**

Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von *B. afzelii* Stamm PKo (Negativkontrast); Zwei Borrelienzellen stoßen innerhalb einer gemeinsamen äußeren Membran mit den Enden des Protoplasmazyinders aneinander (Teilungsstadium). An beiden Zellenden sind Ansatzstellen für Flagellen zu erkennen.

A: Die spitzen Enden des Protoplasmazyinders berühren sich fast (Pfeil);

B: Beide Enden des Protoplasmazyinders sind abgerundet und deutlich voneinander entfernt (Pfeil).

**Abb. 5**

Maßstabgetreue Rekonstruktion einer Zelle von *E. coli*.

äM: äußere Membran; CP: Cytoplasma; Fla: Endoflagellen; iM: innere Membran;
PR: Periplasmatischer Raum; ZW: Zellwand.

IV.3 Untersuchung des Einflusses von Hypotonie auf die Ultrastruktur der Borrelienzelle

Werden Borrelien durch Waschen mit 50 mM Puffer einem hypotonen Schock ausgesetzt, so verändert sich die Form einiger Zellen auffallend. Ein Bereich der schraubenförmigen Borrelienzelle bläht sich kugelig auf, während die übrigen Regionen unverändert bleiben (**Tafel 9 A, B**). Diese Veränderung kann entweder an einem der Zellenden, oder auch in der Mitte der Borrelienzelle auftreten. Durch Inkubation in *Aqua dest.* bilden nahezu alle Borrelien bereits nach 5 min kugelige Formvarianten. Nach 20 min sind im LM keine schraubenförmigen Borrelien mehr zu beobachten. Die kugelförmigen Aufweitungen sind abhängig von der Stärke der Hypotonie und nach der Inkubation in *Aqua dest.* größer als die durch hypotonen Puffer (50 mM) verursachten Veränderungen. Ferner ist dabei meist die gesamte Borrelienzelle betroffen (**Tafel 9 C-F**). Diese Formvarianten werden im folgenden als kokkoide Morphotypen bezeichnet. Durch die Behandlung mit *Aqua dest.* ist es möglich, alle Borrelienzellen einer Kultur auf reproduzierbare Weise in kokkoide Morphotypen umzuwandeln. Daher ermöglicht diese Methode eine detaillierte und umfassende Untersuchung dieser Strukturvarianten.

In ersten Versuchen wurde überprüft, ob es sich bei den entstandenen kokkoiden Morphotypen um lebende Borrelienzellen handelt. Dadurch sollte ausgeschlossen werden, daß es sich bei diesen Formvarianten um Degenerationsformen handelt, die beim Absterben der Borrelien durch die für sie ungeeigneten Bedingungen entstehen. Zunächst wurde überprüft, ob die kokkoiden Morphotypen DNA enthalten. Hierfür wurde eine Färbung mit DAPI durchgeführt. Diese Färbung zeigt deutlich, daß die entstandenen Formvarianten weiterhin DNA enthalten (**Tafel 8 A, B**).

Außerdem wurde eine Vitalfärbung mit Syto9 und Propidiumjodid (Bacterial Viability Kit) durchgeführt. Syto9 färbt alle Bakterien einer Population an, wodurch sie bei einer Anregung mit Licht der Wellenlänge 450–490 nm grün fluoreszieren. Propidiumjodid hingegen kann nur in tote Bakterienzellen mit beschädigter Membran eindringen. Bei einer Anregungswellenlänge von 564 nm zeigen tote Bakterien eine rote Fluoreszenz. Werden die beiden Fluoreszenzfarbstoffe gemeinsam eingesetzt, so lassen sich lebende und tote Bakterien im Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung beider Anregungswellenlängen deutlich unterscheiden, da die rote Fluoreszenz wesentlich intensiver ist und so bei toten Bakterien die grüne Fluoreszenz überlagert. Die Überprüfung der Vitalfärbung an lebenden, sich bewegendenden Borrelien und solchen die durch Hitze (80°C) abgetötet wurden ergab, daß dieser Test für Borrelien geeignet ist. Wendet man die

Vitalfärbung bei kokkoiden Morphotypen an, so zeigen diese eine grüne Fluoreszenz. Daran kann man erkennen, daß es sich hierbei um lebende Formvarianten der schraubenförmigen Borrelienzellen handelt (**Tafel 8 C, D**).

Nach verschiedenen Inkubationszeiten in *Aqua dest.* (10 min, 20 min, 2 Std.) wurden die kokkoiden Morphotypen wieder in MKP-Medium übertragen, um deren Kultivierbarkeit zu testen. Die lichtmikroskopische Kontrolle der Kultur zeigt, daß die kokkoiden Morphotypen in dieser Form nicht weiter kultivierbar sind. Bereits nach 2 Tagen sind neben den kokkoiden Formen einzelne schraubenförmige Borrelienzellen zu beobachten. Nach 4 Tagen Kulturdauer sind im LM keine kokkoiden Morphotypen mehr zu erkennen. Die Kultur besteht nur noch aus schraubenförmigen, sich bewegenden Borrelien. In der parallel durchgeführten Kultur des Filtrats, sind auch nach 4 Wochen Kulturdauer keine Borrelien zu beobachten. Dies zeigt, daß zwischen den kokkoiden Morphotypen keine lebenden schraubenförmigen Borrelien vorhanden sind (vergl. III.8. S. 31).

Anschließend wurde der ultrastrukturelle Aufbau der kokkoiden Morphotypen detailliert untersucht. Sie haben eine annähernd kugelförmige Gestalt, wobei schraubenförmige Enden der Borrelienzellen aus dem kugeligen Teil der kokkoiden Morphotypen herausragen können (**Tafel 9 C-F**). Die Oberfläche der kugelförmigen Anschwellung ist sehr unregelmäßig strukturiert und stark gefaltet. Außerdem sind im REM bei den meisten kokkoiden Morphotypen schraubenförmig verlaufende Aufwölbungen der äußeren Membran mit 2–4 Windungen zu erkennen (**Tafel 9 F**). An Ultradünnschnitten durch diese Strukturvarianten ist zu erkennen, daß die Windungen des Protoplasmazyinders in einem Abstand von nur 8 nm unter der äußeren Membran liegt (**Tafel 10**). Dadurch wölbt der Protoplasmazyylinder die äußere Membran nach außen vor, wodurch die im REM beobachteten schraubenförmig verlaufenden Aufwölbungen verursacht werden. Der Querschnitt zeigt, daß die einzelnen Windungen des Protoplasmazyinders mit einem Abstand von 100–200 nm dicht nebeneinander liegen (**Tafel 10 B-D**). Die Endoflagellen sind meist mit dem Protoplasmazyylinder assoziiert. Sie liegen dem Inneren der kokkoiden Struktur zugewandt, d.h. auf der von der äußeren Membran abgewandten Seite des Protoplasmazyinders. Die für die schraubenförmige Borrelienzelle typische Anordnung der Flagellen in zwei Reihen ist hier nicht zu beobachten (**Tafel 10 C, D**). Außerdem sind meist nur 7–10 Flagellen mit dem Protoplasmazyylinder assoziiert. Die Ultradünnschnitte durch die kokkoiden Morphotypen zeigen, daß der zentrale Bereich dieser Strukturen, mit einem maximalen Durchmesser von 1,4 µm, weitgehend frei von kontrastreichem Material ist. Im Gegensatz dazu

ist mit Hilfe der Tanaka-Bruch-Technik im REM deutlich zu erkennen, daß der zentrale Hohlraum der kokkoiden Morphotypen zum Teil dicht mit granulärem Material gefüllt ist (**Tafel 11; 12**). Außerdem kann man beobachten, daß einzelne Flagellen frei im Inneren der kokkoiden Morphotypen liegen und die Assoziation mit dem Protoplasmazyylinder verloren haben (**Tafel 11 C**). An Ultradünnschnitten sind neben den kokkoiden Morphotypen häufig kleine membranumschlossene Vesikel zu erkennen, die im Inneren kein kontrastiertes Material enthalten (**Tafel 10 B, D**). Auch im REM sind zwischen den kokkoiden Morphotypen kleine kugelförmige Strukturen zu beobachten (**Tafel 11 B**).

Die genaue dreidimensionale Rekonstruktion der kokkoiden Morphotypen war nur mit Hilfe von Serienultradünnschnitten möglich. Um sicher die gesamte Struktur zu erfassen, wurde ein Schnittband mit 30 Ultradünnschnitten von 60 nm Schnittdicke angefertigt. Die Rekonstruktion des Aufbaus der kokkoiden Morphotypen anhand der Serienultradünnschnitte zeigt, daß die äußere Membran die kokkoiden Morphotypen lückenlos umschließt. Außerdem kann man erkennen, daß sowohl die Zellwand als auch der Protoplasmazyylinder intakt sind. Der aufgerollte Protoplasmazyylinder läßt sich sogar kontinuierlich durch die gesamte Struktur hindurch verfolgen (**Tafel 13**).

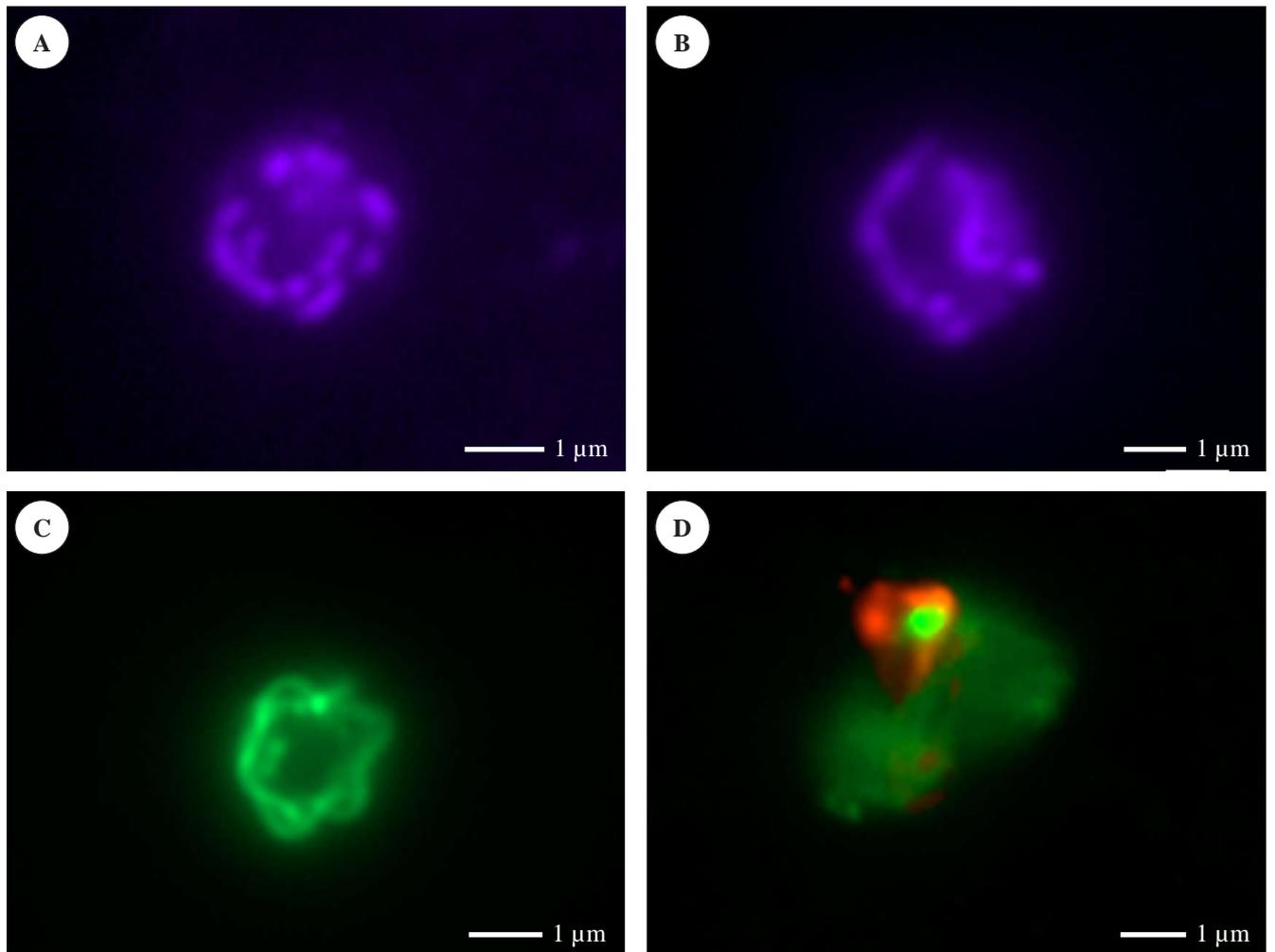
Für die Größe der einzelnen Strukturen der kokkoiden Morphotypen ergaben sich im Mittel folgende Werte (**Tab. 5**).

Struktur	Dimension
Dicke der äußeren Membran	6 nm
Abstand zwischen äußerer Membran und ZW	8 nm
Dicke der Zellwand (ZW)	6 nm
Abstand zwischen ZW und innerer Membran	5 nm
Dicke der inneren Membran	4 nm
Durchmesser des Protoplasmazyinders	184 nm
Flagellendurchmesser	12 nm
Abstand der Windungen zueinander	100–200 nm
Durchmesser des „Hohlraums“	1,4 µm
Gesamtdurchmesser	1,4–1,8 µm

Tab. 5 Mittlere Dimensionen der verschiedenen Strukturen eines kokkoiden Morphotypen von *B. afzelii* nach Behandlung mit *Aqua dest.*

Oberfläche und Volumen der kokkoiden Morphotypen lassen sich, im Gegensatz zu den schraubenförmigen Borrelienzellen, nicht genau berechnen, da die Oberfläche dieser Strukturen unregelmäßig gefaltet ist.

Durch die Rekonstruktion eines kokkoiden Morphotypen mit Hilfe der Serienultradünnschnitte im Vergleich mit den Ergebnissen der raster- und transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen ist es erstmals möglich ein detailliertes, maßstabsgetreues Modell der durch *Aqua dest.* erzeugten kokkoiden Morphotypen von *B. afzelii* zu entwickeln (**Abb. 6**).

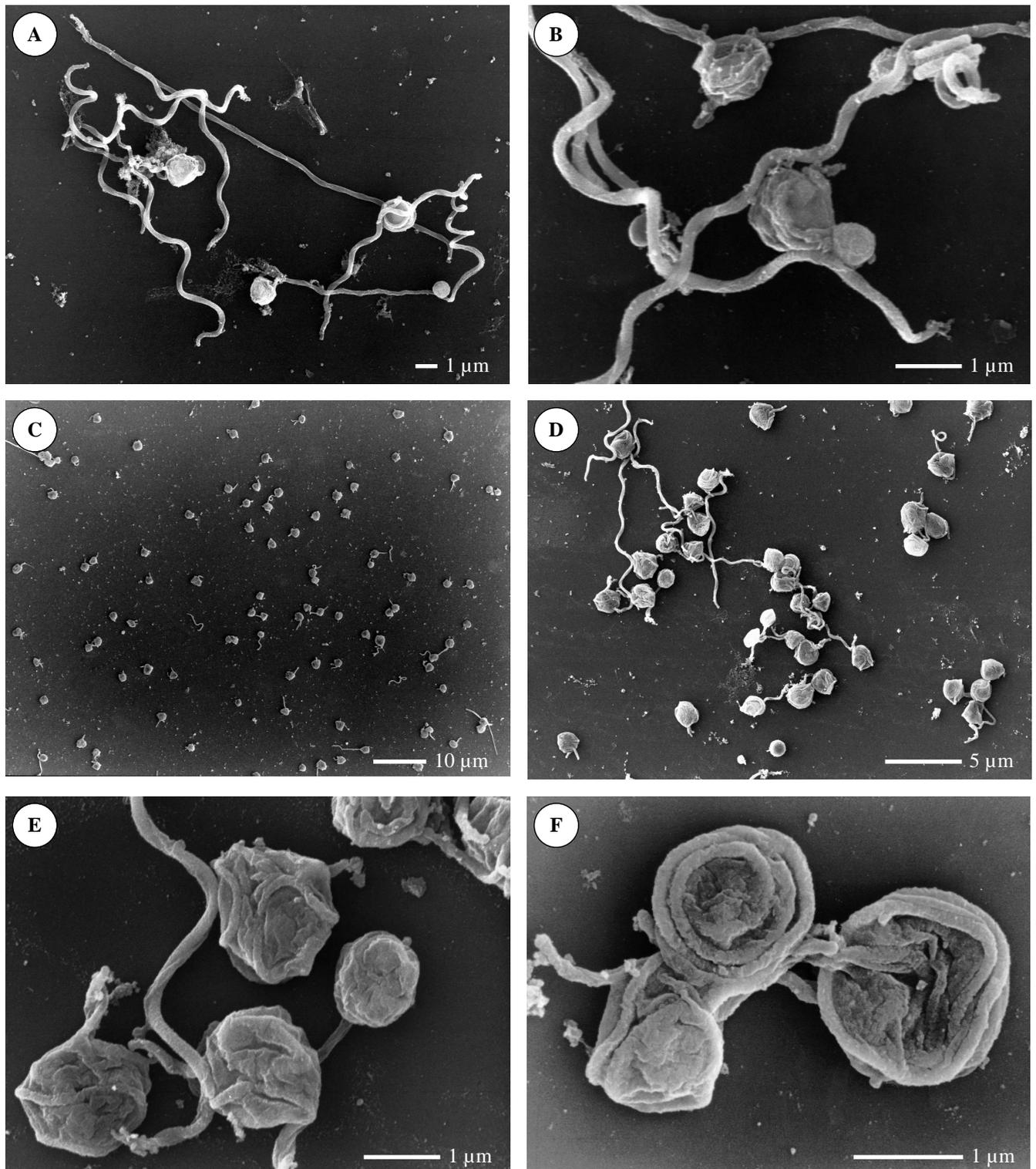


Tafel 8

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der durch *Aqua dest.* erzeugten kokkoiden Morphotypen von *B. afzelii* Stamm PKo.

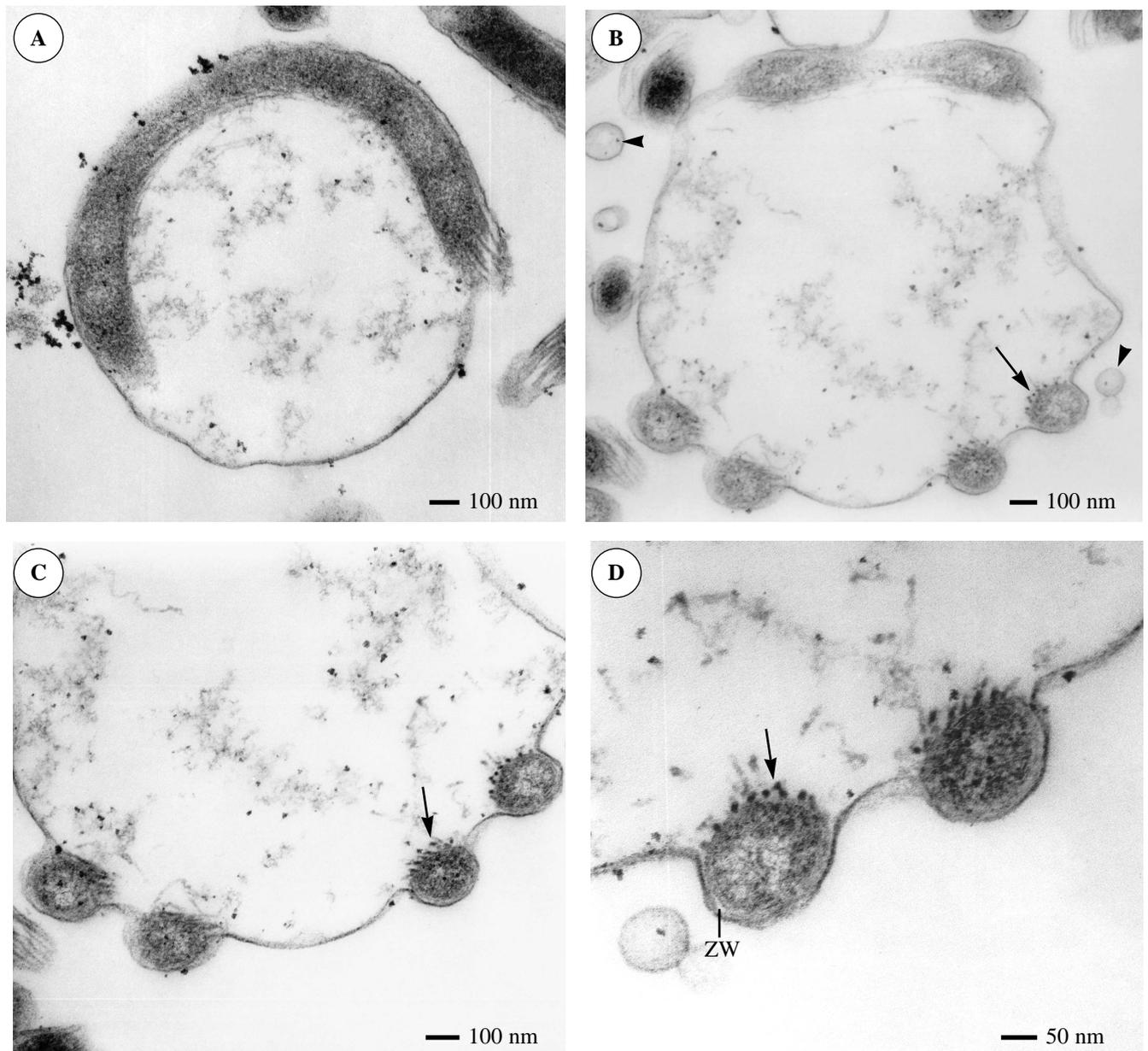
A–B: Färbung mit DAPI; es ist deutlich zu erkennen, daß die kokkoiden Morphotypen im Bereich des Protoplasmazylinders DNA enthalten;

C–D: Färbung mit dem *Live/Death-Stain* (Molecular Probes); Die grüne Fluoreszenz zeigt, daß es sich um lebende Strukturen handelt. Die rote Färbung zeigt ein beginnendes Absterben eines kokkoiden Morphotypen an.



Tafel 9

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen durch Hypotonie erzeugter kokkoider Morphotypen von *B. afzelii* Stamm PKo. **A–B:** Durch die Behandlung mit 50 mM Cacodylatpuffer ist ein Bereich der Borrelienzelle kugelförmig angeschwollen; **C–F:** Durch die Inkubation in *Aqua dest.* haben nahezu alle Borrelienzellen eine kugelförmige Gestalt angenommen; **C:** Übersicht. Es sind nur vereinzelt schraubenförmige Borrelienzellen zu finden; **D:** Von der Formveränderung ist nahezu die gesamte Borrelienzelle betroffen; **E:** Es ist deutlich zu erkennen, daß die Oberfläche der kokkoiden Morphotypen stark gefaltet ist; **F:** Unter der äußeren Membran zeichnen sich mehrere Windungen des Protoplasmazyllinders ab.



Tafel 10

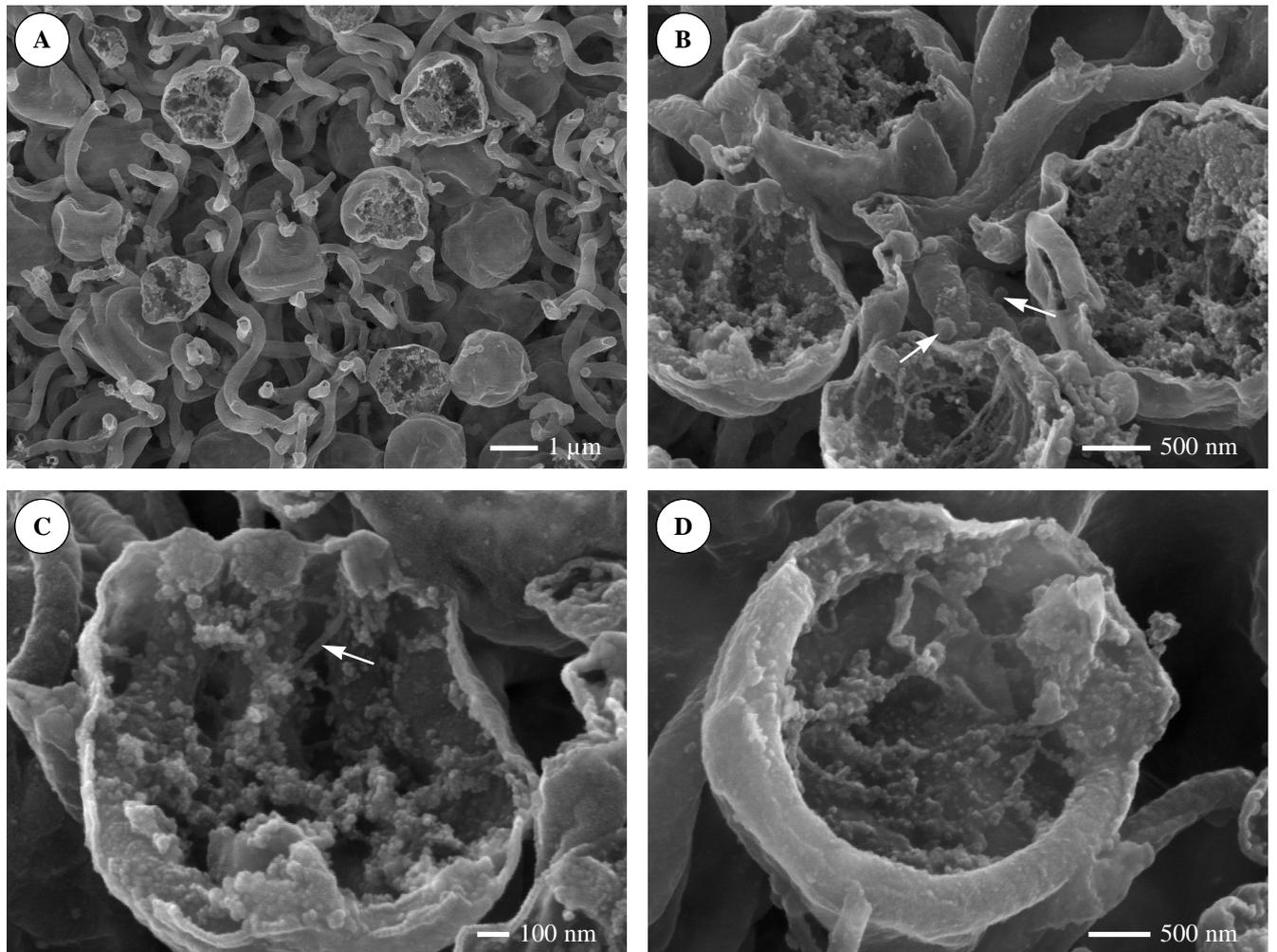
Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der kokkoiden Morphotypen von *B. afzelii* Stamm PKo. Direkt unter der äußeren Membran ist der Protoplasmazyylinder zu erkennen. In diesem Bereich wölbt sich die äußere Membran nach außen hin auf. Die Flagellen liegen dicht am Protoplasmazyylinder dem Inneren den kokkoiden Morphotypen zugewandt (Pfeile). Abgesehen davon ist der Innenraum weitgehend frei von kontrastreichem Material. Bei höherer Vergrößerung (D) ist die Zellwand (ZW) zu erkennen.

A–B: Übersicht;

A: Längsschnitt durch eine Windung des Protoplasmazyinders;

B: Der Protoplasmazyylinder ist quer geschnitten; neben dem kokkoiden Morphotypen sind kleine Vesikel zu erkennen (Pfeilspitzen);

C–D: Detail des Querschnitts durch einen kokkoiden Morphotypen.



Tafel 11

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Tanaka-Kryo-Brüchen der kokkoiden Morphotypen;

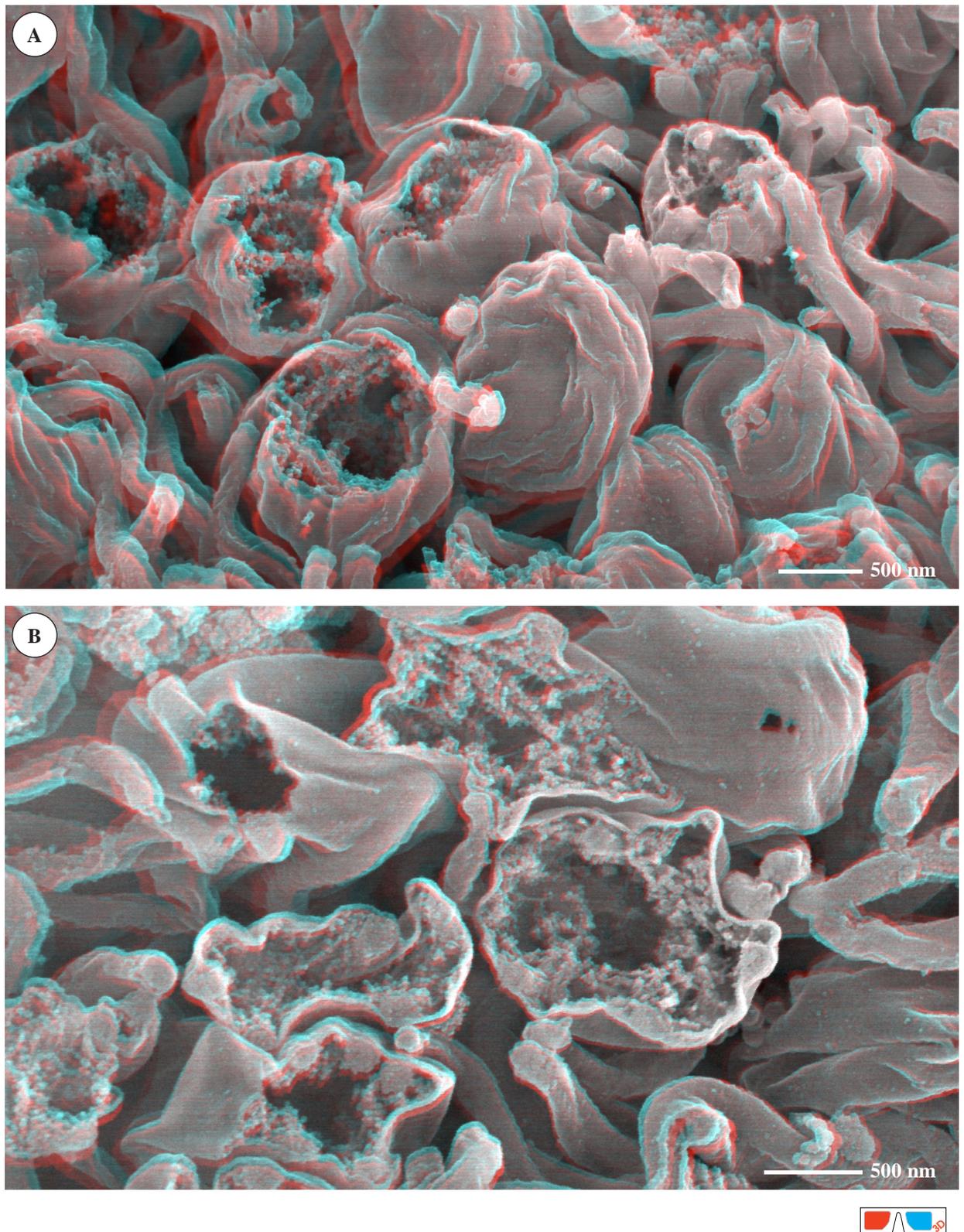
A: Übersicht;

B–D: Detail;

B: Der zentrale Bereich der kugelförmigen Struktur ist mit granulärem Material gefüllt; entlang des Protoplasmazyinders sind Flagellen zu erkennen; zwischen den kokkoiden Morphotypen befinden sich kleine Vesikel (Pfeile);

C: Im Randbereich ist der quergebrosene Protoplasmazyylinder zu erkennen; einzelne Flagellen liegen frei im entstandenen Hohlraum (Pfeil);

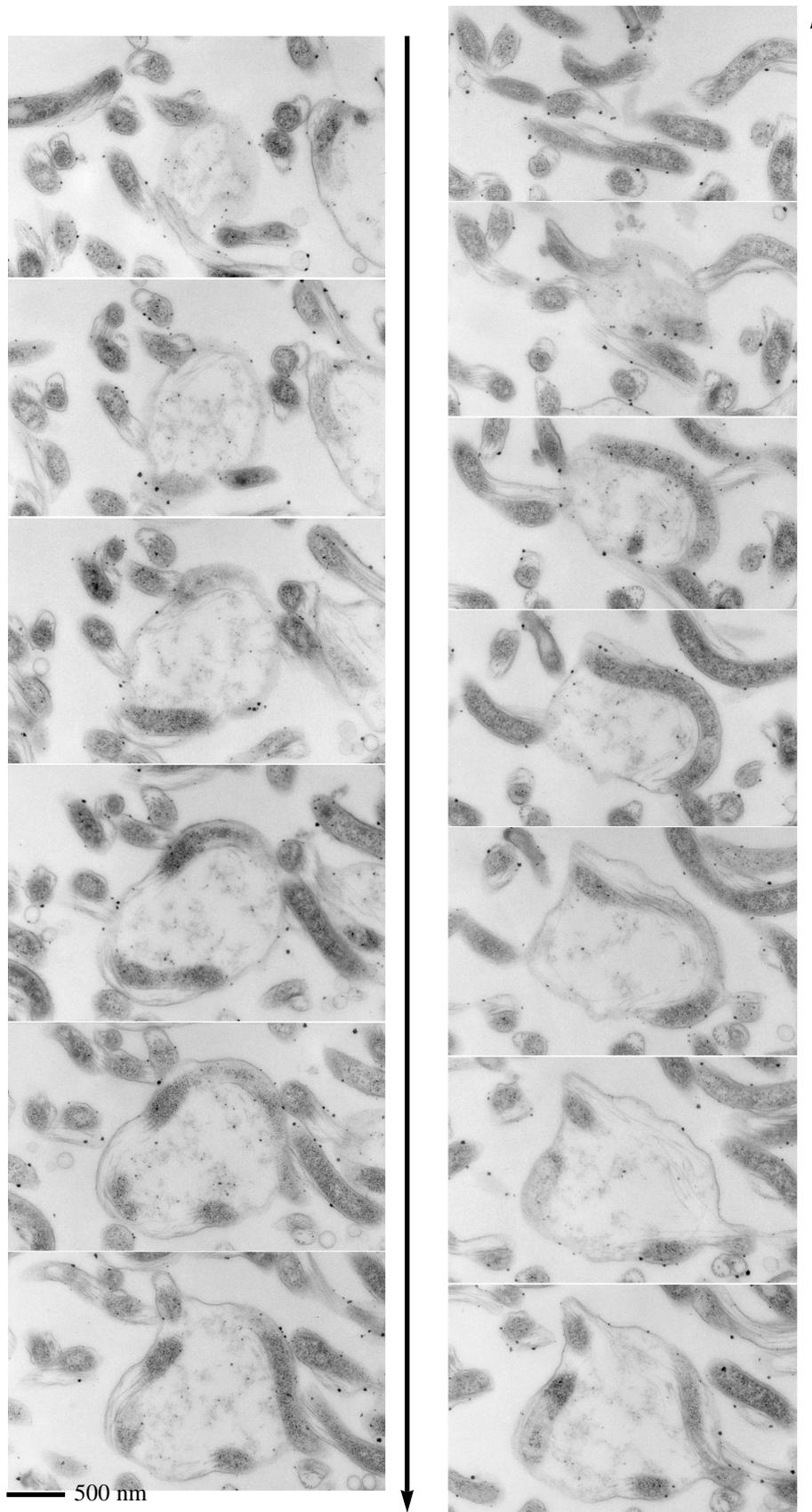
D: Unter der äußeren Membran ist eine Windung des Protoplasmazyinders zu sehen.

**Tafel 12**

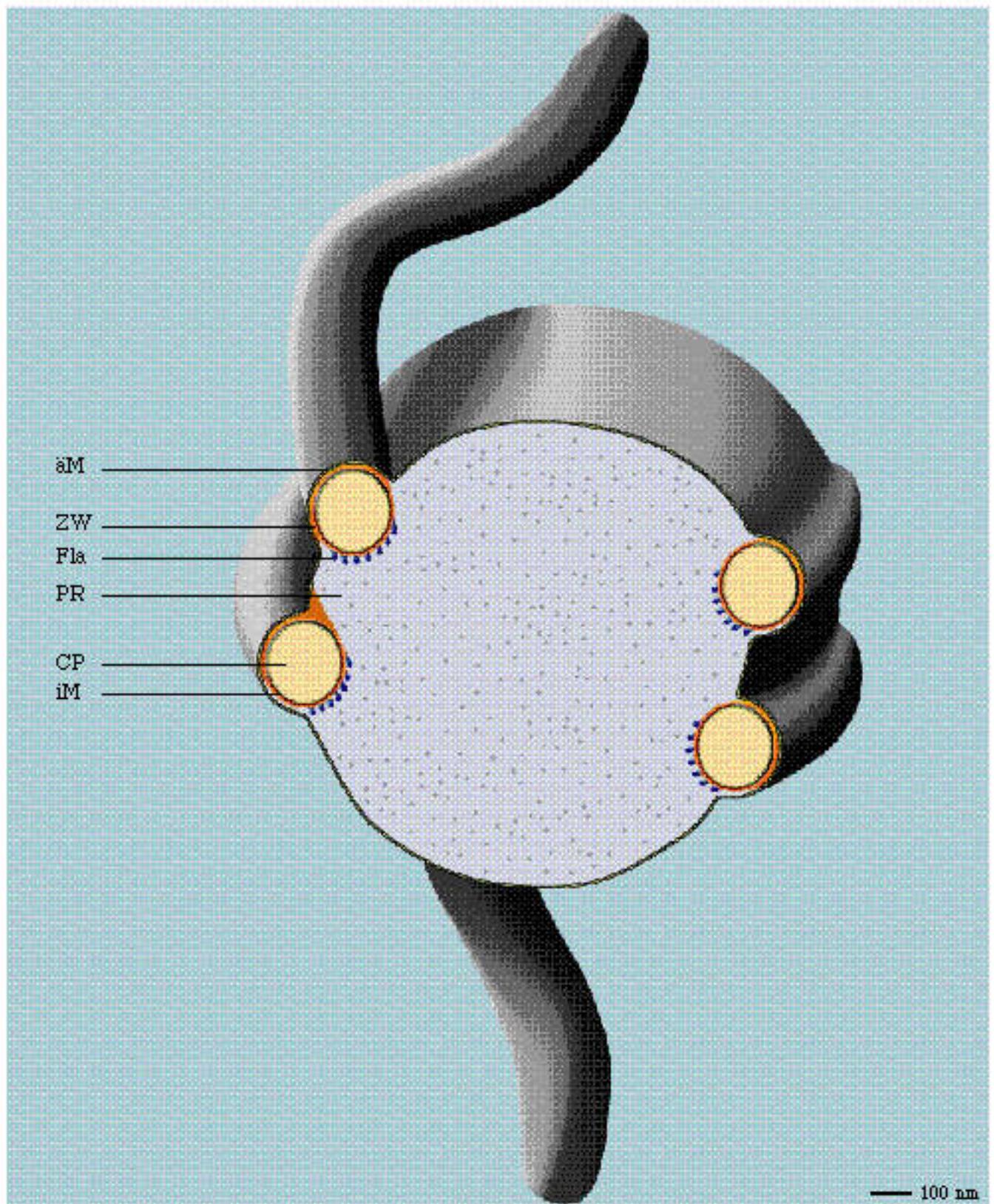
Rasterelektronenmikroskopische Stereoaufnahmen von Tanaka-Kryo-Brüchen der kokkoiden Morphotypen von *B. afzelii* Stamm PKo; im Randbereich der Strukturen ist deutlich der Protoplasmazyylinder zu erkennen (Betrachtung mit der rot-blau Brille; letzte Seite)

A: Übersicht;

B: Detail;

**Tafel 13**

Serie von aufeinanderfolgenden Ultradünnschnitten durch einen kokkoiden Morphotypen; der aufgerollte Protoplasmazyylinder lässt sich durch die gesamte Struktur hindurch beobachten. An allen Einzelschnitten ist die intakte äußere Membran deutlich zu erkennen.

