

**Untersuchungen zur Genregulation eukaryoter Gene in  
Borrelien-infizierten Endothelzellen**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades

**Doktorin der Naturwissenschaften**

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

**Dipl.-Biol. Anja Schlotzhauer**

geboren am 16.06.1971 in Laatzen

2003

**Referent:** Prof. Dr. Walter H. Müller

**Korreferent:** Prof. Dr. Dr. Wilfried Bausch

**Tag der Promotion:** 04.12.2003

*Der Beginn aller Wissenschaften ist das Erstaunen,  
dass die Dinge sind wie sie sind.*

*(Aristoteles; 384 - 322 v. Chr.)*



## Zusammenfassung

Die Lyme-Borreliose ist eine Multisystemerkrankung, die durch Borrelien des *Borrelia burgdorferi* sensu lato-Komplexes verursacht wird. Man unterscheidet mehrere Genospezies (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, und *B. garinii*), die leicht unterschiedliche klinische Erscheinungsformen auslösen. Für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurde *B. burgdorferi* sensu stricto eingesetzt; dieser Erreger ist vornehmlich in Nordamerika beheimatet. Die Bakterien werden durch Zecken übertragen. Die Krankheit verläuft charakteristischerweise in verschiedenen Stadien, wobei der individuelle Krankheitsverlauf recht variabel ist. Während die Frühmanifestationen der Erkrankung normalerweise gut behandelbar sind und in einem hohen Prozentsatz der Fälle spontan ausheilen, sprechen die Spätformen der Lyme-Borreliose – etwa die Lyme-Arthritis – nur mäßig gut auf Antibiotika an und sind durch Chronizität der Symptome und hohe Rezidivneigung gekennzeichnet. Borrelien gelten als typische, extrazellulär wirkende Bakterien. Mehrere Autoren haben nun aber mittels Immunfluoreszenzfärbungen gezeigt, dass Borrelien auch innerhalb von Endothel- und Synovialzellen gefunden werden können. Die pathophysiologische Bedeutung dieses intrazellulären Vorkommens ist aber vollkommen unbekannt.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden durch *Borrelia burgdorferi* ausgelöste Genregulationen in humanen Wirtszellen unter experimentellen Bedingungen untersucht, bei denen es zu einem intrazellulären Befall kommen kann.

- (1) Hierzu wurde zunächst ein Infektionsmodell in humanen Endothelzellen der Nabelschnur (HUVEC) aufgebaut. Infektiöse Borrelien konnten nach Tierpassage durch die Maus gewonnen werden. Mittels Immunfluoreszenzdoppelfärbung konnte mikroskopisch der Nachweis intrazellulärer Bakterien erbracht werden.
- (2) Die erhaltene mRNA infizierter Zellen wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und gegen cDNA-Arrays hybridisiert, um potentiell regulierte Gene zu identifizieren. Als Kontrollen wurden Zellen eingesetzt, die entweder nicht-infiziert oder mit hitzeinaktivierten Borrelien behandelt worden waren. Aus drei verschiedenen Infektionsansätzen konnten so 10 potentiell regulierte Gene aus einem Panel von 1176 identifiziert werden.
- (3) Für 4 dieser Gene wurde anschließend eine Bestätigung auf mRNA- und Proteinebene mittels RT-PCR bzw. FACS/ELISA versucht. Hierbei konnte für 2 Gene, ICAM-1 (interzelluläres Adhäsionsmolekül-1) und MIP-2alpha (Makrophagen inflammatorisches Protein-2alpha), eine Bestätigung der in den cDNA-Arrays gefundenen Regulation erbracht werden. Beide Gene werden durch hitzeinaktivierte Borrelien hochreguliert, während in dem Ansatz mit lebenden Borrelien eine Herunterregulierung nach 24 h gezeigt werden konnte.

Die gefundenen Gene spielen eine wichtige Rolle bei der chemotaktischen Anlockung von Leukozyten und ihrem Durchtritt aus der Blutbahn in infiziertes Gewebe. Unter der Annahme, dass die gefundenen Regulationen durch intrazellulär vorliegende Borrelien ausgelöst werden, machen diese Befunde auch aus Sicht des Erregers biologisch Sinn: Wichtige Gene im Rahmen von Entzündungsprozessen werden in befallenen Zellen durch die Bakterien herunterreguliert, die entzündliche Antwort des befallenen Wirts also auf die Umgebung (nicht-befallene Zellen) „umgeleitet“. Damit können diese Befunde als erste Indizien für eine wichtige pathogenetische Bedeutung des intrazellulären Vorkommens von Borrelien bei der Lyme-Borreliose gewertet werden.



## Abstract

The Lyme borreliosis is a multisystem disease caused by bacteria of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex. Several different genospecies (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, and *B. garinii*) have been described that cause slightly different clinical signs and symptoms. In this work *B. burgdorferi* sensu stricto was used, a species mainly found in North America. The bacteria are transmitted by tick bites. The disease typically proceeds successively through different stages, the natural course in the individual patient, however, may be quite variable. The early manifestations of the disease usually respond well to antibiotic therapy or may even heal spontaneously in a high percentage of cases. The late manifestations, however, are difficult to treat, the symptoms tend to become chronic and there is a high relapse rate after therapy, as in e.g. Lyme arthritis. While commonly regarded as typical extracellular bacteria, several authors have demonstrated by immunofluorescence studies, that borrelia may be found within endothelial and synovial cells. The pathophysiological relevance of these findings, however, is completely unknown.

In this thesis, the gene regulations in human host cells induced by *Borrelia burgdorferi* were analysed under experimental conditions that allow for intracellular invasion of the bacteria.

- (1) For that purpose, an infection model was established in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). Infectious *Borrelia* were generated by animal passage through laboratory mice. Intracellular localization of *Borrelia* could be demonstrated by immunofluorescence analysis.
- (2) Messenger RNA of infected cells was isolated, reversely transcribed into cDNA and hybridized against cDNA arrays to identify potentially regulated genes. As negative control, native HUVEC cells or cells treated with heat-inactivated *Borrelia* were used. In three separate experiments, 10 potentially regulated genes out of a pool of 1176 analysed ones could be identified.
- (3) Four of these genes were further analysed on mRNA and protein level using RT-PCR or FACS/ELISA techniques, respectively. This analysis could confirm the regulation found in the cDNA arrays for two of these genes, ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) and MIP-2alpha (macrophage inflammatory protein-2alpha). Both genes were found to be up-regulated in cells treated with heat-inactivated borrelia, while treatment with live borrelia apparently down-regulated these genes after 24 h.

Both genes, ICAM-1 and MIP-2alpha, play a major role in the chemotaxis and diapedesis of leukocytes. Under the assumption that these regulations are induced by intracellularly localized borrelia, these results make biological sense from the bacteria's point of view: Important genes involved in inflammatory defence processes are down-regulated by the bacteria in infected cells, thus "diverting" the inflammatory response of the host to the surrounding non-infected cells. These data therefore provide a first indication for a pathogenetic relevance of intracellular borrelia in Lyme borreliosis.

## **Schlagworte**

Borrelien, Genregulation, Endothelzellen

## **Keywords**

Borrelia, gene regulation, endothelial cells



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Entdeckung der Borrelien als Erreger der Lyme-Borreliose	1
1.2	Taxonomie und Morphologie der Spirochäten	2
1.3	Biologie der Borrelien im Zusammenhang mit dem Vektor Zecke	6
1.4	Pathogenese zur Lyme-Borreliose Erkrankung	8
1.5	Überleben von Borrelien während persistenter Wirtsinfektion	10
1.5.1	Mechanismen der Borrelien zur Umgehung der Wirts-Immunantwort	10
1.5.2	Intrazelluläres Vorkommen von Borrelien	13
1.5.3	Vermehrte Expression immunrelevanter Proteine	14
1.6	Zielsetzung	16
<b>2</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>17</b>
2.1	Geräte	17
2.2	Organismen	18
2.2.1	Eukaryote Zelllinien, primäre Zellen und Kulturmedien	18
2.2.2	Bakterien und Kulturmedien	19
2.2.3	Versuchstiere	19
2.3	Primer	20
2.4	Enzyme & Kits, Marker und Antikörper	21
2.4.1	Enzyme & Kits	21
2.4.2	Längenstandards (Marker)	21
2.4.3	Antikörper	21
2.5	Puffer und Lösungen	22
2.6	Verbrauchsmaterialien	23
2.7	Chemikalien	23
2.8	Software und Internet	25
2.8.1	Spezielle Software	25
2.8.2	Verwendete Internet-Seiten	25
2.9	Molekularbiologische Methoden	26
2.9.1	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	26
2.9.2	Agarosegelelektrophorese	27
2.9.3	Phenol-Chloroform-Extraktion	28

2.9.4	Präzipitation von Nukleinsäuren-----	29
2.9.4.1	Ethanolische Fällung-----	29
2.9.4.2	Isopropanolfällung-----	29
2.9.5	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren-----	30
2.9.6	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)-----	30
2.9.7	Restriktionsspaltung von DNA-----	32
2.9.8	Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-----	32
2.9.9	DNA-Sequenzierung-----	33
2.9.10	Arbeiten mit RNA-----	34
2.9.10.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus adhärenenten Zellen-----	34
2.9.10.1.1	Isolierung von RNA nach der Trizol-Methode-----	34
2.9.10.1.2	Isolierung von RNA mit dem RNeasy-Verfahren-----	35
2.9.10.2	Isolierung von Leukozyten-Gesamt-RNA aus humanem Blut-----	36
2.9.10.3	Denaturierende RNA-Agarosegele-----	36
2.9.10.4	cDNA-Synthese-----	37
2.9.11	Verwendung von (cDNA-)Micro-Arrays-----	38
2.9.11.1	Durchführung von Atlas-Nylon-cDNA-Arrays-----	38
2.9.12	Real-Time-RT-PCR-----	39
2.9.12.1	Primergenerierung und Austestung der Primer-----	41
2.9.12.2	Quantitative Bestimmung von cDNA mittels <i>Real-Time</i> -PCR-----	42
2.10	Proteinbiochemische Methoden-----	43
2.10.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)-----	43
2.10.2	Silberfärbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamid-Gelen-----	44
2.10.3	Westernblot-----	45
2.10.4	Immunofärbung von Zellulosenitratmembranen-----	45
2.11	Zell- und immunbiologische Methoden-----	46
2.11.1	Kultivierung eukaryoter Zellen-----	46
2.11.2	Bestimmung der Zellzahl-----	46
2.11.3	FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting)-----	47
2.11.3.1	Probengewinnung für die FACS-Messung-----	47
2.11.3.2	Durchführung des FACS-Protokolls-----	48
2.11.4	ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)-----	49
2.11.4.1	Probengewinnung für den ELISA-----	50
2.11.4.2	Durchführung des ELISA-----	50