**Abb. 6**

Maßstabgetreue Rekonstruktion eines kokkoiden Morphotypen von *E. coli*;
 äM: äußere Membran; CP: Cytoplasma; Fla: Endoflagellen; iM: innere Membran;
 PR: Periplasmatischer Raum; ZW: Zellwand.

IV.4 Subzelluläre Lokalisation immunologisch wichtiger Borrelienproteine

Zur Untersuchung der Lokalisation der verschiedenen immundominanten Proteine wurden Stämme ausgewählt, die das entsprechende Protein unter *in vitro* Bedingungen produzieren. Dies wurde in Vorversuchen mit Hilfe von Western-Blots getestet. Das Ergebnis des Western-Blots zeigt deutlich, daß *B. afzelii* Stamm PKo unter den Standardkulturbedingungen die Proteine p17, p35 und p58 exprimiert, die für diese Untersuchungen von Interesse sind (**Abb. 7**). Außerdem zeigen die Ergebnisse des Western-Blots zusätzlich, daß die ausgewählten MAK mit den Proteinen des verwendeten Stammes reagieren. Zur Kontrolle, ob die für die Immunmarkierungen verwendete Passage des *B. afzelii* Stammes PKo tatsächlich das zu lokalisierende Protein exprimiert, wurde vor der Immun-Gold-Markierung ein IFT durchgeführt. Dieser liefert zusätzlich erste Anhaltspunkte für die zu erwartende Lokalisation des Proteins.

IV.4.1 Optimierung der Immun-Gold-Markierung für REM

Anleitungen für Immun-Gold-Markierungen sind nur selten von einem Untersuchungsobjekt auf ein anderes übertragbar. Deshalb wurde zunächst ein für die Markierung von Borrelien geeignetes Verfahren entwickelt. Hierfür wurde der Strukturverlust der Borrelien beim Auffrieren auf OT vor und nach der Fixierung mit Glutaraldehyd verglichen. Des Weiteren wurde untersucht, ob auch nach einer Fixierung mit Glutaraldehyd eine Immun-Gold-Markierung durchgeführt werden kann. Eine mögliche Gefahr bei der Fixierung der Proben ist, daß das antigene Epitop dadurch so stark verändert wird, daß keine spezifische Reaktion mit dem MAK mehr erfolgt. Ebenso wurde das Markierungsergebnis bei Markierung fixierter Borrelien im Eppendorfgefäß und auf OT verglichen. Außerdem wurde getestet, in welcher Konzentration der Antikörper eingesetzt werden muß, um eine ausreichend starke und spezifische Markierung zu erhalten. Die Optimierung des Markierungsverfahrens wurde mit dem gegen das Protein p17 gerichteten MAK L17 G2 an *B. afzelii* Stamm PKo durchgeführt.

Es zeigt sich, daß das Protein p17 auch nach der Fixierung mit 2,5% Glutaraldehyd mit dem spezifischen MAK reagiert. Die Markierung der Borrelien auf OT ergibt für dieses Protein ein wesentlich stärkeres Markierungssignal als eine im Eppendorf-Gefäß durchgeführte Markierung (**Tafel 14 A, B**). Das Auffrieren unfixierter Borrelien auf OT führt zu einer Zerstörung der äußeren Membran und verändert dadurch auch die Lage verschiedener Zellstrukturen (**Tafel 14 C**).

Daher ist diese Methode nur dann für Immun-Gold-Markierungen geeignet, wenn die zu markierenden Strukturen auch nach dieser Behandlung noch zweifelsfrei zu erkennen und zuzuordnen sind. Ein Anwendungsbeispiel für diese Methode ist demnach die Markierung der Endflagellen, die erst durch die Zerstörung der äußeren Membran im REM sichtbar werden und trotzdem noch eindeutig zu erkennen sind (**Tafel 14 D**). Auf Grund dieser Ergebnisse wurde ein für die Immun-Gold-Markierung von Borrelien geeignetes Protokoll entwickelt (siehe III.10.10; S. 40). Dieses Standardprotokoll wurde im jeweils ersten Markierungsversuch auch für die Immun-Gold-Markierung aller anderen Proteine eingesetzt. Es wurde nur die Konzentration bzw. die Verdünnungen des jeweiligen MAK optimiert (**Tab. 6**). Erst wenn sich das Standardprotokoll für den Nachweis eines bestimmten Proteins als ungeeignet erwies, wurde es entsprechend variiert.

MAK	Spezifität	Eingesetzte Konzentration bzw. Verdünnung
L32 1G3	anti OspA; spezifisch für OspA Serotyp 4; für Negativkontrolle bei Serotyp 2	5 µg/ml
L17 G2	anti Osp17	8,5 µg/ml
L41 1C11*	anti Flagellin; breitreaktiv	1:500
L35 1F4*	anti p35	1:10
L58 L6*	anti p58	1:10

*Diese MAK konnten nicht gereinigt werden (siehe S. 44).

Tab. 6 Spezifität der für die Immunmarkierungen verwendeten MAK und die bei der Markierung eingesetzten Konzentrationen bzw. Verdünnungen.

IV.4.2 Einfluß der Gold-Kolloidgröße des Konjugats auf die Markierungsdichte

Für die Immun-Gold-Markierung stehen sek. AK zur Verfügung, die mit Goldkolloiden verschiedener Größe konjugiert sind. Der Einfluß der Größe des Goldkolloids auf die Markierungsdichte wurde anhand einer Markierung der Endflagellen untersucht. Dazu wurden ein sek. AK mit 12 nm Gold-Konjugat und ein sek. AK mit 6 nm Gold-Konjugat verwendet. Nach dem Auftauen der Borrelien auf den OT, ohne Vorfixierung mit Glutaraldehyd, sind die Endflagellen für eine Immun-Gold-Markierung für die Rasterelektronenmikroskopie zugänglich. Die Flagellen eignen sich besonders gut für eine Untersuchung möglicher Unterschiede im Markierungsverhalten, da hier durch die Verwendung des MAK L41 1C11 eine sehr hohe Markierungsdichte erreicht werden kann. Ein Unterschied in der Markierungsdichte bei der Verwendung

verschiedener Konjugate, wird deutlich sichtbar und kann direkt auf den Einfluß der Goldkolloidgröße zurückgeführt werden (**Tafel 15**). Es ist deutlich zu erkennen, daß die Markierungsdichte bei der Verwendung des sek. AK mit dem 6 nm Gold-Konjugat deutlich höher ist als dies bei der Verwendung des 12 nm Gold-Konjugats der Fall ist. Die Auszählung der Goldkolloide ergibt eine Erhöhung der Markierungsdichte um den Faktor 2,5 für das 6 nm Gold-Konjugat gegenüber dem 12 nm Gold-Konjugat (**Tab. 7**).

Goldkolloide 12 nm/1 µm Flagellenlänge	Goldkolloide 6 nm/1 µm Flagellenlänge
26 ± 3,2	67 ± 9,8

Tab. 7 Goldkolloide pro 1 µm Flagellenlänge bei der Verwendung von sek. AK mit 6 nm Gold-Konjugat bzw. mit 12 nm Gold-Konjugat.

Die Markierung mit dem 6 nm Gold-Konjugat bringt jedoch einen deutlichen Nachteil mit sich. Der Nachweis dieses Gold-Konjugats ist im REM erst bei hoher Primärvergrößerung (ab 30.000 x) möglich. Das 12 nm Gold-Konjugat läßt sich hingegen bereits ab einer Vergrößerung von 13.000 x eindeutig nachweisen. Die Verteilung der Markierung über die zu untersuchenden Strukturen ist daher bei der Verwendung von 12 nm Gold-Konjugaten wesentlich besser zu beurteilen. Für die hier beschriebenen Immun-Gold-Markierungen wurde deshalb, trotz der geringeren Markierungsdichte ein sek. AK mit einem 12 nm Gold-Konjugat verwendet.

IV.4.3 Untersuchung der Lokalisation des Proteins p17

Im konventionell durchgeführten IFT mit dem MAK L17 G2 zeigen 78% der Borrelien eine deutliche Fluoreszenz. Daran kann man erkennen, daß die Borrelien der Kulturpassage, die für die Immun-Markierung verwendet wurden das Protein p17 exprimieren. Einen ersten Anhaltspunkt für die Lokalisation des Proteins p17 liefert das Ergebnis der Lebendfärbung im IFT. Diese Markierungsmethode liefert eine hohe Fluoreszenzintensität (**Tafel 16 A**). Dies deutet auf eine Lokalisation des Proteins auf der Oberfläche der äußeren Membran hin.

Die Immun-Gold-Markierung des Proteins p17 mit dem MAK L17 G2 und einem sek. AK mit einem 12 nm Gold-Konjugat zeigt mit Hilfe hochauflösender Rasterelektronenmikroskopie deutlich die Lokalisation des Proteins auf der Oberfläche der äußeren Membran. Es wird deshalb im folgenden Osp17 genannt. Die Spezifität der Markierung wird durch den Vergleich mit den

Ergebnissen der Negativkontrolle eindeutig bestätigt (**Tafel 16 B, C**). Ferner zeigt die fehlende Markierung mit MAK L41 1C11, dem MAK, der gegen ein Protein der Endoflagellen gerichtet ist, daß mit der verwendeten Methode nur die an der Oberfläche liegenden Proteine markiert werden. Die mit 31 Goldkolloiden/ μm^2 Borrelienoberfläche (**Tab. 8**) hohe Markierungsdichte ermöglicht außerdem die Beurteilung der Verteilung des Proteins. Das Osp17 ist gleichmäßig über die gesamte Oberfläche der äußeren Membran verteilt (**Tafel 16 C**).

MAK	Anzahl der Goldkolloide/ μm^2 Borrelienoberfläche
L17 G2	102 \pm 23,1
L32 1G3 (Kontrolle)	0,7 \pm 1,3
L41 1C11 (Kontrolle)	0,3 \pm 0,9

Tab. 8 Anzahl der Goldkolloide/ μm^2 Borrelienoberfläche bei Markierung mit dem MAK L17 G2 und den beiden Kontrollantikörpern.

IV.4.4 Untersuchung der Lokalisation des Proteins p35

Mit dem MAK L35 1F4 lassen sich im konventionellen IFT 88% der Borrelien markieren. Die Lebendfärbung führt zu einer hohen Markierungsintensität (**Tafel 17 A**). Diese beiden Ergebnisse zeigen, daß die Borrelien des Stammes PKo in der verwendeten Kulturpassage das Protein p35 exprimieren und deuten ferner darauf hin, daß dieses Protein auf der Oberfläche der äußeren Membran lokalisiert ist.

Die Immun-Gold-Markierung des Proteins mit dem MAK L35 1F4 und einem Gold konjugierten sek. AK zeigt ein sehr starkes Signal auf der Oberfläche der äußeren Membran. Die Negativkontrolle ist nahezu markierungsfrei und bestätigt dadurch die hohe Spezifität der Markierung (**Tafel 17 B, C; Tab. 9**). Die Signaldichte von 129 Goldkolloiden/ μm^2 läßt deutlich die gleichmäßige Verteilung des Proteins über die gesamte Borrelienoberfläche erkennen.

MAK	Anzahl der Goldkolloide/ μm^2 Borrelienoberfläche
L35 1F4	426 \pm 42,9
L32 1G3 (Kontrolle)	1,3 \pm 2,3

Tab. 9 Anzahl der Goldkolloide/ μm^2 Borrelienoberfläche bei Markierung mit dem MAK L35 1F4 und dem Kontrollantikörper.

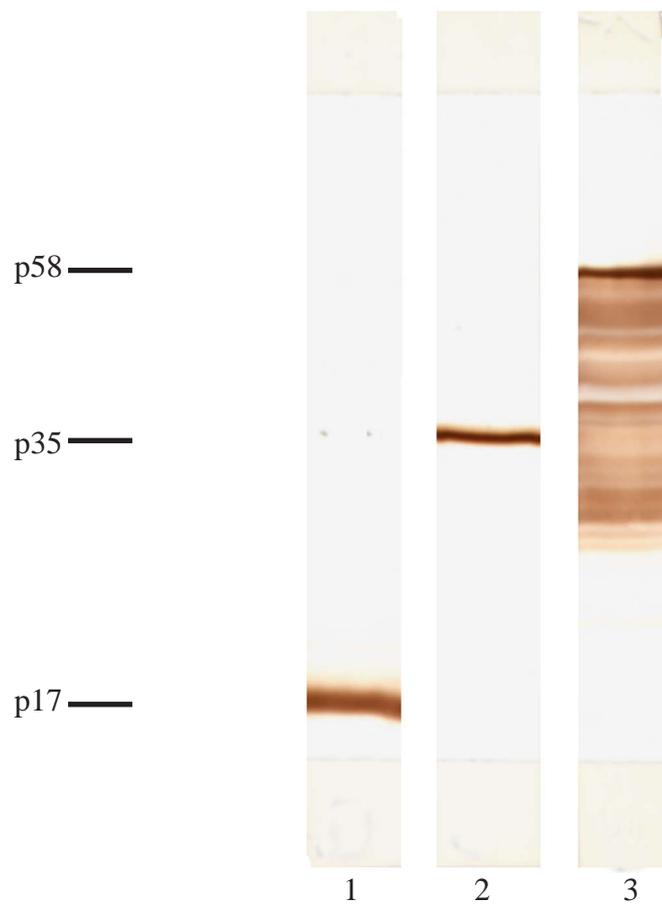
IV.4.5 Untersuchung der Lokalisation des Proteins p58

Der konventionell durchgeführte IFT führt bei 71% der Borrelien zu einer Markierung und zeigt so die Expression des Proteins p58 an. Die erfolgreiche Lebendfärbung mit dem MAK L58 L6 liefert den ersten Anhaltspunkt dafür, daß das Protein p58 ebenfalls auf der Oberfläche der äußeren Membran lokalisiert ist (**Tafel 18 A**).

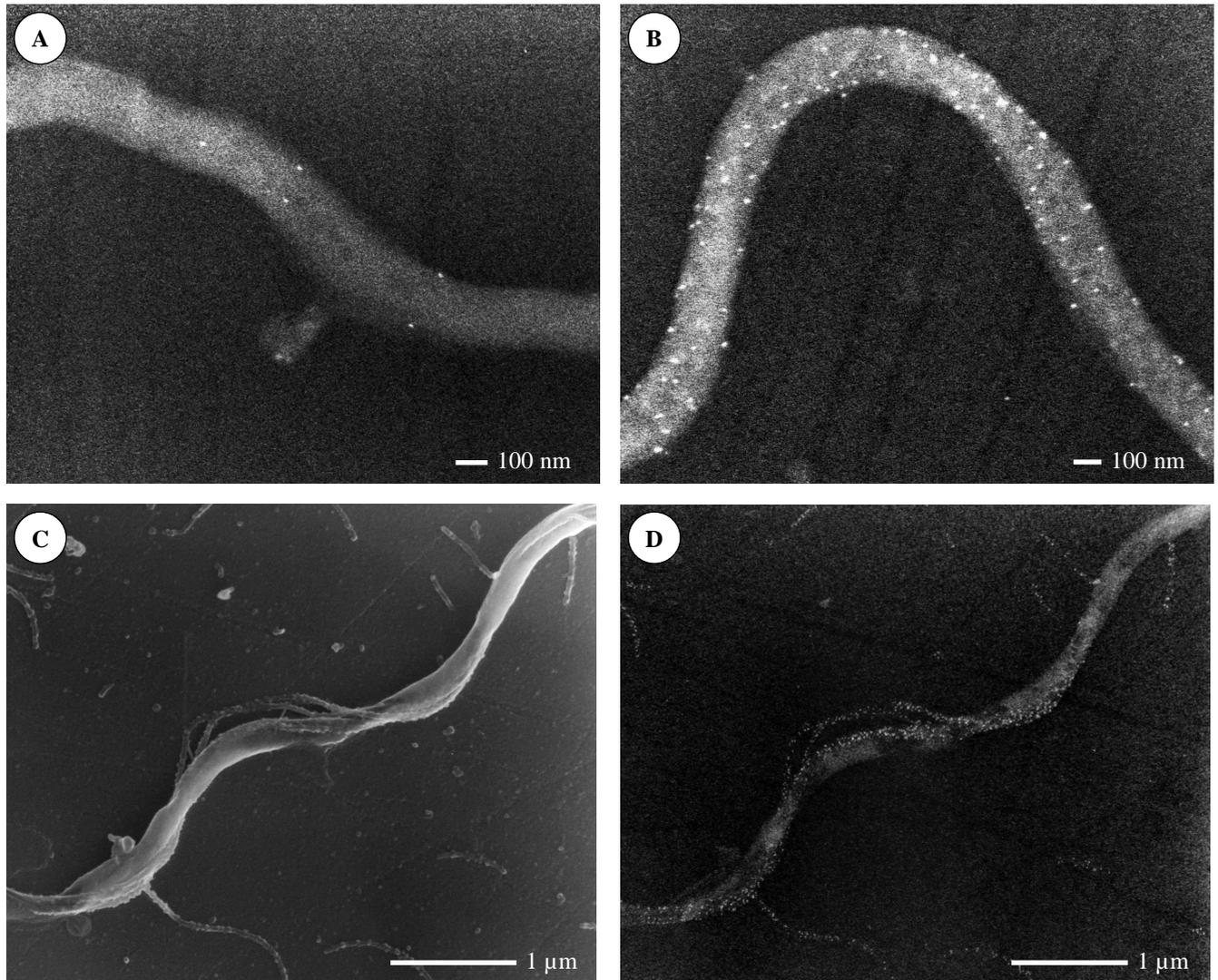
Die Immun-Gold-Markierung mit dem MAK L58 L6 bewirkt eine deutliche Markierung der äußeren Membran und zeigt dadurch, daß das Protein p58 auf der Oberfläche der äußeren Membran lokalisiert ist. Der Vergleich mit der fast markierungsfreien Negativkontrolle zeigt, daß diese Markierung spezifisch ist (**Tafel 18 B, C; Tab. 10**). Trotz der – im Vergleich zur Markierung der Proteine Osp17 und p35 – geringen Markierungsdichte kann man die gleichmäßige Verteilung des Proteins über die gesamte Borrelienoberfläche erkennen. Auffallend ist jedoch der Unterschied in der Markierungsdichte beim Vergleich verschiedener Borrelienzellen.

MAK	Anzahl der Goldkolloide/ μm^2 Borrelienoberfläche
L58 L6	$22 \pm 7,6$
L32 1G3 (Kontrolle)	$0,7 \pm 1,3$

Tab. 10 Anzahl der Goldkolloide/ μm^2 Borrelienoberfläche bei Markierung mit dem MAK L58 L6 und dem Kontrollantikörper.

**Abb. 7**

Western-Blot zum Nachweis der Expression von p58, p35 und p17 bei *B. afzelii* Stamm PKo. Die Auftrennung des Gesamtllysats der Borrelien erfolgte auf einem 12% SDS-Polyacrylamidgel; der Nachweis des p58 erfolgte mit dem MAK L58 L6, der Nachweis des p35 mit dem MAK L35 1F4 und der Nachweis des p17 mit dem MAK L17 G2.



Tafel 14

Rasterelektronenmikroskopische Dokumentation der verschiedenen Präparationstechniken für die Immun-Gold-Markierung.

A–B: Immun-Gold-Markierung von *B. afzelii* Stamm PKo mit dem gegen das p17 gerichteten MAK L17 G2 unter Verwendung eines sekundären Antikörpers mit 12 nm Gold-Konjugat (BSE-Signal);

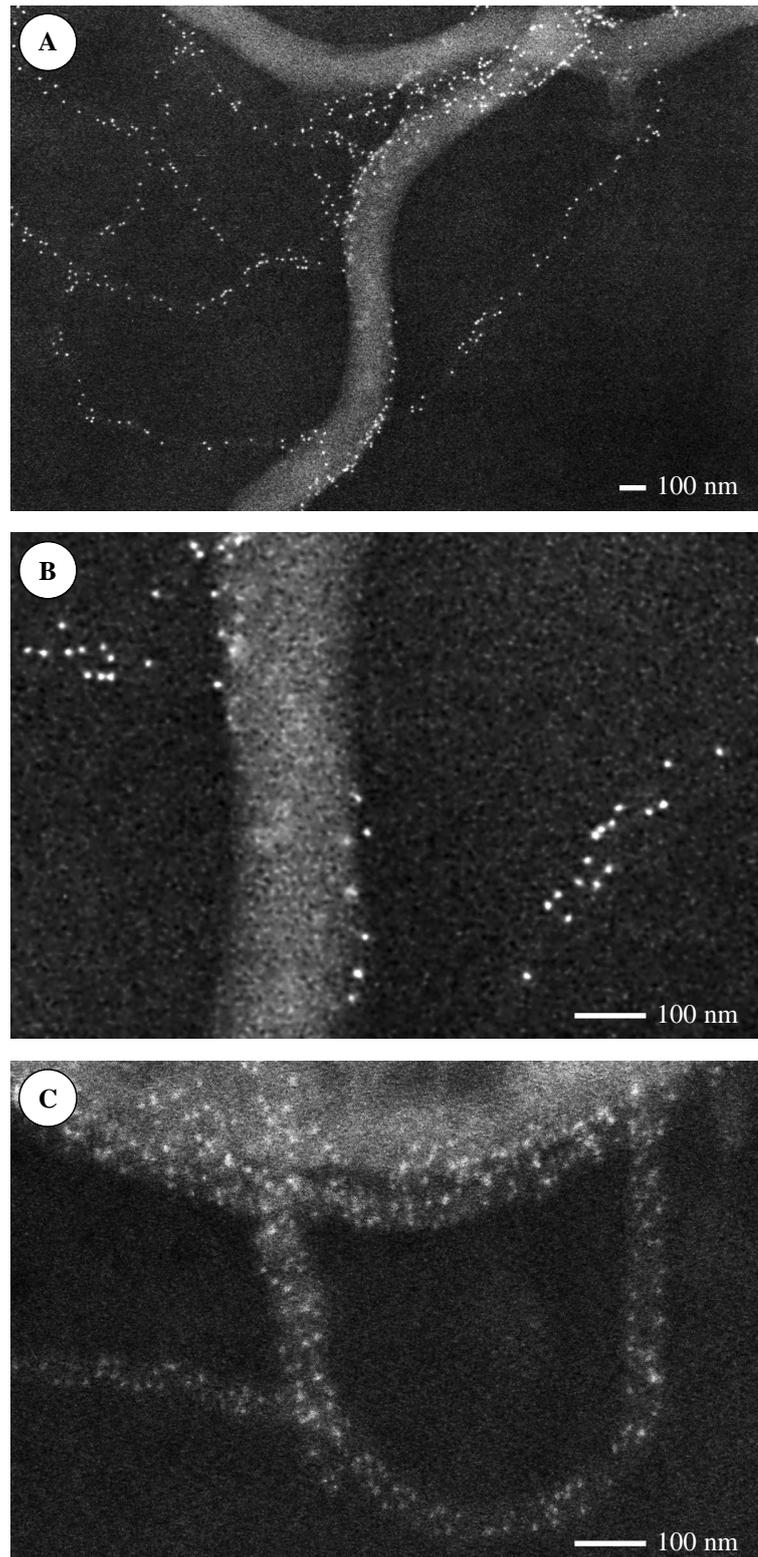
A: Die Immun-Gold-Markierung wurde nach der Fixierung mit Glutaraldehyd im Eppendorf-Gefäß durchgeführt.

B: Die Immun-Gold-Markierung wurde an glutaraldehydfixierten Borrelien erst nach dem Aufbringen auf den OT durchgeführt. Die höhere Signaldichte, die mit dieser Methode erzielt werden kann ist deutlich zu erkennen.

C–D: Immun-Gold-Markierung von *B. afzelii* Stamm PKo mit dem gegen die Endoflagellen gerichteten MAK L41 1C11 unter Verwendung eines sekundären Antikörpers mit 12 nm Gold-Konjugat; Durch das Auffrieren unfixierter Borrelien auf den OT wird die äußere Membran zerstört und die Endoflagellen werden sichtbar.

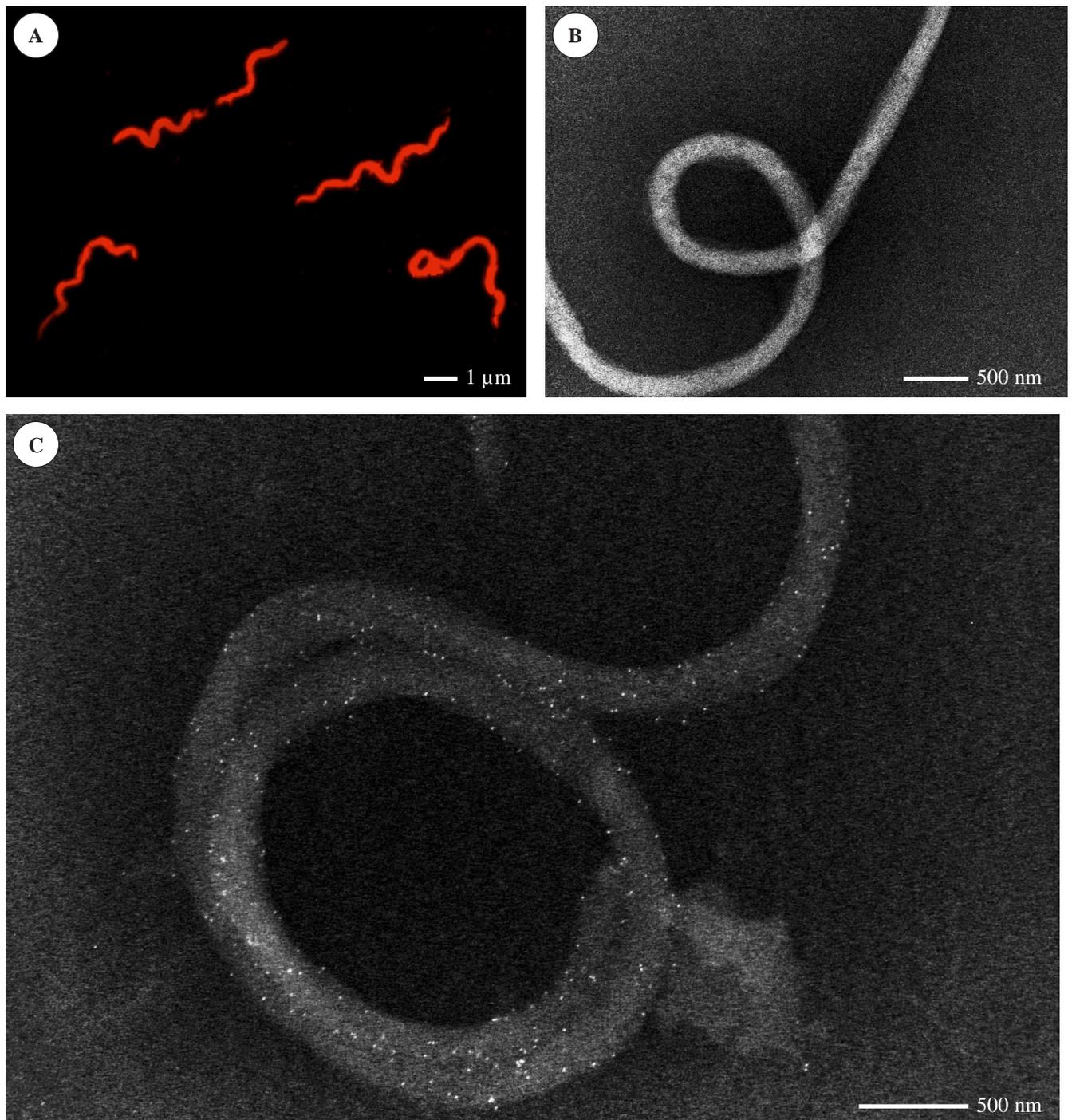
C: SE-Signal;

D: BSE-Signal.

**Tafel 15**

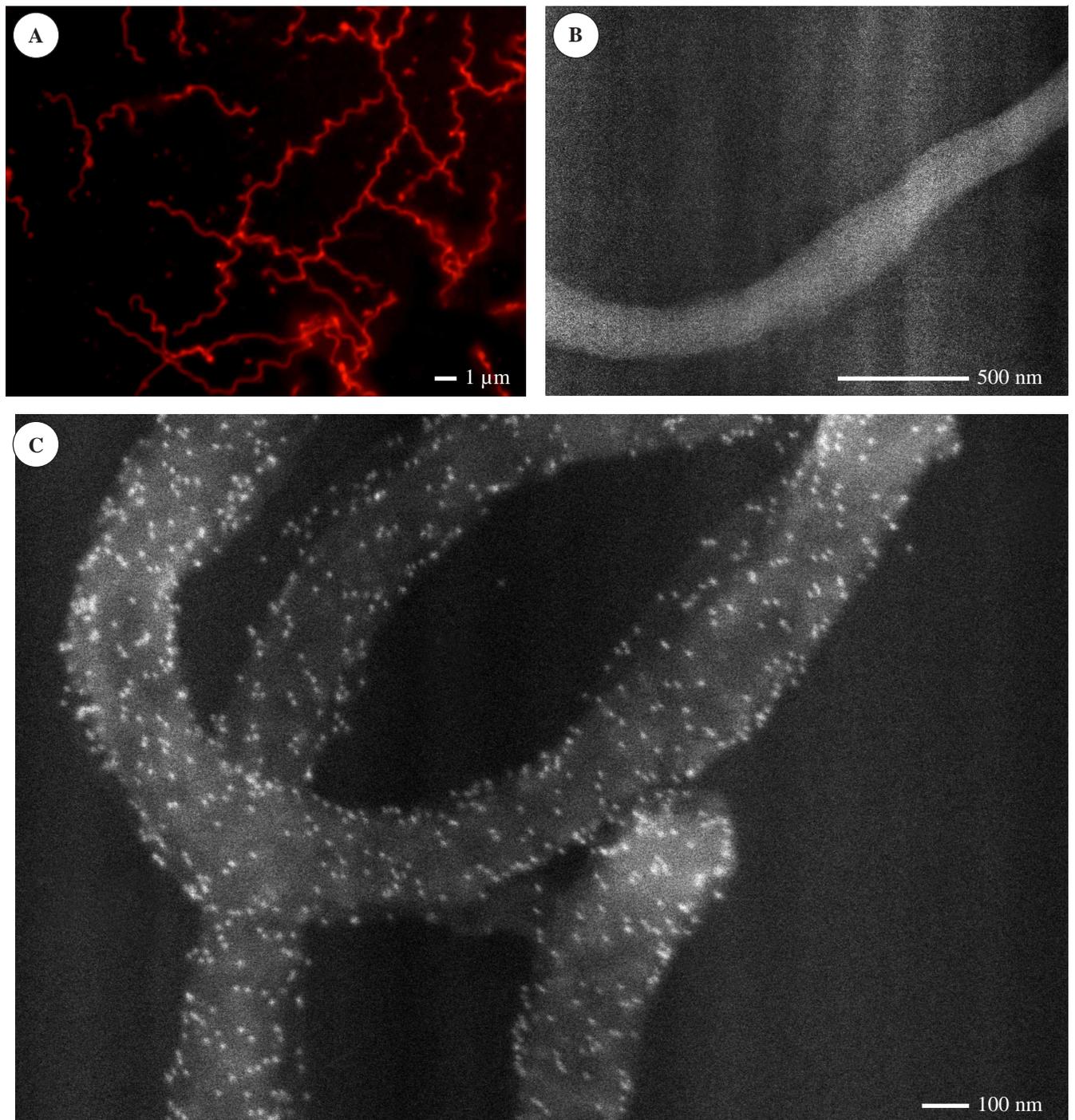
Immun-Gold-Markierung der Endflagellen von *B. afzelii* Stamm PKo mit dem MAK L41 1C11 (BSE-Signal). Vergleich der Markierungsdichte bei Verwendung eines sekundären Antikörpers mit 12 nm Gold-Konjugat bzw. 6 nm Gold-Konjugat.

A: Immun-Gold-Markierung mit 12 nm Gold-Konjugat; **B:** Detail aus A; **C:** Immun-Gold-Markierung mit 6 nm Gold-Konjugat. Die wesentlich höhere Markierungsdichte bei Verwendung des 6 nm Gold-Konjugats ist deutlich zu erkennen.

**Tafel 16**

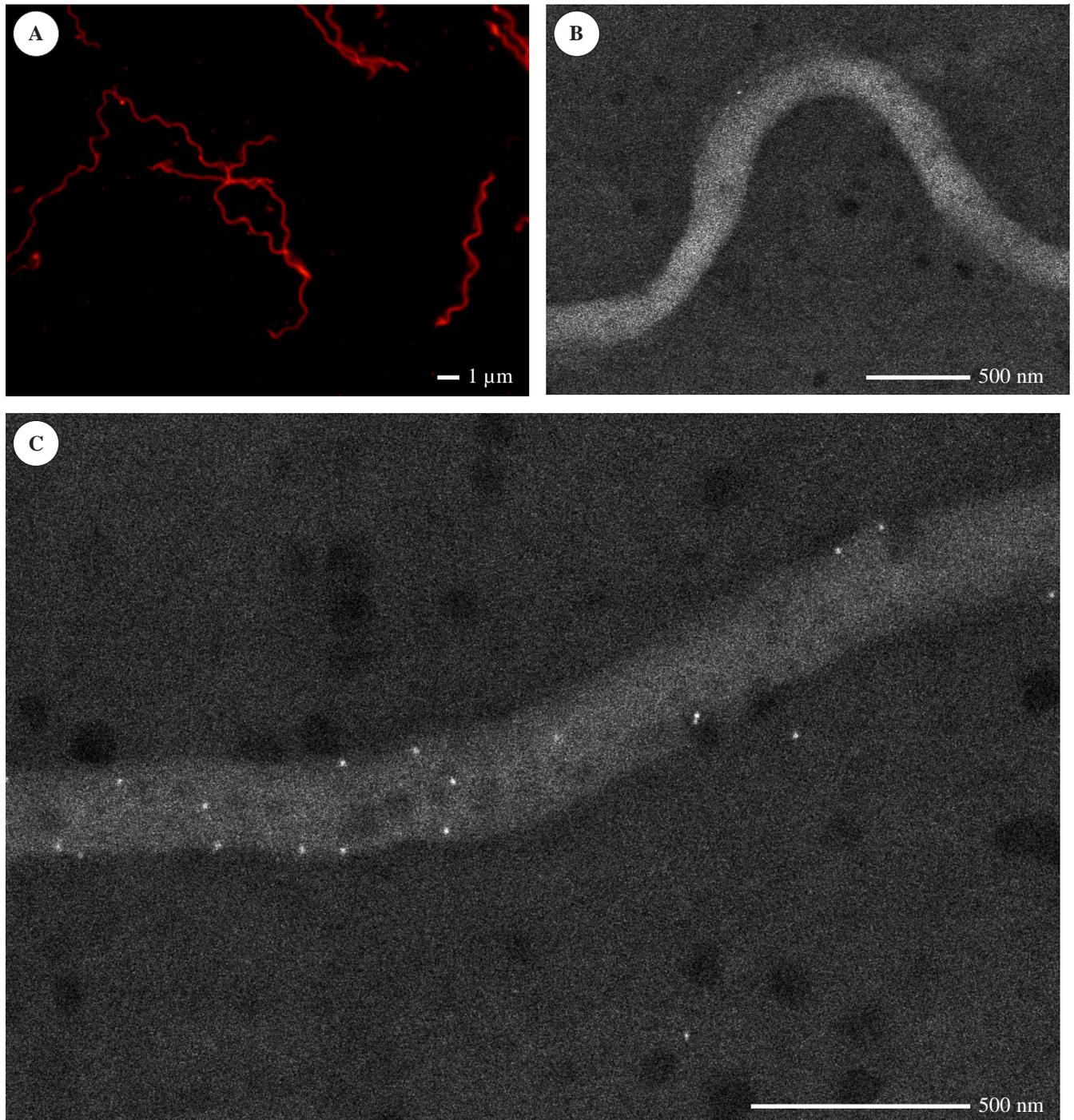
Immun-Markierung des p17 von *B. afzelii* Stamm PKo mit dem MAK L17 G2.

- A: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Lebendmarkierung des p17 mit einem Cy3 markierten sekundären Antikörper;
- B-C: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Immun-Gold-Markierung (BSE-Signal);
- B: Negativkontrolle der Immun-Gold-Markierung; bei der Verwendung des MAK L32 1G3 sind die Borrelien nicht markiert;
- C: Immun-Gold-Markierung des Osp17 unter Verwendung eines sekundären Antikörpers mit 12 nm Gold-Konjugat; das Markierungssignal ist gleichmäßig über die Oberfläche der Borrelienzelle verteilt.

**Tafel 17**

Immun-Markierung des p35 von *B. afzelii* Stamm PKo mit dem MAK L35 1F4.

- A: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Lebendmarkierung mit einem Cy3 markierten sekundären Antikörper;
- B–C: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Immun-Gold-Markierung (BSE-Signal);
- B: Negativkontrolle der Immun-Gold-Markierung; bei der Verwendung des MAK L32 1G3 sind die Borrelien nicht markiert;
- C: Immun-Gold-Markierung des p35 unter Verwendung eines sekundären Antikörpers mit 12 nm Gold-Konjugat; die sehr hohe Markierungsdichte zeigt deutlich die gleichmäßige Verteilung des Signals über die Oberfläche der Borrelienzelle.

**Tafel 18**

Immun-Markierung des p58 von *B. afzelii* Stamm PKo mit dem MAK L58 L6.

- A: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Lebendmarkierung des p58 mit einem Cy3 markierten sekundären Antikörper;
- B–C: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Immun-Gold-Markierung (BSE-Signal);
- B: Negativkontrolle der Immun-Gold-Markierung; bei der Verwendung des MAK L32 1G3 sind die Borrelien nicht markiert;
- C: Immun-Gold-Markierung des p58 unter Verwendung eines sekundären Antikörpers mit 12 nm Gold-Konjugat; das Markierungssignal ist gleichmäßig über die Oberfläche der Borrelienzelle verteilt.

IV.5 Subzelluläre Lokalisation von Epitopen für typspezifische und breitreaktive MAK der Proteine OspA und OspC

Unter Verwendung typspezifischer und breitreaktiver MAK (**Tab. 11**) wurde mit Hilfe der Immun-Gold-Markierung die Lokalisation der variablen und der konservierten Epitope der beiden immunologisch heterogenen Proteine OspA und OspC untersucht.

MAK	Spezifität	Eingesetzte Konzentration
L32 1F11	anti OspA; breitreaktiv	10 µg/ml
L32 14G7	anti OspA; spezifisch für OspA Serotyp 2	10 µg/ml
L32 1G3	anti OspA; spezifisch für OspA Serotyp 4 für Negativkontrolle bei Serotyp 2	5–10 µg/ml
L22 1F8	anti OspC; breitreaktiv	5 µg/ml
L22 1F10	anti OspC; spezifisch für OspA Serotyp 2	2,35 µg/ml

Tab. 11 Spezifität der für die Immunmarkierungen verwendeten MAK und die bei der Markierung eingesetzten Konzentrationen.

IV.5.1 Lokalisation von Epitopen für typspezifische und breitreaktive MAK des Proteins OspA

Für die Untersuchungen der Lokalisation der verschiedenen Epitope von OspA wurden die beiden *B. afzelii* Klone PKo345 II-2-3 und PKo97 K37 verwendet. Beide Klone exprimieren im Gegensatz zum Stamm PKo unter Standardkulturbedingungen OspA. Dies konnte im Western-blot eindeutig nachgewiesen werden. Außerdem wurde der *B. afzelii* Stamm PGau eingesetzt, der ebenfalls *in vitro* das Protein OspA exprimiert (**Abb. 8**).

Sowohl im konventionell durchgeführten IFT als auch bei der Lebendmarkierung zeigen Borrelien des Klons PKo345 II-2-3 eine starke Fluoreszenz. Diese kann gleichermaßen mit dem breitreaktiven MAK L32 1F11 und mit dem typspezifischen MAK L32 14G7 erzielt werden (**Tafel 19**). Mit jedem der beiden MAK werden unabhängig von der Markierungsmethode mehr als 50% der Borrelien markiert. Insgesamt reagieren die Borrelien mit dem breitreaktiven MAK jedoch etwas häufiger, als mit dem typspezifischen MAK (**Tab. 12**).

MAK	Lebendmarkierung	Konventioneller IFT
L32 1F11	58 %	64 %
L32 14G7	51 %	53 %

Tab. 12 Prozentsatz der Borrelien des Klons PKo345 II-2-3, die bei den unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierungsverfahren mit dem MAK L32 1F11 bzw. dem MAK L32 14G7 reagieren.

Borrelien des *B. afzelii* Klons PKo97 K37 reagieren bei beiden Markierungsmethoden mit dem breitreaktiven MAK L32 1F11 stark (**Tafel 20 C, D**), wobei in der Lebendmarkierung etwas weniger Borrelien markiert sind als im konventionellen IFT (**Tab. 13**). Bei der Markierung mit dem MAK L32 14G7 zeigen nur einzelne Borrelien in der Lebendmarkierung eine starke Fluoreszenz. Im Gegensatz dazu entwickeln im konventionellen Markierungsverfahren bei der Markierung mit diesem MAK wesentlich mehr Borrelien eine Fluoreszenz (**Tab. 13**). Allerdings ist diese Fluoreszenz insgesamt weniger intensiv als bei der Lebendmarkierung (**Tafel 20 A, B**).

MAK	Lebendmarkierung	Konventioneller IFT
L32 1F11	50 %	63 %
L32 14G7	5 %	56 %

Tab. 13 Prozentsatz der Borrelien des Klons PKo97 K37, die bei den unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierungsverfahren mit dem MAK L32 1F11 bzw. dem MAK L32 14G7 reagieren.

B. afzelii Stamm PGau zeigt im IFT mit beiden MAK eine deutliche Fluoreszenz, die jedoch bei Verwendung des breitreaktiven MAK L32 1F11 etwas schwächer ausfällt, als dies bei der Markierung mit dem typspezifischen MAK L32 14G7 der Fall ist (**Tafel 21**). Sowohl in der Lebendfärbung als auch im konventionell durchgeführten IFT reagieren mehr als 50 % der Borrelien unabhängig vom verwendeten MAK positiv (**Tab. 14**).

MAK	Lebendmarkierung	Konventioneller IFT
L32 1F11	53 %	67 %
L32 14G7	51 %	59 %

Tab. 14 Prozentsatz der Borrelien des *B. afzelii* Stamms PGau, die bei den unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierungsverfahren mit dem MAK L32 1F11 bzw. dem MAK L32 14G7 reagieren.

Diese Ergebnisse zeigen, daß insgesamt wenigstens 50% der Borrelien des *B. afzelii* Stamms PGau und beider Klone unter Kulturbedingungen OspA exprimieren.

Führt man die Immun-Gold-Markierungen des Proteins OspA nach dem für die Markierung von Borrelienproteinen entwickelten Protokoll durch, so kommt es zu keinem Markierungssignal auf der Oberfläche der äußeren Membran. Das negative Markierungsergebnis ist möglicherweise auf die Veränderung des OspA durch die Glutaraldehydfixierung zu erklären. Es wird daher ein abgewandeltes Markierungsprotokoll ohne vorhergehende Fixierung angewandt (siehe III.10.10; S. 40). Dieses Protokoll ermöglicht die spezifische Markierung des OspA. Deshalb wird für die Untersuchung der Lokalisation der Epitope von OspA für typspezifische und breitreaktive MAK auf die Glutaraldehydfixierung vor der Immun-Gold-Markierung verzichtet.

Die Immun-Gold-Markierung des Klons PKo345 II-2-3 mit dem typspezifischen MAK zeigt ein deutliches Markierungssignal, das gleichmäßig über die gesamte Oberfläche der Borrelienzelle verteilt ist (**Tafel 22 A, B**). Diese Markierung ist gegenüber der Negativkontrolle spezifisch (**Tab. 15**). Die Markierung mit dem breitreaktiven MAK ist im Vergleich zu der Markierung mit dem typspezifischen MAK jedoch wesentlich schwächer. Trotzdem ist gegenüber der Negativkontrolle eine deutliche Reaktion zu erkennen (**Tafel 22 C-F**).

MAK	Goldkolloide/ μm^2 Borrelienoberfläche
L32 1F11	10 \pm 4,9
L32 14G7	23 \pm 11
L32 1G3 (Kontrolle)	1 \pm 1,5

Tab. 15 Anzahl der Goldkolloide/ μm^2 Borrelienoberfläche bei der Markierung des Klons PKo345 II-2-3 mit dem breitreaktiven MAK L32 1F11, dem typspezifischen MAK L32 14G7 und dem Kontrollantikörper.

Borrelien des Klons PKo97 K37 zeigen in der Immun-Gold-Markierung mit dem MAK L32 14G7 nur ein schwaches Signal, das bei einigen Borrelien sehr unregelmäßig über die Oberfläche verteilt ist. Die Immun-Gold-Markierung beschränkt sich auf auffallend wenige Zellen (**Tafel 23 A, B**). Auch bei der Markierung mit dem MAK L32 1F11 ist nur ein schwaches Signal zu erkennen. Hier sind die Goldkolloide jedoch weitgehend gleichmäßig über die Oberfläche verteilt (**Tafel 23 C, D**). Dennoch läßt sich für beide Markierungen im Vergleich zu der Negativkontrolle die Spezifität des Signals bestätigen (**Tafel 23 E, F; Tab. 16**).

MAK	Goldkolloide/ μm^2 Borrelienoberfläche
L32 1F11	11,9 \pm 4,7
L32 14G7	12,5 \pm 10,3
L32 1G3 (Kontrolle)	0,7 \pm 1,9

Tab. 16 Anzahl der Goldkolloide/ μm^2 Borrelienoberfläche bei der Markierung des Klons PKo97 K37 mit dem breitreaktiven MAK L32 1F11, dem typspezifischen MAK L32 14G7 und dem Kontrollantikörper.

Bei der Immun-Gold-Markierung reagiert *B. afzelii* Stamm PGau sowohl mit dem typspezifischen MAK L32 14G7, als auch mit dem breitreaktiven MAK L32 1F11 positiv. Bei der Markierung mit dem typspezifischen MAK ist das Signal meist ungleichmäßig über die Oberfläche verteilt (**Tafel 24**). Die Markierung mit dem breitreaktiven MAK ist im Vergleich mit dem typspezifischen MAK insgesamt etwas stärker und weitgehend gleichmäßig verteilt. Der Vergleich mit der Negativkontrolle zeigt, daß das Markierungsergebnis in beiden Fällen spezifisch ist (**Tab. 17**).

MAK	Goldkolloide/ μm^2 Borrelienoberfläche
L32 1F11	25,4 \pm 5,3
L32 14G7	16,8 \pm 8,5
L32 1G3 (Kontrolle)	0,7 \pm 1,3

Tab. 17 Anzahl der Goldkolloide/ μm^2 Borrelienoberfläche bei der Markierung des *B. afzelii* Stamms PGau mit dem breitreaktiven MAK L32 1F11, dem typspezifischen MAK L32 14G7 und dem Kontrollantikörper.

IV.5.2 Lokalisation von Epitopen für typspezifische und breitreaktive MAK des Proteins OspC

Zur Untersuchung der Lokalisation der konservierten und variablen Epitope von OspC wurden der *B. afzelii* Stamm PKo und der Klon PKo97 K37 verwendet. Im Westernblot ist deutlich zu erkennen, daß sowohl der Stamm PKo als auch der Klon PKo97 K37 unter den Standardkulturbedingungen OspC exprimieren (**Abb. 8**).

Im konventionellen IFT und bei der Lebendmarkierung mit dem typspezifischen MAK L22 1F10 zeigt sowohl der Stamm PKo, als auch der Klon PKo97 K37 eine starke Fluoreszenz (**Tafel 25 A, B; 26 A, B**). Auch bei der Verwendung des breitreaktiven MAK L22 1F8 kann mit beiden Markierungsmethoden eine starke Fluoreszenz beobachtet werden (**Tafel 25 C, D; 26 C, D**). Bei der Markierung mit dem MAK L22 1F8 sind, unabhängig vom verwendeten Klon bzw. Stamm, bei der Lebendmarkierung 10–20 % weniger Borrelien markiert, als im konventionellen IFT. Verwendet man hingegen den typspezifischen MAK L22 1F10, so ist der Unterschied in der Markierungshäufigkeit zwischen den beiden Markierungsmethoden mit ca. 5 % wesentlich geringer (**Tab. 18; 19**).

MAK	Lebendmarkierung	Konventioneller IFT
L22 1F10	64 %	68 %
L22 1F8	52 %	73 %

Tab. 18 Prozentsatz der Borrelien des *B. afzelii* Stamms PKo, die bei den unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierungsverfahren mit dem MAK L22 1F10 bzw. dem MAK L22 1F8 reagieren.

MAK	Lebendmarkierung	Konventioneller IFT
L22 1F10	56 %	61 %
L22 1F8	57 %	67 %

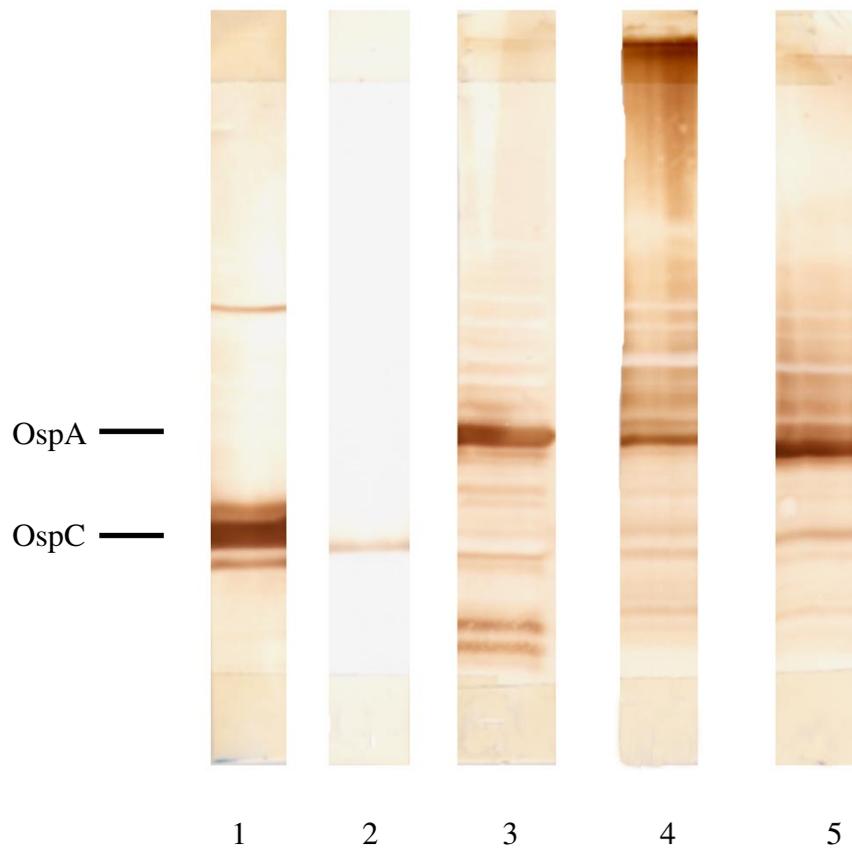
Tab. 19 Prozentsatz der Borrelien des Klons PKo97 K37, die bei den unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierungsverfahren mit dem MAK L22 1F10 bzw. dem MAK L22 1F8 reagieren.

Unter Standard-Kulturbedingungen exprimieren also mehr als 50% der Borrelien OspC.

Die Immun-Gold-Markierung des OspC ergibt sowohl für Stamm PKo als auch für Klon PKo97 K37 ein starkes Signal. Die Stärke des Markierungssignals ist bei Klon PKo97 K37 unabhängig vom verwendeten MAK annähernd gleich groß (**Tafel 28**). Im Gegensatz dazu ist das Markierungsergebnis bei Stamm PKo bei der Verwendung des breitreaktiven MAK L22 1F8 etwa doppelt so stark, wie mit dem typspezifischen MAK L22 1F10 (**Tafel 27**). Alle Markierungen erweisen sich im Vergleich zur Negativkontrolle als spezifisch (**Tab. 20**). Die hohe Markierungsdichte erlaubt eine Beurteilung der Verteilung des OspC. Es ist gleichmäßig über die gesamte Oberfläche der Borrelienzellen verteilt.

MAK	Goldkolloide/ μm^2 Borrelienoberfläche	
	Stamm PKo	Klon PKo97 K37
L22 1F10	106 \pm 16,2	122 \pm 21,1
L22 1F8	254 \pm 31,1	112 \pm 17,8
L32 1G3 (Kontrolle)	0,7 \pm 1,3	1 \pm 1,5

Tab. 20 Anzahl der Goldkolloide/ μm^2 Borrelienoberfläche bei der Markierung des Stammes PKo und des Klons PKo97 K37 mit dem typspezifischen MAK L22 1F10, dem breitreaktiven MAK L22 1F8 und dem Kontrollantikörper.

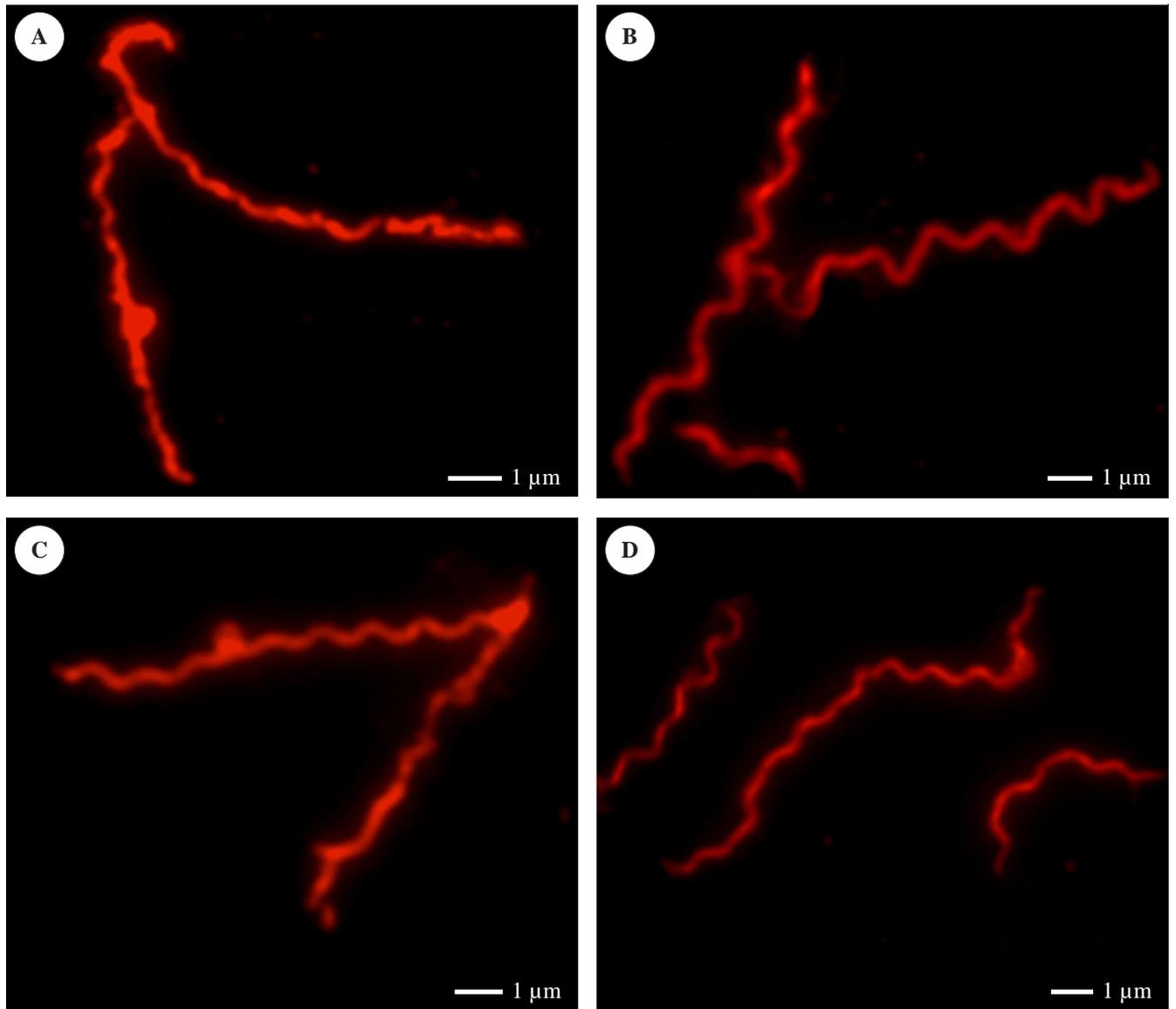
**Abb. 8**

Western-Blot zum Nachweis der Expression von OspA bzw. OspC bei *B. afzelii* Stamm PKo und Stamm PGau, sowie bei *B. afzelii* Klon PKo97 K37 und PKo345 2-3.

Die Auftrennung des Gesamtlisats der Borrelien erfolgte auf einem 12% SDS-Polyacrylamidgel; der Nachweis des OspC erfolgte mit dem MAK L22 1F8, der Nachweis des OspA mit dem MAK L32 1F11;

Spur 1: PKo; Spur 2–3: Klon PKo97 K37; Spur 4: Klon PKo345 2-3; Spur 5: PGau;

Spur 1-2: Nachweis des OspC; Spur 3-5: Nachweis des OspA;

**Tafel 19**

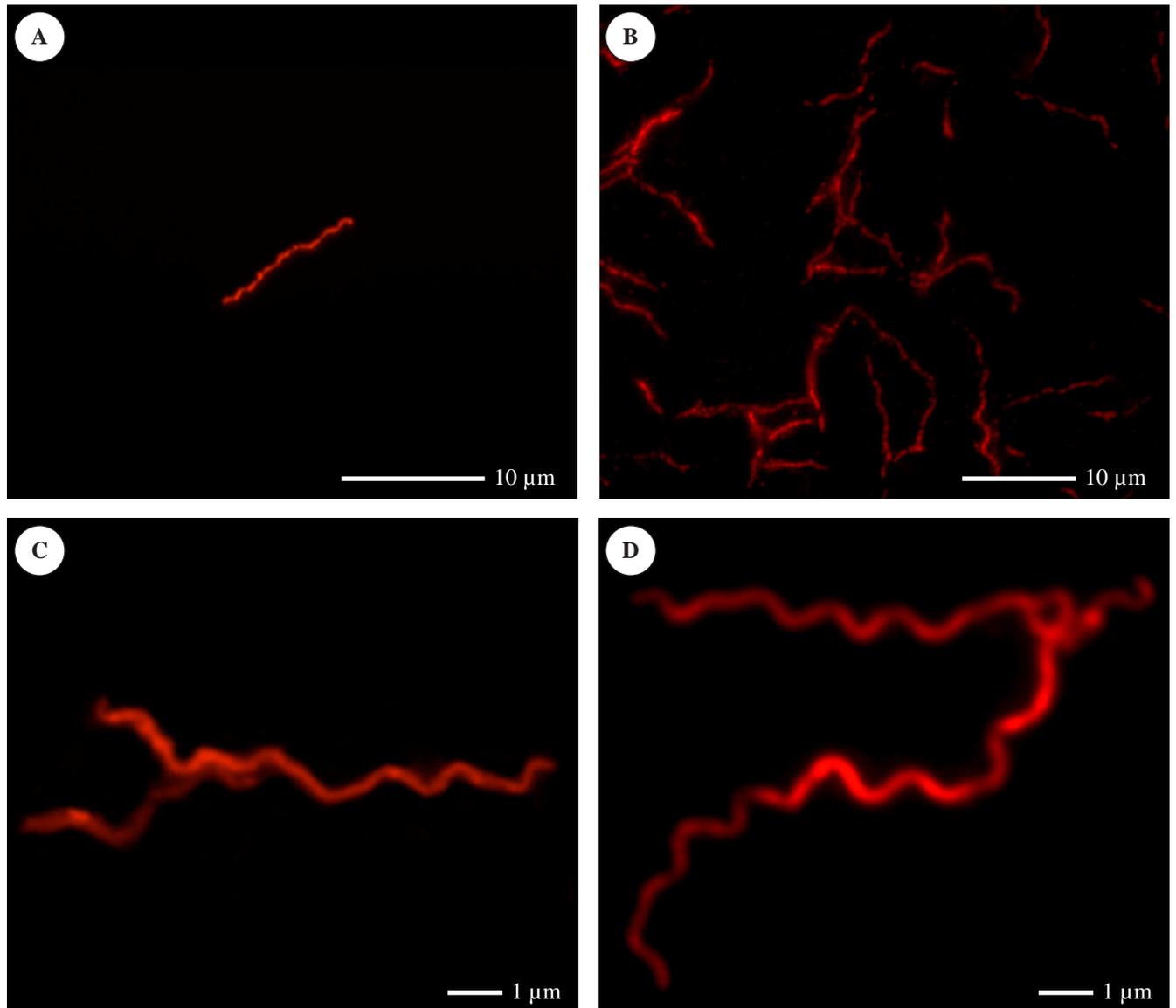
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *B. afzelii* Klon PKo345 II-2-3 nach Markierung des OspA unter Verwendung eines Cy3 markierten sekundären Antikörpers; unabhängig von der angewandten Markierungsmethode und dem verwendeten MAK zeigen die Borrelien ein starkes Fluoreszenzsignal.

A: Lebendmarkierung mit dem typspezifischen MAK L32 14G7;

B: Konventionelle Fluoreszenzmarkierung mit dem typspezifischen MAK L32 14G7;

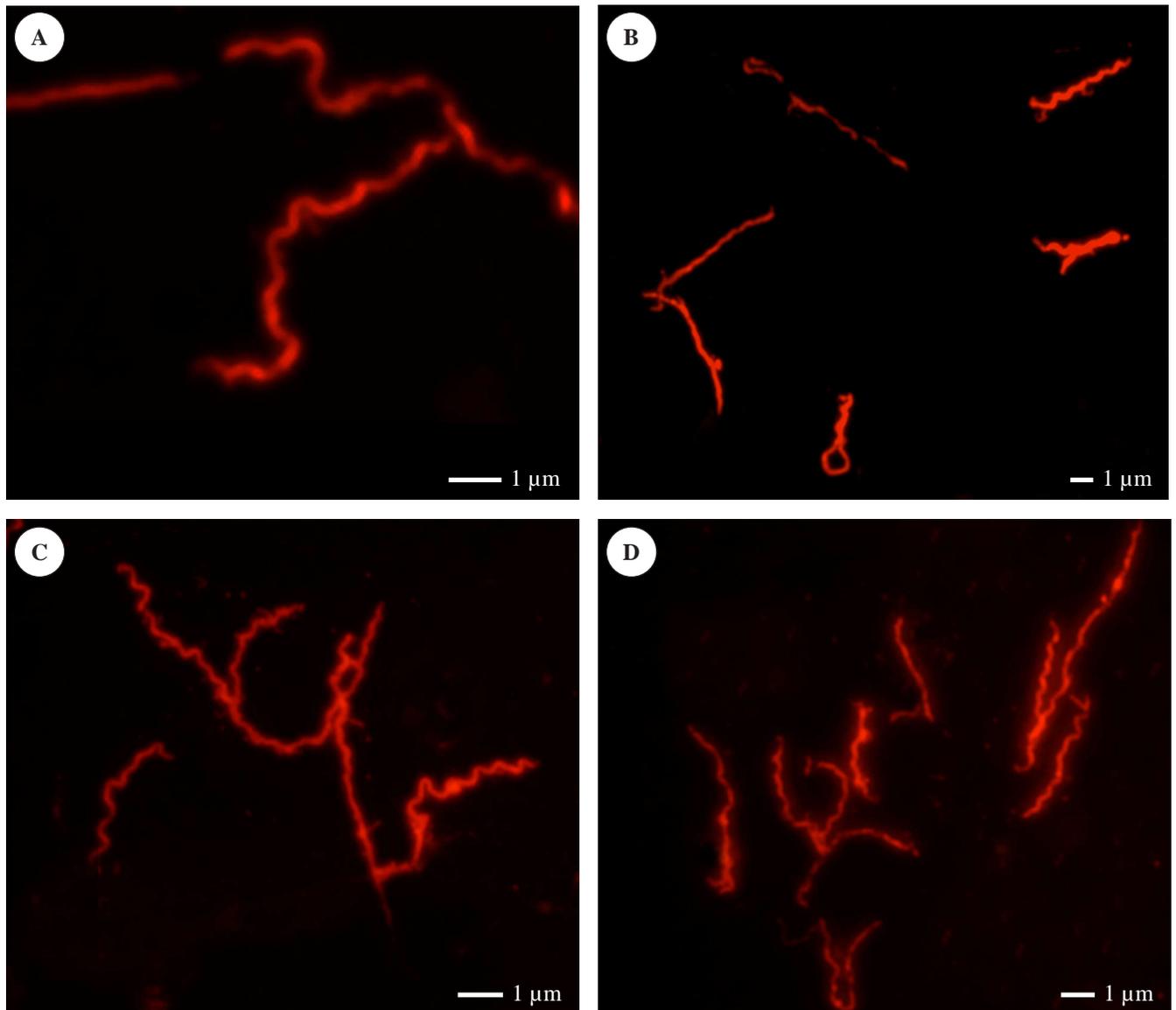
C: Lebendmarkierung mit dem breitreaktiven MAK L32 1F11;

D: Konventionelle Fluoreszenzmarkierung mit dem breitreaktiven MAK L32 1F11.

**Tafel 20**

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *B. afzelii* Klon PKo97 K37 nach der Markierung des OspA unter Verwendung eines Cy3 markierten sekundären Antikörpers.

- A: Lebendmarkierung mit dem typspezifischen MAK L32 14G7; nur einzelne Zellen zeigen eine deutliche Fluoreszenz;
- B: Konventionelle Fluoreszenzmarkierung mit dem typspezifischen MAK L32 14G7; das Fluoreszenzsignal ist relativ schwach;
- C: Lebendmarkierung mit dem breitreaktiven MAK L32 1F11;
- D: Konventionelle Fluoreszenzmarkierung mit dem breitreaktiven MAK L32 1F11.

**Tafel 21**

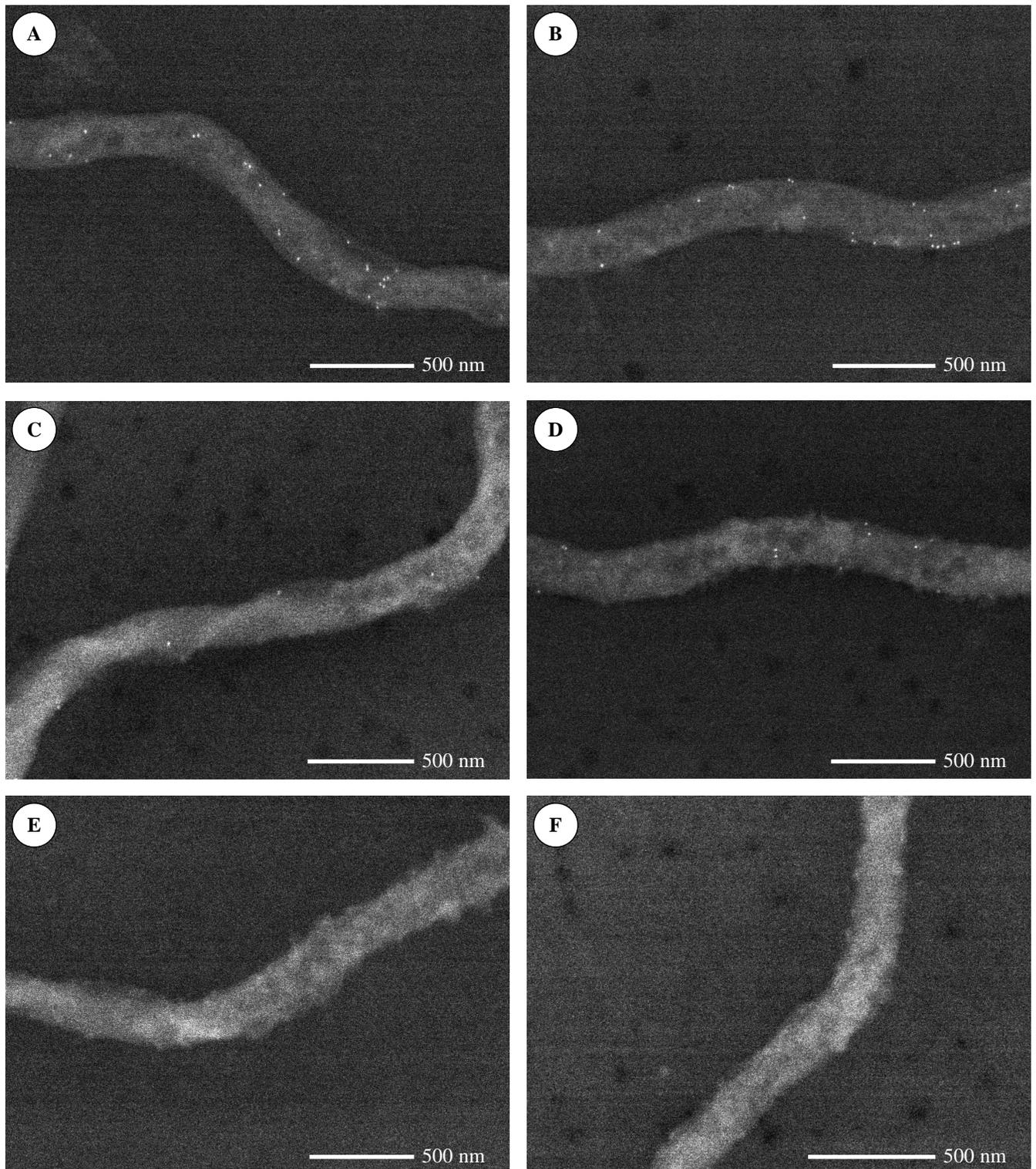
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *B. afzelii* Stamm PGau nach der Markierung des OspA unter Verwendung eines Cy3 markierten sekundären Antikörpers. Unabhängig von der angewandten Markierungsmethode und dem verwendeten MAK zeigen die Borrelien ein starkes Fluoreszenzsignal.

A: Lebendmarkierung mit dem typspezifischen MAK L32 14G7;

B: Konventionelle Fluoreszenzmarkierung mit dem typspezifischen MAK L32 14G7;

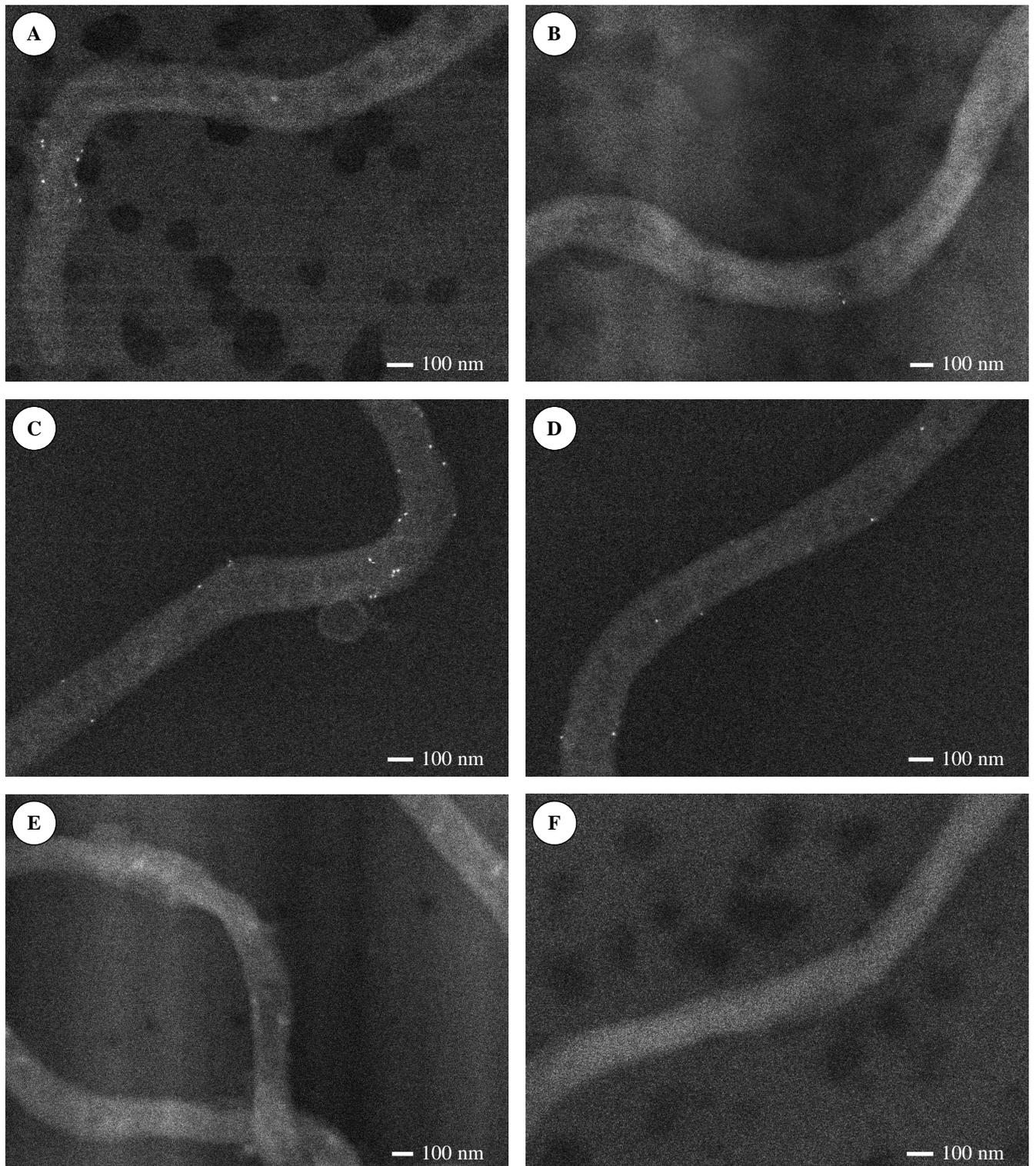
C: Lebendmarkierung mit dem breitreaktiven MAK L32 1F11;

D: Konventionelle Fluoreszenzmarkierung mit dem breitreaktiven MAK L32 1F11.