2.12	Methoden zum Arbeiten mit Borrelien -----	50
2.12.1	Herstellung von Borrelienkultur in großem Maßstab -----	50
2.12.2	Dunkelfeldmikroskopie -----	51
2.12.3	Infektion von adhärennten Zellen mit Borrelien -----	52
2.12.4	Intrazellulärer Borreliennachweis mittels Immunfluoreszenz-Doppelfärbung	53
2.12.4.1	Herstellung und Fixierung der Zellpräparate-----	53
2.12.4.2	Durchführung der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung-----	53
2.12.5	Abtötung von Borrelien-----	54
2.13	Tierexperimentelle Methoden-----	55
2.13.1	Infektion von C3H/HeN-Mäusen (Tiermodell)-----	55
2.13.1.1	Durchführung der Infektion -----	56
2.13.1.2	Tötung der Versuchsmäuse und Organentnahme-----	56
<b>3</b>	<b>Ergebnisse -----</b>	<b>59</b>
3.1	Etablierung eines Infektionsmodells humaner Zellen mit Borrelien -----	59
3.1.1	Identifizierung eines Borrelienisolats durch RFLP-Analyse -----	59
3.1.2	Austestung von Antikörpern zum Borreliennachweis -----	60
3.1.2.1	Immunofärbung mittels monoklonaler Antikörper nach Westernblot -----	60
3.1.2.2	Fluoreszenzfärbung zum Test von Primärantikörpern -----	60
3.1.3	Austestung des intrazellulären Borreliennachweises-----	61
3.1.3.1	Immunfluoreszenzdoppelfärbung (TRITC/FITC) mit Osp-A Antikörper--	61
3.1.3.2	Differenzierung von intra- oder extrazellulären Borrelien durch Giemsa- Färbung nach antibiotischer Behandlung -----	61
3.1.3.3	Immunfluoreszenzdoppelfärbung (TRITC/FITC) mit einem polyklonalen Borrelienantikörper-----	62
3.1.4	Überprüfung der Infektiösität von Borrelienisolaten-----	63
3.1.4.1	Überprüfung eines Borrelienisolats aus dem Pferd im Mausmodell -----	63
3.1.4.2	Überprüfung von Isolaten aus Zecken-Maus-Zyklus im Mausmodell-----	65
3.1.4.3	Überprüfung von Isolaten aus Zecken-Maus-Zyklus in Zellkulturen-----	66
3.1.4.3.1	Vergleich der Infektionsrate von Borrelia burgdorferi-Stämmen -----	67
3.1.4.3.2	Vergleichende Analyse der Infizierbarkeit humaner Zellen -----	67
3.1.4.3.3	Optimierung nach Variation der Infektionsdauer und Borrelienzahl ---	67
3.1.4.3.4	Austestung zweier Abtötungsmethoden von Borrelien-----	69
3.2	Untersuchung der Borrelien-induzierten Wirtszell-Genexpression mittels radioaktiver cDNA-Arrays -----	70

3.2.1	Optimierung der RNA-Isolierung aus humanen Zellen-----	70
3.2.1.1	Austestung der Infektionsansätze für den cDNA-Array -----	70
3.2.1.2	Bestimmung der zu erwartenden Gesamt-RNA-Ausbeute -----	70
3.2.1.3	Optimierung der RNA-Isolierung zur Vermeidung von Degradierung ----	71
3.2.2	Analyse der Genexpression durch Clontech Atlas Arrays-----	72
3.2.2.1	Bearbeitung paralleler Infektionsansätze -----	72
3.2.2.2	Ergebnisse der cDNA-Array Analyse-----	73
3.3	Überprüfung der Ergebnisse der Micro-Arrays durch unabhängige Verfahren-----	77
3.3.1	Überprüfung der Ergebnisse mittels semiquantitativer <i>Real-Time</i> -RT-PCR--	77
3.3.1.1	Auswahl der zu kontrollierenden Gene -----	77
3.3.1.2	Konstruktion und Überprüfung der Primer für die <i>Real-Time</i> -RT-PCR----	77
3.3.1.3	Generierung der Proben und optimierte RNA-Isolierung -----	79
3.3.1.4	Ergebnisse der Real-Time RT-PCR -----	81
3.3.2	Überprüfung der Ergebnisse mittels ELISA für MIP-2 alpha-----	83
3.3.3	Überprüfung mittels FACS-Analyse für ICAM-1 und CD4 Antigen -----	85
3.3.3.1	Vergleichende Messungen der Infektionsansätze-----	85
3.3.3.2	Ergebnisse der FACS-Analysen -----	87
3.3.3.2.1	Ergebnisse der FACS-Analysen zu ICAM-1 -----	87
3.3.3.2.2	Ergebnisse der FACS-Analysen zum CD4-Antigen -----	89
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> -----	<b>91</b>
4.1	Biologische Wertigkeit der ermittelten Borrelien-induzierten Genregulationen -----	92
4.2	Methodische Aspekte-----	100
<b>5</b>	<b>Literatur</b> -----	<b>105</b>
<b>6</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> -----	<b>115</b>
<b>7</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> -----	<b>117</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> -----	<b>119</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b> -----	<b>121</b>
9.1	Messdaten der Mausinfektionsversuche -----	121
9.1.1	Mausinfektion mit Borrelien des „Wendelino“-Isolates -----	121
9.1.2	Mausinfektion: Wiederholung mit „Wendelino“-Isolat-----	122
9.1.3	TaqMan Ergebnisse (MIP-2a)-----	123
9.1.4	TaqMan Ergebnisse (ICAM-1)-----	123
9.1.5	ELISA Ergebnisse (MIP-2a) -----	123
9.2	Statistiken zur FACS-Analyse von ICAM-1 -----	124

---

9.2.1	Statistik zu Endothelzellen mit lebenden Borrelien -----	124
9.2.2	Statistik zu Endothelzellen mit toten Borrelien -----	124
9.2.3	Statistik zu Endothelzellen ohne Borrelien -----	124
9.3	Position der generierten Primer -----	125
	<b>Lebenslauf -----</b>	<b>127</b>
	Eigene Publikation-----	129
	Danksagung -----	131
	<b>Eidesstattliche Erklärung-----</b>	<b>133</b>



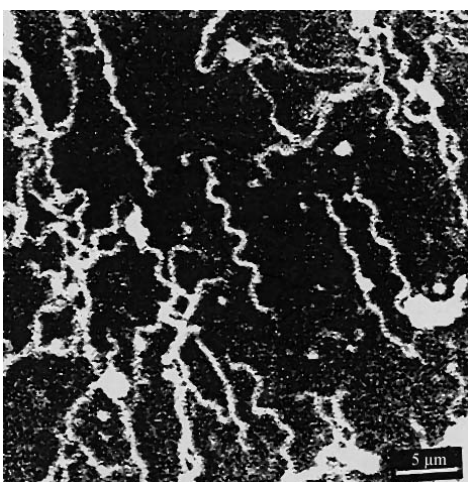
# 1 Einleitung

Im Rahmen dieser Dissertation wurden durch Bakterien der Gattung *Borrelia* ausgelöste Genregulationen in humanen Wirtszellen untersucht. Zur Einführung in dieses Thema werden der Hintergrund zur Entdeckung, Taxonomie und Biologie dieses Erregers dargestellt, sowie die durch ihn hervorgerufene Erkrankung erläutert, die Lyme-Borreliose. Ebenso wird auf bereits vorhandene Forschungsergebnisse zum Überleben von Borrelien in Wirtszellen, sowie verursachte Genregulationen eingegangen.

## 1.1 Entdeckung der Borrelien als Erreger der Lyme-Borreliose

Die seit dem II. Internationalen Kongress über Lyme-Disease in Wien 1985 international akzeptierte Bezeichnung "Lyme-Borreliose" fasst verschiedene Krankheitsbilder zusammen, die bereits seit einigen Jahrzehnten bekannt und beschrieben, jedoch nicht miteinander in Beziehung gebracht wurden. Die Lyme-Borreliose ist die bedeutendste durch Zecken übertragene Infektion bei Mensch und Haustier in Europa. Die Namensgebung erfolgte aufgrund der 1974/75 beobachteten Häufigkeit von Arthritis bei Kindern in der Stadt Lyme (USA), was eine forcierte Ursachenforschung zur Folge hatte [1]. Als historische Indizien waren bereits 1883 in Europa von Buchwald die chronische Hautentzündung (*Acrodermatitis chronica atrophicans*) und 1910 von Afzelius die Wanderröte (*Erythema migrans*) nach Zeckenstichen beschrieben worden. Zudem wurden 1922 von Garin und Bujadoux einige neurologische Erkrankungen und 1941 von Bannwarth die Meningopolyneuritis als Folge von Zeckenstichen beschrieben.

Doch erst die verstärkte Untersuchung des Arthritisphänomens in Lyme durch Allen L. Steere und Steven E. Malawista von der Universität in New Haven (Connecticut), führte Ende der siebziger Jahre zum starken Verdacht der Zecken als Träger des pathogenen Agens.



Schließlich gelang 1982 Willy Burgdorfer von den Rocky-Mountains-Laboratorien in Hamilton (Montana) die Isolierung und Identifizierung des bakteriellen Erregers aus dem Mitteldarm von *Ixodes dammini* (heute: *I. scapularis*; Hirschzecke)[2].

**Abbildung 1: Laserscan-mikroskopische Aufnahme von *Borrelia burgdorferi* (Wallich, Hofmann; Biospektrum 4/99).**

Nach dieser entscheidenden Entdeckung wurde daraufhin in Europa der nach seinem Entdecker benannte Erreger *Borrelia burgdorferi* auch im gemeinen Holzbock (*Ixodes ricinus*) nachgewiesen [3]. Erst diese Entdeckung ermöglichte eine klarere Definition des Krankheitsspektrums der *Borrelia burgdorferi*-Infektion. Weitere Untersuchungen zur klinischen Manifestation charakterisierten die Lyme-Borreliose als eine typische Multisystemerkrankung [4]. Es handelt sich um eine Erkrankung, die neben Allgemeinsymptomen vor allem die Haut, das zentrale und periphere Nervensystem sowie die Gelenke, selten auch Muskeln, Bindegewebe und andere Organe betrifft und abhängig von der Immunreaktion des Patienten einen sehr unterschiedlichen Verlauf nehmen kann.

## 1.2 Taxonomie und Morphologie der Spirochäten

Die Borrelien gehören zu den Eubakterien in der systematischen Ordnung der *Spirochaetales*. Die einzige Familie der Spirochäten (*Spirochaetaceae*) unterteilt sich in 6 Gattungen (siehe Abbildung 2). Die pathologisch am bedeutsamsten Gattungen sind die Gattung *Borrelia* mit Lyme-Borreliose oder Rückfallfieber verursachenden Borrelienspezies, die Gattung *Leptospira* mit *L. interrogans* dem human pathogenen Erreger der „Weilschen Krankheit“, die Gattung *Treponema* mit dem Syphilis-Erreger *Treponema pallidum*, aber auch harmloseren Spezies wie Schmarotzer der Mundhöhle. Ein großer Teil der anderen Gattungen beinhaltet freilebende Spirochäten, die vorwiegend apathogen sind und verbreitet an unterschiedlichsten aquatischen Habitaten in Süß- und Salzwasser vorkommen. Aufgrund des unterschiedlichen Lebensraumes gibt es aerobe, mikroaerophile und anaerobe Spezies.

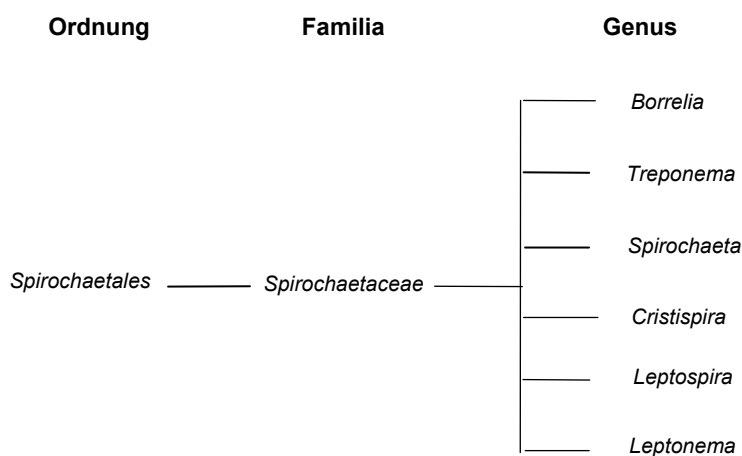


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Ordnung *Spirochaetales* mit sechs bekannten Gattungen



Ihre charakteristische spiralförmige Gestalt und Beweglichkeit, die allen Spirochaeten gemeinsam ist, erhalten diese fädigen Schraubenbakterien durch kontraktile fibrilläre Elemente, die den Protoplasmazyylinder spiralförmig umwinden. Eine äußere Hüllmembran umschließt dabei Protoplasmazyylinder und Achsialfibrillen. Diese dadurch erhaltene ideale Morphologie und Motilität erlaubt den Erregern die Penetration von Organgeweben, die auf inter- und intrazellulärem Wege stattfinden kann [5]. Speziell zu Borrelien gab es Studien zur Untersuchung der Beweglichkeit in Flüssigkeiten mit unterschiedlicher Viskosität, wobei erkannt wurde, dass Borrelien sich sehr schnell durch visköse Substanzen bewegen können, was seine natürliche Übertragung über die ebenfalls visköse Haut erklärt [6].

Die Borrelien besitzen im Vergleich zu ihrer großen Länge (20 µm) einen ungewöhnlich geringen Durchmesser (0,3 µm), aufgrund dessen sie sogar feinporige Filter passieren, die die meisten Bakterien zurückhalten, was zu ihrer Anreicherung ausgenutzt werden kann. Aufgrund des geringen Durchmessers sind sie im Hellfeld-Mikroskop nur schwer sichtbar und werden daher im Phasenkontrast- und Dunkelfeld-Mikroskop beobachtet.

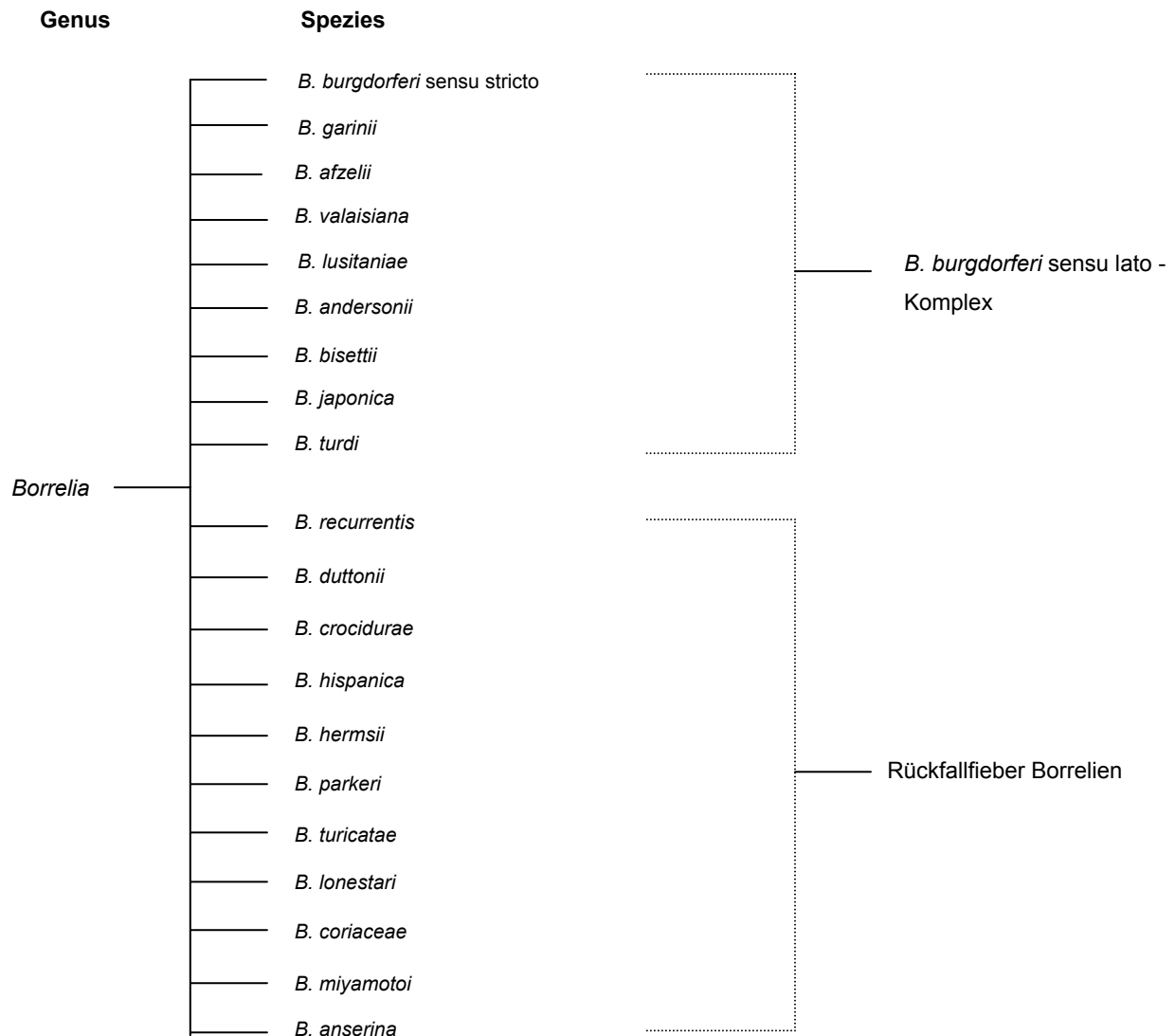
Eine Anzucht erfolgt in komplexen Spezialmedien. Die Vermehrung der Spirochaeten erfolgt durch Längsteilung, wobei die Generationszeit mit 6 bis 20 Stunden sehr lang ist.

Ultrastrukturelle Untersuchungen von Borrelien aus Isolaten von Zecken, Tieren und Menschen verschiedener geographischer Regionen brachten Unterschiede in Bezug auf Windungen und Proportionen zu Tage [7, 8]. Neben dieser morphologischen Heterogenität kam es zur Erkennung einer antigenen Heterogenität von *B. burgdorferi* [9].

Die Lyme-Borreliose selbst zeigt unterschiedliche Verläufe, deren Molekularpathologie derzeit noch intensiv untersucht wird. Als gesichertes Erkenntnis aufgrund von DNA-Sequenzuntersuchungen und der Reaktivität monoklonaler Antikörper [10] gilt bisher die Identifizierung von drei verschiedenen humanpathogenen *B. burgdorferi*-Genospezies:

- *B. burgdorferi* sensu stricto (in den USA und in Europa)
- *B. garinii* (in Europa und Asien)
- *B. afzelii* (in Europa und Asien)

Aufgrund dieser Differenzierung in Genospezies werden alle Lyme-Borreliose verursachenden Borrelienspezies unter dem Begriff *Borrelia burgdorferi* sensu lato Komplex zusammengefasst, wobei *Borrelia burgdorferi* sensu stricto davon abgegrenzt wird und eine eigene Genospezies darstellt. Aufgrund von Sequenzvergleichen werden die verwandten Borrelienspezies, welche das Rückfallfieber verursachen, etwa *B. recurrentis*, davon phylogenetisch abgegrenzt [11, 12].



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der Gattung *Borrelia*. Als eindeutig mit Lyme-Borreliose assoziiert gelten bislang drei Spezies des *Borrelia burgdorferi* sensu lato Komplexes: *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* und *B. afzelii*.

Innerhalb des *Borrelia burgdorferi* sensu lato Komplex wurde eine Reihe Genospezies identifiziert, deren Pathogenität teilweise noch ungeklärt ist oder die bisher als apathogen eingestuft werden. Sicherlich sind noch nicht alle existierenden Genospezies entdeckt und identifiziert worden. So wurde erst vor wenigen Jahren ein neues Isolat charakterisiert, welches offensichtliche Unterschiede zu allen bisher bekannten Spezies des *Borrelia burgdorferi* sensu lato Komplexes zeigt [13]. Zudem ist auch die Zuordnung in humanpathogene und apathogene Borrelienarten nach neueren Forschungsergebnissen nicht

entgültig. Dies zeigte sich zum Beispiel bei dem als apathogen eingestuften, genetisch und phänotypisch analysierten *B. valaisiana* [11], der in einer späteren Untersuchung in Probenmaterial von Patienten mit Erythema migrans als alleiniger Erreger detektiert wurde, womit ein möglicherweise pathogenes Potential aufgedeckt wurde.

Das Genom der Borrelien (*B. burgdorferi* sensu stricto Stamm B31) wurde vollständig sequenziert [14]. Als einzigartiges Merkmal im Gegensatz zu anderen Eubakterien besteht das Borreliengenom aus nur einem linearen Chromosom (910.000 bp) mit bis zu zwanzig linearen und zirkulären Plasmiden (Gesamtgröße: 530.000 bp). Das Genom ist ziemlich klein, was offenbar auf das Fehlen von Synthesewegen zurückzuführen ist. Die meisten Gene kodieren Transport- und Bindungsproteine, was dem Erreger das Überleben im Wirt erlaubt. Mehr als 6% der chromosomalen Gene sind involviert in Bewegungsfunktionen und Chemotaxis und für viele Gene ist die Funktion noch unbekannt.

Das Genom der Borrelien kodiert ungefähr 150 verschiedene Oberflächenproteine (outer surface protein = Osp), die auf der Zellmembran exprimiert ihren Dienst an der Schnittstelle zwischen Bakterium und Wirtsimmunsystem leisten. Unter anderem über diese Oberflächenproteine, wie z. B. OspA-, OspB- oder OspC [9], erfolgt eine Differenzierung der Borrelien. Ebenso wurden phylogenetische Beziehungen der Genospezies über die Analyse der für OspC kodierenden Gene aufgestellt [15], sowie deren geographischer Ursprung und Verbreitung untersucht [16].

Die meisten Gene zu Oberflächenproteinen sind auf linearen oder zirkulären Plasmiden lokalisiert.