**Tafel 22**

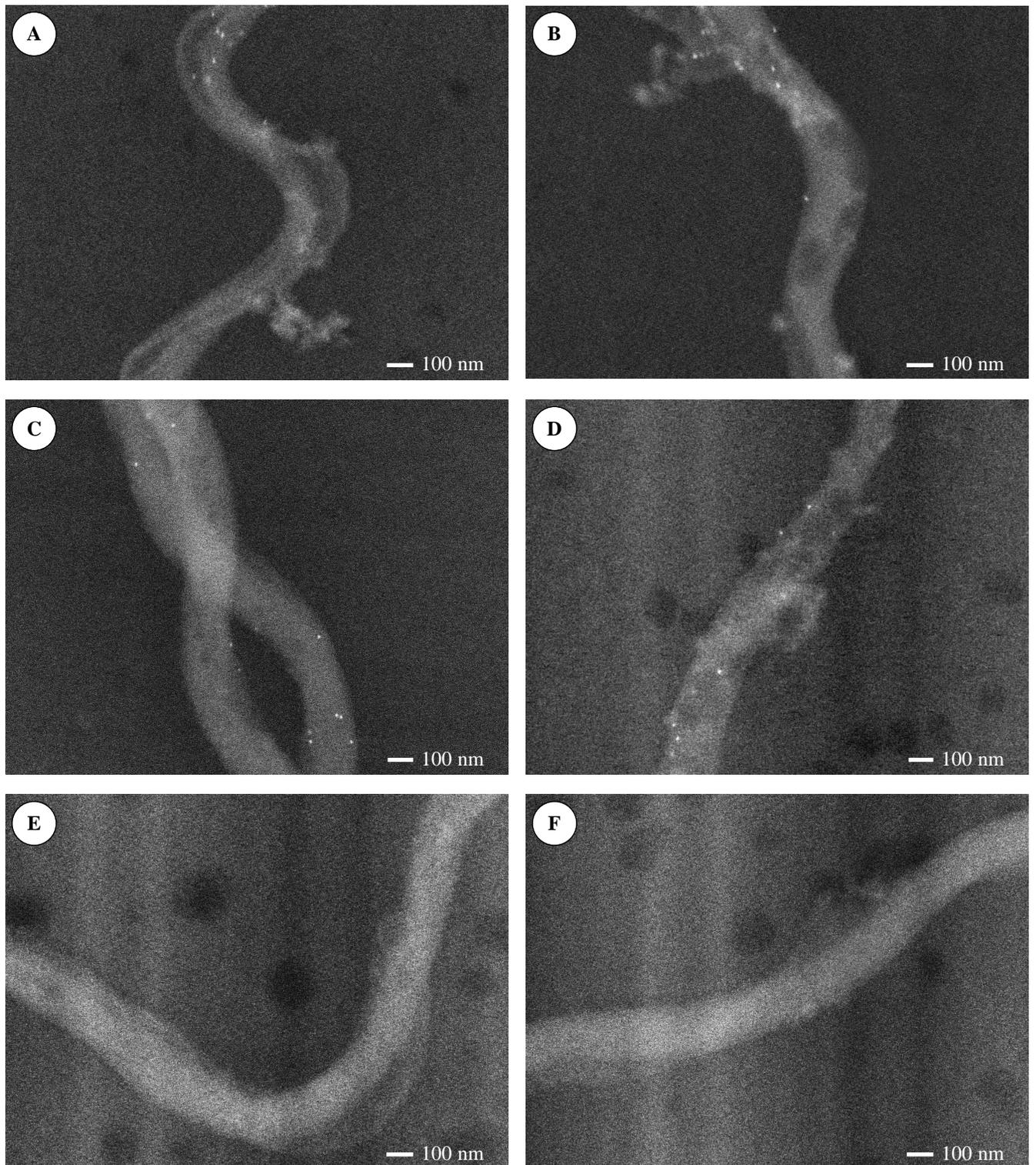
Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Immun-Gold-Markierung des OspA von *B. afzelii* Klon PKo345 II-2-3 unter Verwendung eines sekundären Antikörpers mit 12 nm Gold-Konjugat (BSE-Signal).

A–B: Immun-Gold-Markierung mit dem typspezifischen MAK L32 14G7; die Markierungssignale sind gleichmäßig über die Oberfläche verteilt; **C–D:** Immun-Gold-Markierung mit dem breitreaktiven MAK L32 1F11; es sind nur einzelne Signale zu detektieren; **E–F:** Negativkontrolle; mit dem MAK L32 1G3 werden die Borrelien nicht markiert.

**Tafel 23**

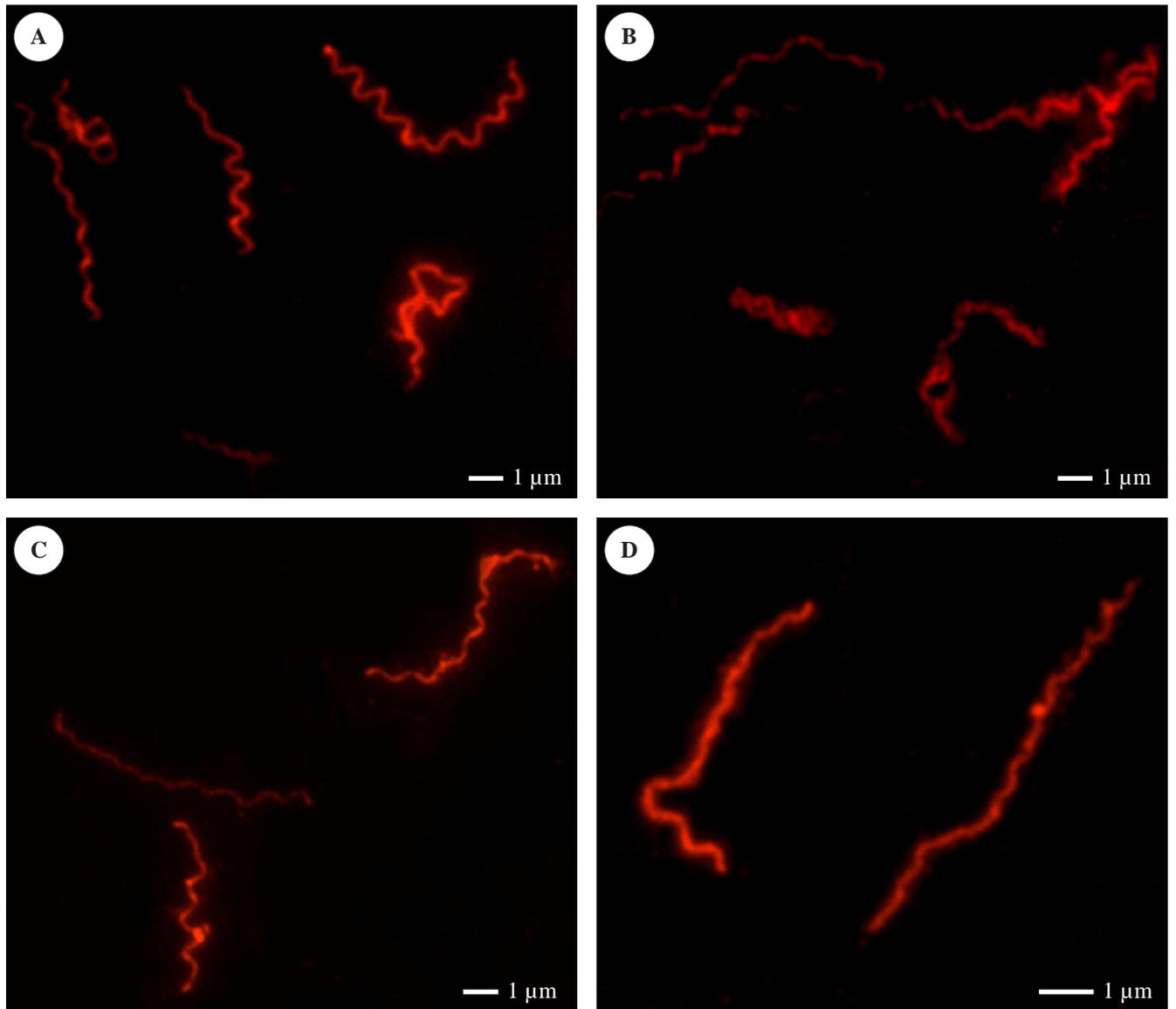
Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Immun-Gold-Markierung des OspA von *B. afzelii* Klon PKo97 K37 unter Verwendung eines sekundären Antikörpers mit 12 nm Gold-Konjugat (BSE-Signal).

A–B: Immun-Gold-Markierung mit dem typspezifischen MAK L32 14G7; das meist schwache Signal ist auf einzelne Bereiche der Oberfläche beschränkt; **C–D:** Immun-Gold-Markierung mit dem breitreaktiven MAK L32 1F11; die wenigen Goldkolloide sind weitgehend gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt; **E–F:** Negativkontrolle; mit dem MAK L32 1G3 werden die Borrelien nicht markiert.

**Tafel 24**

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Immun-Gold-Markierung des OspA von *B. afzelii* Stamm PGau unter Verwendung eines sekundären Antikörpers mit 12 nm Gold-Konjugat (BSE-Signal).

A–B: Immun-Gold-Markierung mit dem typspezifischen MAK L32 14G7; das Signal ist ungleichmäßig über die Oberfläche verteilt; **C–D:** Immun-Gold-Markierung mit dem breitreaktiven MAK L32 1F11; die wenigen Markierungssignale sind weitgehend gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt; **E–F:** Negativkontrolle; mit dem MAK L32 1G3 werden die Borrelien nicht markiert.

**Tafel 25**

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *B. afzelii* Stamm PKo nach Markierung des OspC unter Verwendung eines Cy3 markierten sekundären Antikörpers.

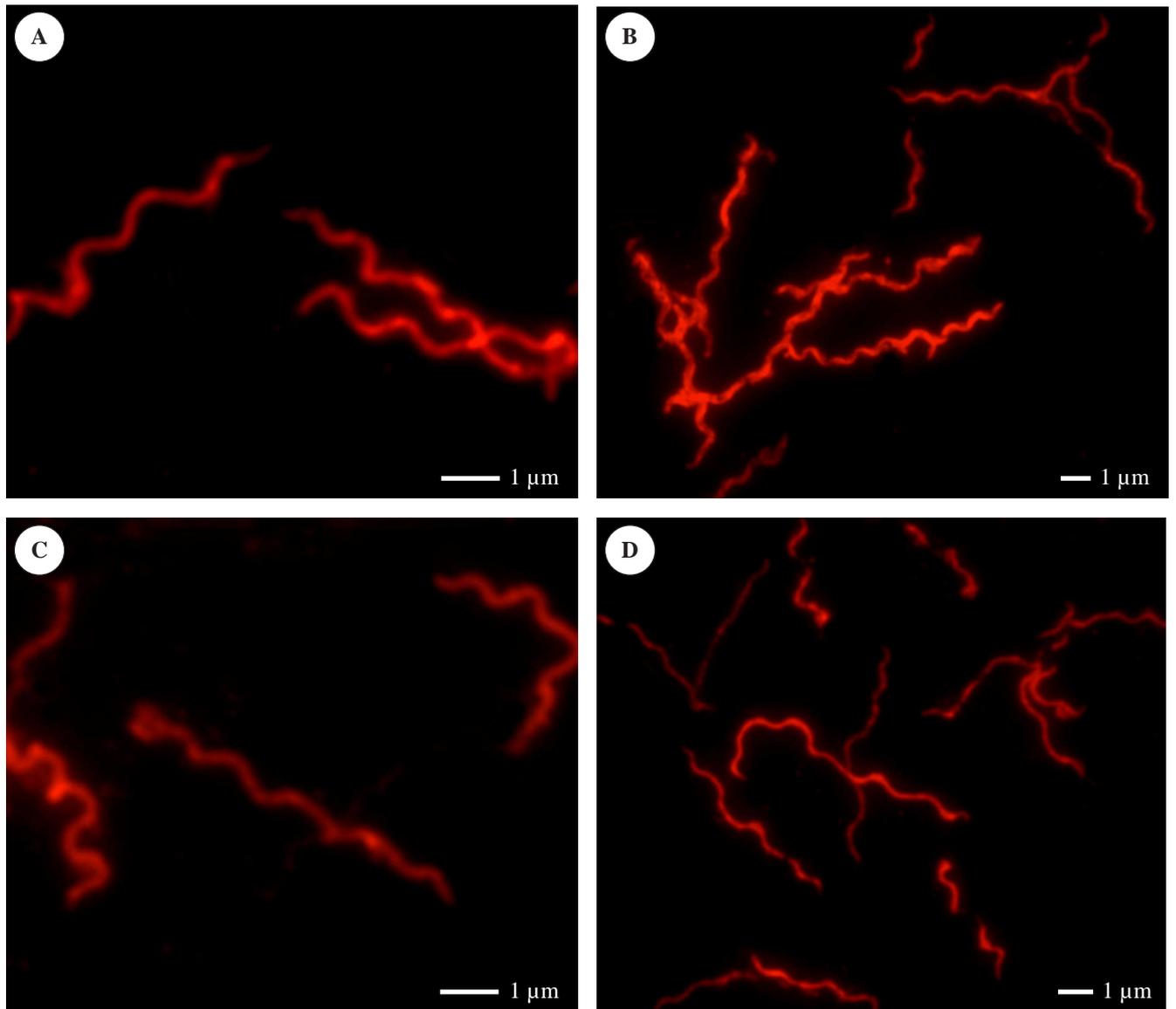
A–C: Die Borrelienzellen sind unterschiedlich stark markiert.

A: Lebendmarkierung mit dem typspezifischen MAK L22 1F10;

B: Konventionelle Fluoreszenzmarkierung mit dem typspezifischen MAK L22 1F10;

C: Lebendmarkierung mit dem breitreaktiven MAK L22 1F8;

D: Konventionelle Fluoreszenzmarkierung mit dem breitreaktiven MAK L22 1F8.

**Tafel 26**

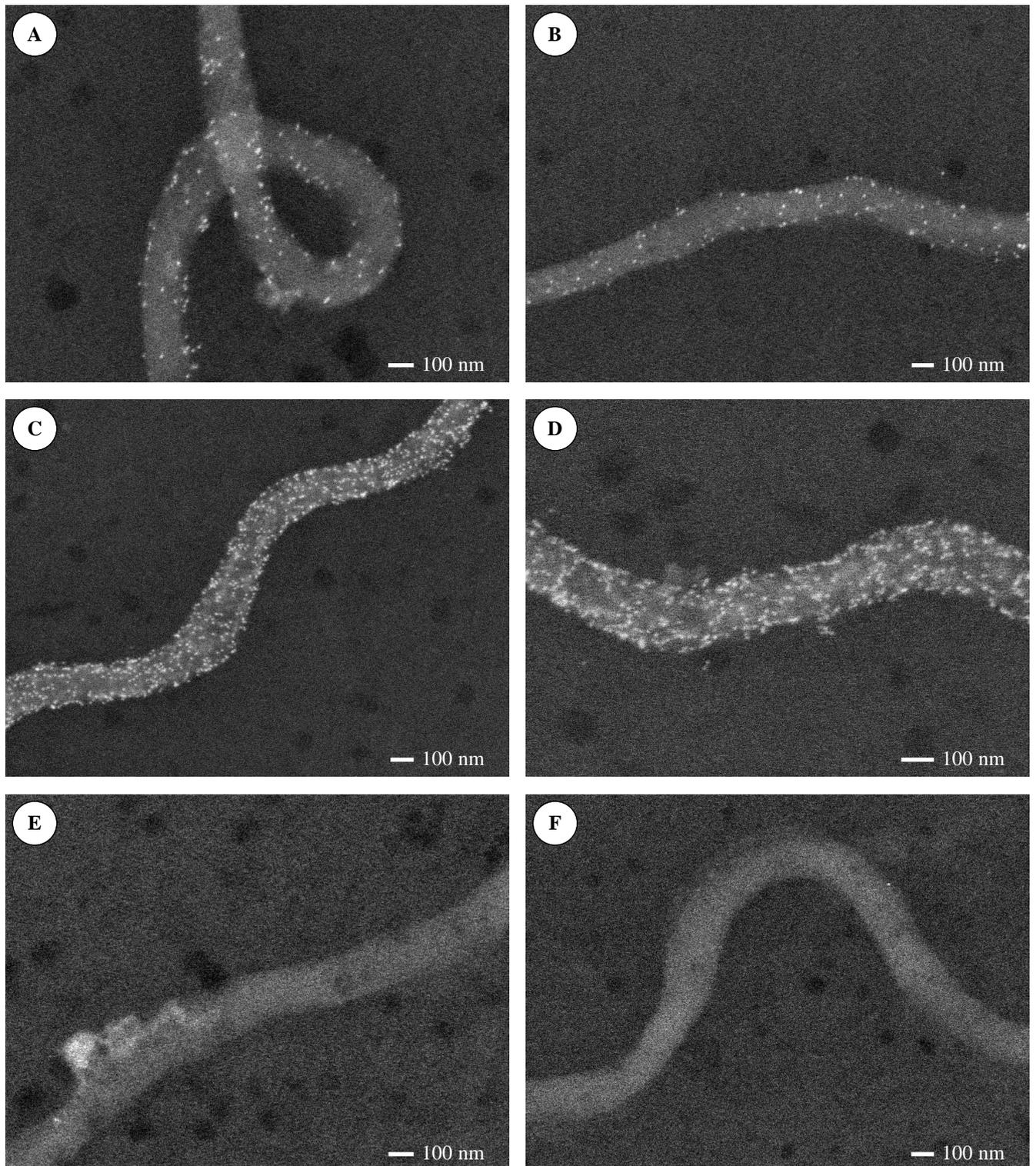
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *B. afzelii* Klon PKo97 K37 nach Markierung des OspC unter Verwendung eines Cy3 markierten sekundären Antikörpers. Unabhängig von der verwendeten Markierungsmethode und dem eingesetzten MAK zeigen die Borrelien eine starke Fluoreszenz.

A: Lebendmarkierung mit dem typspezifischen MAK L22 1F10;

B: Konventionelle Fluoreszenzmarkierung mit dem typspezifischen MAK L22 1F10;

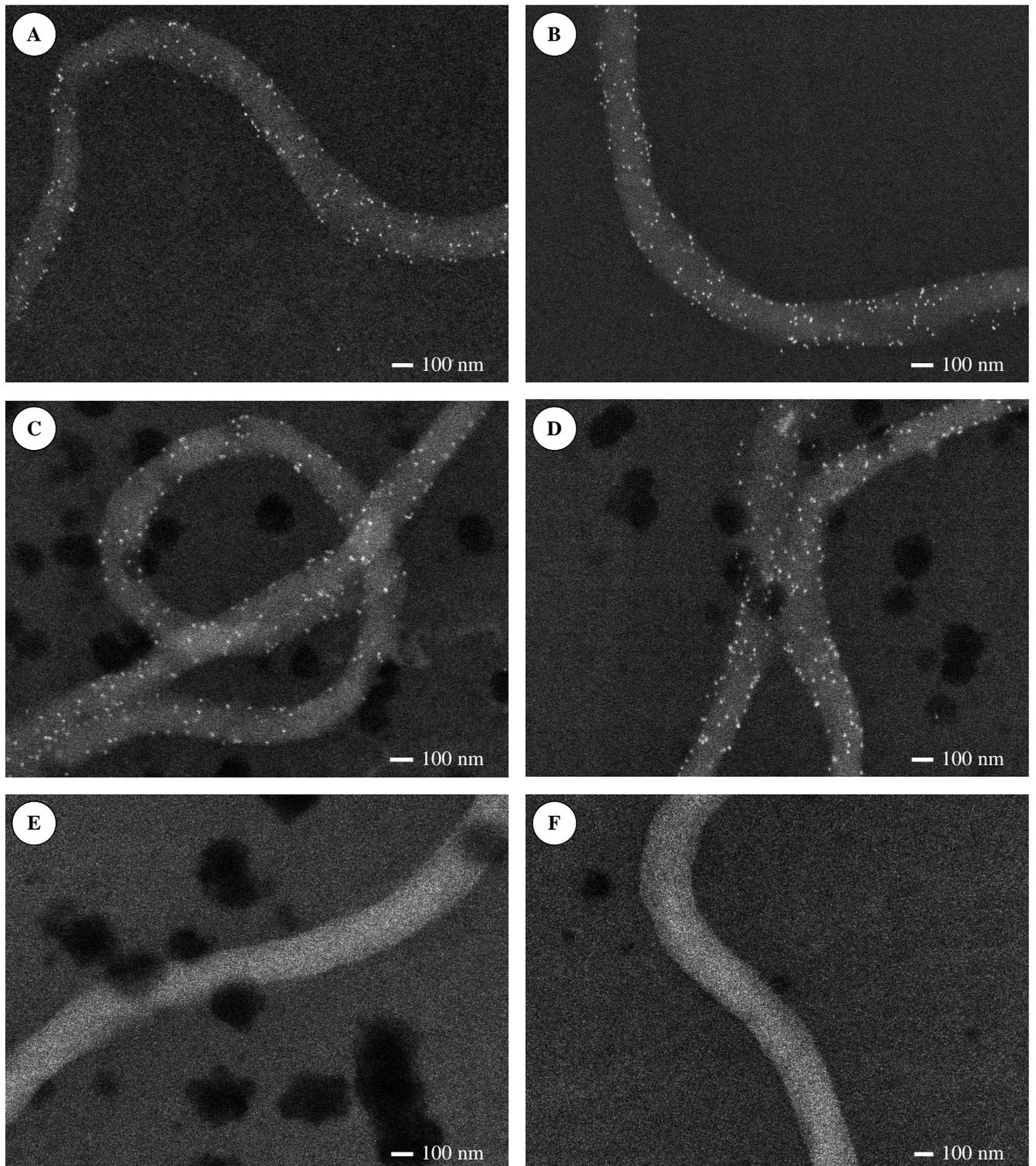
C: Lebendmarkierung mit dem breitreaktiven MAK L22 1F8;

D: Konventionelle Fluoreszenzmarkierung mit dem breitreaktiven MAK L22 1F8.

**Tafel 27**

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Immun-Gold-Markierung des OspC von *B. afzelii* Stamm PKo unter Verwendung eines sekundären Antikörpers mit 12 nm Gold-Konjugat (BSE-Signal).

A–B: Immun-Gold-Markierung mit dem typspezifischen MAK L22 1F10; das Signal ist gleichmäßig über die Oberfläche verteilt; **C–D:** Immun-Gold-Markierung mit dem breitreaktiven MAK L22 1F8; das außerordentlich starke Markierungssignal ist gleichmäßig über die Oberfläche der Borrelienzelle verteilt; **E–F:** Negativkontrolle; mit dem MAK L32 1G3 werden die Borrelien nicht markiert.

**Tafel 28**

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Immun-Gold-Markierung des OspC von *B. afzelii* Klon PKo97 K37 unter Verwendung eines sekundären Antikörpers mit 12 nm Gold-Konjugat (BSE-Signal).

A–B: Immun-Gold-Markierung mit dem typspezifischen MAK L22 1F10; das Markierungssignal ist gleichmäßig über die Oberfläche der Borrelienzelle verteilt; **C–D:** Immun-Gold-Markierung mit dem breitreaktiven MAK L22 1F8; das Markierungssignal ist gleichmäßig über die Oberfläche verteilt; **E–F:** Negativkontrolle; mit dem MAK L32 1G3 werden die Borrelien nicht markiert.

IV.6 Untersuchung der Lokalisation ausgewählter immunologisch wichtiger Oberflächenproteine an kokkoiden Morphotypen

Die kokkoiden Morphotypen haben im Vergleich zu den schraubenförmigen Borrelienzellen eine stark veränderte Oberfläche (siehe IV.3; S. 60). Die Lokalisation und Verteilung der Oberflächenproteine, die für die schraubenförmigen Zellen nachgewiesen wurden, könnten daher bei den kokkoiden Morphotypen völlig anders ausfallen. Die Lokalisation der Oberflächenproteinen wurden exemplarisch an drei vom *B. afzelii* Stamm PKo exprimierten Proteinen – Osp17, OspC und p35 – untersucht.

Lokalisation des Proteins Osp17

Die Immun-Gold-Markierung der kokkoiden Morphotypen mit dem gegen das Osp17 gerichteten MAK L17 G2 und einem mit 12 nm Gold-Kolloid konjugierten sek. AK zeigt, daß dieses Protein auch bei den kokkoiden Morphotypen auf der Oberfläche der äußeren Membran lokalisiert ist. Der Vergleich mit der Negativkontrolle zeigt, daß die Markierung spezifisch ist (**Tab. 21**). Die hohe Markierungsdichte läßt die gleichmäßige Verteilung des Osp17 auf der Oberfläche der kokkoiden Morphotypen erkennen (**Tafel 29 E, F**).

MAK	Goldkolloide/ μm^2 Oberfläche
L17 G2	105 \pm 18,2
L32 1G3 (Kontrolle)	0,7 \pm 1,3

Tab. 21 Anzahl der Goldkolloide/ μm^2 Oberfläche der kokkoiden Morphotypen bei der Markierung mit dem MAK L17 G2 und dem Kontrollantikörper.

Lokalisation des Proteins OspC

Die Immun-Gold-Markierung mit dem MAK L22 1F8 erzeugt ein deutliches Goldsignal auf der Oberfläche der äußeren Membran der kokkoiden Morphotypen (**Tab. 22**). Die Negativkontrolle, mit einem nicht mit *B. afzelii* Stamm PKo reagierenden MAK, ist nahezu frei von Markierungssignalen. Dies zeigt deutlich, daß die Immun-Gold-Markierung spezifisch ist. Die regelmäßige Verteilung der Signale über die gesamte Oberfläche der kokkoiden Morphotypen spiegelt die gleichmäßige Verteilung des OspC wider (**Tafel 29 A, B**).

MAK	Goldkolloide/ μm^2 Oberfläche
L22 1F8	$171,6 \pm 25,4$
L32 1G3 (Kontrolle)	$1,7 \pm 2,9$

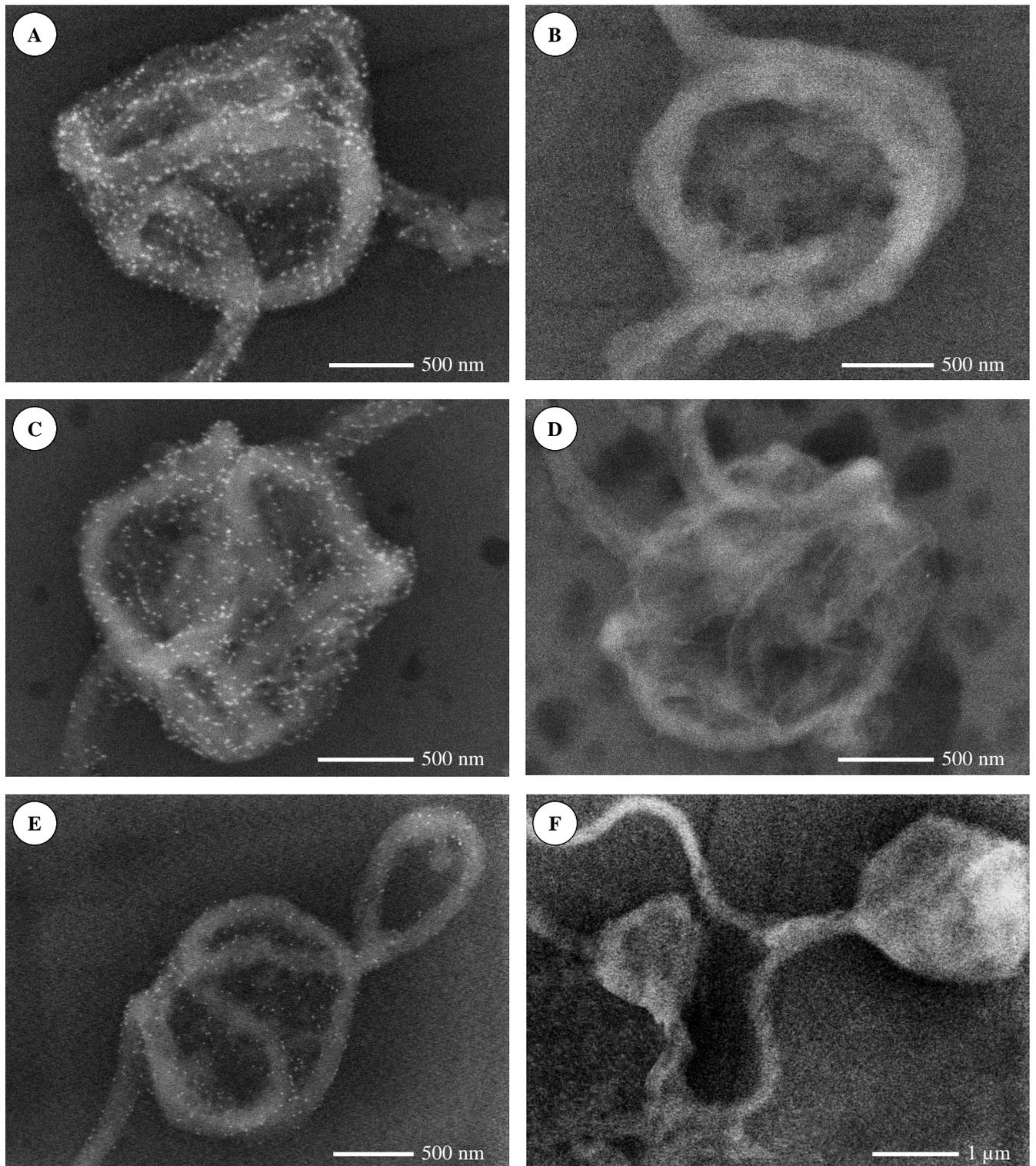
Tab. 22 Anzahl der Goldkolloide/ μm^2 Oberfläche der kokkoiden Morphotypen bei der Markierung mit dem MAK L22 1F8 und dem Kontrollantikörper.

Lokalisation des Proteins p35

Die Immun-Gold-Markierung mit dem MAK L35 1F4 zeigt, daß auch das Protein p35 bei den kokkoiden Morphotypen auf der Oberfläche der äußeren Membran lokalisiert ist. Die hohe Dichte der Goldmarkierung mit 39 Goldsignalen/ μm^2 läßt eine Aussage über die Verteilung des Proteins zu. Sie zeigt deutlich die gleichmäßige Verteilung des Proteins p35 an (**Tafel 29 C, D**). Der Vergleich der Markierung mit der Negativkontrolle bestätigt, daß das Goldsignal spezifisch ist (**Tab. 23**).

MAK	Goldkolloide/ μm^2 Oberfläche
L35 1F4	$128,7 \pm 20,1$
L32 1G3 (Kontrolle)	$1,3 \pm 2,3$

Tab. 23 Anzahl der Goldkolloide/ μm^2 Oberfläche der kokkoiden Morphotypen bei der Markierung mit dem MAK L35 1F4 und dem Kontrollantikörper.



Tafel 29

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Immun-Gold-Markierung der kokkoiden Morphotypen von *B. afzelii* Stamm PKo unter Verwendung eines sekundären Antikörpers mit 12 nm Gold-Konjugat (BSE-Signal).

A: Immun-Gold-Markierung mit dem gegen das OspC gerichteten MAK L22 1F8; C: Immun-Gold-Markierung mit dem gegen das p35 gerichteten MAK L35 1F4; E: Immun-Gold-Markierung mit dem gegen das Osp17 gerichteten MAK L17 G2; A, C, E: Die Markierungssignale sind gleichmäßig über die Oberfläche verteilt; B, D, F: Negativkontrollen; mit dem MAK L32 1G3 werden die Borrelien nicht markiert.

IV.7 Interaktion von Borrelien mit humanen Astrozyten (Zelllinie 1321N1)

Die Interaktion von Borrelien mit humanen Astrozyten (Zelllinie 1321N1) wurde am Beispiel von zwei verschiedenen Borrelienspezies untersucht. Es wurden *B. afzelii* Stamm PKo, ein Hautisolat und *B. garinii* Stamm PBi, ein Liquorisolat verwendet. Für *B. garinii* Stamm PBi wurde, wie für *B. afzelii* Stamm PKo (siehe IV.2; S. 46), zunächst eine Wachstumskurve unter Standard-Kulturbedingungen erstellt, um für die Koinkubationsversuche für beide Stämme eine vergleichbare Ausgangssituation zu gewährleisten. Die Borrelien wurden zu den verschiedenen Zeitpunkten im LM im Dunkelfeld gezählt und die Zellzahlen/ml anhand der im Max-von-Pettenkofer Institut verwendeten Methode berechnet (**Tab. 24**).

Zeit	Zellzahl 1	Zellzahl 2	Mittelwert
0 Std.	$1,5 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	$1,55 \times 10^6$
24 Std.	$2,7 \times 10^6$	$3,3 \times 10^6$	$3,0 \times 10^6$
48 Std.	$5,3 \times 10^6$	$5,1 \times 10^6$	$5,2 \times 10^6$
72 Std.	$7,6 \times 10^6$	$7,8 \times 10^6$	$7,7 \times 10^6$
96 Std.	$1,0 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$
144 Std. (6 Tage)	$1,7 \times 10^7$	$5,3 \times 10^7$	$3,5 \times 10^7$
192 Std. (8 Tage)	$3,6 \times 10^7$	$5,6 \times 10^7$	$4,6 \times 10^7$
240 Std. (10 Tage)	$4,4 \times 10^7$	$6,2 \times 10^7$	$5,3 \times 10^7$

Tab. 24 Übersicht über die nach der im Max von Pettenkofer Institut verwendeten Methode ermittelten Borrelienzahlen/ml des *B. garinii* Stamms PBi zu den verschiedenen Zeiten.

Aus den Mittelwerten (**Tab. 24**) ergibt sich für die log-Phase eine mittlere Teilungsrate von $0,03 \text{ Std.}^{-1}$ und eine Generationszeit von 32 Std. unter Standardkulturbedingungen.

Die Wachstumskurve wurde sowohl für die beiden Parallelversuche, als auch für die daraus errechneten Mittelwerte aufgestellt (**Abb. 9**). Als Impfkultur wurden Borrelien aus der log-Phase einer Kultur eingesetzt, wie dies im Standard-Kulturprotokoll vorgesehen ist. Die Wachstumskurve läßt keine lag-Phase erkennen. Die Borrelien befinden sich von Anfang an in der log-Phase, die nach etwa 144 Std. (6 Tagen) Kulturdauer langsam in die stationäre Phase übergeht. Borrelien beider Stämme (*B. afzelii* PKo und *B. garinii* PBi) werden nach 5 Tagen Kulturdauer

für die Koinkubationsversuche eingesetzt. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich beide Stämme in der log-Phase.

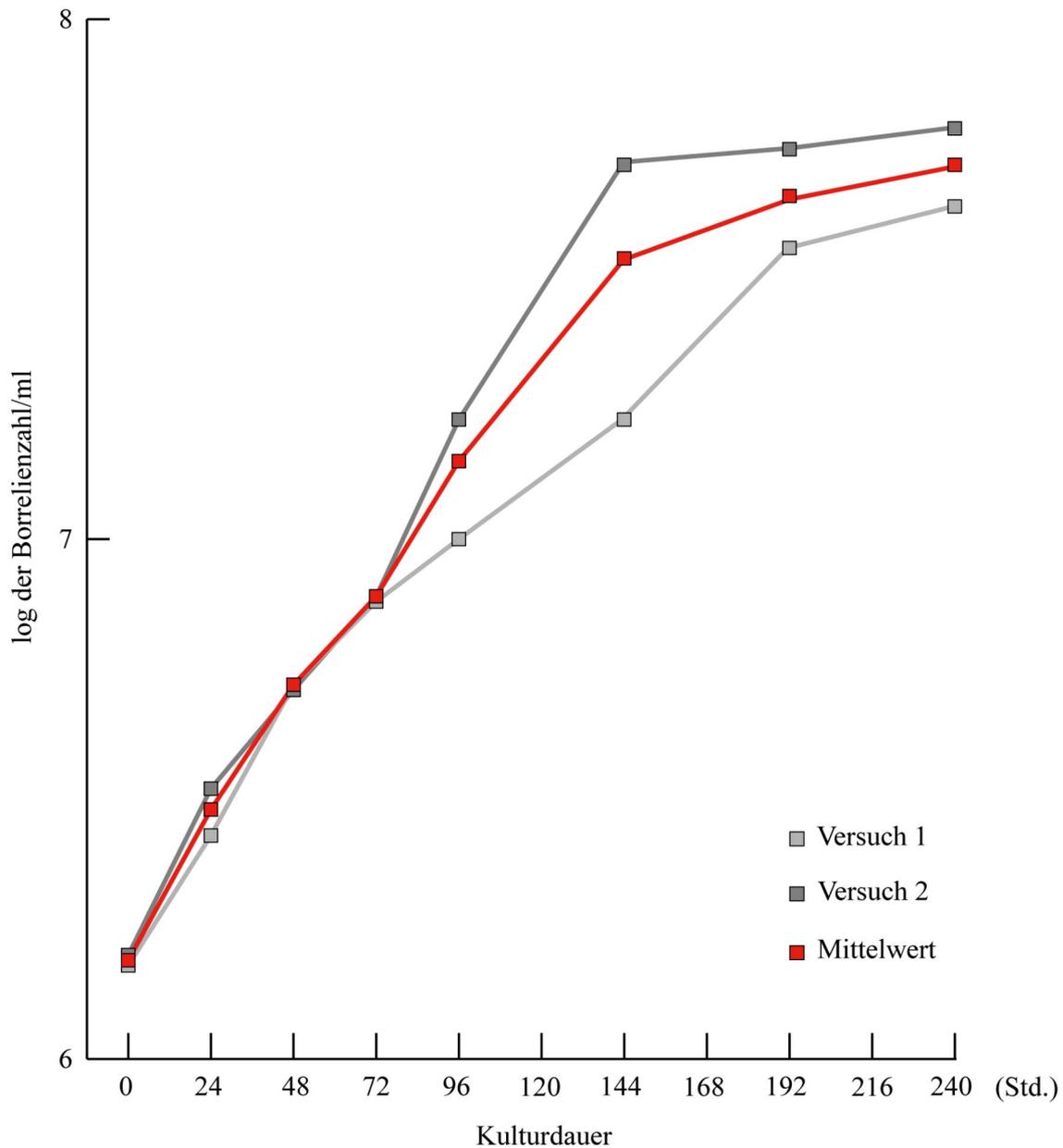


Abb. 9 Wachstumskurve von *B. garinii* Stamm PBi unter Standard-Kulturbedingungen mit log-Phase Borrelien als Impfkultur.