### 1.3 Biologie der Borrelien im Zusammenhang mit dem Vektor Zecke

Die Vektoren zur Übertragung der Lyme-Borreliose sind ausschließlich Zecken der Gattung *Ixodes*, im Gegensatz zu Rückfallfieber-Borrelien, deren Überträger neben der Zecke auch die Laus (*Pediculus*) ist. Die eindeutig wichtigste und häufigste Art in Europa ist *Ixodes ricinus* (Gemeiner Holzbock), wobei auch die nest- bzw. höhlenbewohnenden Zeckenspezies *Ixodes hexagonus* (Igelzecke) und *Ixodes canisuga* (Fuchszecke) eine Rolle bei der Borrelienübertragung spielen. Die häufigste Art in den USA ist hingegen die kleine Hirschzecke *Ixodes scapularis* (ehemals: *I. dammini*)

Die Zecken sind hämatophage Ektoparasiten, für die die Blutmahlzeit, ausgenommen das männliche Stadium, für alle Stadien obligatorisch ist. Männliche Zecken saugen teilweise kleine Mengen Blut am Wirt, werden aber nie vollgesogen aufgefunden. Die Gattung *Ixodes* gehört zu den dreiwirtigen Zecken, d.h. Larven, Nymphen und Adulte saugen an verschiedenen Wirten, was ihr Infektionsverbreitungspotential im Gegensatz zu ein- oder zweiwirtigen Zecken deutlich macht. Eine Weiterentwicklung aller Zeckenstadien sowie die Eiablage der Weibchen kann ohne vorherige Blutaufnahme nicht stattfinden.

Eine weitere Besonderheit von *Ixodes ricinus* ist sein umfangreiches Wirtsspektrum, was diese Art so erfolgreich in der Besiedlung verschiedener Habitats macht und deren Kontrolle erschwert. Es sind mindestens 35 Säuger- und 45 Vogelarten, sowie Reptilien als Wirte für *Ixodes ricinus* in Deutschland bekannt [17] was auch die Verbreitung des Erregers *B. burgdorferi* begünstigt. Diese ökologische Nische der Borrelien innerhalb des Vektors und der Reservoirwirte wird oft parallel genutzt von einer Reihe nicht verwandter, aber auch durch Zecken übertragener Erreger wie *Ehrlichia*, *Babesia*, *Rickettsia* und dem Virus der viralen Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME).

Der Entwicklungszyklus von *Ixodes ricinus* dauert in Norddeutschland ca. 2-3 Jahre [18], kann sich jedoch unter ungünstigen Bedingungen wie Wirtsmangel auf 5-6 Jahre ausdehnen [19]. Allerdings werden von dieser Entwicklungszeit lediglich etwa 3 Wochen am Wirt verbracht [17]. Die juvenilen Stadien saugen 3-5 Tage, vollgesogene Weibchen verlassen nach 7-10 Tagen ihren Wirt. Nach der Begattung, die vor, nach oder während der Blutaufnahme am Wirt erfolgen kann, kommt es nach 8-10 Tagen zur Ablage von bis zu 3000 Eiern, die sich nach 4-8 Wochen zum Larvenstadium entwickeln. Im Anschluss an den ersten Saugakt entwickeln sich die sechsbeinigen Larven nach der Häutung zu achtbeinigen Nymphen. Jedes Entwicklungsstadium ist dabei in der Lage, in einer Diapause zu überwintern. Der Entwicklungszyklus wird zudem beeinflusst vom Mikroklima, z.B. führen höhere Temperaturen zu einem kürzeren Zyklus. Allerdings liegt der tolerierte

Temperaturbereich zwischen  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis  $+35\text{ }^{\circ}\text{C}$ , und die relative Luftfeuchtigkeit sollte dabei 80 % nicht unterschreiten.

Die Ausbreitung der *B. burgdorferi*-Infektion innerhalb der Vektorpopulation erfolgt parallel auf zwei Übertragungswegen:

- Die transstadiale Transmission, bei der die Infektion während der Metamorphose bestehenbleibt und somit die Borrelieninfektionsrate von Larven über Nymphen bis zu Adulten zunimmt [20].
- Die transovariale Transmission, wobei in einigen Fällen nach Besiedlung der Ovarien des Zeckenweibchens durch *B. burgdorferi* die Eier und damit die schlüpfenden Larven der Folgegeneration infiziert werden [21, 22].

Die Voraussetzung zur Übertragung der Borrelien ist, dass eine infizierte Zecke sich lange genug in der Haut des Wirtes hält. Denn um eine infektiöse Dosis von Erregern zu übertragen, muss der hämatophage Ektoparasit ca. 24-36 Stunden saugen. Da die Zecke jedoch gleichzeitig eine schmerzstillende Substanz absondert, wird dies von dem Patienten nicht bemerkt, während das Risiko der Infektion mit der Saugdauer steigt. Beim Saugakt der Zecke werden durch zytolytische Substanzen im Speichel die Kapillärwände aufgelöst und neben Blut auch Gewebssäfte sowie aufgelöste Zellbestandteile aufgenommen. Durch diese Aufnahme aus dem erzeugten Nahrungspool erfolgt auch leichter eine Infektion der Zecke selbst durch einen infizierten Wirt, da so nicht nur Blut, sondern auch im Gewebe neben der Einstichstelle befindliche Erreger in den Zeckendarm gelangen [23].

Sobald eine infizierte nüchterne Zecke bei einem neuen Wirt wieder Blut aufnimmt, beginnen sich die Borrelien im Mikrovillisaum des Mitteldarmepithels zu vermehren. Diese in der nüchternen Zecke mit dem Oberflächenprotein A (OspA) besetzten Borrelien vollziehen unter dem Einfluss des Blutkontakts während des Saugaktes eine Phasenvariation, in der es zur Herunterregulation von OspA und zur Hochregulation von OspC in den Borrelien kommt. Diese nun OspC-positiven Erreger treten durch die Zeckendarmwand in die Hämolymphe der Zecke über und weiter in die Speicheldrüsen, wo sie schließlich mit dem Speichel in die Wunde des Opfers und somit in das Blut gelangen.

Besonders interessant wurde dieses Phänomen der Veränderung von Oberflächenproteinen während des Wirtwechsels für die Entwicklung einer Vaccine. Tatsächlich wurde bereits ein Impfstoff gegen die Lyme-Borreliose entwickelt, der auf dem OspA beruht und seit Anfang 1999 in den USA zugelassen und auf dem Markt ist [24, 25]. Das Prinzip dieser OspA-Impfung basiert auf der Abtötung von OspA-positiven Borrelien noch während des Saugaktes

im Zeckendarm, durch entwickelte OspA-Antikörper des Geimpften. Eine mittlerweile ebenfalls existierende OspC-Impfung basiert auf dem Prinzip der Verhinderung einer Infektion des Patienten mit OspC-positiven Borrelien durch gebildete OspC-Antikörper.

Wegen der Heterogenität der Oberflächenproteine bei den humanpathogenen europäischen Stämmen im Gegensatz zur Homogenität der amerikanischen Stämme [26] ist seine Anwendung in Europa wohl nicht sinnvoll.

## 1.4 Pathogenese zur Lyme-Borreliose Erkrankung

Der Verlauf einer *Borrelia burgdorferi* Infektion ist individuell sehr unterschiedlich. Man unterscheidet allerdings ein örtlich begrenztes und ein streuendes Frühstadium, sowie ein Spätstadium. Nach dem Zeckenstich kommt es nach einer erscheinungsfreien Latenzphase von Tagen bis Wochen zunächst zu einer örtlich begrenzten Infektion der Haut.

### Stadium I:

Es existiert eine große Variabilität des klinischen Bildes, wobei die häufigste, aber nicht zwangsläufige Erscheinungsform das *Erythema migrans* (EM) ist. Diese typische Hautrötung entsteht in der Umgebung des Zeckenstichs und breitet sich entsprechend der Wanderung der Borrelien innerhalb der Haut über Wochen bis Monate kreisförmig aus. Das typische Erythema migrans erscheint randbetont hellrot mit zentraler Abblässung. Allerdings kommen auch homogene flammend rote, wandernde oder stationäre EM vor. Tage bis Wochen nach dem Stich kann eine Ausbreitung der Erreger über den Blutkreislauf in viele Gewebe erfolgen. Eine häufige Folge davon sind grippeähnliche Beschwerden wie Schüttelfrost, Fieber, Müdigkeit, sowie Gelenk- und Muskelschmerzen.

### Stadium II:

Die häufigste Manifestation des Stadium II ist die Neuroborreliose. Bei ca. 20 % der unbehandelten Patienten können neurale Komplikationen auftreten. Dazu gehören wochen- bis monatelange einseitige oder beidseitige Lähmungen der paarig vorhandenen Fazialisnerven und somit der davon innervierten Gesichtsmuskulatur, ferner Hirnhautentzündungen, die sich durch Kopfschmerzen, Nackensteife und Lichtempfindlichkeit ankündigen.

Stadium III:

Im Spätstadium sind die Lyme-Arthritis oder die *Acrodermatitis chronica atrophicans* (ACA) die beiden häufigsten Manifestationen. Vor allem in den USA tritt eine akute mehrwöchige Arthritis mit schmerzhaften einseitigen Gelenkschwellungen, meist im Knie, auf. Wenn in diesem Stadium keine antibiotische Therapie erfolgt, wird der Zustand meist chronisch. In Europa sind dagegen Hirnstörungen wesentlich häufiger. Überdies entwickeln 10 % der unbehandelten Fälle eine sogenannte Pergamenthaut (ACA), wobei sich die betroffenen Bereiche rötten und dünn und knitterig wie Zigarettenpapier werden.

Den drei humanpathogenen Spezies werden derzeit unterschiedliche Manifestationen der europäischen Lyme-Borreliose zugewiesen [27]:

- *Acrodermatitis chronica atrophicans* (ACA) (assoziiert mit *B. afzelii*)
- Neurologische Symptome (assoziiert mit *B. garinii*)
- Arthritis (assoziiert mit *B. burgdorferi sensu stricto*)

Analoge Krankheitsbilder werden zudem auch bei Haustieren beobachtet, wobei die Borreliose beim Hund besonders häufig, eingeschränkt auch bei der Katze, vorkommt [23]. Neuere Untersuchungen weisen auch auf Borreliose Erkrankungen bei Pferden hin, wobei die verantwortlichen Borrelienspezies noch nicht genauer charakterisiert sind. Von klinisch erkrankten Pferden wurden erstmals in Europa Borrelien aus vielen Organen in Reinkultur gezüchtet [28].

## 1.5 Überleben von Borrelien während persistenter Wirtsinfektion

Eine Reihe von Untersuchungen zur Borrelieninfektion wurden in den letzten Jahren durchgeführt. Diese Studien, die Infektionen in verschiedenen Tiermodellen, unterschiedlichen Zelllinien oder primären Zellen sowie in natürlich infizierten Menschen verglichen, lieferten den eindeutigen Beweis, dass die Lyme-Borreliose eine persistente Infektionskrankheit darstellt. Obwohl immer noch viele Pathomechanismen der Borrelien nicht ausreichend geklärt sind, konnten doch mittlerweile erste Mechanismen zum Überleben des Erregers innerhalb des Wirtes aufgezeigt und einige Anhaltspunkte für neue Hypothesen erlangt werden. Zur Einordnung der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen werden im folgenden einige bereits bekannte oder noch vermutete Hintergründe zu Vorgängen während persistenter Infektion kurz erläutert.

### 1.5.1 Mechanismen der Borrelien zur Umgehung der Wirts-Immunantwort

In einer Vielzahl von Tierexperimenten mit Mäusen [29], Ratten [30], Hamstern [31], Hunden [32] und auch mit Affen [33] konnte festgestellt werden, dass eine Persistenz des Erregers der Lyme-Borreliose die Regel ist. Obwohl natürliche Infektionen weniger gut kontrolliert werden können, gibt es auch überzeugende Beweise dafür, dass Persistenz ebenfalls bei natürlich infizierten Menschen auftritt [34, 35]. Auch vor dem Hintergrund, dass die Zecke (*Ixodes*) als Vektor einen langen und manchmal ineffektiven Lebenszyklus von bis zu 6 Jahren hat, ist es nicht verwunderlich, dass *B. burgdorferi* evolutionär eine Strategie entwickelt hat, um seinen Reservoirwirt fortdauernd zu infizieren.

Während der Infektion konnte bei Arthritis, Karditis und anderen Manifestationen einer Lyme-Borreliose ein periodischer Wechsel von Verschlimmerung der Schmerzen und vorübergehender Besserung festgestellt werden, was an Rückfallfieber erinnert [29]. Im Gegensatz zu den Rückfallfieber-verursachenden Borrelien, wo Myriaden von Spirochaeten im peripheren Blut vorkommen, ist während der Lyme-Borreliose jedoch nur eine geringe Anzahl Borrelien vorhanden [36].

Trotz der Tatsache, dass *B. burgdorferi* eine persistente Infektion ausbildet, erfolgt eine starke Immunantwort vom Wirt. Dies konnte in mehreren Studien gezeigt werden. So wurde Serum von persistent infizierten immunkompetenten Mäusen in immunsuppressive (SCID) Mäuse transferiert und ein Schutz gegen eine frühe Infektion mit Borrelien erhalten [37, 38]. Ähnliches Schutzzpotential konnte bei passiver Immunisierung von Mäusen mit Serum von natürlich infizierten Hunden und Menschen demonstriert werden [39, 40]. Bei Injektion von Serum persistent infizierter immunkompetenter Mäuse in erkrankte SCID-Mäuse konnte



sogar eine Überwindung von Arthritis beobachtet werden, allerdings blieben Spirochaeten im Gewebe nachweisbar und andere Krankheitssymptome ließen nicht nach [37, 38]. Bei ähnlicher Versuchsdurchführung jedoch mit Serum gegen abgetötete Kulturborrelien ist dies zwar passiv immunisierend, jedoch nur wenn vor der Borrelieninfektion gegeben und führt nicht zu einer Überwindung von Arthritis [37, 38]. Bei der Untersuchung von infiziertem Gewebe mittels indirekter Immunhistochemie unter Verwendung des Immunsерums konnten Spirochäten in den Geweben von Gelenken und Herz detektiert werden, jedoch nicht in anderen Geweben. Bei Verwendung des Immunsерums gegen abgetötete Kulturborrelien konnten jedoch keine Spirochäten detektiert werden [37, 38].

Diese Beobachtungen führten zu der Vermutung, dass *B. burgdorferi* während der Infektion undefinierte Antigene exprimiert. Es existieren neben antigenen Unterschieden von verschiedenen Borrelien-Subtypen untereinander [9] auch Variationen durch veränderte Expression von Antigenen während der Infektion. So werden im Zuge einer Anpassung an den Wirt von den Borrelien unterschiedliche Oberflächenstrukturen exprimiert [41]. Diese sind verantwortlich für die hohe antigenen Variabilität von Borrelien und damit auch ihre Fähigkeit, der Immunabwehr zu entkommen.

Es ist mittlerweile allgemein akzeptiert, dass *B. burgdorferi* eine Phasenvariation vollzieht, allerdings ist noch unklar, ob dies auch dazu dient, um der Erkennung durch das Immunsystem zu entgehen. Die vielversprechendsten Genprodukte für diese Aktivität sind OspC [42], Erp Proteine [43, 44], der 2.9 Locus [45] und Vls, [46] da für alle diese Proteine auch Beweise für ihre Expression im Säugewirt vorliegen. Allerdings scheint OspC keinen genetischen Wechsel während einer Infektion zu zeigen [42], während einige Mitglieder der Erp Protein-Familie eine bevorzugte Expression *in vivo* zeigen [43, 47]. Außerdem zeigte eine Studie, dass ErpG während der ersten Infektionswochen nicht exprimiert wurde, jedoch in späteren Infektionsstadien heraufreguliert wurde [44]. Trotzdem konnte die Hypothese, dass ein antigener Wechsel den Bakterien einen selektiven Vorteil durch Umgehung der Immunabwehr liefert, noch nicht bewiesen werden.

Kürzlich konnte jedoch der Beweis für eine Immunsuppression des Wirtes durch Borrelien erbracht werden [48]. Eine weitere Charakterisierung dieses Vorgangs zeigte eine durch Borrelien bewirkte Desensitivierung von humanen Monocyten durch messbar abgeschwächte Zytokinsekretion [49].

Zur Untersuchung der Genregulationen bei Borrelien selbst wurden kürzlich ebenfalls einige Micro-Array Studien durchgeführt [50, 51]. So wurden die Regulationen in den drei

unterschiedlichen Wachstumsbedingungen von Borrelien innerhalb ihres Lebenszyklus (nüchterne Zecke, saugende Zecke und im Säugewirt) miteinander verglichen. Ein großer Prozentsatz der unterschiedlich regulierten Gene kodiert Exportsignale und leistet dadurch wahrscheinlich einen Beitrag zum extrazellulären Überleben im Wirt. Ein großer Teil der Genregulationen wurde unter den Bedingungen in der saugenden Zecke ermittelt, welche charakterisiert sind durch erhöhte Temperatur (37°C) und reduzierten pH-Wert nach der Blutaufnahme bzw. dem Wirtswechsel. Ebenso konnte für die allgemein als Ruhestadium bezeichneten Bedingungen in der nüchternen Zecke (23 °C) eine starke Regulation von Faktoren festgestellt werden, die eine bakterielle Zellteilung beschränken [50].

Später wurde versucht Regulationen, zu ermitteln, die ausschließlich durch Signale des Säugewirtes hervorgerufen und nicht durch Temperaturveränderungen induziert werden. Hierzu wurden Dialyse-Membran-Kammern (DMC) in den Säugewirt (Ratte) implantiert und bei der Analyse mit in vitro temperaturveränderten Erregern verglichen. Von den gefundenen 125 regulierten Genen gehörte der größte Teil zur einer funktionellen Gruppe, die mit der Bakterienhülle, inklusive der Außenmembranproteine, in Zusammenhang steht [51].

Ein beobachtetes Phänomen sind formveränderte Varianten von *B. burgdorferi* in L-Form oder zystischer Form, die in einer Reihe von Publikationen unter in vitro Bedingungen beschrieben wurden [52-55]. Diese Formen besitzen unvollständig ausgebildete Zellwände, sind aber resistent gegen Beta-Lactam-Antibiotika [56]. Zystische Formen konnten jedoch nicht nur in Zellkultur, sondern auch im Gewebe von infizierten Menschen nachgewiesen werden [53, 57]. Es wurde beobachtet, dass sich Spirochäten nach Überführung in Liquor innerhalb von 24h in zystische Formen umwandeln und durch Rückführung in normales Kulturmedium (BSK-H) wieder in bewegliche Formen zurückverwandeln können [54, 55]. Dieses Phänomen konnte noch nicht ausreichend charakterisiert werden, doch es wirft die Frage auf, ob diese antigenetisch wenig aktiven L-Formen, welche sich periodisch in bewegliche Formen zurückverwandeln und proinflammatorische Antigene exprimieren, für den teilweise periodischen Charakter der *B. burgdorferi* Infektion verantwortlich sind.

Ein weiteres noch weitgehend ungeklärtes Phänomen ist das „blebbing“, das heißt die Absonderung von extrazellulär membrangebundenen Vesikeln von der Oberfläche der Spirochäten. Der Proteingehalt dieser Strukturen ist dem Membranproteingehalt eines intakten Organismus sehr ähnlich und die Vesikel enthalten Plasmid-DNA, aber keine chromosomale DNA [58, 59]. Dies wird als möglicher Mechanismus diskutiert, um potentiell schädigende Wirtsfaktoren wie z.B. Antikörper abzuwerfen, oder schnell die

Bakterienoberfläche als Anpassung an neue Umweltbedingungen nach erfolgtem Wirtswechsel zu ändern.

### 1.5.2 Intrazelluläres Vorkommen von Borrelien

In der Regel persistieren *B. burgdorferi* extrazellulär, können jedoch auch in Zellen wie zum Beispiel Endothelzellen [60] überleben und dadurch möglicherweise zu einer chronischen Infektion beitragen. Obwohl nur wenige Infizierte auch manifest erkranken und Spontanheilung jederzeit auftreten kann, werden trotzdem in einem kleinen Teil der klinisch apparenten Fälle chronische Verläufe beobachtet, die auch bei hinlänglicher antibiotischer Therapie keine Heilung zeigen. Als Ursache hierfür werden immunpathologische Phänomene vermutet, die bislang schlecht charakterisiert sind [61, 62], allerdings wurden in den letzten Jahren neue Aspekte zur Pathogenese der Lyme-Borreliose aufgezeigt [63].

Die meisten Studien zur intrazellulären Lokalisation von Borrelien basieren auf Ergebnissen von in vitro Experimenten mit einer Reihe verschiedener Zellkulturtypen wie Fibroblasten [64], Synovialzellen [65] und Endothelzellen [60, 66]. Allerdings existieren auch Tiermodell-Studien: So konnten durch Elektronenmikroskopie in Muskelzellen und Endothelzellen aus dem Herz von infizierten Mäusen intrazelluläre Borrelien entdeckt werden [67].

Ebenso gibt es eine Reihe Publikationen zur Detektion von intrazellulären Borrelien innerhalb von Makrophagen [68, 69]. Da es sich allerdings hierbei wohl nicht um einen aktiven Eindringprozess von Borrelien, sondern eher um eine passive Aufnahme durch eine aktiv arbeitende Immunabwehrzelle handelt, kann dies nicht als ein Beispiel für typisches intrazelluläres Überleben dienen. Wohl aber als Indiz dafür, dass Borrelien trotz ihrer Fähigkeit zum bemerkenswerten antigenen Wechsel bei der Übertragung durch die Zecke auf den Wirt noch von der Immunabwehr erkannt werden können.