Die Koinkubationsversuche der Borrelien mit den Astrozyten wurden über einen Gesamtzeitraum von 12 bzw. 24 Std. in je zwei Parallelen durchgeführt. Die Inkubation der Astrozyten mit den Borrelien wurde nach 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 1 Std., 2 Std., 4 Std., 12 Std. und

24 Std. gestoppt, um die Anzahl der adhärierenden Borrelien lichtmikroskopisch zu bestimmen. Bereits nach 5 min Koinkubationsdauer sind bei der lichtmikroskopischen Betrachtung bei beiden Stämmen 1–3 adhärente Borrelienzellen/10 Astrozyten zu finden (**Tafel 30 A, B**). Im weiteren Zeitverlauf adhäreren immer mehr Borrelien an die Astrozyten (**Tafel 30 C-F**). Während der ersten Stunde des Koinkubationsversuchs adhäriert der *B. afzelii* Stamm PKo mit 12–14 Borrelien/10 Astrozyten nur etwas häufiger an die Astrozyten als der *B. garinii* Stamm PBi. Hier sind etwa 7–9 Borrelien/10 Astrozyten zu beobachten (**Tab. 25; 26**). In der Zeit zwischen 1–12 Std. Koinkubationsdauer nimmt die Anzahl der adhärerten Borrelien weiter zu, wobei ab einer Koinkubationsdauer von 1–2 Std. Borrelien des *B. afzelii* Stamms PKo deutlich häufiger an die Astrozyten adhäreren als solche des *B. garinii* Stamms PBi (**Tab. 25; 26**). Nach 2 Std. Koinkubationsdauer sind mit 25–49 Borrelien/10 Astrozyten bereits annähernd doppelt so viele Borrelien des *B. afzelii* Stamms PKo an den Astrozyten zu finden, wie solche des *B. garinii* Stamms PBi mit nur 17–19 Borrelien/10 Astrozyten (**Tab. 25; 26**). Diese Tendenz setzt sich auch im weiteren Zeitverlauf fort. Allerdings ist nach 24 Std. Koinkubationsdauer eine Zählung der adhärenen Borrelien nicht mehr möglich. Borrelien beider Stämme sind nach dieser Zeit so stark miteinander verklumpt, daß es ist einzelne Borrelienzellen nicht mehr zu unterscheiden sind. Allerdings kann man erkennen, daß die Anzahl der adhärenen Borrelien gegenüber dem 12 Std.-Wert weiter zugenommen hat.

Während sich der *B. garinii* Stamm PBi in allen drei durchgeführten Versuchen annähernd gleich verhält, variiert die Zahl der adhärerten Borrelien des *B. afzelii* Stamms PKo erheblich (**Abb. 10; 11**). Die Anzahl der Borrelien des *B. afzelii* Stamms PKo nach 12 Std. variiert von 62 Borrelien/10 Astrozyten bis 108 Borrelien/10 Astrozyten (**Tab. 25**). Im Gegensatz dazu sind bei der Inkubation mit *B. garinii* Stamm PBi nach diesem Zeitraum eine relativ konstante Anzahl von 37–44 Borrelien/10 Astrozyten zu beobachten (**Tab. 26**). In allen Versuchen ist, trotz dieser Schwankung, ein deutlicher Unterschied im Adhäsionsverhalten zwischen den beiden Stämmen vorhanden. *B. afzelii* Stamm PKo adhäriert nach 12 Std. 1,6–2,5 mal so häufig an die Astrozyten wie *B. garinii* Stamm PBi.

<i>B. afzelii</i>	5 min	10 min	20 min	30 min	1 Std.	2 Std.	4 Std.	12 Std.
Versuch 1	1,7 ±	2,6 ±	5,7 ±	8,9 ±	12,3 ±	48,9 ±	62,3 ±	108,1 ±
	2,1	2,1	2,7	4,9	3,2	6,3	6,4	25,1
Versuch 2	1,2 ±	2,0 ±	3,3 ±	7,8 ±	11,9 ±	25,3 ±	42,0 ±	61,5 ±
	0,9	1,6	1,8	3,4	3,2	6,4	6,5	7,9
Versuch 3	1,9 ±	2,6 ±	4,1 ±	8,3 ±	14,2 ±	36,3 ±	47,3 ±	72,3 ±
	1,6	1,7	2,1	3,4	8,0	7,2	7,8	13,3

Tab. 25 Anzahl der adhärierenden Borrelien des *B. afzelii* Stamms PKo pro 10 Astrozyten zu bestimmten Zeiten nach Koinkubationsbeginn.

<i>B. garinii</i>	5 min	10 min	20 min	30 min	1 Std.	2 Std.	4 Std.	12 Std.
Versuch 1	2,4 ±	3,8 ±	4,3 ±	5,5 ±	9,3 ±	18,6 ±	25,8 ±	42,7 ±
	2,1	2,9	1,8	2,9	4,1	6,5	9,5	14,3
Versuch 2	0,9 ±	1,9 ±	3,3 ±	5,1 ±	7,2 ±	17,9 ±	22,4 ±	36,6 ±
	0,8	1,3	3,1	2,1	2,5	4,4	4,9	6,8
Versuch 3	3,3 ±	4,9 ±	5,5 ±	5,8 ±	8,2 ±	16,9 ±	23,7 ±	43,9 ±
	3,2	3,2	2,3	2,3	2,2	6,7	5,8	10,1

Tab. 26 Anzahl der adhärierenden Borrelien des *B. garinii* Stamms PBi pro 10 Astrozyten zu bestimmten Zeiten nach Koinkubationsbeginn.

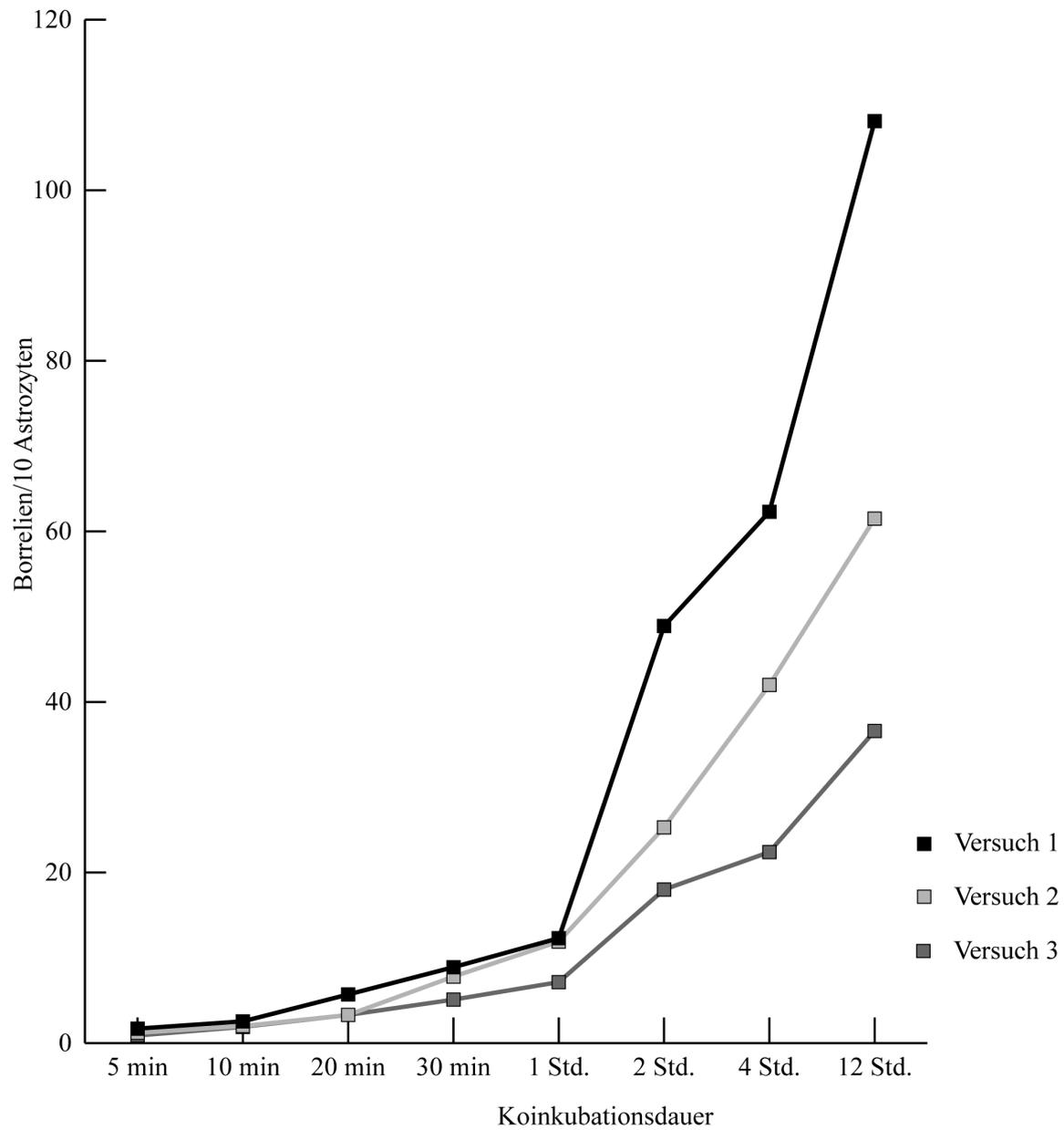
B. afzelii Stamm PKo

Abb. 10 Graphische Darstellung der Anzahl adhärerender Borrelien des *B. afzelii* Stamms PKo pro 10 Astrozyten zu bestimmten Zeiten nach Koinkubationsbeginn.

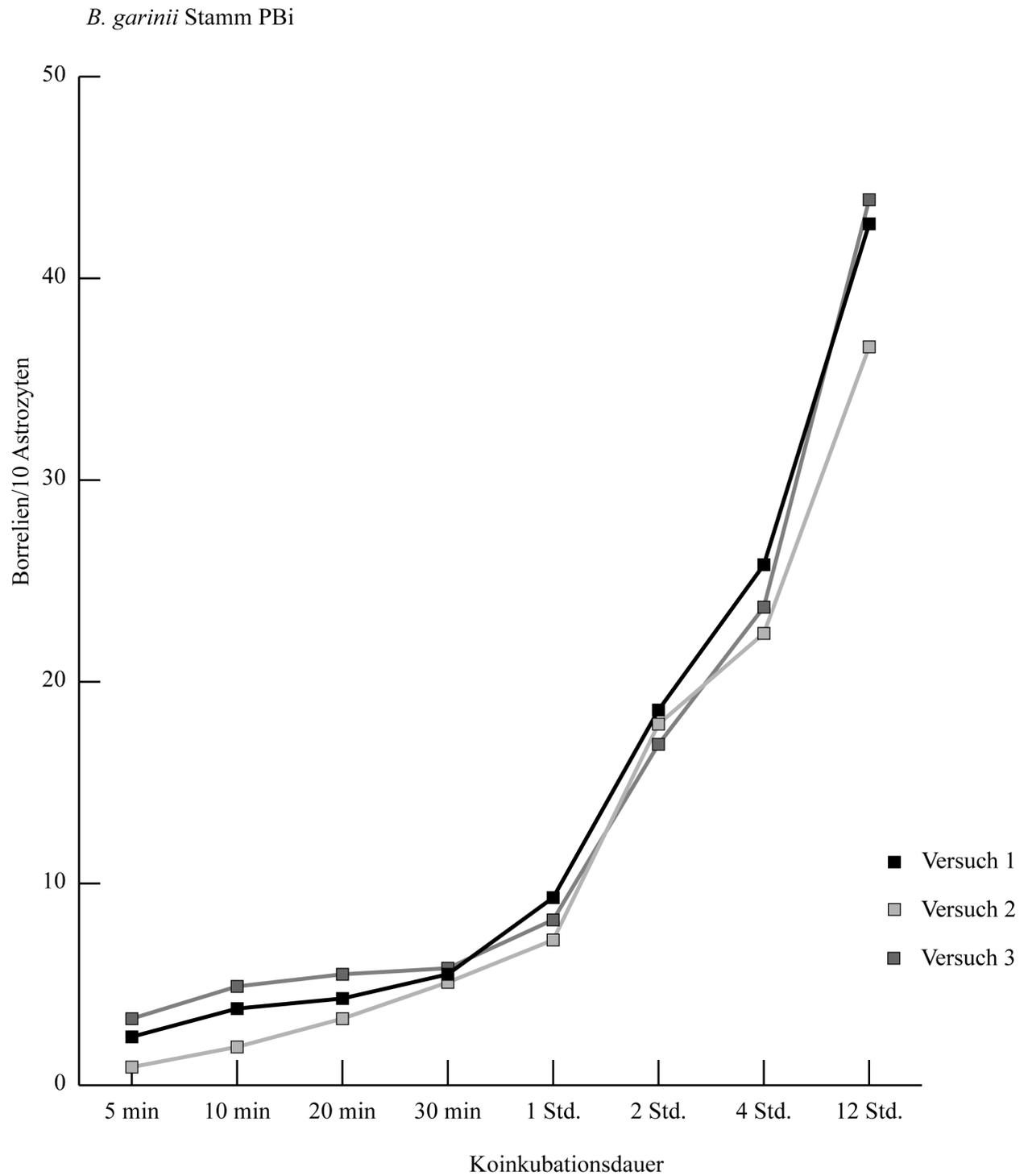


Abb. 11 Graphische Darstellung der Anzahl der adhärierenden Borrelien des *B. garinii* Stamms PBi pro 10 Astrozyten zu bestimmten Zeiten nach Koinkubationsbeginn.

Zur Untersuchung der ultrastrukturellen Merkmale der Adhärenz von Borrelien an Astrozyten wurden Proben nach 12 Std. und 24 Std. Koinkubationsdauer für die Rasterelektronenmikroskopie präpariert. Außerdem wurden Astrozyten, die ohne Borrelien kultiviert wurden als Negativkontrolle untersucht.

Astrozyten bilden nach 12–36 Std. Inkubationszeit auf Deckgläschen einen einschichtigen, mehr oder weniger lückenlosen Zellverband aus (**Tafel 31 A**). Die Zellen sind relativ flach und der Zellkörper der Astrozyten variiert zwischen annähernde spindelförmigen, drei- oder rechteckigen Formen. Die Zellen besitzen mehrere dicke und viele sehr dünne Zellausläufer mit denen sie auf dem Untergrund „verankert“ sind (**Tafel 31 B**). Auch auf der Zelloberfläche befinden sich meist mehrere dünne Zellausläufer. Im Gegensatz dazu ist die Oberfläche einiger Zellen ist fast völlig frei von solchen Ausläufern (**Tafel 31 C, D**). Darüber hinaus sind auf der Zelloberfläche häufig langgezogene Falten zu erkennen.

Durch die Koinkubation der Astrozyten mit den Borrelien ändert sich die Oberfläche der Astrozyten in den meisten Fällen nicht. Vereinzelt sind jedoch an den Kontaktstellen von Borrelien und Astrozyten schwach ausgeprägte Membranaufwölbungen zu beobachten. Borrelien beider Stämme interagieren im wesentlichen mit den dünnen Zellausläufern der Astrozyten. Diese Zellausläufer legen sich dabei über die Borrelien (**Tafel 32 A; 33 A, C**). Hierbei ist es nicht von Bedeutung, ob die Borrelien mit Ausläufern der Zelloberfläche oder mit solchen am Rand der Astrozyten in Kontakt treten. Darüber hinaus findet man die Borrelien auch an den Grenzen zwischen zwei Zellen (**Tafel 32 B**). Ferner lagen sich Borrelien in den stärker ausgeprägten Falten auf der Zelloberfläche an (**Tafel 32 C, D**). Gelegentlich sind Borrelien jedoch auf Astrozyten mit einer völlig glatten Oberfläche zu finden. In diesen Fällen ist keine strukturelle Veränderung der Astrozytenoberfläche beim Kontakt mit Borrelien zu erkennen (**Tafel 33 B, D**).

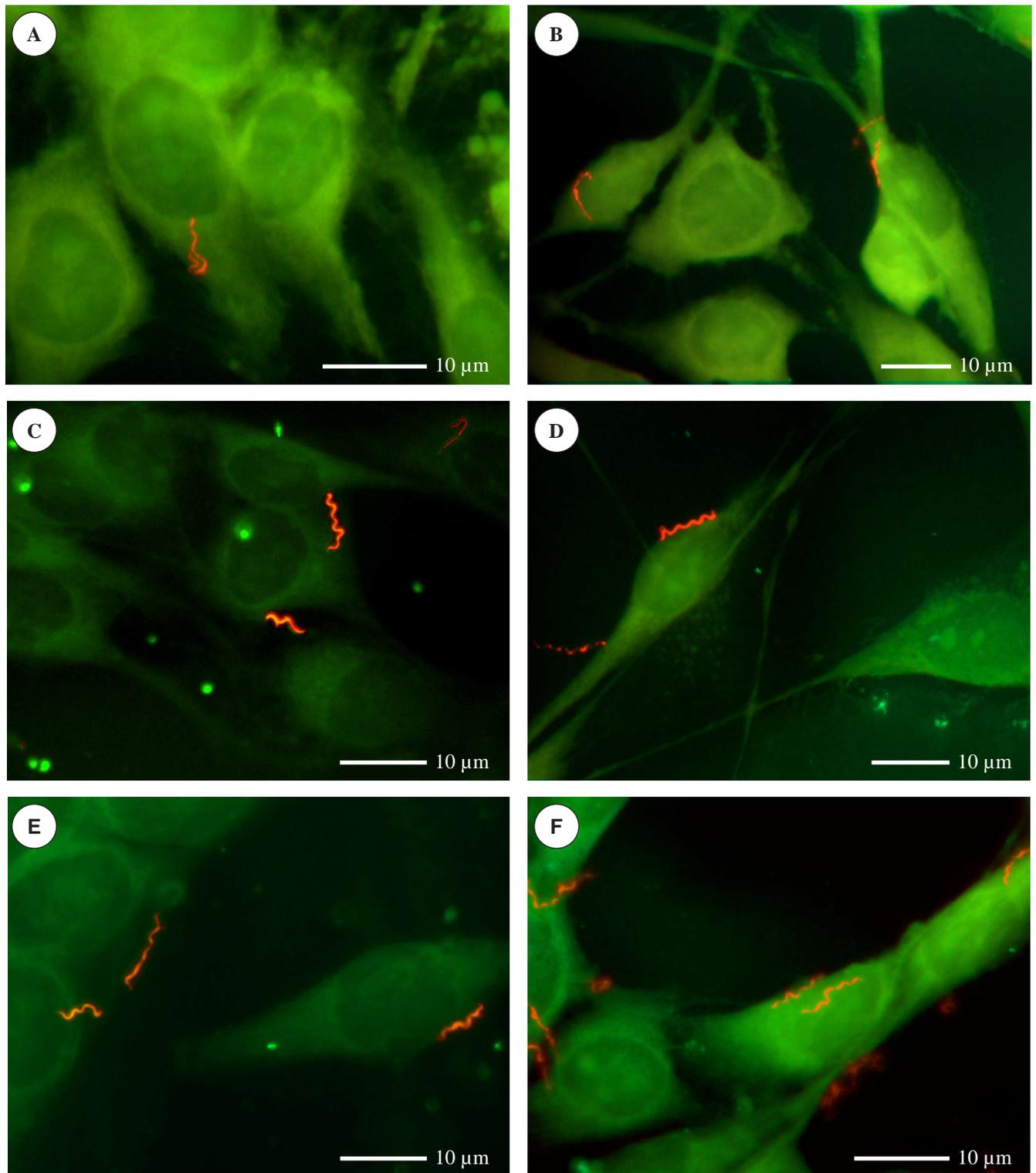
Die Adhärenz der Borrelien an die Astrozyten ist ungerichtet. Die Borrelien können sowohl mit ihrer Spitze als auch der Länge nach an die Oberfläche der Astrozyten binden. An mehreren Stellen scheinen Borrelien der beiden untersuchten Stämmen in die Zellen einzudringen (**Tafel 32 D-F; 33 E, F**). Dieses Eindringen der Borrelien läßt sich sowohl nach einer Koinkubationsdauer von 12 Std. als auch nach 24 Std. beobachten. In einigen Fällen ist dabei eine leichte Aufwölbung der Zelloberfläche zu erkennen, die das Ende der Borrelienzelle umschließt (**Tafel 32 F**). Häufig jedoch ist die Oberfläche der Astrozyten im Bereich um das sichtbare Ende der Borrelienzelle herum besonders unregelmäßig ausgebildet, wodurch eine genaue

Untersuchung erschwert wird. Die Zelloberfläche ist in diesem Bereich von granulärem Material bedeckt oder ein Zellausläufer überlagert die mutmaßliche Eindringstelle (**Tafel 32 E; 33 E, F**). Die in die Astrozyten eindringenden Borrelien sind zudem in den meisten Fällen nicht kürzer als die in ihrer Gesamtlänge sichtbaren Borrelien. Daher kann man nicht sicher davon ausgehen, daß die Borrelien tatsächlich in die Zellen eindringen und von ihnen aufgenommen werden. Vielmehr könnte auch nur das Ende der Borrelienzelle durch Falten auf der Oberfläche der Astrozyten verdeckt sein.

Insgesamt zeigen diese Versuche daß die Interaktion von Borrelien und Astrozyten nie zu einer ultrastrukturell sichtbaren Schädigung der Zellen führt. Auch nach 24 Std. Koinkubationsdauer sind die Astrozyten intakt. Bei keinem der beiden untersuchten Stämme führt die Adhärenz der Borrelien während des Versuchszeitraums zu einer Zerstörung der Zellschicht. Sie bleibt durchgehend geschlossen und die Astrozyten bleiben auch während der Inkubation mit den Borrelien fest am Untergrund verankert.

Die Ergebnisse der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen lassen vermuten, daß die Borrelien in die Astrozyten eindringen. Daher wurden nach 12 bzw. 24 Std. Koinkubationsdauer Präparate für die Transmissionselektronenmikroskopie hergestellt, um zu überprüfen, ob die Borrelienzellen tatsächlich in die Astrozyten eindringen. Hierfür wurden die Astrozyten zunächst auf Melinexfolie kultiviert, da diese zusammen mit der Zellschicht geschnitten werden kann. Die Astrozyten zeigen jedoch im Gegensatz zu der Kultur auf Deckgläschen ein deutlich verlangsamtes Wachstum. Erst nach 48–72 Std. bilden die Zellen eine annähernd geschlossene Zellschicht. Außerdem zeigen die Astrozyten bei der Kultur auf Melinexfolie bereits während der lichtmikroskopischen Kontrolle der Zellkultur eine stark abgerundete Gestalt und besitzen nur wenige Zellausläufer mit denen sie am Untergrund verankert sind. Auch am Ultradünnschnitt durch die Astrozyten ist ein Unterschied in der Zellform zwischen Astrozyten, die auf Melinexfolie kultiviert wurden und solchen, die auf Deckgläschen gewachsen sind, zu erkennen. Astrozyten, die auf Deckgläschen kultiviert wurden, flachen im Randbereich allmählich ab. Nach der Kultur auf Melinexfolie sind die Astrozyten deutlich abgerundet (**Tafel 34 A**). Ein flach auslaufender Randbereich, wie er bei der Kultur auf Deckgläschen entsteht, ist hier nicht zu erkennen. Im folgenden wurden daher die Astrozyten auf Deckgläschen kultiviert und die entstandene Zellschicht zusammen mit den adhärenzten Borrelien, nach der Fixierung mit Osmium, vorsichtig vom Untergrund abgelöst (**Tafel 34 B**).

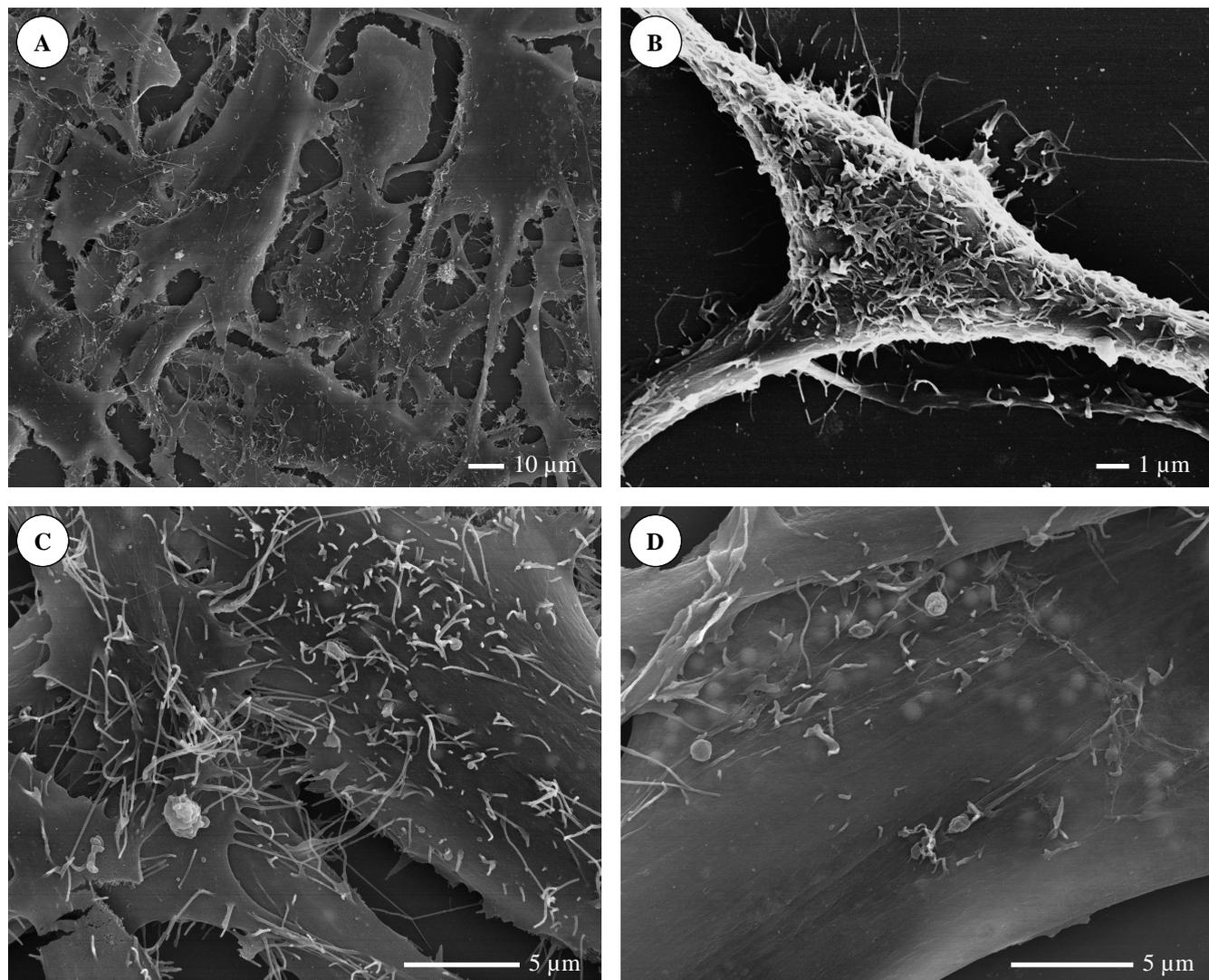
Bei der transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchung der Koinkubationspräparate kann man im Randbereich der Astrozyten Borrelien erkennen. Einige der Borrelien werden von Zellausläufer eingeschlossen (**Tafel 34 C, D**). Diese Zellausläufer können sich entlang der Borrelien, die außerhalb der Astrozyten liegen, bilden und diese umschließen. Dies läßt sich auch anhand weniger aufeinanderfolgender Ultradünnschnitte beobachten (**Tafel 36**). Abgesehen von den Borrelien im Randbereich der Astrozyten, die nur von den Zellausläufern umschlossen sind, kann man sowohl nach 12 Std. als auch nach 24 Std. Koinkubationsdauer Borrelien innerhalb der Astrozyten erkennen (**Tafel 35**). Sowohl Borrelien des *B. afzelii* Stamms PKo, als auch solche des *B. garinii* Stamms PBi sind innerhalb der Astrozyten zu finden. Kurze Serien von Ultradünnschnitten dienen zur Bestätigung der intrazellulären Lage einer bestimmten Borrelienzelle, da sie die Untersuchung der Lokalisation dieser Borrelienzelle über einen größeren Bereich hinweg erlauben (**Tafel 37**). Die in den Astrozyten liegenden Borrelienzellen erscheinen auf Grund ihrer ultrastrukturellen Merkmale intakt. Innere Membran, Zellwand und äußere Membran sind erhalten und meist deutlich zu erkennen. Bei geeigneter Lage der Borrelienzelle im Ultradünnschnitt sind auch die Endoflagellen sichtbar (**Tafel 35 A, D**). Die Borrelienzellen liegen meist in einem membranumschlossenen Raum im Zytoplasma der Astrozyten. Derartige intrazellulär liegende Borrelien finden sich sowohl in den Randbereichen der Astrozyten, als auch in zentral gelegenen Bereichen in der Nähe des Zellkerns. Einige wenige Borrelienzellen sind hingegen nicht von einer zusätzlichen Membran umschlossen. Diese Borrelien liegen frei im Zytoplasma der Astrozyten. Das Protoplasma dieser Borrelien ist meist stärker kontrastiert, als das von Borrelien die in Vesikeln oder außerhalb der Astrozyten lokalisiert sind (**Tafel 35 E, F**). Darüber hinaus unterscheiden sie sich jedoch nicht von den Borrelien, die in den Vesikeln zu erkennen sind. Gelegentlich liegen auch mehrere Borrelien gemeinsam in einem Vesikel. Neben den deutlich zu erkennenden intakten Borrelien sind diese Vesikeln jedoch zusätzlich mit granulärem Material angefüllt (**Tafel 35 D**).

**Tafel 30**

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Koinkubationspräparate von Astrozyten (Zelllinie 1321N1) und Borrelien; Färbung der Astrozyten mit *Vybrant DiO Cell-Labeling Solution* (Molecular Probes); Markierung der Borrelien mit dem MAK L41 1C11 und einem Cy3 markierten sekundären Antikörper;

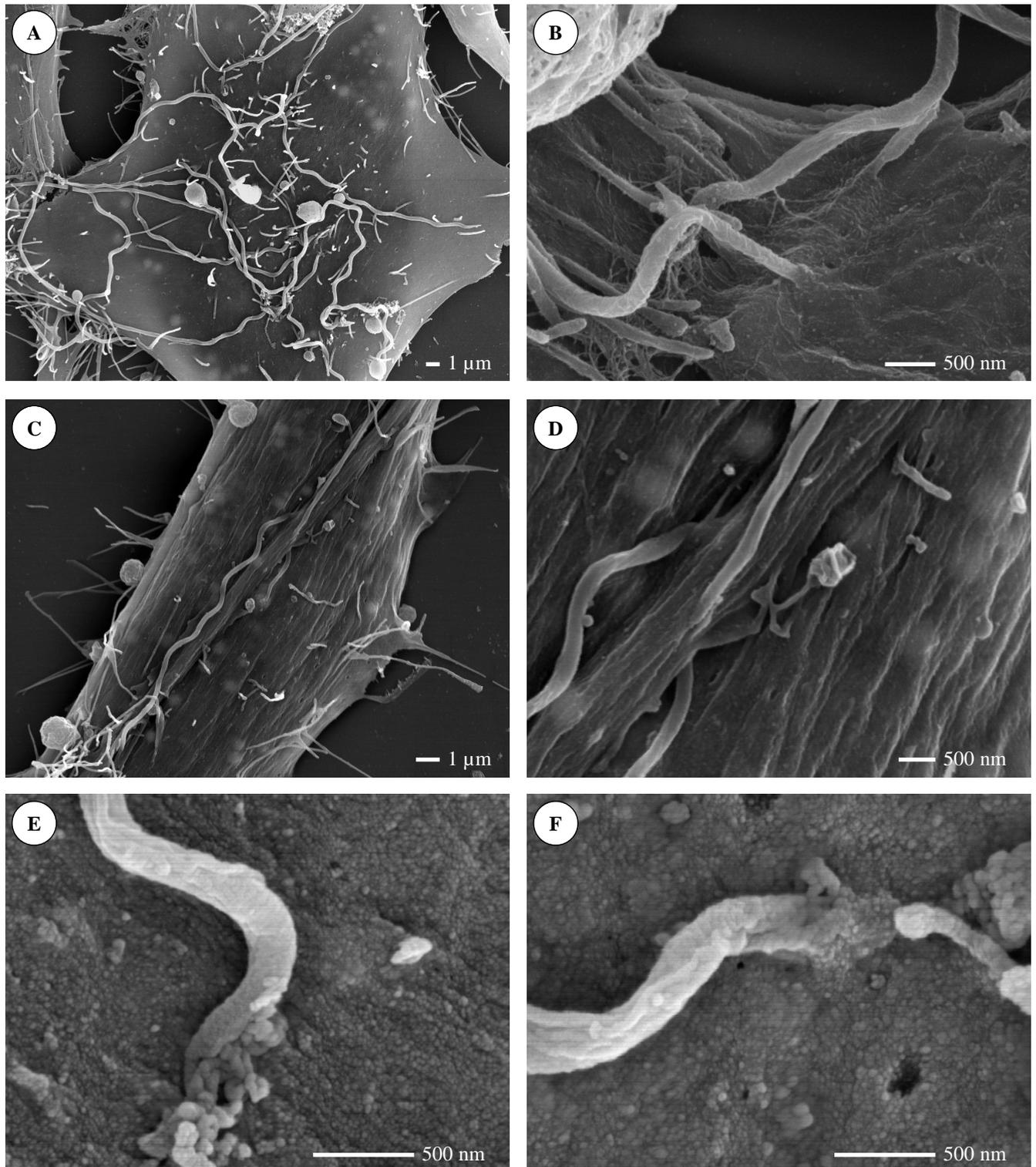
A, C, E: Koinkubation der Astrozyten mit *B. garinii* Stamm PBi nach 5 min (A), 20 min (C) und 45 min (E) Koinkubationsdauer;

B, D, F: Koinkubation der Astrozyten mit *B. afzelii* Stamm PKo nach 5 min (B), 20 min (D) und 45 min (F).

**Tafel 31**

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Astrozyten (Zelllinie 1321N1) nach 48 h Kultur auf Deckgläschen.

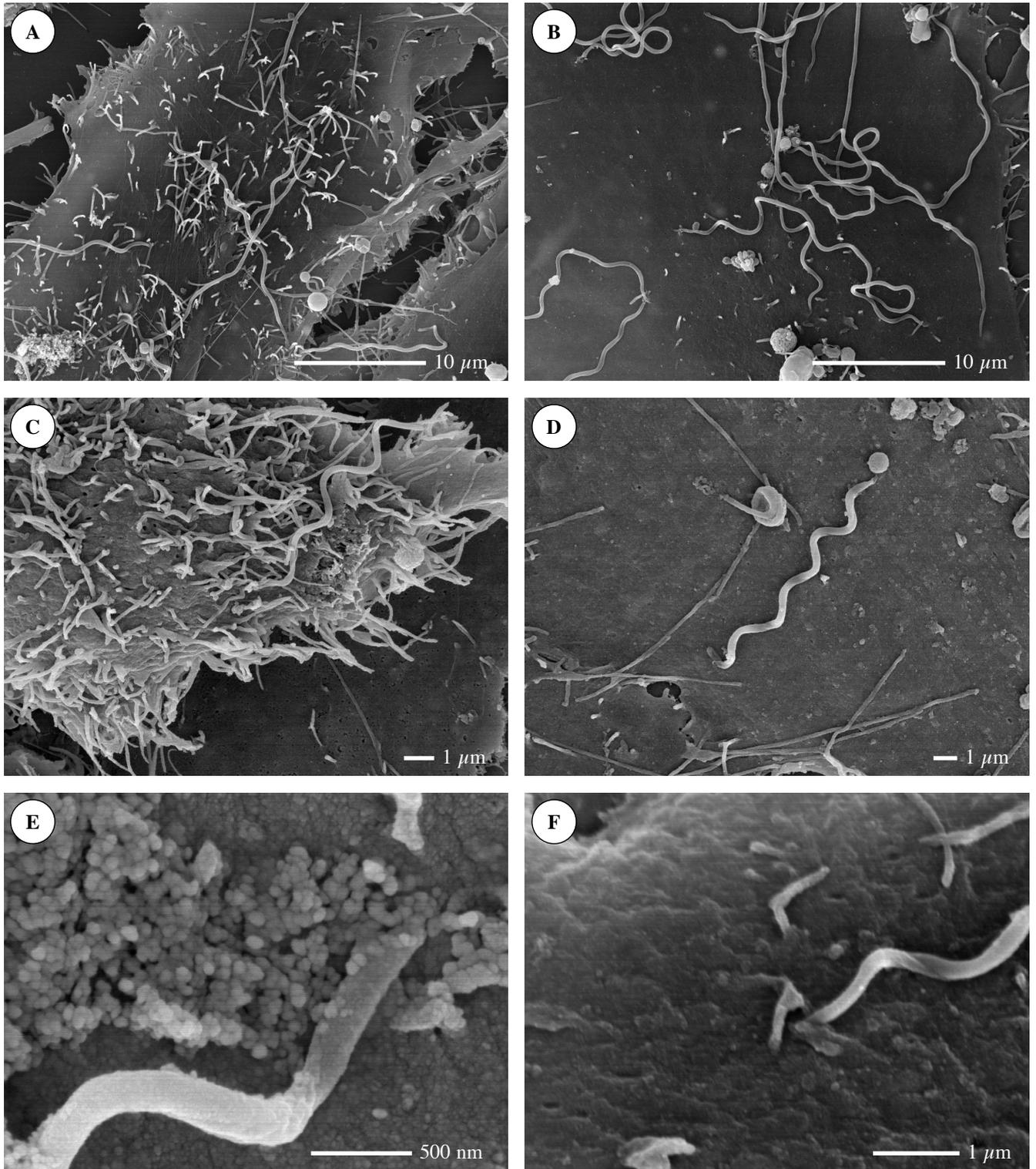
- A:** Übersicht; nach 48 h Kulturdauer sind die Astrozyten flächig ausgebreitet und bilden eine nahezu geschlossene Zellschicht;
- B:** Die Astrozyten bilden mehrere breite und viele dünne Zellausläufer aus, mit denen sie auf dem Untergrund haften. Die Oberfläche der Astrozyten ist entweder dicht mit Zellausläufern bedeckt (**C**), oder nahezu glatt (**D**).

**Tafel 32**

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Koinkubationspräparate von Astrozyten (Zelllinie 1321N1) mit *B. afzelii* Stamm PKo.

A–E: 24 h Koinkubationsdauer; F: 12 h Koinkubationsdauer.