Unbestritten scheint der Nutzen von intrazellulärem Überleben in Wirtszellen als Schutz vor der Immunabwehr und extrazellulär höheren Konzentrationen von Antibiotika [54, 70]. Die Anheftung der Erreger an die Wirtszellen wird anscheinend unter anderem durch ein Zusammenwirken von Oberflächenstrukturen der Wirtszelle (Glykosaminoglykane, GAGs) und Oberflächenproteinen (Decorin-binding protein) der Borrelien vermittelt [71].

Trotz dieser Beobachtungen zeigt sich in vielen Studien, dass *Borrelia burgdorferi* sensu lato normalerweise ein hauptsächlich extrazellulär vorliegender Erreger ist; in einigen Studien konnten überhaupt keine intrazellulären Spirochäten gefunden werden [72]. Dagegen konnten noch ein Jahr nach der Infektion von Mäusen extrazelluläre Spirochäten in der Haut gefunden werden [29].

Mit arthritisanfälligen C3H-Mäusen konnte die Kinetik des Befalls von *Borrelia burgdorferi*, sowie der Mechanismus der Persistenz und Pathogenese weiter entschlüsselt werden. Nach Silberfärbung von Gewebepräparaten infizierter Mäuse konnte ein Ausstreuen des Erregers nach dem dermalen Eintritt bewiesen werden, indem gezeigt werden konnte, dass die Spirochäten die Wände von kleinen Arterien penetrieren und das umgebene Gewebe aufsuchen. Dabei wurde eine generelle Bevorzugung kollagener Verbundgewebe festgestellt, wie die Befestigungsansätze von Bändern und Sehnen am Knochen, Haut oder der großen Gefäße an der Basis des Herzens. Basierend auf Silberfärbung, PCR, Immunhistochemie und Kultivierung wurde bewiesen, dass der Beginn einer Entzündung im Gelenk begleitet ist vom Vorkommen eingedrungener Spirochäten. Erstaunlich ist auch die Tatsache, dass Spirochäten andere Gewebe wie Haut, Milz und Nervensystem, befallen können ohne größere Entzündungsreaktionen auszulösen [73].

Auch nach mehr als einem Jahr *post infectionem* konnte durch Silberfärbung, PCR und Kultivierung bei infizierten Mäusen die Haut als der häufigste Ort für persistentes Vorliegen von Borrelien erkannt werden [29]. Diese Vorliebe von Spirochäten für die Haut macht einen evolutionären Sinn für diesen Erreger, da Haut die Schnittstelle zwischen seinem Vektor (Zecke) und dem Wirt darstellt. Diese Bevorzugung von kollagenen Verbundgeweben, die Haut eingeschlossen, wird ebenfalls als möglicher Mechanismus zur erfolgreichen Persistenz diskutiert. In Studien zur vergleichenden Untersuchung der Beweglichkeit von Borrelien in Flüssigkeiten mit unterschiedlicher Viskosität wurde die Fähigkeit von Borrelien ersichtlich, sich sehr schnell durch visköse Substanzen bewegen zu können [6]. Da Phagozyten dagegen in viskösen Substanzen nicht so schnell beweglich sind, wird vermutet, dass Borrelien dies als Vorteil zum Entkommen vor der Immunantwort des Wirtes nutzen.

### 1.5.3 Vermehrte Expression immunrelevanter Proteine

Nach Infektion mit *B. burgdorferi* kommt es bei verschiedenen Zelltypen zu einigen Regulationen die vorwiegend auf Proteinebene dokumentiert wurden. Es erfolgt vor allem eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen und ein messbarer Anstieg der Sekretion verschiedener Zytokine. Bei den publizierten Adhäsionsmolekülen wurde vorwiegend ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) reguliert, aber auch VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) und Selektine treten häufiger auf. Während fast alle der tabellarisch aufgeführten Expressionen auf Proteinnachweisen basieren, konnte in einer Studie [74] für

Endothelzellen und Fibroblasten auch auf mRNA-Ebene mittels *Real-time*-RT-PCR die vermehrte Expression einiger Adhäsionsmolekülen nachgewiesen werden.

<b>Eukaryoter Zelltyp</b>	<b>Vermehrte Expression durch <i>Borrelia burgdorferi</i></b>
Synovialgewebe; Endothelzellen	ICAM-1, P-Selectin, VAP-1, LFA-1 [75]
Endothelioma- Zelllinie (Maus)	ICAM-1, P-Selectin, E-Selectin, VCAM-1 [76]
Endothelzellen	ICAM-1, E-Selectin, VCAM-1, Gro- $\alpha$ [74] IL-8, MCP-1 [77]
Endothelzellen (HUVEC)	ICAM-1, VCAM-1 [78, 79] ICAM-1, E-Selectin, VCAM-1 [74]
Fibroblasten	ICAM-1, E-Selectin, VCAM-1 [74] IL-8, MCP-1 [77] IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ [69]
Synovialzellen human	ICAM-1 (runterreguliert) [80]
Synovialzellen Maus	ICAM-1, P-Selectin, E-Selectin, VCAM-1 [81]
Makrophagen/ Monozyten	IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ [77, 82]

**Tabelle 1: Publierte Borrelien-induzierte Veränderungen der Expression von Adhäsionsmolekülen sowie der Sekretion von Zytokinen bei verschiedenen Wirtszellen**

## 1.6 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die molekulare Analyse von Genregulationen in Wirtszellen, die durch Infektion mit Borrelien ausgelöst werden. Um möglichst viele Informationen zu erhalten, sollten die Analysen mit cDNA-Arrays (1176 Gene, Atlas Human 1.2; Clontech) durchgeführt werden.

### ***1. Etablierung eines Infektionsmodells humaner Zellen mit Borrelien***

Hierzu sollten 1.) hoch infektiöse Borrelien durch Tierpassage erzeugt werden, da die Infektiosität der vorhandenen Langzeit-Kultivierungsstämme im Laufe zahlreicher Passagierungen abgeschwächt sein kann. Zudem sollten 2.) geeignete humane Zellen ermittelt und ihre Infizierbarkeit ausgetestet werden. Ein weiterer Abschnitt hierzu umfasste 3.) die Prüfung einer Reihe von Antikörpern und verschiedener Methoden auf ihre projektbezogene Tauglichkeit zum Borreliennachweis bzw. intrazellulären Infektionsnachweis.

### ***2. Untersuchung der Borrelien-induzierten Wirtszell-Genexpression mittels radioaktiver cDNA-Arrays***

Durch den Einsatz von cDNA-Arrays kann simultan eine große Menge von Genen analysiert werden. Im vorliegenden Projekt sollten nach Optimierung der RNA-Isolierung verschiedene Infektionsansätze von humanen Zellen mit lebenden oder hitze-inaktivierten Borrelien mit nicht-infizierten Zellen auf mRNA-Ebene verglichen werden, um spezifisch regulierte Gene zu ermitteln.

### ***3. Überprüfung der Ergebnisse der Micro-Arrays durch unabhängige Verfahren***

Ein Teil der Ergebnisse der Micro-Arrays und so ermittelten Veränderungen des Wirtszelltranskriptoms durch eine erfolgte Infektion sollte anschließend mit unabhängigen Methoden gezielt überprüft werden. Zunächst sollte die gefundene Regulation auf mRNA-Ebene mittels *Real-Time-RT-PCR* überprüft werden, sowie für einige regulierte Gene eine zusätzliche Analyse auf Proteinebene durchgeführt werden.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Geräte

Blotkammer, Fast Blot B33 (Biometra/ B. Braun, Göttingen)

Brutschränke: Modell B 5090 E, Modell function line (Heraeus, Osterode)

Gelelektrophoresekammern für horizontale Agarosegele: verschiedene Modelle (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden und Biometra/Blomed Göttingen)

Geltrockner: Slab Gel Dryer Modell SGD 4050 (Savant, Farmingdale)

Heizblock: Modell BT3 (Techne-Driblock, Typ DB-3, Gesellschaft für Laborgeräte, Wertheim)

Hybridisierungsöfen: Modell 400 HY (Bachhofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen), Modell Shake 'n Stack (Hybaid, Heidelberg)

Mikroskope: Unterschiedliche Modelle (Zeiss, Jena)

Mikrotiterplattenscanner: Titertek Multiskan MCC/340 (Labsystems, Finnland)

*Real-Time-RT-PCR-Gerät*: Abi Prism 7700 Sequence Detection System<sup>®</sup> (Applied Biosystems, Weiterstadt)

PCR-Thermocycler: Modell TVC 5x9 (Landgraf, Langenhagen), Techne Genius (thermo Dux Gesellschaft für Laborgeräte, Wertheim)

pH-Meter: 761 Calimatic, digital (Knick)

Phosphoimagingplatte: BAS-MP 2040S (Fuji Photo Film, Japan)

Phosphoimager: Fuji BAS-2500 (Fuji Photo Film, Japan)

Photometer: Ultrospec III (Pharmacia Biotech Inc., Uppsala, Schweden)

Photosystem: Leuchttisch, UV-Kontaktlampe Chroma 43, 302 nm (Vetter); Kamera, E.A.S.Y. 429 K (Herolab, Wiesloch); Videodokumentation E.A.S.Y. RH-3 (Herolab, Wiesloch)

Quarzküvetten: Typ 105202-QS, 1 cm Schichtdicke, 60 µl Probenvolumen (Hellma)

Spannungsgeräte: Standard Power Pack P25 (Biometra/Blomed Göttingen)

Speedvac: Speedvac Concentrator SVC 100 (Savant, Farmingdale, USA)

Sterilbänke: Lamin Air, HA 2448 (Heraeus; Osterode); TC A60 (Gelaire, Flow Laboratories, Meckenheim)

Szintillationszähler: Win Spectral 1414 liquid scintillation counter (Wallac)

Taumelschüttler: Modell WT (Biometra, Göttingen)

UV-Crosslinker: UV-Stratalinker<sup>™</sup> (Stratagene, La Jolla, USA)

Wasserbad (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel)

Zählkammer, Neubauer (HBG)

Zentrifugen: Biofuge 13 und 15R, Minifuge (Heraeus Sepatech, Osterode),

Kühlzentrifuge: Modell J2-21 (Beckman Coulter, Unterschleißheim), Typ Rotanta 96 RSC (Hettich Zentrifugen, Tutlingen)

## 2.2 Organismen

### 2.2.1 Eukaryote Zelllinien, primäre Zellen und Kulturmedien

Stammbezeichnung	Beschreibung	Kulturmedium
HUVEC	Adhärente primäre Endothelzellen (HUVEC - <u>h</u> uman <u>u</u> mbilical <u>v</u> enous endothelial cells = humane Endothelzellen der Nabelvenen), erhalten von Dr. U. Martin, Oststadtkrankenhaus, Hannover	EGM-2 Bullet Kit (BioWhittaker Europe, Verviers, Belgien)+ Zugabe von 10 % [v/v] FCS  Stopppmedium: (nach Trypsinverdau) Dulbecco's modified Eagle's medium = DMEM (Biochrome, Berlin) + Zugabe von 20 % [v/v] FCS
K4IM	adhärente Synovialfibroblast-Zelllinie, transformiert mit DNA des SV40 T-Antigens (C. Kaps, Charité, Berlin) erhalten von Dr. S. Hess, Med. Mikrobiologie, MHH	RPMI (Biochrome, Berlin) + Zugabe von 10 % [v/v] FCS
HeLa 229	Humane epitheloide Cervix-Carcinoma-Zelllinie, adhärent  Subklon 229 (ATTC-Nummer CCL-2.1) erhalten von Prof. A. Klos, Med. Mikrobiologie, MHH	MEM Eagle with Earle's BSS (Biochrome, Berlin) + Zugabe von 2,2 g/l Natriumbicarbonat, 2 mM Glutamin, 0,1 mM nicht-essentiellen Aminosäuren und 1 mM Natriumpyruvat, 10 % [v/v] FCS
RBL-2H3	Basophile leukämische Rattenzelllinie (adhärent) erworben von der American Type Culture Collection (Rockville, USA)  ATTC-Nummer CRL-1593	Dulbecco's modified Eagle's medium =DMEM (Biochrome, Berlin) + Zugabe von 10 % [v/v] FCS

**Tabelle 2: Verwendete Zelllinien und primäre Zellen mit Angaben zu den eingesetzten Kulturmedien**

Alle Medienbestandteile wurden entweder bereits steril vom Hersteller bezogen oder sterilfiltriert. Zeitweise wurden einige Medien mit Antibiotika (1% Penicillin/Streptomycin) versetzt. Das fetale Kälberserum (Gibco) wurde durch 30minütiges Erhitzen auf 56 °C inaktiviert. Alle verwendeten Zellen wurden generell im Brutschrank bei 37 °C in einer Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.



### 2.2.2 Bakterien und Kulturmedien

Stammbezeichnung	Beschreibung	Kulturmedium
B31	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto Quelle: W. Burgdorfer, USA	BSK-H complete medium (Sigma, St. Louis, USA) enthält 6 % Kaninchenserum u. v. a.  Einfriermedium: 28 ml BSK-H, 10 ml Kaninchenserum (Sigma, St. Louis, USA), 5 ml Glycerin, 3,8 ml DMSO (Dimethylsulfoxid, Merck, Darmstadt)
N40	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto Rückisolat aus Maus Quelle: Prof. F.-R. Matuschka, Charité, Berlin	siehe <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto (B31)
GÖ16	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto Rückisolat aus Maus Quelle: Prof. F.-R. Matuschka, Charité, Berlin	siehe <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto (B31)
PkO	<i>Borrelia afzelii</i> Quelle: Prof. B. Wilske, Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene, München	siehe <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto (B31)
Wendolino	<i>Borrelia afzelii</i> Isolat aus Milz vom Pferd Quelle: Dr. G. Liebisch, ZeckLab, Burgwedel	siehe <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto (B31)
VS461	<i>Borrelia afzelii</i> Quelle: Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig DMSZ 105-08	siehe <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto (B31)
N34	<i>Borrelia garinii</i> Quelle: Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig DSMZ 105-34	siehe <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto (B31)
VS116	<i>Borrelia valaisiana</i> Quelle: Dr. O. Peter, Schweiz	siehe <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto (B31)

**Tabelle 3: Verwendete Bakterienstämme mit Angaben zu den eingesetzten Kulturmedien**

Bei allen Medien waren die nachträglich zugegebenen Lösungen entweder durch Autoklavieren oder durch Sterilfiltration sterilisiert worden. Alle Borrelienkulturen wurden generell im Brutschrank bei 33 °C inkubiert.

### 2.2.3 Versuchstiere

Stammbezeichnung	Beschreibung	Quelle
C3H/HeN	Mausstamm (arthritisanfällig bei Borrelieninfektion)	Zuchtbetrieb (Charles River, Sulzfeld, Deutschland)

## 2.3 Primer

Primer für *Real-Time*-RT-PCRs:

Gen	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer	Produktlänge [bp]	Annealing-Temperatur [°C]
MIP-2 $\alpha$	Primername: <b>MIP-s</b> TTTTAGGTCAAACCCAA GTTAGTT	Primername: <b>MIP-r</b> TTCTTGGATTCTCAGCC TCTATC	150	58
ICAM-1	Primername: <b>AS1</b> AAGGCCACCCCAGAGGA CAAC	Primername: <b>AS2</b> CAGTCGGGGGCCATACA GGA	119	60
CD4	Primername: <b>AS5</b> ATTGGGCTAGGCATCTT CTTCTGTGT	Primername: <b>AS6</b> GGCACTGGCAGGTCTTC TTCTCA	108	60
IEX-1L	Primername: <b>SH208</b> CCGGCTGGGATGAAGTC TGGTG	Primername: <b>SH209</b> TCCTAATGGTCCGCCGA AGTCTCA	109	58
RPS9	Primername: <b>RPS9 hs 5'</b> CGCAGGCGCAGACGGTG GAAGC	Primername: <b>RPS9 hs 3'</b> CGAAGGGTCTCCGCGGG GTCACAT	90	60

**Tabelle 4: Primer für die spezifische Amplifikation von Teilstücken von cDNA in der *Real-Time*-PCR, angegeben sind die Namen der Gene (Abkürzung) für die Primer entwickelt wurden, die Primersequenz (in Richtung 5'  $\rightarrow$  3') sowie der zugehörige Primername, die Produktlänge und die Temperatur, die für das Annealing in der PCR verwendet wurde.**

### Weitere Primer:

Primer für den Genus-spezifischen Nachweis von Borrelien:

**P18:** 5'-CTG CGA GTT CGC GGG AGA-3'

**P19:** 5'-TCC TAG GCA TTC ACC ATA-3'

Die beiden Primer amplifizieren ein 320 bp Fragment aus der 16S rRNA-Sequenz, wobei die Annealing-Temperatur in der PCR bei 52 °C liegen sollte.

Primer für die cDNA-Synthese von RNA:

**Oligo(dT)<sub>15</sub> Primer** 0,5 mg/ml (Promega, Mannheim)

## 2.4 Enzyme & Kits, Marker und Antikörper

### 2.4.1 Enzyme & Kits

Brilliant SYBR<sup>®</sup>-Green QPCR Master Mix (Stratagene, Amsterdam, Niederlande)

cDNA-Array: Atlas Human 1.2 Array (Clontech, Palo Alto, USA)

ELISA Kit: human GRO  $\beta$  (Immuno-Biological Laboratories, Hamburg)

GFX<sup>™</sup> PCR-DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biotech Inc, Piscataway, NJ, USA)

QIAamp<sup>®</sup> RNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden)

Restriktionsenzyme (Mse I, Dra I) mit entsprechenden Puffern (New England Biolabs, Frankfurt a.M.)

Ribonuklease-Inhibitor RNasin, rekombinant (Promega, Mannheim)

RNase-free DNase RQ1 (Promega, Mannheim)

RNase-free DNase Set (Qiagen, Hilden)

RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden)

Superscript II Reverse Transkriptase (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe)

*Taq*-Polymerase Kit (Promega, Mannheim)

Ultrapure dNTP Set (Pharmacia, Freiburg)

### 2.4.2 Längenstandards (Marker)

1 Kb DNA Ladder (Life Technologies, Eggenstein)

2-log DNA Ladder (New England Biolabs, Frankfurt a.M.)

25 bp DNA Ladder (Life Technologies, Eggenstein)

100 bp DNA Ladder (MBI Fermentas)

0,24-9,5 Kb RNA Ladder (Life Technologies, Eggenstein)

Prestained SDS Molecular Weight Marker (Sigma, St. Louis, USA)

SDS-PAGE Molecular Weight Standard, Low Range (BioRad, Richmond, USA)

### 2.4.3 Antikörper

Anti-mouse-POX (Sekundärantikörper mit Peroxidase für Markierung nach Westernblot) (Jackson ImmunoResearch, West Baltimore, USA)

BacTrace<sup>™</sup> Antibody (polyklonal gegen Borrelien, aus Ziege), (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg)

Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-conjugated AffiniPure Rabbit Anti-Goat IgG (Jackson ImmunoResearch, West Baltimore Pike, USA)

FACS-Antikörper (siehe Tab. bei FACS-Methode)

Tetramethylrhodaminisothiocyanat (TRITC)-conjugated AffiniPure Rabbit Anti-Goat IgG  
(Jackson ImmunoResearch, West Baltimore, USA)

## 2.5 Puffer und Lösungen

Alle Lösungen wurden mit Aqua dest. (dH<sub>2</sub>O) angesetzt und, sofern nicht anders angegeben, durch Autoklavieren oder Sterilfiltration sterilisiert.

Lösung	Zusammensetzung
Ampli-Puffer	50 mM TRIS-HCl, 150 mM NaCl, mit NaCl auf 15 mS und mit HCl auf pH 7,5 eingestellt
Blot-Puffer	25 mM TRIS-HCl, 150 mM Glycin, 10 % Methanol, pH 8,5
Chloronaphthollösung	150 mg 4-Chloro-1-naphthol, 50 ml Methanol
20x SSC	175 g NaCl; 88,2 g MgSO <sub>4</sub> ; in 800 ml dH <sub>2</sub> O lösen, auf pH 7,2 mit HCl einstellen, ad 1 l dH <sub>2</sub> O
50x TAE	2 M Tris-Acetat, pH 8; 150 mM EDTA, pH 8,0
5x GEBS	20 % [v/v] Glycerin; 50 mM EDTA, pH 8,0; 0,05 % Bromphenolblau; 0,5 % [v/v] N-Laurylsarcosin
10 x TE	10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA
PBS	8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0,24 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; in 800 ml dH <sub>2</sub> O lösen, auf pH 7,4 einstellen mit HCl, ad 1 l dH <sub>2</sub> O, sollte eine Leitfähigkeit von 15 mS/cm haben
10 x TBE	1 M TRIS-HCl, 1M Borsäure, 0,25M EDTA, pH 8,3
Mowiol-Mischung (Einbettungsmittel für IF)	20g Mowiol, 80 ml PBS, pH 7,3; 40 ml Glycerin, Spatelspitze NaN <sub>3</sub>
RNA-5x Laufpuffer	0,1 M MOPS, pH 7,0; 40 mM Natriumacetat; 5 mM EDTA, pH 8,0
RNA- Probenauftragspuffer	50 % Formamid; 2,2 M Formaldehyd (37 %ig); 10 mM EDTA; 20 % Glycerin (87 %); 0,2 % Bromphenolblau; 50 µg/ml Ethidiumbromid
SDS- Aufschlußpuffer	2% [w/v] SDS, 12,5% [v/v] Glycerin, 0,3 g/L Bromphenolblau, 5% [v/v] 2-Mercaptoethanol in SDS-Gellösung D
SDS-Gellsg. A	30% [w/v] Acrylamid und 0,8% [w/v] N,N'-Methylendiacylamid in dH <sub>2</sub> O
SDS-Gellsg. B	1,5 M TRIS-HCl pH 8,8
SDS-Gellsg. C	10% [w/v] SDS in dH <sub>2</sub> O
SDS-Gellsg. D	0,5 M TRIS-HCl pH 6,8
SDS-Laufpuffer	50 mM TRIS, 0,4 M Glycin, 0,1% [w/v] SDS; pH 8,5
SDS-Sammelgellsg.	10% [v/v] SDS-Gellsg. A, 25% [v/v] SDS-Gellsg. D, 1% [v/v] SDS-Gellsg. C
Stopplösung (Silberfärbung)	500 ml Methanol, 120 ml Eisessig, ad 1 l dH <sub>2</sub> O
Fixierlösung (Silberfärbung)	100 ml Stopplösung, 50 µl Formaldehyd (37 %ig)
Na-Thiosulfat-Lsg	20 mg Na-Thiosulfat, ad 100 ml dH <sub>2</sub> O
Silberlösung	1 ml Silbernitrat (20 %), 75 µl Formaldehyd (37 %ig), ad 100 ml dH <sub>2</sub> O
Entwickler (Silberfärbung)	6 g Na-Carbonat, 2ml Na-Thiosulfat, 50 µl Formaldehyd (37 %ig), ad 100 ml dH <sub>2</sub> O