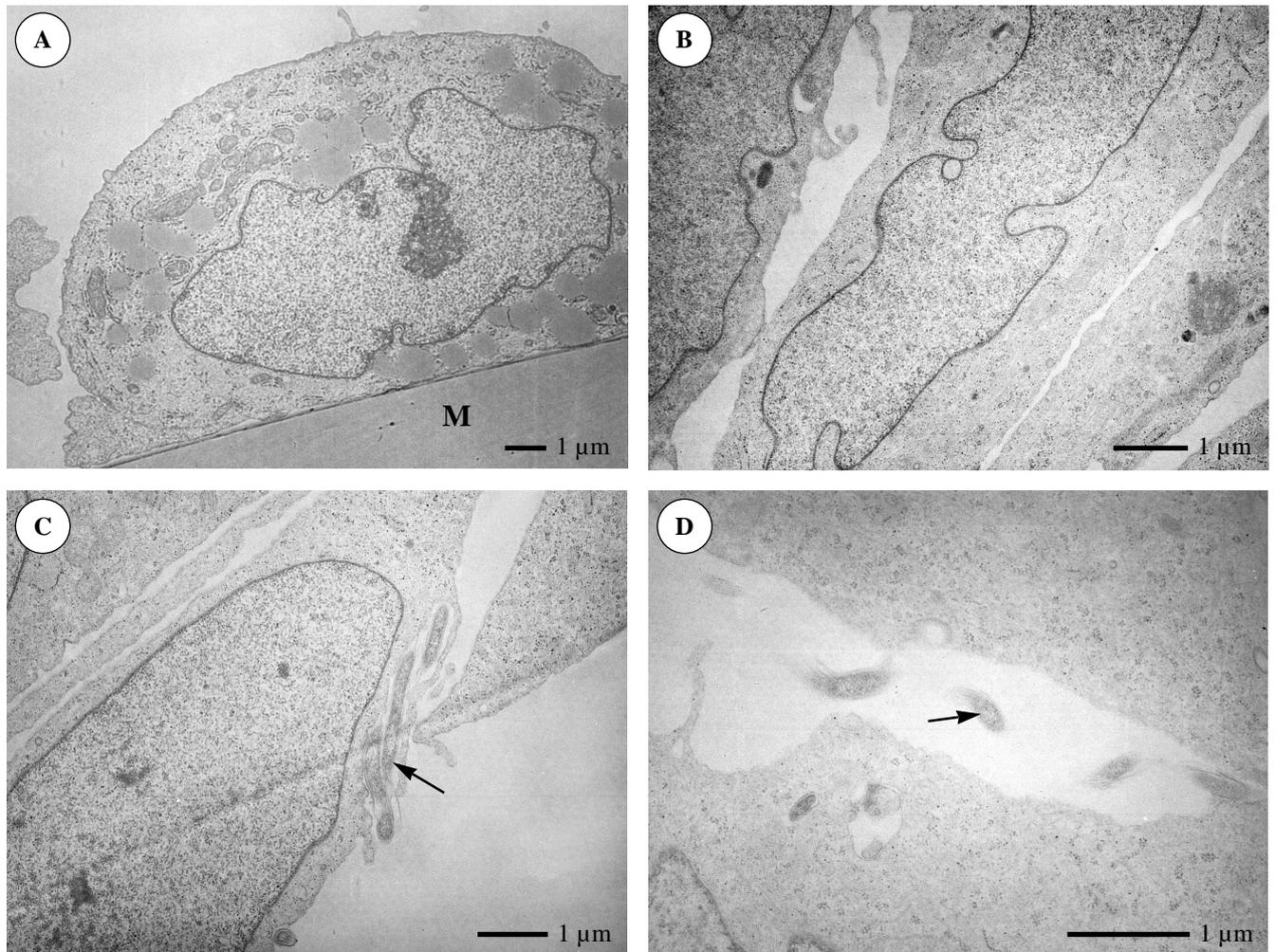
A: Die Borrelien adhären auf der Oberfläche der Astrozyten; B: Eine Borrelienzelle dringt an der Zellgrenze zwischen zwei Astrozyten in die Astrozyte ein; C–D: Die Borrelien adhären in den Falten auf der Oberfläche der Astrozyte; D: Detail aus C; E: Die Oberfläche ist im Bereich um die Kontaktstelle mit der Borrelienzelle mit granulärem Material bedeckt; F: Die Borrelienzelle dringt in die Astrozyte ein. Im Bereich der Eindringstelle ist die Oberfläche der Astrozyte leicht aufgewölbt.

**Tafel 33**

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Koinkubationspräparate von Astrozyten (Zelllinie 1321N1) mit *B. garinii* Stamm PBI.

A, B, C, E: 24 h Koinkubationsdauer; **D, F:** 12 h Koinkubationsdauer.

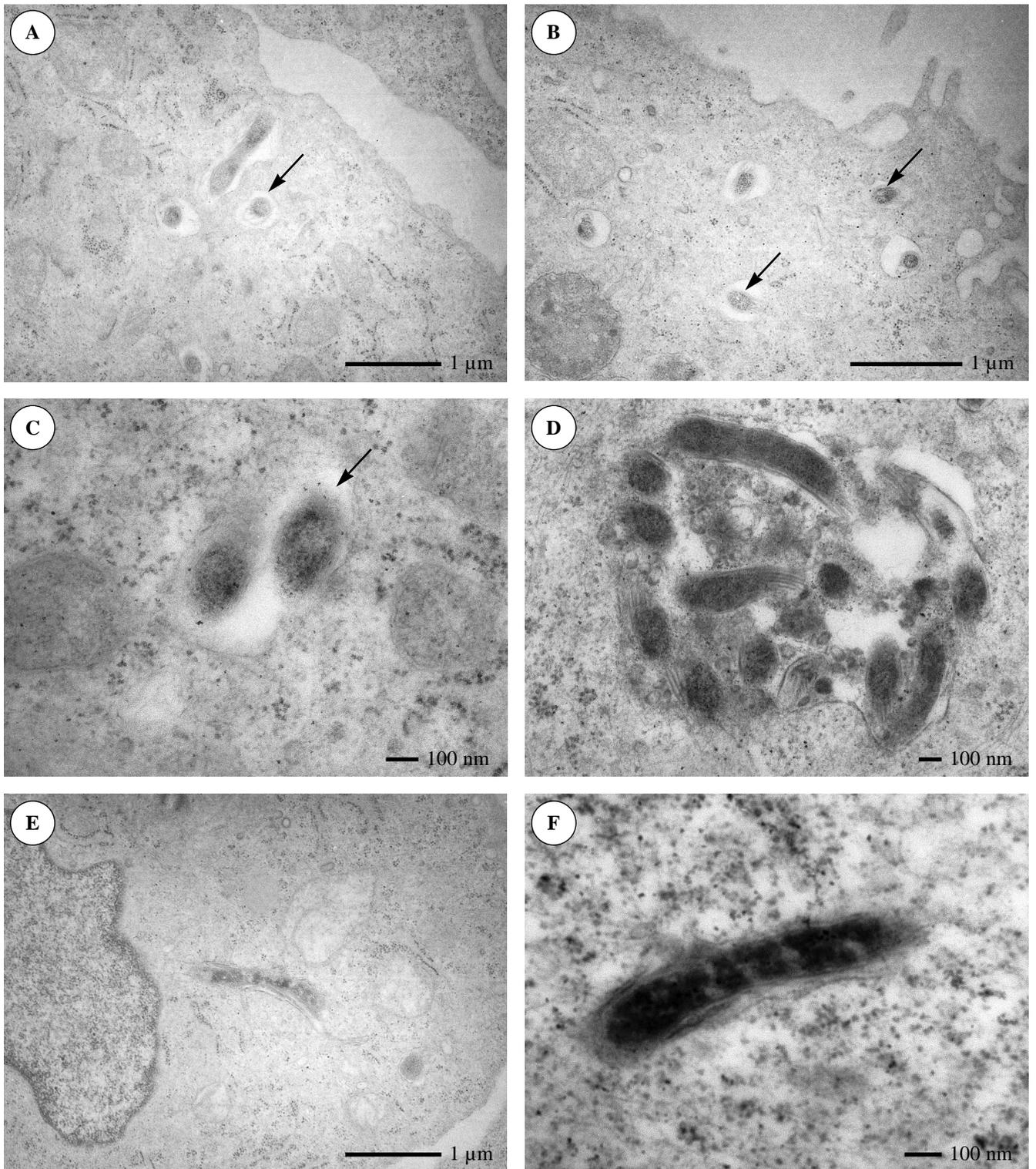
A: Die Borrelien adhäreren auf der Oberfläche der Astrozyten; **B:** Die Borrelien adhäreren auf Astrozyten mit nahezu glatter Oberfläche; **C:** Die Borrelien liegt zwischen den Zellausläufern auf der Oberfläche der Astrozyten; **D:** Die glatte Zelloberfläche zeigt keine Reaktion auf die adhärerende Borrelienzelle; **E:** Die Oberfläche ist im Bereich der Kontaktstelle mit der Borrelienzelle mit granulärem Material bedeckt; **F:** Die Borrelienzelle dringt in die Astrozyte ein.



Tafel 34

Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Astrozyten (Zelllinie 1321N1).

- A:** Astrozyte nach 48 h Kultur auf Melinexfolie (M); die Astrozyte besitzt eine ungewöhnlich glatte Oberfläche ohne Ausläufer und eine stark abgerundete Gestalt;
- B:** Astrozyten nach 48 h Kultur auf Deckgläschen; im Zytoplasma sind mehrere stark kontrastierte Einschlüsse zu erkennen;
- C:** Astrozyten nach 12 h Koinkubation mit *B. afzelii*; die Borrelien befinden sich an der Oberfläche der Astrozyten und werden von Zellausläufern umschlossen (Pfeil);
- D:** Astrozyten nach 12 h Koinkubation mit *B. garinii*; die Borrelienzelle liegt zwischen zwei Astrozyten (Pfeil);

**Tafel 35**

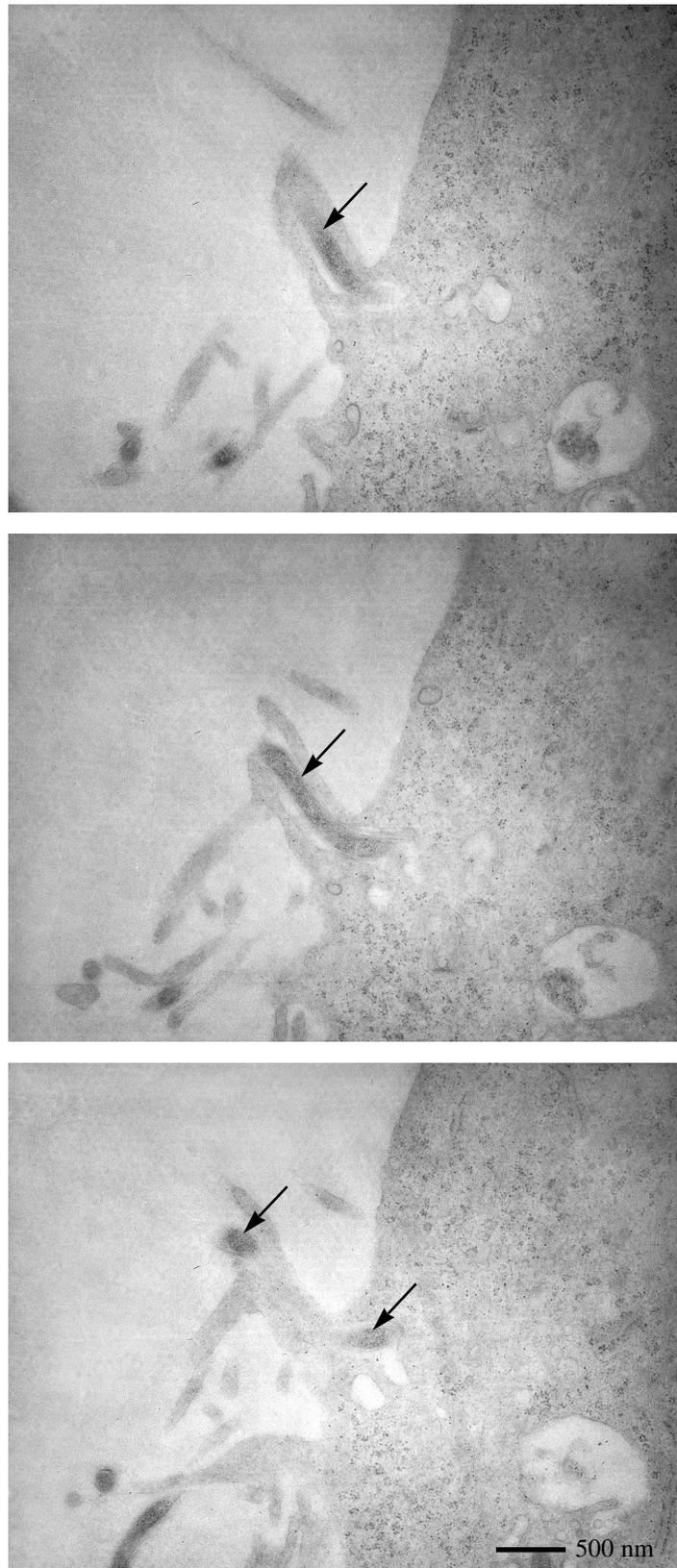
Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Astrozyten (Zelllinie 1321N1) nach 24 h Koinkubation mit Borrelien;

A, E: *B. afzelii*; **B, C, D, F: *B. garinii*.**

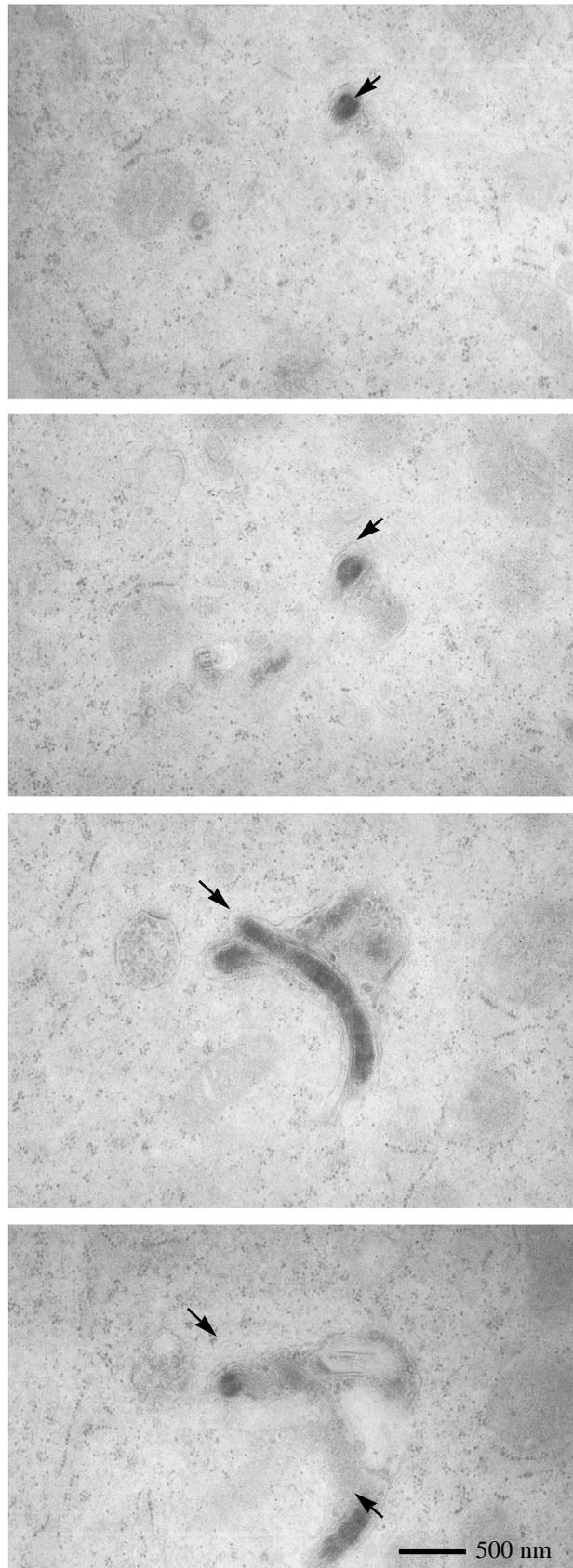
A–C: Die intrazellulären Borrelien liegen in Vesikeln im Zytoplasma der Astrozyten (Pfeile); an einigen Stellen ist die Membran, die die Vesikel begrenzt deutlich zu erkennen;

D: In einzelnen Fällen sind mehrere Borrelien in einem Vesikel zu beobachten;

E–F: Einige Borrelien liegen direkt im Zytoplasma des Astrozyten; sie sind nicht von einer zusätzlichen Membran umgeben; das Protoplasma dieser Borrelien zeigt Degenerationserscheinungen.

**Tafel 36**

Drei aufeinanderfolgende Ultradünnschnitten aus dem Randbereich einer Astrozyte (Zelllinie 1321N1) nach der Koinkubation mit *B. garinii*; ein Zellausläufer umschließt die Borrelienzelle (Pfeile).

**Tafel 37**

Kurze Serie von aufeinanderfolgenden Ultradünnschnitten zweier *B. garinii* Zellen (Pfeile) in einer Astrozyte (Zelllinie 1321N1); An allen vier Schnitten ist zu erkennen, daß die Borrelien innerhalb der Astrozyte lokalisiert sind.

V Diskussion

V.1 Ultrastrukturelle Charakterisierung der Borrelienzelle aus der *in vitro* Kultur

Die rasterelektronenmikroskopischen Ergebnisse zeigen eindeutig, daß Borrelienzellen eine schraubenförmige Gestalt besitzen (**Tafel 2 A, B; 5 A**). Diese Beobachtung stimmt mit den Beschreibungen anderer Autoren überein, die von einer schraubenförmigen Gestalt der Borrelienzelle sprechen (BARBOUR und HAYES, 1986; KIMSEY und SPIELMAN, 1990). Der Schraubendurchmesser nimmt mit zunehmendem Kulturalter ab, wobei die Zellen eine nahezu gestreckte Form annehmen. Die von verschiedenen Autoren (GOLDSTEIN et al., 1994, LI et al., 2000; MOTALEB et al., 2000) beschriebene „Wellenform“ der Zellen konnte an keinem der für die Beurteilung der dreidimensionalen Gestalt geeigneten Präparate beobachtet werden.

Der strukturelle Aufbau von *B. afzelii* zeigt alle wesentlichen Merkmale, die für die Zellen von Spirochäten charakteristisch sind. Sie bestehen aus einem Protoplasmazyliner, der von der inneren Membran und der Zellwand begrenzt wird (**Tafel 4 D**). Der an die Zellwand anschließende periplasmatische Raum enthält Endoflagellen, deren Anzahl bei den einzelnen Gattungen unterschiedlich ist. Der periplasmatische Raum wird von der äußeren Membran umschlossen (MADIGAN et al., 1997). Die Endoflagellen stellen ein typisches Merkmal aller Spirochäten dar. Die Anzahl der Endoflagellen, sowie deren genaue Anordnung innerhalb des periplasmatischen Raums wird jedoch, zumindest für die Gattung *Borrelia*, kontrovers diskutiert. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß die Untersuchung der Endoflagellen außer durch ihre Lage unterhalb der äußeren Membran zusätzlich durch die schraubenförmige Gestalt der Borrelienzelle erschwert wird. Außerdem geht man davon aus, daß die Anzahl der Endoflagellen nicht nur zwischen verschiedenen Borrelienarten, sondern auch innerhalb eines Stammes variiert. Die Literaturwerte für die Anzahl der Ansatzstellen schwanken daher zwischen 3 und 10 pro Zellende, die Anzahl der Flagellen zwischen 3 und 18 pro Borrelienzelle (HAYES und BURGDORFER, 1993).

Frühe ultrastrukturelle Untersuchungen an Spirochäten kamen zu dem Ergebnis, daß eine bestimmte Flagelle an beiden Zellenden inseriert und dadurch die schraubenförmige Gestalt der Spirochätenzellen verursacht wird (BRADFIELD und CATER, 1952; RYTER und PILLOT, 1963; SWAIN, 1955). Neuere Untersuchungen an verschiedenen Spirochätengattungen, wie *Treponema* und *Leptospira*, beschreiben jedoch einheitlich, daß jede Flagelle nur an einem Zellende ansetzt

und frei endet (DETTORI et al., 1987; NAUMAN et al., 1969). Auch verschiedene Untersuchungen an Borrelien gelangen zu dem Ergebnis, daß die einzelnen Flagellen frei enden (BARBOUR and HAYES, 1986; HOVIND-HOUGEN, 1974; JOHNSON et al., 1984 a). Die Frage, ob die Flagellen beider Zellenden in der Zellmitte überlappen oder nicht, wird jedoch für verschiedene Gattungen kontrovers diskutiert (BIRCH-ANDERSEN et al., 1973; DETTONI et al., 1987; JOHNSON et al., 1984 a). Der Überlappungsbereich der Flagellen kann auch bei Borrelien nicht eindeutig bestimmt werden. Trotzdem ist es sehr wahrscheinlich daß die Flagellen der Borrelien im Bereich der Zellmitte überlappen. An den Zellenden von *B. afzelii* sind 5–9 Ansatzstellen der Flagellen zu erkennen, wohingegen bei der Mehrzahl der Querschnitt durch die Borrelienzelle 13–18 Endoflagellen sichtbar sind (**Tafel 4 D; 5 C, D**). Die Ansatzstellen der Flagellen sind nur nach der Negativkontrastierung darstellbar. Durch die Überlagerung der Flagellenansatzstellen mit dem Protoplasmazyylinder können nicht immer alle Ansatzstellen bei der Zählung erfaßt werden. Auf diese Weise läßt sich die Schwankungsbreite bezüglich der Anzahl der Flagellenansatzstellen erklären. Im Querschnitt sind also etwa doppelt so viel Flagellen zu erkennen, wie Ansatzstellen an einem Zellende vorhanden sind. Die Anzahl der Flagellen, die im Negativkontrast über die gesamte Zelllänge hinweg sichtbar sind ist jedoch mit 10–13 Flagellen deutlich niedriger (**Tafel 6**). Dieser Unterschied kann jedoch durch die Anordnung der Flagellen in zwei Reihen bedingt sein (**Tafel 4 D; Abb. 5**). Bei der Negativkontrastierung können sich einzelne Flagellen gegenseitig verdecken, so daß nur ein Teil deutlich zu unterscheiden ist. Die Grenzen der Überlappungszone sind auch bei *B. afzelii* nicht zu erkennen. Hierbei muß berücksichtigt werden, daß die Flagellen um den Protoplasmazyylinder gewunden sind und so wiederholt Bereiche vorhanden sind, in denen der Verlauf der Flagellen nicht eindeutig nachvollzogen werden kann. Die Anzahl der Flagellen ist daher nicht immer genau zu erkennen ist. Da bei den verschiedenen Querschnitten nur selten weniger als 15 Einzelflagellen vorhanden sind, ist es durchaus wahrscheinlich, daß die beiden Flagellenbündel nicht nur in der Zellmitte, sondern über einen größeren Bereich hinweg einander überlappen. Die vorliegenden Ergebnisse deuten insgesamt darauf hin, daß an jedem Zellende 7–9 Flagellen inserieren. Diese bilden ein Bündel, das im mittleren Zellbereich mit dem Flagellenbündel des anderen Zellendes überlappt. Gestützt wird diese Annahme dadurch, daß weder im Querschnitt noch im REM Borrelien mit mehr als einem Flagellentunnel beobachtet werden konnten. Im Überlappungsbereich müssen also die Flagellen beider Seiten als ein Bündel in einem gemeinsamen Tunnel lokalisiert sein.

Auf Grund der detaillierten Ergebnisse zur Ultrastruktur der Borrelienzelle ist es möglich, den Aufbau der Zellhülle von Borrelien, aus einem Bereich des Querschnitts, der keine

Endoflagellen enthält, mit den von WANNER (unveröffentlicht) erstellten Modellen zum Aufbau der Zellhülle von Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien zu vergleichen (**Abb. 12**). Borrelien werden auf Grund ihres Färbeverhaltens den Gram-negativen Bakterien zugeordnet (WILSKE et al., 1991). Auch der grundlegende Aufbau der Zellhülle der Borrelien entspricht dem Gram-negativen Bakterien. Beide besitzen eine äußere Membran und eine im Vergleich zu Gram-positiven Bakterien dünne Zellwand. Die Zellwand der Borrelien ist jedoch mit 6 nm dicker als die der Gram-negativen Bakterien, die nur 2–3 nm dick ist. Auch die Anordnung der einzelnen Elemente zueinander ist unterschiedlich. Während bei Gram-negativen Bakterien der Abstand zwischen Cytoplasmamembran und Zellwand größer ist als der zwischen Zellwand und äußerer Membran verhält es sich bei den Borrelienzellen genau umgekehrt. Hier ist der Abstand der Zellwand zur äußeren Membran größer als derjenige zur Cytoplasmamembran. Besonders auffällig ist die Cytoplasmamembran der Borrelien. Sie weicht mit einer Dicke von nur 4 nm deutlich von den für Membranen typischen Werten von 7–8 nm Dicke ab.

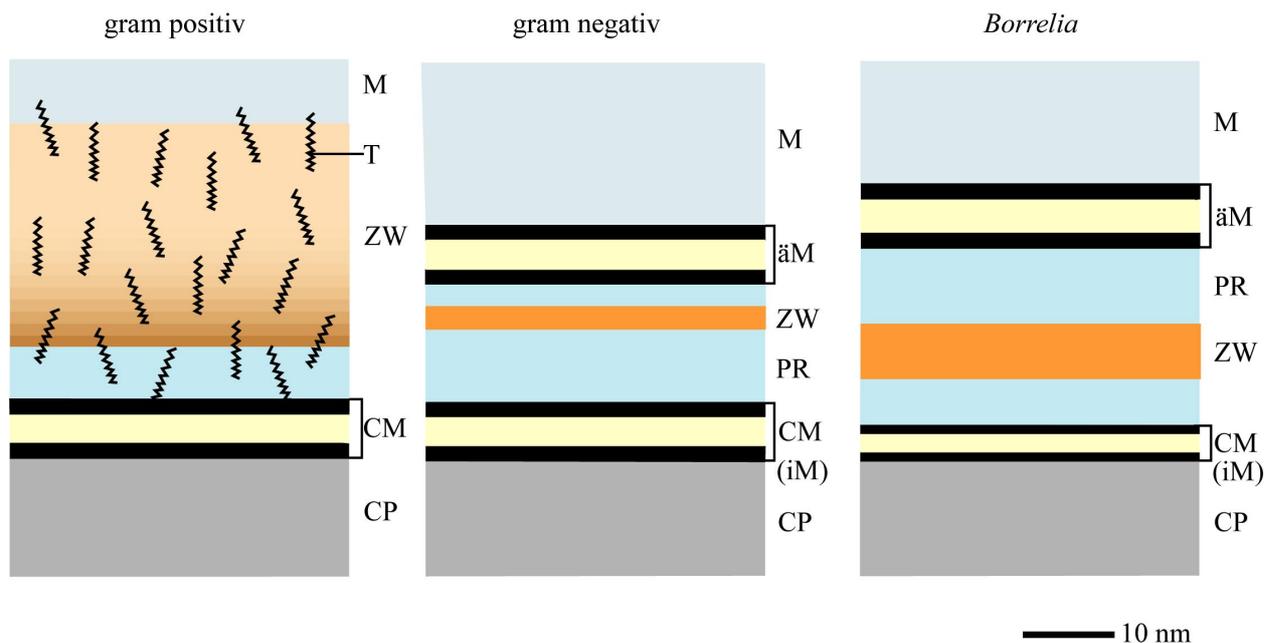


Abb. 12 Schematische Darstellung des Aufbaus der Zellhüllen von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien, sowie von Borrelien; äM: äußere Membran; CM: Cytoplasmamembran; CP: Cytoplasma; iM: innere Membran; M: Medium; PR: periplasmatischer Raum; T: Teichonsäuren; ZW: Zellwand.

Auf Grund der langen Generationszeit sind bei *B. afzelii* nur vereinzelt Stadien zu beobachten, mit deren Hilfe auf die Art der Zellteilung geschlossen werden kann. Obwohl die Beobachtung von zwei völlig parallel liegenden Borrelienzellen im REM (**Tafel 3**) an die früher von

CZEKALOWSKI (1963) für *Leptospira* diskutierte Längsteilung denken läßt, spricht eine Vielzahl verschiedener anderer Beobachtungen für die Querteilung. Zum einen ist zu erkennen, daß in Kulturen aus der späten log-Phase Borrelien mit 6–9 Windungen gegenüber kürzeren mit nur 3–5 Windungen deutlich überwiegen. Ältere Borrelienzellen sind also länger als solche kurz nach der Zellteilung (**Tafel 1; 2**). Würden sich Borrelien längs teilen, so wären entweder alle Zellen einer Kultur gleich lang, oder das Verhältnis kurzer zu langer Borrelienzelle wäre in einer Kultur während der gesamten Wachstumsphase konstant. Auch die Beobachtung, daß die Enden zweier Protoplastmazyylinder innerhalb einer gemeinsamen äußeren Membran aneinander stoßen, spricht für die Querteilung (**Tafel 7**). Beide Protoplastmazyylinder besitzen an der Kontaktstelle Flagellenansatzstellen, von denen Flagellen in entgegengesetzte Richtungen ausgehen. Diese Beobachtung steht mit dem für verschiedene Spirochäten beschriebenen Teilungsschema in Einklang (HOLT, 1978; HOVIND-HOUGEN, 1974). Nach dieser Vorstellung werden zu beiden Seiten der Mitte der Ausgangszelle zunächst neue Flagellen gebildet. Anschließend teilt sich der Protoplastmazyylinder und zuletzt die äußere Membran. Die Borrelienzellen (**Tafel 7**) befinden sich demnach kurz vor der vollständigen Trennung in zwei neue Borrelien. Auf Grund der langen Generationszeit der Borrelien waren Teilungsstadien nur sehr selten zu beobachten. Borrelien zu einem früheren oder späteren Zeitpunkt während des Teilungsvorgangs konnten nicht gefunden werden. Die Beobachtung lebender, sich bewogender Borrelienzellen im Dunkelfeld liefert eine Erklärung der parallel liegenden Borrelien im REM. Borrelien mit mehr als 9 Windungen können in der Zellmitte umknicken. Durch die korkenzieherartigen Bewegungen schrauben sich die beiden Enden ineinander. Dies erklärt auch, warum die scheinbar parallel liegenden Borrelienzellen an einem Ende miteinander verbunden sind (**Tafel 3**). Es handelt sich demnach um eine einzelne Borrelienzelle, deren Enden miteinander verdrillt sind. Diese Beobachtung läßt also keinen Schluß auf eine Längsteilung zu.

V.2 Lokalisation von immundominanten Proteinen

V.2.1 Diskussion der verwendeten Markierungsmethoden

Für eine erfolgreiche Immun-Markierung ist es zunächst entscheidend, daß die verwendeten Borrelien das zu untersuchende Protein auch exprimieren. Vor jeder Immun-Gold-Markierung wurde daher zunächst mit Borrelien aus der gleichen Kultur ein IFT durchgeführt. Dieses Vorgehen ist notwendig, da die Expression eines bestimmten Proteins nicht nur zwischen verschiedenen Stämmen, sondern auch innerhalb eines Stamms in den verschiedenen Passagen variiert.

Mit Hilfe des IFT kann sehr schnell überprüft werden, ob die entsprechende Passage des verwendeten Stamms oder Klons das zu untersuchende Protein exprimiert. Außerdem kann man hierbei den Prozentsatz an Einzelzellen ermitteln, die das zu untersuchende Protein exprimieren. Die lichtmikroskopische Untersuchung ermöglicht eine schnelle quantitative Unterscheidung markierter und unmarkierter Borrelien. Diese Auszählung an Hand von goldmarkierten Borrelien im REM durchzuführen ist nicht sinnvoll, da es auf Grund der nötigen Vergrößerung für die Detektion des Goldsignals nicht möglich ist mit Hilfe von Übersichtsaufnahmen zwischen markierten und unmarkierten Borrelien zu unterscheiden. Der Anteil fluoreszenzmarkierter Borrelien im LM liefert einen Anhaltspunkt für den zu erwartenden Anteil an goldmarkierten Borrelien im REM.

Außerdem liefert der Vergleich der Markierung im konventionellen IFT mit dem Ergebnis der Lebendmarkierung bereits einen Anhaltspunkt für die zu erwartende Lokalisation des Proteins. Liefern beide Methoden ein vergleichbar intensives Fluoreszenzsignal, so kann man von einer Oberflächenlokalisierung des markierten Proteins ausgehen. Eine Immun-Gold-Markierung für die Rasterelektronenmikroskopie ist daher erfolgversprechend. Ein detaillierter Vergleich von IFT und Immun-Gold-Markierung ist jedoch auf Grund der unterschiedlichen Präparations- und Untersuchungsbedingungen nicht möglich.

Die Immun-Gold-Markierung erlaubt eine detaillierte Untersuchung der Lokalisation eines Proteins. Zunächst dient sie der Bestätigung der vermuteten Lokalisation des Proteins auf der Oberfläche. Anders als im IFT kann man im REM erkennen, ob die markierte Borrelienzelle intakt ist und das Protein wirklich auf der Oberfläche liegt. Kommt es zu einer Zerstörung der äußeren Membran, und dadurch zu einer Markierung innenliegender Zellbestandteile, so ist das deutlich zu erkennen (**Tafel 14 C, D**). Darüber hinaus gibt die Anordnung der Goldsignale auf der Oberfläche das Verteilungsmuster der Proteine wieder.

Die Ergebnisse des IFT ließen vermuten, daß die zu untersuchenden Proteine auf der Oberfläche der äußeren Membran lokalisiert sind. Deshalb wurde ein Protokoll für die Immun-Gold-Markierung mit anschließender Untersuchung im REM entwickelt. Eine geeignete Möglichkeit zur rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung von Bakterien stellt die Kryo-Präparation auf OT dar. Die Immun-Gold-Markierung kann dabei vor oder nach dem Aufbringen auf den OT erfolgen. In den Vorversuchen zeigte sich, daß durch die Markierung der Borrelien nach dem Auffrieren auf OT ein stärkeres, spezifisches Markierungssignal zu erzielen war, als das bei der

Markierung im Eppendorfgefäß der Fall war (**Tafel 14 A, B**). Möglicherweise verändert eine starke Gold-Markierung die Oberfläche der Borrelienzellen so, daß diese schlechter auf dem OT haften als schwach markierte Borrelien. Eine Markierung auf OT war jedoch nur nach vorhergehender Glutaraldehyd-Fixierung möglich. Wurden Borrelien ohne vorherige Fixierung auf OT aufgefroren, so führte das zu einer Zerstörung der Borrelienzellen. Eine Zuordnung der Markierungssignale ist dann nur noch in Einzelfällen, wie etwa bei der Markierung der Flagellen möglich (**Tafel 14 C, D**). Die vor der Markierung durchgeführte Fixierung setzt voraus, daß das Epitop, das von dem verwendeten MAK erkannt wird, durch die Behandlung mit Glutaraldehyd nicht verändert wird. Die Epitope des OspA wurden jedoch im Gegensatz zu den Epitopen der übrigen zu untersuchenden Proteinen durch die Fixierung mit Glutaraldehyd so verändert, daß die Bindung des spezifischen MAK unterblieb. In diesem Fall mußte die Markierung daher im Eppendorfgefäß erfolgen, da nur bei der Verwendung unfixierter Borrelien eine Immun-Gold-Markierung möglich war. Eine weitere Optimierungsmöglichkeit stellt die Wahl des sekundären Antikörpers dar, der mit Goldkolloiden unterschiedlicher Größe konjugiert sein kann. Bei der Verwendung eines sekundären Antikörpers mit einem 6 nm Gold-Konjugat konnte eine etwa 2,5-fach höhere Markierungsdichte erreicht werden, als bei Verwendung eines 12 nm Gold-Konjugats (**Tafel 15**). Dies ermöglicht eine überaus detaillierte Untersuchung der Verteilung eines bestimmten Proteins auf einer kleinen Fläche, wie sie z. B. bei der Immunlokalisation eines Flagellenproteins nötig ist. Der Nachweis des 6 nm Gold-Kolloids erfordert aber auch eine hohe Primärvergrößerung (min. 30.000 x). Borrelienzellen sind jedoch relativ groß, so daß es bei dieser Vergrößerung nur schwer möglich ist einen Überblick über die Verteilung der Markierungssignale über die gesamte Oberfläche zu erhalten. Deshalb wurde, trotz der höheren zu erwartenden Markierungsdichte, auf die Verwendung des 6 nm Gold-Konjugats verzichtet und für alle Markierungen der sekundäre AK mit dem 12 nm Gold-Konjugat eingesetzt.

V.2.2 Diskussion der Markierungsergebnisse

Verschiedene Oberflächenproteine, wie OspA und OspC, scheinen für die Dissemination der Borrelien in der Zecke und den anschließenden Übertritt in den Säugewirt von entscheidender Bedeutung zu sein (FINGERLE et al., 1995; SCHWAN et al., 1995; SCHWAN und PIESMAN, 2000). Zudem sind Oberflächenproteine an der Adhäsion der Borrelien an die verschiedenen Gewebe des Wirts beteiligt. Der Verlust bestimmter Plasmide und das damit verbundene Fehlen verschiedener Oberflächenproteine geht mit dem Verlust der Pathogenität dieser Borrelienstämme einher (HINDERSSON et al., 1992). Darüber hinaus sind Oberflächenproteine mögliche

Kandidaten für die Entwicklung einer Vakzine gegen die Lyme Borreliose. Die Untersuchung der Lokalisation von immundominanten Proteinen leistet daher einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis der Interaktion von Borrelien mit dem Wirt und kann außerdem als Grundlage für die Entwicklung einer Vakzine dienen.

OspA und OspC sind Proteine, die auf der Oberfläche der äußeren Membran lokalisiert sind (BARBOUR et al., 1983 b; WILSKE et al., 1993 b). An Tiermodellen konnte gezeigt werden, daß Antikörper gegen OspA oder OspC nur vor der Infektion mit homologen Stämmen schützen (BOCKENSTEDT et al., 1997; PADILLA et al., 1996). OspA wird jedoch erfolgreich als Impfantigen in den USA eingesetzt, da hier nur *B. burgdorferi* s. s. mit einem einheitlichen OspA Serotyp vorkommt (SIMON et al., 1999). Auf Grund der starken Heterogenität von OspA und OspC bei europäischen Borrelien-Stämmen ist es für die Entwicklung einer Vakzine für Europa von großer Bedeutung, ob typspezifische und breitreaktive Epitope dieser Proteine gleichermaßen auf der Oberfläche lokalisiert sind.

Bei den untersuchten Stämmen bzw. Klonen sind in allen Fällen typspezifische und breitreaktive Epitope des OspA auf der Oberfläche der äußeren Membran lokalisiert. Dies zeigen die Ergebnisse des IFT und der Immun-Gold-Markierung in übereinstimmender Weise. Im IFT sind beide Epitope auf über 50% der Borrelien nachweisbar (vergl. **Tab. 12–14**). Auch die Immun-Gold-Markierung zeigt ein vergleichbares, wenn auch insgesamt nur schwaches, Markierungssignal (vergl. **Tab. 15–17** und **Tafel 22–24**). Eine Ausnahme diesbezüglich stellt die Markierung von Klon PKo97 K37 mit dem typspezifischen MAK L32 14G7. Hier sind bei der Lebendfärbung im IFT nur einzelne Borrelien stark markiert (vergl. **Tab. 13** und **Tafel 20 A**). Auch die Signale der Immun-Gold-Markierung beschränken sich auf wenige Zellen. Diejenigen Borrelien des Klons PK197 K37, die bei der Markierung mit dem typspezifischen MAK L32 14G7 ein Goldsignal zeigen, unterscheiden sich in der Signalintensität jedoch nicht von denjenigen Zellen, die mit dem breitreaktiven MAK L32 1F11 markiert wurden (**Tafel 23**). Die Markierung mit dem typspezifischen MAK ist also trotz der Beschränkung auf einzelne Zellen spezifisch. Die Ursache dafür, daß die Markierung mit dem typspezifischen MAK auf einzelne Zellen beschränkt ist, konnte trotz mehrfacher Versuche, nicht gefunden werden.

Eine mögliche Erklärung für die insgesamt nur schwache Goldmarkierung des OspA ist, daß die Markierung im Eppendorfgefäß durchgeführt werden muß. Diese Methode liefert auch bei der Markierung anderer Proteine nur ein relativ schwaches Markierungssignal (**Tafel 14 A, B**). Auf

Grund der geringen Signaldichte ist eine Beurteilung des Verteilungsmusters des Proteins auf der Borrelienoberfläche nur eingeschränkt möglich. Trotzdem ist zu erkennen, daß unabhängig vom verwendeten MAK, die Goldsignale bei der Markierung von Klon PKo97 K37 im Vergleich zur Markierung von Stamm PGau und Klon PKo345 II-2-3 etwas ungleichmäßiger verteilt sind (**Tafel 22 A-D; 23A-D; 24 A-D**). Die von BARBOUR et al. (1983 b) beschriebene Aggregation der Markierungssignale bei fehlender Vorfixierung läßt sich jedoch bei keiner der Markierungen beobachten.

Auch bei der Immunmarkierung des OspC zeigen der IFT und die Immun-Gold-Markierung übereinstimmend eine Lokalisation breitreaktiver und typspezifischer Epitope auf der Oberfläche der Borrelienzellen. Das Signal der Immun-Gold-Markierung ist vor allem bei der Markierung von *B. afzelii* Stamm PKo mit dem breitreaktiven MAK L22 1F8 sehr stark, während die Markierung des Klons PKo97 K37 mit dem gleichen MAK weniger intensiv ausfällt (vergl. **Tab. 20** und **Tafel 27 C, D; 28 C, D**). Dieser Unterschied ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß Klon PKo97 K37 gleichzeitig OspA und OspC exprimiert, während Stamm PKo nur OspC exprimiert. Die Expression beider Proteine auf der Oberfläche der äußeren Membran reduziert möglicherweise die Zugänglichkeit des konservierten Epitops für den breitreaktiven MAK. Die Markierung mit dem typspezifischen MAK L22 1F10 führt dagegen in beiden Fällen zu einem vergleichbaren Markierungsergebnis (vergl. **Tab 20** und **Tafel 27 A, B; 28 A, B**).

Auf Grund der Expression von typspezifischen und breitreaktiven Epitopen auf der Oberfläche der Borrelienzelle, die sowohl für OspA als auch für OspC nachgewiesen werden konnte, ist die Entwicklung eines Impfstoffs, der auf diesen Proteinen beruht auch für den europäischen Raum denkbar. Hierbei ist außerdem zu berücksichtigen, daß die Expression beider Proteine auf etwa 50–60% der Borrelien *in vitro* nicht mit den Verhältnissen *in vivo* übereinstimmt. In „nüchternen“ Zecken exprimieren etwa 85% der vorhandenen Borrelien OspA, während bei Patienten nur vereinzelt eine Immunantwort gegen dieses Protein zu finden ist (FINGERLE et al., 1995; WILSKE et al., 1986). Die frühe Immunantwort richtet sich vor allem gegen OspC. Dies läßt den Schluß zu, daß die Expression des OspC während des Saugvorgangs der Zecke am Säugwirt induziert wird und dieses Protein auch während der frühen Infektionsstadien von den Borrelienzellen exprimiert wird. Im Gegensatz dazu wird die Expression von OspA herunterreguliert (FINGERLE et al., 1998; WILSKE et al., 1986). Direkte Untersuchungen zur Expression von OspA und OspC während des gesamten Infektionsverlaufs liegen jedoch bisher nicht vor.

Neben OspA und OspC gibt es noch weitere immundominante Proteine, die möglicherweise eine Bedeutung als Pathogenitätsfaktoren haben, oder als Impfantigen in Frage kommen.

So zeigen die Ergebnisse des IFT und der Immun-Gold-Markierung übereinstimmend die Lokalisation des Osp17 auf der Oberfläche der äußeren Membran (**Tafel 16 A, C**). Unter *in vitro* Bedingungen wird dieses Protein in den verwendeten Passagen von etwa 80% der Borrelien des *B. afzelii* Stamms PKo exprimiert. Über die Expression dieses Proteins *in vivo* ist nur wenig bekannt. Gesichert ist jedoch, daß eine Immunantwort gegen Osp17 vor allem im Stadium III der Lyme Borreliose beobachtet werden kann. (JAURIS-HEIPKE et al., 1999 ; WILSKE et al., 2000). Die Immunantwort deutet darauf hin, daß dieses Protein vor allem während des späten Krankheitsverlaufs von den Borrelien exprimiert wird. Neuere Ergebnisse weisen darauf hin, daß es sich beim Osp17 um das Decorin bindende Protein A (dbpA) von *B. afzelii* handelt (SCHULTE-SPECHTEL, unveröffentlicht). Das dbpA vermittelt die Bindung von Borrelien an Kollagenfasern, da Borrelien nicht in der Lage sind, direkt an Kollagen zu binden (GUO et al., 1998). Das dbpA und somit auch das Osp17 sind demnach für die Adhäsion der Borrelien an die extrazelluläre Matrix in den verschiedenen Wirtsgeweben von entscheidender Bedeutung. Eine Impfung mit dem dbpA führt im Tierversuch zum Schutz vor der Infektion mit Borrelien, wenn diese mittels einer Spritze in die Versuchstiere inokuliert werden (HANSON et al., 1998). Allerdings ließ sich durch die Impfung mit dem dbpA keine Immunität gegen durch Zecken übertragene Borrelien erzeugen (HAGMAN et al., 2000). Der Einsatz des Osp17 als mögliches Impfantigen erscheint daher wenig erfolgversprechend, da der natürliche Infektionsweg über die Zecke führt.

Die verschiedenen Immunmarkierungsmethoden zeigen einheitlich eine Lokalisation des Proteins p58 und des Proteins p35 auf der Oberfläche der äußeren Membran der Borrelien (**Tafel 17 A, C; 18 A, C**). Sie werden deshalb im folgenden als Osp58 und Osp35 bezeichnet.

Aus Untersuchungen von Patientenserum aus Europa ist bekannt, daß das Osp35 eine deutliche Immunantwort hervorruft. Diese ist vor allem im Stadium III der Erkrankung von Bedeutung, kann jedoch in geringerem Umfang auch während der frühen Phase der Infektion beobachtet werden (HAUSER et al., 1999). Über die Bedeutung des Osp35 für den Infektionsverlauf ist bisher nichts bekannt. Untersuchungen aus den USA beschreiben im Gegensatz zu den europäischen Verhältnissen eine starke Immunantwort gegen ein chromosomal kodiertes Protein von 35 kDa bei Patienten mit Erythema migrans (GILMORE et al., 1997). Die Peptidsequenz dieses Proteins von *B. burgdorferi* s. s. ist jedoch nur zu 56% mit der Peptidsequenz des von uns unter-

suchten Proteins von *B. afzelii* identisch. Eine Suche in der Genbank zeigt darüber hinaus eine Identität der Peptidsequenzen von 55% für ein von FRASER et al. (1997) bei *B. burgdorferi* s. s. beschriebenes Protein. Dieses Protein ist jedoch auf einem linearen Plasmid kodiert. Der Vergleich mit anderen bekannten p35 Proteinen läßt auf Grund der geringen Sequenzidentität keinen Rückschluß auf die Bedeutung des Osp35 zu. Außerdem ist es nicht möglich eindeutig zu klären, ob es sich um ein chromosomal kodiertes oder ein plasmid-kodiertes Protein handelt.

Osp58 hingegen scheint bereits früh im Krankheitsverlauf der Lyme Borreliose von den Erregern exprimiert zu werden. Bereits im Stadium II der Erkrankung ist die Immunantwort gegen dieses Protein von entscheidender diagnostischer Bedeutung. Auch im Stadium III zeigen etwa 80% der Patienten eine deutlich Immunantwort gegen dieses Protein (HAUSER et al., 1999; WILSKE et al., 2000). Diese Beobachtungen lassen den Schluß zu, daß Osp58 während des gesamten Infektionsverlaufs von den Borrelien exprimiert wird. Im Gegensatz zu anderen immundominanten Oberflächenproteinen, wie OspB, OspC oder Osp17, die plasmid-kodiert sind, ist dieses Protein chromosomal kodiert (WILSKE et al., 2000).

Auf Grund der Lokalisation des Gens für Osp58 auf dem Chromosom der Borrelien ist zu erwarten, daß dieses Gen bei der Mehrzahl der Stämme von *B. burgdorferi* s. l. vorhanden ist. Dies wird durch die Beobachtung unterstützt, daß Osp58 bei Vertretern aller drei Spezies von *B. burgdorferi* s. l. nachgewiesen werden kann (HAUSER et al., 1997). Im Gegensatz dazu kann es auf Grund von Selektionsprozessen bei Borrelien zum Verlust von bestimmten Plasmiden, wie dem 49 kb Plasmid, das für OspA und OspB kodiert, kommen (COLEMAN et al., 1992; SADZINE et al., 1992; WILSKE et al., 1992 a). Darüber hinaus ist bekannt, daß plasmid-kodierte Proteine wie OspA und OspC eine starke immunologische Heterogenität bei verschiedenen Borrelienstämmen zeigen (WILSKE et al., 1992 a; 1995 a). Ein chromosomal-kodiertes Protein weist eine größere Stabilität auf, als das bei plasmid-kodierten Proteinen zu erwarten ist, da ein Austausch oder Verlust von Plasmid-DNA weit häufiger vorkommt, als der Austausch chromosomaler DNA zwischen verschiedenen Zellen.

Die starke Immunantwort der Patienten gegen Osp58 läßt darauf schließen, daß dieses Protein auch während der Infektion von den Borrelien exprimiert wird. Ein chromosomal kodiertes Oberflächenprotein wie Osp58 wäre daher möglicherweise ein geeigneter Kandidat für die Entwicklung einer Vakzine gegen Lyme Borreliose. Dazu ist jedoch eine genaue Untersuchung der protektiven Wirkung der Antikörper, die gegen dieses Protein gebildet werden erforderlich.

Eine detaillierte Untersuchung der Expression der verschiedenen Oberflächenproteine während des Infektionsverlauf wäre wünschenswert. Diese kann bisher nur indirekt mit Hilfe der Immunantwort der Patienten rückgeschlossen werden. Eine umfassende Untersuchung ist jedoch auf Grund der geringen Erregerdichte im Gewebe sehr schwierig und nur in Ausnahmefällen möglich (DEKONING und DURAY, 1993; WILSKE et al., 2000).

V.3 Ultrastrukturelle Charakterisierung der kokkoiden Morphotypen und deren mögliche Bedeutung

Das Auftreten kokkoider Formen, wie Cysten, Sphäroplasten oder Gemmae, wurde bei *B. burgdorferi* s. l. unter verschiedenen Bedingungen beschrieben (BRORSON und BRORSON, 1997; KERSTEN et al., 1995; SCHALLER und NEUBERT, 1994). Die verschiedenen Bezeichnungen für die sphärischen Strukturen werden dabei unabhängig von den ultrastrukturellen Merkmalen verwendet. Die Bezeichnungen für die beschriebenen Strukturen sind den jeweiligen Literaturstellen entnommen. Auch bei Vertretern anderer Gattungen der Spirochäten, wie *Treponema* oder *Leptospira*, konnte die Bildung sphärischer Strukturen beobachtet werden (CZEKALOWSKI und EAVES, 1954; KAWATA und INOUE, 1964; WECKE et al., 1995). Es handelt sich hierbei offenbar um eine bei Spirochäten weit verbreitete cytologische Besonderheit. Detaillierte Untersuchungen der ultrastrukturellen Merkmale der kokkoiden Formvarianten bei *B. burgdorferi* s. l. gibt es bisher nur in sehr geringem Umfang. Sie wurden vor allem durch die zeitintensiven Methoden zur Generierung der kokkoiden Morphotypen erschwert. Durch die Inkubation der Borrelien in *Aqua dest.* gelang es diese Formvarianten sehr schnell und in großer Anzahl zu generieren, wodurch eine genaue ultrastrukturelle Untersuchung möglich ist.

Sowohl das Ergebnis der Vitalfärbung (**Tafel 8 C, D**) als auch das Anwachsen der kokkoiden Morphotypen zu schraubenförmigen Borrelienzellen in Kulturmedium zeigt deutlich, daß es sich bei den durch die Inkubation in *Aqua dest.* gebildeten kokkoiden Morphotypen um lebende Formvarianten handelt. Für die Rekultivierungsversuche wurden die kokkoiden Morphotypen von möglicherweise vorhandenen schraubenförmigen Borrelienzellen getrennt. Kokkoide Morphotypen werden von einem Filter mit einer Porengröße von 0,45 µm zurückgehalten, wohingegen schraubenförmige Borrelien in der Lage sind durch diesem Filter zu gelangen und anschließend in Kulturmedium wieder anzuwachsen (JOBE et al., 1993). Während der Kultur des Filtrats kann kein Anwachsen von Borrelien beobachtet werden. Dies dient als Beleg dafür, daß sich zwischen den kokkoiden Morphotypen keine wachstumsfähigen schraubenförmigen

Borrelien befinden. Die schnelle Generierung schraubenförmiger Borrelien nach dem Animpfen der kokkoiden Morphotypen ist also nicht auf einzelne Borrelien zurückzuführen, die unverändert in *Aqua dest.* überdauern konnten.

Die Auswertung der Ergebnisse zeigt, daß die Bildung der kokkoiden Morphotypen auf die starke Ausdehnung des periplasmatischen Raums zurückzuführen ist (**Tafel 10 A, B**). Da dem aufgerollten Protoplasmazyylinder die äußere Membran fehlt (**Tafel 10 D**), ist es durchaus wahrscheinlich, daß die Membran, die die kokkoide Struktur umgibt, und die äußere Membran der schraubenförmigen Borrelienzelle einander entsprechen. Im Inneren des entstehenden Hohlraums rollt sich der Protoplasmazyylinder in engen Windung auf, wobei der Abstand zwischen den einzelnen Windungen etwa 100–200 nm beträgt (**Tafel 10 B–D**). Die Ganghöhe der schraubenförmigen Borrelienzellen beträgt im Gegensatz dazu 2–3 μm . Der Windungsdurchmesser liegt im zentralen Bereich der kokkoiden Struktur mit 1,4 μm etwas über dem der schraubenförmigen Borrelienzelle. Es kommt also bei der Bildung der kokkoiden Morphotypen zu einer Stauung der Schraubenwindungen des Protoplasmazyinders. Die Endoflagellen verlieren ihre typische Anordnung in zwei Reihen, wie sie bei den schraubenförmigen Borrelienzellen zu beobachten ist (vergl. **Tafel 4 D, 10 D**). Außerdem ist die Anzahl der Endoflagellen, die mit dem Protoplasmazyylinder assoziiert sind, bei den kokkoiden Morphotypen niedriger, als bei den schraubenförmigen Borrelien. Möglicherweise bleiben nur diejenigen Flagellen, die bei den schraubenförmigen Borrelien entlang des Protoplasmazyinders liegen bei der Bildung der kokkoiden Morphotypen mit diesem assoziiert. Während die übrigen Flagellen frei im entstandenen Hohlraum liegen.

Auf Grund der Rekonstruktion der kokkoiden Morphotypen an Hand von Serienultradünnschnitte wird deutlich, daß nur jeweils eine Borrelienzelle an der Bildung dieser Struktur beteiligt ist (**Tafel 13**). Eine genaue Berechnung der Oberfläche der kokkoiden Morphotypen ist wegen der starken Faltenbildung nicht möglich. Man kann jedoch versuchen die Größe der Oberfläche abzuschätzen, indem man zunächst von einer Kugel als Grundform der kokkoiden Morphotypen ausgeht.

$$\text{Oberfläche (Kugel): } 4 r^2 \pi = 4 \times 0,8 \mu\text{m}^2 \times 3,14 = 8,04 \mu\text{m}^2$$

Eine Oberfläche von 8 μm^2 würde bedeuten, daß sich die Oberfläche gegenüber der schraubenförmigen Borrelienzelle um 70% reduziert. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, daß diese Be-

rechnung von einer Kugel mit glatter Oberfläche ausgeht, während die Oberfläche der kokkoiden Morphotypen stark gefaltet ist. Versuch man nun mit Hilfe eines Modells die Faltenbildung mit einzubeziehen, so ergibt sich eine Reduktion der Oberfläche um etwa 30-35%. Diese Oberflächenreduktion ist möglicherweise auf Membranabschnürungen während der Bildung der kokkoiden Morphotypen zurückzuführen. Für diese Vorstellung sprechen auch die kleinen Membranvesikel, die neben den kokkoiden Morphotypen zu beobachten sind (**Tafel 10 B, D; 11 B**).

Der aufgerollte Protoplasmazyylinder in einem membranumschlossenen Hohlraum ist auch ein wesentliches Merkmal der von ALBAN et al. (2000) beschriebenen sphärischen Zysten von *B. burgdorferi* s.s., die sich in serumfreiem Medium bilden. Auch unter dem Einfluß von Penicillin bildet *B. afzelii* Sphäroplasten, in denen der Protoplasmazyylinder aufgerollt ist (SCHALLER und NEUBERT, 1994). Interessanter Weise zeigen die von HULINSKA et al. (1994) in der Dermis von Patienten gefundenen zystenartigen Strukturen große Ähnlichkeit mit den kokkoiden Morphotypen, die sich bei der Behandlung mit *Aqua dest.* bilden. Das Auftreten ultrastrukturell ähnlicher sphärischer Strukturen unter verschiedenen für Borrelien ungeeigneten Wachstumsbedingungen, legt die Vermutung nahe, daß es sich hierbei um einen Schutzmechanismus handelt. Obwohl für die kokkoiden Morphotypen gezeigt werden konnte, daß die immundominanten Proteine OspC, Osp17 und Osp35 weiterhin gleichmäßig über die Oberfläche verteilt sind (**Tafel 29 A, C, E**), stellen diese Strukturen möglicherweise Überdauerungsformen dar. Durch die starke Reduktion der Oberfläche gegenüber der schraubenförmigen Borrelienzelle ist die Angriffsfläche für Antikörper trotz der Expression der immundominanten Proteine deutlich reduziert. Außerdem ist zu berücksichtigen, daß es bei der schnellen Bildung der kokkoiden Morphotypen *in vitro* zwar zu einer Umverteilung der Oberflächenproteine kommen kann, eine Änderung in der Expression jedoch nicht zu erwarten ist. Es ist durchaus wahrscheinlich, daß *in vivo* gebildete sphärische Strukturen ein anderes Muster an Oberflächenproteinen zeigen. Darüber hinaus bieten die kokkoiden Morphotypen möglicherweise einen Schutz vor dem Angriff durch Antibiotika. Hierfür ist vor allem die fehlende Teilungsaktivität dieser Formvarianten verantwortlich. Unterstützt wird diese Ansicht durch die Tatsache, daß Borrelien, die nach einer Antibiotikatherapie aus Patienten isoliert werden, häufig sphäroide Strukturen aufweisen (PREAC-MURSIC et al., 1996).

Das Auftreten kugelförmiger Strukturvarianten bei einer Vielzahl anderer Spirochäten spricht ebenfalls für eine biologische Bedeutung dieser Formvarianten. Detaillierte Untersuchungen gibt

es hier vor allem für Vertreter der Gattung *Treponema*. Anders als bei Borrelien sind hier jedoch mehrere Treponemen an der Bildung eines sphärischen Körpers beteiligt. Die Anordnung des Protoplasmazyllinders dicht unter der äußeren Membran entspricht jedoch den Verhältnissen bei Borrelien. Auch hier wird eine Schutzfunktion der sphärischen Strukturen bedingt durch die Reduktion der Oberfläche diskutiert (WOLF und WECKE, 1994).

Darüber hinaus zeichnen sich einige durch Spirochäten verursachte Krankheiten, wie Syphilis oder Lyme Borreliose, durch einen Verlauf mit mehreren Stadien aus, die häufig durch symptomfreie Intervalle voneinander getrennt sind. Es ist bisher unklar in welcher Form die Erreger zwischen den einzelnen Krankheitsschüben im Körper überleben. Möglicherweise stellen die sphärischen Formen für den Erreger eine geeignete Möglichkeit dar längere Zeit unauffällig im Körper des Patienten zu überleben.

V.4 Interaktion von Borrelien mit humanen Astrozyten

Nach einer anfangs lokal beschränkten Infektion mit Borrelien im Bereich der Einstichstelle der Zecke kommt es im weiteren Verlauf der Lyme Borreliose zu einer hämatogenen Verbreitung der Erreger im Körper des Patienten. Aus verschiedenen Untersuchungen ist bekannt, daß Borrelien in der Lage sind einschichtige Zellverbände aus humanen Endothelzellen zu überwinden (COMSTOCK und THOMAS, 1989; SZCZEPANSKI et al., 1990). Diese Fähigkeit spielt vermutlich eine entscheidende Rolle beim Übertritt aus dem Blutgefäßsystem in die verschiedenen Organe, die von Borrelien infiziert werden können. Die Pathogenese der verschiedenen Manifestationen der Lyme Borreliose ist bisher unbekannt. Eine entscheidende Bedeutung spielt hierbei wahrscheinlich die Fähigkeit von Borrelien mit einer Vielzahl verschiedener eukaryontischer Zellen in Kontakt zu treten. Untersuchungen der Interaktion von Borrelien mit Zellen des Zentralnervensystems konzentrieren sich jedoch auf Experimente mit Zellen aus dem Gehirn der Ratte (GARCIA-MONCO et al., 1989; 1991; PETERS und BENACH, 1997). Für ein besseres Verständnis der Vorgänge, die möglicherweise für das Entstehen der Neuroborreliose mit verantwortlich sind, ist es jedoch nötig die Interaktion von Borrelien auch mit Zellen aus dem menschlichen Gehirn zu untersuchen. Astrozyten sind die ersten Zellen, mit denen die Borrelien nach dem Übertritt aus dem Blut ins Gehirn in Kontakt kommen. Wir konnten zeigen, daß sowohl *B. garinii* Stamm PBi als auch *B. afzelii* Stamm PKo *in vitro* an die Oberfläche humaner Astrozyten adhäreren (**Tafel 30; 32; 33**). Die Zahl der adhärierenden Borrelien nimmt mit zunehmender Koinkubationsdauer zu, wobei auch nach 24 h noch keine Sättigung erreicht ist

(**Abb. 10; 11**). Die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigen, daß sich die Oberfläche der Astrozyten durch die Adhärenz der Borrelien nur geringfügig durch kleine Aufwölbungen oder granuläre Strukturen im Bereich der adhärierenden Borrelien ändert (**Tafel 32 B, E, F; 33 E, F**). Es ist daher wahrscheinlich, daß die Interaktion von Borrelien mit Astrozyten vor allem von den Borrelien ausgeht. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse anderer Autoren unterstützt, die eine deutliche Verringerung der Adhärenz an verschiedene eukaryontische Zellen beobachteten, wenn die Borrelien durch Hitzeeinwirkung inaktiviert bzw. abgetötet wurden (HECHEMY et al., 1992; KURTTI et al., 1993). Die Fähigkeit an die Astrozyten zu adhären ist wahrscheinlich von entscheidender Bedeutung bei der Entstehung der neurologischen Manifestationen der Lyme Borreliose. Allerdings kommt es *in vitro* durch die Interaktion von Borrelien mit den Astrozyten zu keiner Schädigung der humanen Zellen. Dies läßt den Schluß zu, daß die Affinität der Borrelien zu den Astrozyten die Entstehung der neurologischen Manifestationen begünstigt, nicht jedoch direkt für die Ausprägung der Krankheits Symptome verantwortlich ist.

Interessanter Weise adhärirt *B. afzelii* *in vitro* wesentlich häufiger an die Astrozyten als *B. garinii*. Im Gegensatz dazu stellt *B. garinii* die Borrelienspezies dar, die am häufigsten aus dem Liquor von Patienten mit Neuroborreliose isoliert werden kann. *B. afzelii* läßt sich dagegen vor allem aus Biopsiematerial der Hautmanifestationen isolieren. Möglicherweise kommt es *in vivo* bereits in der Haut zu einer Selektion der verschiedenen Borrelienspezies, so daß die hohe Affinität von *B. afzelii* zu den Astrozyten nicht zum Tragen kommt. Eine andere mögliche Erklärung für die geringe Isolationsrate von *B. afzelii* aus dem Liquor könnte gerade die deutlich stärkere Adhärenz dieser Borrelienspezies an die Astrozyten sein. Sie führt dazu, daß nur ein geringer Teil der Bakterien mit dem Liquor entnommen und anschließend kultiviert werden kann.

Einige neurologische Manifestationen der Lyme Borreliose zählen zum Stadium III der Erkrankung. Diese treten erst Monate bis Jahre nach dem Zeckenstich auf (WEBER et al., 1993 b). Die Produktion intrathekalen Antikörper ist ein Hinweis darauf, daß diese neurologischen Krankheitssymptome auf eine aktive Infektion mit Borrelien zurückzuführen sind (GARCIA-MONCO et al., 1989; WILSKE et al., 2000). Borrelien haben also die Möglichkeit über lange Zeit im Körper des Patienten zu überdauern. Die rasterelektronenmikroskopischen Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß sowohl *B. afzelii* als auch *B. garinii* in der Lage sind, in die Astrozyten einzudringen (**Tafel 32 E, F; 33 E, F**). Auf Grund der Untersuchungen an Ultradünnschnitten konnte diese Vermutung bestätigt werden (**Tafel 35**). Die intrazelluläre Lage der Borrelien läßt

sich über eine kurze Serie von Ultradünnschnitten hinweg verfolgen (**Tafel 27**). Es ist daher unwahrscheinlich, daß die Borrelien lediglich in oberflächliche Membranfalten eingeschlossen sind. Ein Unterschied zwischen den beiden Stämmen kann im Hinblick auf die Aufnahme ins Innere der Astrozyten nicht beobachtet werden.

Die kurzen Membranausläufer, die die adhärierenden Borrelien umschließen, lassen vermuten, daß die Astrozyten die Borrelien ins Zellinnere aufnehmen (**Tafel 36**). Die Borrelien liegen dann meist innerhalb eines Vesikels, dessen Membran von der Astrozyte gebildet wird. Die Borrelien sind intakt und besitzen auch nach 24 h Koinkubationsdauer ihre typischen ultrastrukturellen Merkmale (**Tafel 35 A-D**). Auf Grund von Untersuchungen anderer eukaryontischer Zellen ist bekannt, daß bereits wenige Stunden nach Beginn der Koinkubation mit Borrelien die Abbauvorgänge innerhalb der gebildeten Vesikel einsetzen, wenn die beteiligten Zellen zum Abbau der Borrelien fähig sind (FILGUEIRA et al., 1996; GIRSCHICK et al., 1996). Diese Abbauvorgänge sind durch deutliche ultrastrukturelle Veränderungen der Borrelienzellen zu erkennen. Diese aus der Literatur bekannten Degenerationsformen treten bei der Koinkubation mit Astrozyten jedoch nicht auf. Allerdings sind vereinzelt Vakuolen zu beobachten, in denen mehrere Borrelien enthalten sind (**Tafel 35 D**). Zusätzlich ist innerhalb dieser Vakuolen granuläres Material zu erkennen, das auf einen beginnenden Abbauprozess hinweisen könnte. Die Borrelien zeigen jedoch auch hier ihren typischen ultrastrukturellen Aufbau. Darüber hinaus sind Borrelien, sowohl von *B. afzelii* als auch von *B. garinii*, direkt im Zytoplasma der Astrozyten zu finden (**Tafel 35 E, F**). Offensichtlich gelingt es einzelnen Borrelien die Zellmembran der Astrozyten zu überwinden. Es ist jedoch unklar, ob die Borrelien direkt von außen ins Zytoplasma der Astrozyten gelangen, oder ob es ihnen erst später gelingt die Membran der Vesikel zu durchdringen und so ins Zytoplasma zu wandern. Das ungleichmäßig kontrastierte Zytoplasma dieser Borrelien könnte jedoch ein Hinweis auf Degenerationserscheinungen sein. Daher ist nicht auszuschließen, daß es den Astrozyten in einzelnen Fällen gelingt die Borrelien zu verdauen.

VI Zusammenfassung

Die Lyme Borreliose ist die häufigste durch Zecken übertragene Infektionskrankheit des Menschen auf der Nordhemisphäre. Der Erreger *Borrelia burgdorferi* s. l. wird in drei humanpathogene Arten, *B. burgdorferi* s. s., *B. garinii* und *B. afzelii* unterteilt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Struktur von *Borrelia afzelii* am Beispiel des Stamms PKo, dem Hautisolat eines Patienten, mit Hilfe elektronenmikroskopischer Methoden untersucht. Raster- und transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen an Borrelien des *B. afzelii* Stammes PKo wurden zur Aufklärung der Ultrastruktur der Borrelienzelle unter *in vitro* Kulturbedingungen durchgeführt.

In Abhängigkeit vom Kulturalter zeigen die Borrelien starke strukturelle Veränderungen, die rasterelektronenmikroskopisch gut zu untersuchen sind. Während der log-Phase nimmt die Anzahl der Schraubenwindungen zu und somit auch die Länge der Borrelien. Gegen Ende der log-Phase verlieren die Borrelien ihre typische Schraubengestalt. Im Lichtmikroskop (Dunkelfeld) kann man gleichzeitig einen Verlust der Beweglichkeit beobachten. Allerdings bedeutet der Verlust der Beweglichkeit nicht wie bisher angenommen gleichzeitig den Tod der Borrelien, da sich nach dem Überimpfen in frisches Kulturmedium wieder bewegliche schraubenförmige Borrelien bilden.

Die Untersuchungen zur Ultrastruktur der Borrelienzelle wurden an Borrelien aus der log-Phase der Kultur durchgeführt. Die Borrelienzellen sind zu diesem Zeitpunkt 10–20 µm lang und besitzen 3–9 Schraubenwindungen. Ultradünnschnitte zeigen, daß die Borrelien aus einem Protoplasmazylinder bestehen, der von einer 4 nm dünnen Zellmembran begrenzt wird. An ihn schließt sich im Abstand von 5 nm die Zellwand an. Die Borrelienzellen sind von einer äußeren Membran umgeben, die den periplasmatischen Raum umschließt. Diese Membran ist zu einem Tunnel aufgewölbt in dem die Endoflagellen liegen. An jedem Zellende befinden sich 7–9 Flagellensatzstellen, die in der Längsachse der Borrelienzelle angeordnet sind. Jede der Flagellen inseriert nur an einem Zellende. Im mittleren Bereich der Borrelienzelle kommt es zu einer Überlappung der Flagellen der beiden Zellenden. Die Überlappungsregion ist jedoch nur undeutlich abzugrenzen. Auf Grund dieser Untersuchungen konnte ein detailliertes, maßstabsgetreues Modell einer Borrelienzelle rekonstruiert werden.

Ein weiteres Untersuchungsziel war die Aufklärung der Lokalisation wichtiger immundominanter Proteine. Mit Hilfe von Immun-Gold-Markierungen konnte durch hochauflösende Raster-elektronenmikroskopie gezeigt werden, daß die Proteine p17 (Osp17), p35 (Osp35) und p58 (Osp58) auf der Oberfläche der äußeren Membran der Borrelienzelle lokalisiert sind. Durch die Optimierung der Markierungsmethode konnte das Signal so weit gesteigert werden, daß die gleichmäßige Verteilung dieser Proteine über die gesamte Zelloberfläche dargestellt werden konnte. Auf Grund ihrer Lokalisation auf der Oberfläche der Borrelienzelle kommen diese Proteine grundsätzlich als Vakzinekandidaten in Frage.

Die Lokalisation typspezifischer und konservierter Epitope der beiden immunologisch heterogenen Oberflächenproteine OspA und OspC konnte durch Immun-Gold-Markierungen mit Hilfe typspezifischer und breitreaktiver monoklonaler Antikörper nachgewiesen werden. Typspezifische und konservierte Epitope beider Proteine befinden sich auf der Oberfläche der äußeren Membran. Die Lokalisation breitreaktiver Epitope von OspA und OspC auf der Oberfläche der Borrelienzelle läßt den Einsatz dieser Proteine als Impfantigene auch im europäischen Raum erfolgversprechend erscheinen.

Des weiteren konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Methode entwickelt werden, die es erlaubt kokkoide Morphotypen der Borrelienzelle zu erzeugen. Durch die Inkubation von Borrelien in *Aqua dest.* gelingt es innerhalb weniger Minuten auf reproduzierbare Weise diese Formvarianten der Borrelien zu erzeugen. Mittels Vitalfärbungen konnte gezeigt werden, daß es sich bei den kokkoiden Morphotypen um lebende Formvarianten der Borrelienzelle handelt. Diese Formvarianten sind nicht kultivierbar. Nach dem Überführen in Kulturmedium sind nach 4–5 Tagen nur noch schraubenförmige Borrelienzellen zu beobachten.

Bei den kokkoiden Morphotypen handelt sich um eine kugelförmige Anschwellung der äußeren Membran in der sich der Protoplasmazyylinder in engen Windungen aufrollt. Der vom aufgerollten Protoplasmazyylinder umgebene Raum ist weitgehend strukturlos. Die Flagellen befinden sich auf der von der äußeren Membran abgewandten Seite des Protoplasmazyinders. Die Rekonstruktion von Serienultradünnschnitten ergab, daß diese kokkoiden Morphotypen jeweils von einer einzelnen Borrelienzelle gebildet werden; Protoplasmazyylinder, Zellwand und äußere Membran bleiben intakt.

Darüber hinaus konnte am Beispiel von Osp17, Osp35 und OspC gezeigt werden, daß die Oberflächenproteine der schraubenförmigen Borrelienzelle auch bei den kokkoiden Morphotypen auf der Oberfläche lokalisiert sind. Diese drei Proteine sind auch auf den kokkoiden Morphotypen gleichmäßig über die gesamte Oberfläche verteilt. Allerdings kommt es bei der Bildung der kokkoiden Morphotypen im Vergleich zu den schraubenförmigen Borrelienzellen zu einer deutlichen Reduktion der Oberfläche. Diese Formvarianten besitzen somit nur eine reduzierte Angriffsfläche für die Antikörper des Wirts. Sie stellen also möglicherweise Formen dar, die es den Borrelien ermöglichen dem Abwehrsystem des Wirts auszuweichen.

Außerdem wurde die Adhäsion von Borrelien zweier unterschiedlicher Spezies an humane Astrozyten untersucht. Dafür wurde außer dem bereits erwähnten *B. afzelii* Stamm PKo der *B. garinii* Stamm PBi eingesetzt. Hierbei handelt es sich um ein Isolat aus dem Liquor eines Patienten. In einem über 24 Std. Zeitdauer durchgeführten Koinkubationsversuch konnte mittels Lichtmikroskopie gezeigt werden, daß beide Stämme an die Astrozyten adhärieren. Borrelien des *B. afzelii* Stamms PKo adhärieren jedoch insgesamt weit häufiger als solche des *B. garinii* Stamms PBi. Bei den rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigte sich, daß eine Vielzahl von Borrelien beider Stämme mit den Zellausläufern am Rand der Astrozyten und auf deren Oberfläche in Kontakt treten. Die Fähigkeit der Borrelien an die Astrozyten zu adhärieren spielt möglicherweise eine Rolle beim Übertritt von der Blutbahn ins Gehirn.

Eine deutliche Reaktion der Astrozyten auf den Kontakt mit den Borrelien in Form von Oberflächenveränderungen ist nicht zu erkennen. Bei beiden Stämmen können im Rahmen der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen Borrelien gefunden werden, die in die Zellen eindringen. Dieses Eindringen kann mit Hilfe von Ultradünnschnitten durch die Koinkubationspräparate im TEM bestätigt werden. Hierbei konnten Borrelien sowohl in Vesikeln, als auch frei im Zytoplasma der Astrozyten gefunden werden. Die intrazellulär liegenden Borrelien waren auch nach 24 Std. noch intakt. Es sind keine Degenerationsformen zu erkennen. Durch das Eindringen in die Astrozyten gelingt es den Borrelien möglicherweise über längere Zeit im Wirt zu überdauern.

VII Literaturverzeichnis

- ACKERMANN, R. (1983) Erythema chronicum migrans und durch Zecken übertragene Meningopolyneuritis (Garin-Bujadoux-Bannwarth): Borrelien-Infektionen? Dtsch. Med. Wochenschr. 108: 577-580.
- ACKERMANN, R., KABATZKI, J., BOISEN H. P., STEERE, A. C., GRODZICKI, R. L., HARTUNG, S., RUNNE, U. (1984) Spirochäten-Ätiologie der Erythema-chronicum-migrans-Krankheit. Dtsch. Med. Wochenschr. 109: 92-97.
- ACKERMANN, R., GOLLMER, E., REHSE-KÜPPER, B. (1985) Progressive Borrelien-Encephalomyelitis. Dtsch. Med. Wochenschr. 126: 1039-1042.
- AFZELIUS, A. (1921) Erythema chronicum migrans. Acta Derm. Venereol. 2: 120-125.
- ALBAN, P. S., JOHNSON, P. W., NELSON, D. R. (2000) Serum-starvation-induced changes in protein synthesis and morphology of *Borrelia burgdorferi*. Microbiology 146: 119-127.
- ÅSBRINK, E., HEDERSTEDT, B., HOVMARK, A. (1984 a) The spirochetal etiology of Erythema chronicum migrans Afzelius. Acta Derm. Venereol. 64: 291-295.
- ÅSBRINK, E., HOVMARK, A., HEDERSTEDT, B. (1984 b) The spirochetal etiology of Acrodermatitis chronica atrophicans Herxheimer. Acta Derm. Venereol. 64: 506-512.
- ÅSBRINK, E., HOVMARK, A., WEBER, K. (1993) Acrodermatitis chronica atrophicans. In: Weber K., Burgdorfer W. (eds.), Aspects of Lyme borreliosis. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 193-204.
- BANNWARTH, A. (1941) Chronische lymphocytäre Meningitis, entzündliche Polyneuritis und "Rheumatismus". Arch. Psychiatr. Nervenkr. 113: 284-376.
- BANNWARTH, A. (1944) Zur Klinik und Pathogenese der „chronischen lymphocytären Meningitis“. Arch. Psychiatr. Nervenkr. 117: 161-185.
- BARANTON, G., POSTIC, D., SAINT GIRONS, I., BOERLIN, P., PIFFARETTI, J.-C., ASSOUS, M., GRIMONT, P. A. D. (1992) Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. Int. J. Syst. Bacteriol. 42: 378-383.
- BARBOUR, A. G., BURGDORFER, W., HAYES, S. F., PETER, O., AESCHLIMANN, A. (1983 a) Isolation of a cultivable spirochete from *Ixodes ricinus* ticks of Switzerland. Curr. Microbiol. 8: 123-126.
- BARBOUR, A. G., TESSIER, S. L., TODD, W. F. (1983 b) Lyme disease spirochetes and Ixodid tick spirochetes share a common surface antigenic determinant defined by a monoclonal antibody. Infect. Immun. 41: 795-804.
- BARBOUR, A. G. (1984) Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. Yale J. Biol. Med. 57: 71-75.

- BARBOUR, A. G., HAYES, S. F. (1986) Biology of *Borrelia* species. Microbiol. Rev. 50 (4): 381-400.
- BARBOUR, A. G., SCHRUMPF, M. E. (1986) Polymorphisms of major surface proteins of *Borrelia burgdorferi*. Zbl. Bakt. Hyg. A 263: 83-91.
- BARBOUR, A. G., GARON, C. F. (1987) Linear plasmids of the bacterium *Borrelia burgdorferi* have covalently closed ends. Science 237: 409-411.
- BARBOUR, A. G. (1988) Plasmid analysis of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. J. Clin. Microbiol. 26: 475-478.
- BENACH, J. L., BOSLER, E. M., HANRAHAN, J. P., COLEMAN, J. L., HABICHT, G. S., BAST, T. F., CAMERON, D., ZIEGLER, J. L., BARBOUR, A. G., BURGDORFER, W., EDELMAN, R., KASLOV, R. A. (1983) Spirochetes isolated from the blood of two patients with Lyme disease. N. Engl. J. Med. 308: 740-742.
- BENACH, J. L., HABICHT, G. S., GOCINSKI, B. L., COLEMAN, J. L. (1984) Phagocytic cell responses to *in vivo* and *in vitro* exposure to the Lyme disease spirochete. Yale J. Biol. Med. 57: 599-605.
- BIRCH-ANDERSON, A., HOVIND-HOUGEN, K., BORG-PETERSEN, C. (1973) Electron microscopy of *Leptospira*. I. *Leptospira* strain Pomona. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B 81: 665-676.
- BOCKENSTEDT, L. K., HODZIC, E., FENG, S., BOURREL, K. W., DESILVA, A., MONTGOMERY, R. R., FIKRIG, E., RADOLF, J. D., BARTHOD, S. W. (1997) *Borrelia burgdorferi* strain-specific Osp C-mediated immunity in mice. Infect. Immun. 65 (11): 4661-4667.
- BRADFIELD, J. R. G., CATER, D. B. (1952) Electron-microscopic evidence on the structure of spirochetes. Nature 169: 944-946.
- BRORSON, Ø. BRORSON, S. H. (1997) Transformation of cystic forms of *Borrelia burgdorferi* to normal, mobile spirochetes. Infection 25 (4): 240-246.
- BRORSON, Ø. BRORSON, S. H. (1998) *In vitro* conversion of *Borrelia burgdorferi* to cystic forms in spinal fluid, and transformation to mobile spirochetes by incubation in BSK-H medium. Infection 26 (3): 144-150.
- BUCHWALD, A. (1883) Ein Fall von diffuser idiopathischer Haut-Atrophie. Dermatol. Vierteljahresschr. 10:553-556.
- BURGDORFER, W., BARBOUR, A. G., HAYES, S. F., BENACH, J. L., GRUNWALDT, E., DAVIS, J. R. (1982) Lyme Disease - A tick-borne spirochetosis? Science 216: 1317-1319.
- BURGDORFER, W. (1984) Discovery of the Lyme disease spirochete and its relation to tick vectors. Yale J. Biol. Med. 57: 515-520.
- BURGDORFER, W., HAYES, S. F. (1989) Vector-spirochete relationships in louse-borne and tick-borne Borreliosis with emphasis on Lyme disease. In: Advances in Disease Vector Research, Vol. 6, Springer Verlag New York: 127-150.

- BRADFORD, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochemistry* 72: 248-254.
- CANICA, M. M., NATO, F., DU MERLE, L., MAZIE, J. C., BARANTON, G., POSTIC, K. (1993) Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. *Scan. J. Infect. Dis.* 25: 441-448.
- CASJEN, S., DELANGE, M., LEY, H. L., ROSA, P., HUANG, W. M. (1995) Linear chromosomes of Lyme disease agent spirochetes: genetic diversity and conservation of gene order. *J. Bacteriol.* 177: 2769-2780.
- COLEMAN, J. L., ROGER, R. C., BENACH, J. L. (1992) Selection of an escape variant of *Borrelia burgdorferi* by use of bactericidal monoclonal antibodies to OspB. *Infect. Immun.* 60 (8): 3098-3104.
- COMSTOCK, L. E., THOMAS, D. D. (1989) Penetration of endothelial cell monolayers by *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 57 (5): 1626-1628.
- CZEKALOWSKI, J. W., EAVES, G. (1954) Formation of granular structures by Leptospirae as revealed by the electron microscope. *J. Bacteriol.* 67: 619-627.
- CZEKALOWSKI, J. W. (1963) Electron microscope study of *Leptospira*. *Antonie von Leeuwenhoek J. Microbiol Serol.* 29: 29-34.
- DEKONING, J., DURAY, P. H. (1993) Histopathology of human Lyme borreliosis. In: Weber K., Burgdorfer W. (eds.), *Aspects of Lyme borreliosis*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 70-92.
- DETTORI, G., AMALFITANO, G., POLONELLI, L., ROSSI, A., GRILLO, R., PLAISANT, P. (1987) Electron microscopy studies of human intestinal spirochetes. *Eur. J. Epidemiol.* 3 (2): 187-195.
- DUCHATEAU, B. K., MUNSON, E. L., ENGLAND, D. M., LOVRICH, S. D., CALLISTER, S. M., JENSEN, J. R., SCHELL, R. F. (1999) Macrophages interact with enriched populations of distinct T lymphocyte subsets for the induction of severe destructive Lyme arthritis. *J. Leukocyte Biol.* 65: 162-170.
- DURAY, P. H., STEERE, A. C. (1986) The spectrum of organ and systems pathology in human Lyme disease. *Zbl. Bakt. Hyg. A* 236: 169-178.
- EVANS, J. (2000) Lyme disease. *Curr. Opin. Rheumatol.* 12(4): 311-317.
- FERDOWS, M. S., BARBOUR, A. G. (1989) Megabase-sized linear DNA in the bacterium *Borrelia burgdorferi* the Lyme disease agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5969-5973.

- FILGUEIRA, L., NESTLE, F. O., RITTIG, M., JOLLER, H. I., GROSCURTH, P. (1996) Human dendritic cells phagocytose and process *Borrelia burgdorferi*. J. Immunol. 157: 2998-3005.
- FINGERLE, V., BERGMEISTER, H., LIEGL, G., VANEK, E., WILSKE, B. (1994) Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* in Southern Germany. J. Spiroch. Tick Dis. 1: 41-45.
- FINGERLE, V., HAUSER, U., LIEGL, G., BRANISLAV, P., PREAC-MURSIC, V., WILSKE, B. (1995) Expression of outer surface proteins A and C of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus*. J. Clin. Microbiol. 33 (7): 1867-1869.
- FINGERLE, V., LIEGL, G., MUNDERLOH, U. G., WILSKE, B. (1998) Expression of outer surface proteins A and C of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks removed from humans. Med. Microbiol. Immunol. 187: 121-126.
- FINGERLE, V., LAUX, H., MUNDERLOH, U. G., SCHULTE-SPECHTEL, U., WILSKE, B. (2000) Differential expression of outer surface proteins A and C by individual *Borrelia burgdorferi* in different genospecies. Med. Microbiol. Immunol. 189: 59-66.
- FRASER, C. M., CADJENS, S., HUANG, W. M., SUTTON, G. G., CLAYTON, R., LATHIGRA, R., WHITE, O., KETCHUM, K. A., DODSON, R., HICKEY, E. K., GWINN, M., DOUGHERTY, B., TOMB, J.-F., FLEISCHMAN, R. D., RICHARDSON, D., PETERSON, J., KERLAVAGE, A. R., QUACKENBUSH, J., SALZBERG, S., HANSON, M., VAN VUGT, R., PALMER, N., ADAMS, M.D., GOCAYNE, J., WEITMAN, J., UTTERBACK, T., WATTHEY, L., McDONALD, L., ARTIACH, P., BOWMAN, C., GARLAND, S., FUJII, C., COTTON, M., D., HORST, K., ROBERTS, K., HATCH, B., SMITH, H. O., VENTER, J. C. (1997) Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. Nature 390 580-586.
- FUCHS, H., WALLICH, R., SIMON, M. M., KRAMER, M. D. (1994) The outer surface protein A of the spirochete *Borrelia burgdorferi* is a plasmin(ogen) receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 12594-12598.
- GARCIA-MONCO, J. C., VILLAR, B. F., BENACH, F. L. (1989) Adherence of the Lyme disease spirochete to glial cells and cells of glial origin. J. Infect. Dis. 160 (3): 497-506.
- GARCIA-MONCO, J. C., VILLAR, B. F., SZCZEPANSKI, A., BENACH, F. L. (1991) Cytotoxicity of *Borrelia burgdorferi* for cultured rat glial cells. J. Infect. Dis. 163: 1362-1366.
- GARIN, C., BUJADOUX, C. H. (1922) Paralysie par les tiques. J. Med. Lyon 71: 756-767.
- GILMORE, R. D., KAPPEL, K. J., JOHNSON, B. J. B. (1997) Molecular characterization of a 35-kilodalton protein of *Borrelia burgdorferi*, an antigen of diagnostic importance in early Lyme disease. J. Clin. Microbiol. 35 (1): 86-91.
- GIRSCHICK, H. J., HUPPERTZ, H. I., RÜSSMAN, H. KRENN, V. KRACH, H. (1996) Intracellular persistence of *Borrelia burgdorferi* in human synovial cells. Rheumatol. Int. 16: 125-132.

- GOLDSTEIN, S. F., CHARON, N. W., KREILING, J. A. (1994) *Borrelia burgdorferi* swims with a planar waveform similar to that of eukaryotic flagella. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3433-3437.
- GOLDSTEIN, S. F., BUTTLE, K. F., CHARON, N. W. (1996) Structural analysis of the Leptospiraceae and *Borrelia burgdorferi* by high voltage electron microscopy. J. Bacteriol. 178 (22): 6539-6545.
- GUO, B. P., BROWN, E. L., DORWARD, D. W., ROSENBERG, L. C., HÖÖK, M. (1998) Decorin-binding adhesins from *Borrelia burgdorferi*. Mol. Microbiol. 30 (4): 711-723.
- HAGMAN, K. E., YANG, C., WIKEL, S. K., SCHOELLER, G. B., CAIMANO, M. J., RADOLF, J. D., NORGARD, M. V. (2000) Decorin-binding protein A (dbpA) of *Borrelia burgdorferi* is not protective when immunized mice are challenged via tick infestation and correlates with the lack of dbpA expression by *B. burgdorferi* in ticks. Infect. Immun. 68 (8): 4759-4764.
- HANSON, M. S., CASSATT, D. R., GUO, B. P., PATEL, N. K., MCCARTHY, M. P., DORWARD, D. W., HÖÖK, M. (1998) Active and passive immunity against *Borrelia burgdorferi* decorin binding protein A (DbpA) protects against infection. Infect. Immun. 66 (5): 2143-2153.
- 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 (6): 1433-1444.
- HAUSER, U., LEHNERT, G., WILSKE, B. (1999) Validity of interpretation criteria for standardized Western blots (immunoblots) for serodiagnosis of Lyme Borreliosis based on sera collected throughout Europe. J. Clin. Microbiol. 37 (7): 2241-2247.
- HAYES, S. F., BURGDORFER, W. (1993) Ultrastructure of *Borrelia burgdorferi*. In: Weber K., Burgdorfer W. (eds.), Aspects of Lyme borreliosis. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 29-43.
- HECHEMY, K. E., SAMSONOFF, W. A., HARRIS, H. L., MCKEE, M. (1992) Adherence and entry of *Borrelia burgdorferi* in vero cells. J. Med. Microbiol. 36: 229-238.
- HERZER, P. (1993) Joint manifestations. In: Weber K., Burgdorfer W. (eds.), Aspects of Lyme borreliosis. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 168-184.
- HINDERSSON, P., THOMAS, D., STAMM, L., PENN, C., NORRIS, S., JOENS, L. A. (1992) Interaction of spirochetes with the host. Res. Microbiol. 143 (6): 629-639.
- HOVIND-HOUGEN, K. (1974) Electron microscopy of *Borrelia merionesi* and *Borrelia recurrentis*. Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B 82: 799-809.
- HOLT, S. C. (1978) Anatomy and chemistry of spirochetes. Microbiol. Rev. 42 (1): 114-160.
- HU, C. M., WILSKE, B., FINGERLE, V., LOBET, Y., GERN, L. (2001) Transmission of *Borrelia garinii* OspA Serotype 4 to BALB/c mice by *Ixodes ricinus* ticks collected in the field. J. Clin. Microbiol. 39 (3): 1169-1171.

- HULINSKA, D., BARTAK, P., HERCOGOVA, J., HANCIL, J., BASTA, J., SCHRAMLOVA, J. (1994) Electron microscopy of Langerhans cells and *Borrelia burgdorferi* in Lyme disease patients. Zbl. Bakt. 280: 348-359.
- HUPPERTZ, H. I., BÖHME, M., STANDAERT, S. M., KARCH, H., PLOTKIN, S. A. (1999) Incidence of Lyme borreliosis in the Würzburg Region of Germany. Eur. J. Clin. Infect. Dis. 18: 697-703.
- JOURIS-HEIPKE, S., RÖBLE, B., WANNER, G., HABERMANN, C., RÖSSLER, D., FINGERLE, V., LEHNERT, G., LOBENTANZER, R., PRADEL, I., HILLENBRAND, B., SCHULTE-SPECHTEL, U., WILSKÉ, B. (1999) Osp17, a novel immunodominant outer surface protein of *Borrelia afzelii*: recombinant expression in *Escherichia coli* and its use as a diagnostic antigen for serodiagnosis of Lyme borreliosis. Med. Microbiol. Immunol. 187: 213-219.
- JOBE, D. A., CALLISTER, S. M., SCHELL, R. F. (1993) Recovery of *Borrelia burgdorferi* by filtration. J. Clin. Microbiol. 31: 1896-1897.
- JOHNSON, R. C., HYDE, F. W., RUMPEL, C. M. (1984 a) Taxonomy of the Lyme disease spirochetes. Yale J. Biol. Med. 57: 529-537.
- JOHNSON, R. C., SCHMID, G. P., HYDE, F. W., STEIGERWALD, A. G., BRENNER, D. J. (1984 b) *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiologic agent of Lyme disease. Int. J. Syst. Bacteriol. 34: 436-497.
- KAHL, O., JANETZKI-MITTMAN, C., GRAY, J. S., JONAS, R., STEIN, J., DEBOER, R. (1998) Risk of infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato for a host in relation to the duration of nymphal *Ixodes ricinus* feeding and the method of tick removal. Zbl. Bakt. Hyg. A 287: 41-52.
- KAWATA, T., INOUE, T. (1964) Fine structure of the Reiter Treponeme as revealed by electron microscopy using thin sectioning and negative staining techniques. Japan. J. Microbiol. 8: 49-65.
- KELLENBERGER, E., RYTER, A., SÉCHAUD, J. (1958) Electron microscope study of DNA-containing plasmids II. Vegetative and mature phage DNA as compared with normal bacterial nucleoids in different physiological states. J. Biophys. Biochem. Cytol. 4: 671-678.
- KERSTEN, A., POITSCHKEK, C., RAUCH, S., ABERER, E. (1995) Effects of penicillin, ceftriaxone, and doxycycline on morphology of *Borrelia burgdorferi*. Antimicrob. Agents Chemother. 39 (5): 1127-1133.
- KLEMPNER, M. S., NORING, R., ROGERS, R. A. (1993) Invasion of human skin fibroblasts by the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. J. Infect. Dis. 167: 1074-1081.
- KIMSEY, R. B., SPIELMAN, A. (1990) Motility of Lyme disease spirochetes in fluids as viscous as the extracellular matrix. J. Infect. Dis. 162: 1205-1208.

- KURTTI, T. J., MUNDERLOH, U. G., KRUEGER, D. E., JOHNSON, R. C., SCHWAN, T. G. (1993) Adhesion to and invasion of cultured tick (Acarina; Ixodidae) cells by *Borrelia burgdorferi* (Spirochaetales: Spirochaetaceae) and maintenance of infectivity. *J. Med. Entomol.* 30 (3): 586-596.
- KYSE-ANDERSEN, J. (1984) Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamid to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 10: 203-209.
- LAEMMLI, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- LI, C., MOTALEB, M. A., SAL, M., GOLDSTEIN, F., CHARON, N. W. (2000) Spirochete periplasmic flagella and motility. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2 (4): 345-354.
- LIPSCHÜTZ, B. (1913) Über eine seltene Erythemform (Erythema chronicum migrans). *Arch. Dermatol. Syph.* 118: 349-356.
- MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., PARKER, J. (1997) Brock – Biology of Microorganisms. Prentice Hall International Editions.
- MOTALEB, M. A., CORUM, L., BONO, J. L., ELIAS, A. F., ROSA, P., SAMUELS, D. S., CHARON, N. W. (2000) *Borrelia burgdorferi* periplasmic flagella have both skeletal and motility functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (20): 10899-10904.
- NAUMAN, R. K., HOLT, S. C., COX, C. D. (1969) Purification, ultrastructure, and composition of axial filaments from *Leptospira*. *J. Bacteriol.* 98 (1): 264-280.
- PADILLA, M. L., CALLISTER, S. M., SCHELL, R. F., BRYANT, G. L., JOBE, D. A., LOVRICH, S. D., DUCHATEAU, B. K., JENDEN, J. R. (1996) Characterization of the protective borreliacidal antibody response in humans and hamsters after vaccination with a *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A vaccine. *J. Infect. Dis.* 174: 739-746.
- PAUL, H., GERTH, H.-J., ACKERMANN, R. (1986) Infectiousness for humans of *Ixodes ricinus* containing *Borrelia burgdorferi*. *Zbl. Bakt. Hyg. A* 263: 473-476.
- PETERS, D. J., BENACH, J. L. (1997) *Borrelia burgdorferi* adherence and injury to undifferentiated and differentiated neural cells in vitro. *J. Infect. Dis.* 176: 470-477.
- PFISTER, H.-W., KRISTOFERITSCH, W., MEIER, C. (1993) Early neurological involvement (Bannwarth's Syndrome) In: Weber K., Burgdorfer W. (eds.), Aspects of Lyme borreliosis. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 152-167.
- PILLOT, J., RYTER, A. (1965) Structure des spirochètes. 1. Étude des genres *Treponema*, *Borrelia* et *Leptospira* au microscope électronique. *Ann. Inst. Pasteur* 108 (6): 791-804.

- PLATTNER, H., ZINGSHEIM, H. P. (1987) Elektronenmikroskopische Methodik in der Zell- und Molekularbiologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.
- PREAC-MURSIC, V., SCHIERZ, G., PFISTER, H.-W., EINHÄUPL, K., WILSKE, B., WEBER, K. (1984 a) Isolierung einer Spirochäte aus Liquor cerebrospinalis bei Meningoradiculitis-Bannwarth. Münch. Med. Wochenschr. 126: 275-276.
- PREAC-MURSIC, V., WILSKE, B., SCHIERZ, G., PFISTER, H.-W., EINHÄUPL, K. (1984 b) Repeated isolation of spirochetes from the cerebrospinal fluid of a patient with meningoradiculitis Bannwarth (letter). Eur. J. Clin. Microbiol. 3: 564-565.
- PREAC-MURSIC, V., WILSKE, B., HERZER, P., SCHIERZ, G., BAUER, M. (1985) Acrodermatitis chronica atrophicans-eine Borreliose! Hautarzt 36: 691-693.
- PREAC-MURSIC, V., WILSKE, B., SCHIERZ, G. (1986) European *Borrelia burgdorferi* isolated from humans and ticks: culture conditions and antibiotic susceptibility. Zbl. Bakt. Hyg. A 263: 112-118.
- PREAC-MURSIC, V., WILSKE, B., SCHIERZ, G., HOLMBURGER, M., SÜß, E. (1987) *In vitro* and *in vivo* susceptibility of *Borrelia burgdorferi*. Eur. J. Clin. Microbiol. 6: 424-426.
- PREAC-MURSIC, V., WILSKE, B., PATSOURIS, E., JAURIS, S., WILL, G., SOUTSCHEK, E., REINHARDT, S., LEHNERT, G., KLOCKMANN, U., MEHRAEIN, P. (1992) Active immunization with pC protein of *Borrelia burgdorferi* protects gerbils against *B. burgdorferi* infection. Infection 20 (6): 342-349.
- PREAC-MURSIC, V., WILSKE, B. (1993) Biology of *Borrelia burgdorferi*. In: Weber K., Burgdorfer W. (eds.), Aspects of Lyme borreliosis. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 44-58.
- PREAC-MURSIC, V., WANNER, G., REINHARDT, S., WILSKE, B., BUSCH, U., MARGET, W. (1996) Formation and cultivation of *Borrelia burgdorferi* spheroplast-L-form variants. Infection 24 (3): 218-226.
- REYNOLDS, E. S. (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. 17: 208-212.
- RIBEIRO, J. M. C., MATHER, T. N., PIESMAN, J., SPIELMAN, A. (1987) Dissemination and salivary delivery of Lyme disease spirochetes in vector ticks (Acari: Ixodidae). J. Med. Entomol. 24: 201-205.
- RITTIG, M. G., HÄUPL, T., KRAUSE, A., KRESSEL, M., GROSCURTH, P., BURMESTER, G. R. (1994) *Borrelia burgdorferi*-induced ultrastructural alternations in human phagocytes: a clue to pathogenicity? J. Pathol. 173: 269-282.
- RYBERG, B., NILSSON, B., BURGDORFER, W., BARBOUR, A. G. (1983) Antibodies to Lyme-disease spirochete in European lymphocytic meningoradiculitis (Bannwarth's syndrome). Lancet (letter) II: 519.
- RYTER, A., PILLOT, J. (1963) Étude au microscope électronique de la structure externe et interne du tréponème Reiter. Ann. Inst. Pasteur 104: 496-501.

- SABATINI, D. D., BENSCH, K., BARNETT, R. J. (1963) Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J. Cell Biol.* 17: 19-58.
- SADZIENE, A., ROSA, P. A., THOMPSON, P. A., HOGAN, D. M., BARBOUR, A. G. (1992) Antibody-resistant mutants of *Borrelia burgdorferi*: in vitro selection and characterisation. *J. Exp. Med.* 176 (3): 799-809.
- SCHAIBLE, U. E., GERN, L., KRAMER, M. D., KURTENBACH, K., MUSETEANU, C., WALLICH, R., SIMON, M. M. (1992) Von der Maus zum Menschen – Lyme-Borreliose in Wild-, Haus- und Labortieren. In: Burmester, G.-R., Rittig, M., Häupl, T. (eds.) Lyme-Borreliose. Neue Aspekte in Klinik und Diagnostik. II. Erlanger Borreliose-Symposium: 31-48.
- SCHALLER, M., NEUBERT, U. (1994) Ultrastructure of *Borrelia burgdorferi* after exposure to benzylpenicillin. *Infection* 22 (6): 401-406.
- SCHIMMEL, G., VOGELL, W. (eds.) (1975) Methodensammlung der Elektronenmikroskopie.
- SCHLEGEL, H. G. (1985) Allgemeine Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- SCHMUTZHARD, E., STANEK, G., PLESCHETTE, M., HIRSCHL, A. M., PALLUA, A., SCHMITZBERGER, R., SCHLÖGL, R. (1988) Infections following tickbites. Tick-borne encephalitis and Lyme Borreliose – a prospective epidemiological study from Tyrol. *Infection* 16: 269-272.
- SCHWAN, T. G., PIESMAN, J., GOLDE, W. T., DOLAN, M. C., ROSA, P. A. (1995) Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 92: 2990-2913.
- SCHWAN, T. G., PIESMAN, J. (2000) Temporal changes in outer surface proteins A and C of the Lyme disease-associated spirochete, *Borrelia burgdorferi*, during the chain of infection in ticks and mice. *J. Clin. Microbiol.* 38: 382-388.
- SIMON, M. M., BAUER, Y., ZHONG, W., HOFMANN, H., WALLICH, R. (1999) Lyme disease: pathogenesis and vaccine development. *Zbl. Bakt.* 289 (5-7) 690-695.
- SPURR, A. R. (1969) A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* 26: 31-43.
- STANEK, G. (1985) Lyme disease and related disorders. *Microbiol. Sci.* 2 (8): 231-234.
- STANEK, G., SATZ, N., STRLE, F., WILSKE, B. (1993) Epidemiology of Lyme Borreliosis. In: Weber K., Burgdorfer W. (eds.), Aspects of Lyme borreliosis. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 358-370.
- STEERE, A. C., MALAWISTA, S. E., SNYDMAN, D. R., ANDIMAN, W. A. (1976) A cluster of arthritis in children and adults in Lyme, Connecticut. *Arthritis Rheum.* 19: 824.
- STEERE, A. C., MALAWISTA, S. E., HARDIN, J. A., RUDDY, S., ASKENASE, P. W., ANDIMAN, W. A. (1977 a) Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis. The enlarging clinical spectrum. *Ann. Intern. Med.* 86 (6): 685-698.

- STEERE, A. C., MALAWISTA, S. E., SYNDMAN, D. R., SHOPE, R. E., ANDIMAN, W. A., ROSS, M. R., STEELE, F. M. (1977 b) Lyme arthritis: An epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. *Arthritis Rheum.* 20 (1): 7-17.
- STEERE, A. C., BRODERICK, T. F., MALAWISTA, S. E. (1978) Erythema chronicum migrans and Lyme Arthritis: Epidemiological evidence for a tick vector. *Am. J. Epidemiol.* 108 (4): 312-321.
- STEERE, A. C., MALAWISTA, S. E. (1979) Cases of Lyme disease in the United States: Location correlated with distribution of *Ixodes dammini*. *Ann. Intern. Med.* 91: 730-733.
- STEERE, A. C., GRODZICKI, R. L., A, KORNBLATT, A. N., CRAFT, J. E., BARBOUR, A. G., BURGDORFER, W., SCHMID, G. P., JOHNSON, E., MALAWISTA, S. E. (1983) The spirochetal etiology of Lyme disease. *N. Engl. J. Med.* 308 (13): 733-740.
- STEERE, A. C. (1989) Medical progress – Lyme disease. *N. Engl. J. Med.* 321: 586-596.
- SWAIN, R. H. A. (1955) Electron microscopic studies of the morphology of pathogenic spirochaetes. *J. Path. Bacteriol.* 69: 117-128.
- SZCZEPANSKI, A., FURIE, M. B., BENACH, J. L., LANE, B., P., FLEIT, H. B. (1990) Interaction between *Borrelia burgdorferi* and endothelium in vitro. *J. Clin. Invest.* 85: 1637-1647.
- TANAKA, K., NAGURO, T. (1981) High resolution scanning electron microscopy of cell organelles by a new specimen preparation method. *Biomed. Res.* 2 (Suppl.): 63-70.
- TANAKA, K., MITSUSHIMA, A. (1984) A preparation method for observing intracellular structures by scanning electron microscopy. *J. Microscopy* 133 (2): 213-222.
- VAN DER LINDE, M. R., BALLMER, P. E. (1993) Lyme Carditis.
In: Weber K., Burgdorfer W. (eds.), *Aspects of Lyme borreliosis*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 131-151.
- WEBER, K., SCHIERZ, G., WILSKE, B., PREAC-MURSIC, V. (1985) Das Lymphozytom-eine Borreliose? *Z. Hautkr.* 60: 1585-1598.
- WEBER, K., PREAC-MURSIC, V., NEUBERT, U., THURMAYR, R., HERZER, P., WILSKE, B., SCHIERZ, G., MARGET, W. (1988) Antibiotic therapy of early European Lyme borreliosis and acrodermatitis chronica atrophicans. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 539: 324-345.
- WEBER, K., BURGDORFER W. (1993 a) Therapy of Tick Bite. In: Weber K., Burgdorfer W. (eds.), *Aspects of Lyme borreliosis*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 351.
- WEBER, K., PFISTER, H.- W., REIMER, C. D. (1993 b) Clinical overview.
In: Weber K., Burgdorfer W. (eds.), *Aspects of Lyme borreliosis*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 93-104.

- WECKE, J., WOLF, V., FATH, S., BERNIMOULIN, J.-P. (1995) The occurrence of treponemes and their spherical bodies on polytetrafluoroethylene membranes. *Oral. Microbiol. Immunol.* 10: 278-283.
- WILSKE, B., PREAC-MURSIC, V., SCHIERZ, G., VON BUSCH, K. (1986) Immunochemical and immunological analysis of European *Borrelia burgdorferi* strains. *Zbl. Bakt. Hyg. A* 263: 92-102.
- WILSKE, B., STEINHUBER, R., BERGMEISER, H., FINGELE, V., SCHIERZ, G., PREAC-MURSIC, V., VANEK, E., LORBEER, B. (1987) Lyme-Borreliose in Süddeutschland. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 112: 1730-1736.
- WILSKE, B., PREAC-MURSIC, V., SCHIERZ, G. (1988 a) Lyme-Borreliose. *Die Gelben Hefte* Jg. XXVIII 4: 146-159.
- WILSKE, B., PREAC-MURSIC, V., SCHIERZ, G., KÜHBECK, R., BARBOUR, A. B., KRAMER, M. (1988 b) Antigenic variability of *Borrelia burgdorferi*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 539: 126-143.
- WILSKE, B., PREAC-MURSIC, V., FUCHS, R., BRUCKBAUER, H., HOFMAN, A., ZUMSTEIN, G., JAURIS, S., SOUTSCHEK, E., MOTZ, M. (1990) Immunodominant proteins of *Borrelia burgdorferi*: implications for improving serodiagnosis of Lyme borreliosis. In: Neu, H. C. (ed.) *New antibacterial strategies*. Churchill Livingstone Verlag London: 47-63.
- WILSKE, B., ANDERSON, F. F., BARANTON, G., BARBOUR, A. G., HOVIND-HOUGEN, K., JOHNSON, R. C., PREAC-MURSIC, V. (1991) Taxonomy of *Borrelia* spp. *Scand. J. Infect. Dis. (Suppl)* 77: 108-129.
- WILSKE, B., BARBOUR, A. G., BERGSTRÖM, S., BURMAN, N., RESTREPO, B. I., ROSA, P. A., SCHWAN, T., SOUTSCHEK, E., WALLICH, R. (1992 a) Antigenic variation and strain heterogeneity in *Borrelia* spp. *Res. Microbiol.* 143: 583-596.
- WILSKE, B., LUFT, B., SCHUBACH, W. H., ZUMSTEIN, G., JAURIS, S., PREAC-MURSIC, V., KRAMER, M. D. (1992 b) Molecular analysis of the outer surface protein A (OspA) of *Borrelia burgdorferi* for conserved and variable antibody binding domains. *Med. Microbiol. Immunol.* 181: 191-207.
- WILSKE, B., PREAC-MURSIC, V., GÖBEL, U. B., GRAF, B., JAURIS-HEIPKE, S., SOUTSCHEK, E., SCHWAB, E., ZUMSTEIN, G. (1993 a) An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis. *J. Clin. Microbiol.* 31 (2): 340-350.
- WILSKE, B., PREAC-MURSIC, V., JAURIS, S., HOFMANN, A., PRADEL, I., SOUTSCHEK, E., SCHWAB, E., WILL, G., WANNER, G. (1993 b) Immunological and molecular polymorphisms of OspC, an immunodominant major outer surface protein of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 61: 2182-2191.
- WILSKE, B., JAURIS-HEIPKE, S., LOBENTANZER, R., PRADEL, I., PREAC-MURSIC, V., RÖSSLER, D., SOUTSCHEK, E., JOHNSON, R. C. (1995 a) Phenotypic analysis of outer surface protein C (OspC) of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by monoclonal antibodies: relationship to genospecies and OspA serotype. *J. Clin. Microbiol.* 33 (1): 103-109.

- WILSKE, B., PFISTER, H.-W. (1995 b) Lyme borrelioses research. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 8: 137-144.
- WILSKE, B., BUSCH, U., EIFFERT, H., FINGERLE, V., PFISTER, H.-W., RÖSSLER, D., PREAC-MURSIC, V. (1996 a) Diversity of OspA and OspC among cerebrospinal fluid isolates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from patients with neuroborreliosis in Germany. *Med. Microbiol. Immunol.* 184: 195-201.
- WILSKE, B., BUSCH, U., FINGERLE, V., JAURIS-HEIPKE, S., PREAC-MURSIC, V., RÖSSLER, D., WILL, G. (1996 b) Immunological and molecular variability of OspA and OspC. Implications for *Borrelia* vaccine development. *Infection* 24: 208-212.
- WILSKE, B., FINGERLE, V. (2000) Therapy of Lyme borreliosis. Stage-appropriate antibiotic selection and dosage. *MMW Fortschr. Med.* 142 (15): 32-33.
- WILSKE, B., ZÖLLER, L., BRADE, V., EIFFERT, H., GÖBEL, U. B., STANEK, G. (2000) Lyme Borreliose. In: Mauch, H., Lütticken, R. (eds.) *Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik*. Urban Fischer Verlag, München, Jena.
- WOLF, V., WECKE, J. (1994) Formation of multiple treponemes. *Zbl. Bakt.* 280: 297-303.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Gerhard Wanner und Frau PD Dr. Bettina Wilske möchte ich dafür danken, daß sie es mir ermöglicht haben, dieses interessante Thema als Kooperationsprojekt zwischen dem Botanischen Institut und dem Max von Pettenkofer-Institut der LMU München zu bearbeiten.

Herrn Prof. Dr. G. Wanner danke ich besonders für die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit, die geduldige und ausführliche Einweisung in die Elektronenmikroskopie, die Einführung in die Geheimnisse eines Macintosh-Computers, seine ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft, sowie die Gewährung der nötigen Freiräume.

Frau PD Dr. B. Wilske gilt mein besonderer Dank für die fortwährende Unterstützung bei der Bearbeitung des Themas und ihr stets großes Interesse am Fortgang der Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. H.-W. Pfister möchte ich mich dafür bedanken, daß er mir die Astrozyten-Zelllinie zur Verfügung gestellt hat.

Herrn Dr. A. Bock möchte ich für seine unerschöpfliche Geduld bei der Einweisung in die trickreiche Bedienung des „kleinen TEM“, sowie seine stete Unterstützung bei allen anfallenden Laborproblemen danken.

Frau Dr. E. Facher, E.-M. Rottmayr, U. Wengenroth und E. Schröder-Reiter danke ich für viele ergiebige Diskussionen und manchen „lustigen Freitag“.

Bei S. Steiner, A. Mohr, S. Dobler und C. Niemann möchte ich mich für die Einführung in die Präparationstechnik und die tatkräftige Unterstützung während des Laboralltags bedanken. Außerdem danke ich R. Ulbrich für seinen hilfreichen Einsatz bei Computerproblemen.

Für die Einweisung in das „Leben der Zecken“ und seine große Bereitschaft medizinische Fragen zum Thema „Lyme Borreliose“ zu diskutieren möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Dr. V. Fingerle bedanken.

Frau Dr. S. Jauris-Heipke und Frau Dr. U. Schulte-Spechtel danke ich für ihre stete Diskussionsbereitschaft.

Für die Herstellung der monoklonalen Antikörper möchte ich mich ganz herzlich bei Frau R. Hillermann bedanken.

C. Heimerl danke ich vor allem für die Einweisung in die Zellkulturtechnik.

C. Hizo-Teufel, G. Lehnert, S. Lange, und U. Wilhelm möchte ich für die freundliche Aufnahme in die „Lyme Gruppe“ danken, sowie die geduldige Einweisung in die Technik der Borrelienkultur, der Antikörperreinigung und der Gelelektrophorese.

Allen Kolleginnen und Kollegen möchte ich für das angenehme und freundschaftliche Arbeitsverhältnis während der vergangenen Jahre danken.

Ganz besonders danke ich Maximilian Rößle für das zeitaufwendige Korrekturlesen und seine fortwährende Unterstützung während der gesamten Doktorarbeit.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Birgit Röble, geb. Kampfinger
Anschrift Gärtnerstr. 6
86153 Augsburg
Geburtsdatum, -ort 24.07.72 in Augsburg
Familienstand verheiratet;
Ehemann Maximilian Röble
Eltern Elisabeth Kampfinger-Poloczek
Josef Kampfinger

Schulbildung 1978 - 1982 Grundschule Westheim, Grundschule Leitershofen
1982 - 1991 Jakob-Fugger-Gymnasium der Stadt Augsburg

Studium 1991 - 1997 Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität, München;
Abschluß mit der Diplomprüfung 1997

Promotion seit September 1997
Promotion in der Borrelienforschung am Botanischen Institut der Fakultät für Biologie in einem Kooperationsprojekt mit dem Max von Pettenkofer-Institut, der Ludwig-Maximilians-Universität, München.

September 1997-August 2000
Mitglied des Graduiertenkollegs „Infektion und Immunität“ am Max von Pettenkofer-Institut; gefördert durch die DFG.

September 2000-Dezember 2000
Wissenschaftliche Angestellte am Botanischen Institut bzw. am Max von Pettenkofer-Institut.

seit März 2001
Stipendium im Rahmen des Hochschulsonderprogramms III.