**Tabelle 5: Verwendete Lösungen mit ihren Zusammensetzungen**

## 2.6 Verbrauchsmaterialien

Diafilm: Ektachrome Elite 400, 36 A (Kodak)

Filterpapier: Whatman® 3MM Chr, 46 x 57 cm (Schleicher & Schuell, Dassel)

Materialien für die *Real-Time*-PCR: Optical Adhesive Covers u. Optical Tubes (Applied Biosystems, Weiterstadt)

Material für RNA-Arbeiten: Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße, verschiedenen Größen (Biozym/Cambrex, Hessisch Oldendorf)

Reaktionsgefäße:

0,5; 1,5 und 2,0 mit und ohne Schraubdeckel (Sarstedt, Nürnberg)

12, 15 und 50 ml Plastikröhrchen (Greiner, Frickenhausen)

Microplatte 96 K, Polystyrol, Rundboden, (Greiner, Frickenhausen)

Mikrotiterplatten, (6, 12, 96-well) Polystyrol, Flachboden (Greiner, Frickenhausen und TPP, Trasadingen, Schweiz)

Röhrchen mit Deckgläsern, 7 ml (Dunn Labortechnik, Asbach)

Spritzen und Kanülen: unterschiedliche Größen (Sterican/Braun, Melsungen)

Zellkulturflaschen für adhärenente Zellen: 25, 75 und 182 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche (Greiner, Frickenhausen)

Zellulosenitratmembran, PH 79, 0,1 µm (Schleicher & Schüll, Dassel)

## 2.7 Chemikalien

Agarose: ultraPure (Life Technologies, Eggenstein), SeaKem LE (Bio Whittaker/Cambrex, Apen)

Albumin, Fraktion V aus Rinderserum (BSA) (Boehringer, Mannheim)

Ammoniumpersulfat (APS) (Serva, Heidelberg)

BCP (Bromo-3-Chloro-Propan) (Sigma, Deisenhofen)

Borsäure, reinst (Merck, Darmstadt)

Bromphenolblau (Serva, Heidelberg)

Chloroform (Baker, Deventer, Niederlande)

4-Chloro-1-naphthol (Sigma, St. Louis, USA)

DEPC, Diethylpyrocarbonat (Applichem, Darmstadt)

Desoxy-Adenosintriphosphat ([ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP, 10 mCi/ml), (Amersham, Braunschweig)

Di-Natriumhydrogenphosphat (Merck, Darmstadt)

DMSO (Dimethylsulfoxid) (Merck, Darmstadt)

Essigsäure (Eisessig), (Baker, Deventer, Niederlande)  
Ethanol, z.A. (Baker, Deventer, Niederlande)  
Ethidiumbromid (Boehringer, Mannheim)  
Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA) (Roth, Karlsruhe)  
Fetales Kälberserum (FCS) (Life Technologies, Eggenstein)  
Formaldehyd (Formalin) (Merck, Darmstadt)  
Gelatine (Baker, Deventer, Niederlande)  
Glycerin (Merck, Darmstadt)  
Glycin (Biomol, Hamburg)  
Glycogen (Boehringer, Mannheim)  
Kaliumdihydrogenphosphat (Merck, Darmstadt)  
Lachssperm, gebrauchsfertige Lösung zum Hybridisieren (Boehringer, Mannheim)  
 $\beta$ -Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt)  
Methanol (Baker, Deventer, Niederlande)  
Mineralöl (Sigma, St. Louis, USA)  
MOPS (Merck, Darmstadt)  
Mowiol (Calbiochem)  
Natriumcarbonat, wasserfrei (Merck, Darmstadt)  
Natriumchlorid (Merck, Darmstadt)  
Natriumthiosulfat (Merck, Darmstadt)  
Penicillin (50 U/ml), (Life Technologies, Eggenstein)  
Rotiphorese<sup>®</sup> Gel 30 (30 % Acrylamid mit 0,8 % Bisacrylamid) (Roth, Karlsruhe)  
Salzsäure (37 %) (Riedel-de Haën, Seelze)  
SDS (Dodecylsulfat, Na-salt), research grade (Serva, Heidelberg)  
Silbernitrat, analytical grade (Serva, Heidelberg)  
Streptomycin (50  $\mu$ g/ml), (GibcoBRL, Eggenstein)  
TEMED (N, N, N', N',-Tetramethyldiamin) (Merck, Darmstadt)  
Tris (Serva, Heidelberg)  
Trizol (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe)  
Trypanblau (Boehringer, Mannheim)

## 2.8 Software und Internet

### 2.8.1 Spezielle Software

ABI Prism 7000 SDS Software (Applied Biosystems, Weiterstadt)

Adobe® Photoshop® Version 7.0 (Adobe Systems, USA)

ArrayVision Version 5.1 (Imaging Research, St. Cathrines, Ontario, Kanada)

CELLQuest™-Pro, Version 4.0.2 (Becton Dickinson, Heidelberg)

Edit Sequence, Meg Align (DNA Star Inc., USA)

Primer Select (DNA Star Inc.; USA)

Referenzmanager Version 10.0 (Research Information Systems)

PowerPoint 2000 (Microsoft, USA)

Word 2000, Excel 2000 für Windows™ (Microsoft, USA)

### 2.8.2 Verwendete Internet-Seiten

National Center for Biotechnology Information (NCBI):

Hauptseite: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Suchmaschine für Literatur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>

Verzeichnis von Gen-/Protein-Sequenzen: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>

Verzeichnis/Suchmaschine für genetische Loci mit Beschreibungen zu den einzelnen Genen:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink>

Robert Koch Institut mit Ratgeber Infektionskrankheiten:

<http://www.rki.de/INFEKT/RATGEBER/LYMEBOR.html>

Nationales Referenzzentrum für Borrelien (Uni München):

<http://www.alpha1.mpk.med.uni-muenchen.de>

## 2.9 Molekularbiologische Methoden

### 2.9.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) [83] ist ein Prozeß zur Vervielfältigung eines bestimmten DNA-Fragments (Template). Dazu wird ein DNA-Doppelstrang, der die gewünschte zu amplifizierende Sequenz enthält, aufgeschmolzen und das jeweils komplementäre Stück synthetisiert. Bei einem DNA-Einzelstrang wird mit diesem begonnen und ein Gegenstrang erzeugt. Anschließend werden die Doppelstränge erneut aufgeschmolzen und der Prozeß wiederholt. So erhält man eine exponentielle Vervielfältigung des Ausgang-Fragments.

Die Synthese erfolgt dabei in zwei Schritten, wobei im ersten Schritt ein kurzes komplementäres DNA-Oligomer (Primer) an den Anfang der zu bildenden Sequenz bindet (Annealing) und anschließend eine DNA-Polymerase dort ansetzt und den Gegenstrang synthetisiert (Elongation).

Durch Wahl von Primern, die sehr spezifisch nur an eine DNA-Sequenz binden, kann ein bestimmtes DNA-Fragment amplifiziert werden. Wichtig ist die Temperatur, die zur Hybridisierung der Primer gewählt wird (Annealing-Temperatur). Liegt diese Temperatur zu hoch, kann keine Doppelstrangausbildung stattfinden, ist die Temperatur zu niedrig, kommt es zu unspezifischen Bindungen zwischen Primer und DNA-Strang, und unterschiedliche DNA-Fragmente werden synthetisiert.

Zur wiederholten Synthese des Gegenstranges müssen DNA-Polymerasen verwendet werden, die relativ hohe Temperaturen aushalten (das Aufschmelzen des Doppelstranges erfolgt bei 96 °C) und die zudem bei hohen Temperaturen aktiv sind (72 °C), da sonst die Spezifität der Primer zu gering ist. Bei den hier durchgeführten Experimenten wurde die *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* YTI verwendet.

Die Annealing-Temperatur richtet sich nach dem A/T- und G/C-Gehalt der Oligonukleotide und kann so über diese GC-Methode nach folgender Formel berechnet werden:

$$T_{M, \text{errechnet}} [\text{°C}] = (\text{Anzahl G bzw. C}) \times 4 + (\text{Anzahl T bzw. A}) \times 2$$

Zur Optimierung von neuen Primern wurde die Annealing-Temperatur ( $T_M$ ) nach der GC-Methode ermittelt und je eine PCR für die Annealing-Temperaturen  $T_{M, \text{errechnet}} \pm 4 \text{ °C}$  durchgeführt. Die PCR-Proben mit parallel stets mitgeführter Negativkontrolle wurden im Agarosegel (2.9.2 ) analysiert und die Annealing-Temperatur gewählt, die ein eindeutiges Amplifikat



ohne zusätzliche unerwünschte Produkte ergab und bei höchstmöglicher Temperatur eine große Ausbeute erzielte.

Teilweise wurden zur Erhöhung der Spezifität zwei Vorzyklen bei einer im 1. Zyklus um 4 °C erhöhten Annealing-Temperatur  $T_a$  und im 2. Zyklus um 2 °C erhöhten Annealing-Temperatur  $T_a$  durchgeführt („Touchdown-PCR“).

## 2.9.2 Agarosegelelektrophorese

Nukleinsäuregemische können durch eine Agarosegelelektrophorese aufgetrennt werden. Dies kann zur Aufreinigung, zur Identifizierung und zur Quantifizierung von Nukleinsäuren genutzt werden.

Das Prinzip der Agarosegelelektrophorese beruht darauf, dass Nukleinsäuren durch ihre Phosphatgruppen eine negative Gesamtladung haben und somit in einem elektrischen Feld vom Minus- zum Pluspol wandern. Das Wanderungsverhalten der Nukleinsäuren im Gel wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst, wobei kleine Fragmente in der Regel schneller wandern als große. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist weiterhin abhängig von der elektrischen Feldstärke, der Temperatur, dem pH-Wert und der Ionenstärke des verwendeten Puffers, der Konformation der Nukleinsäure (linearisierte DNA, Plasmide, supercoiled-Formationen) und von der Dichte der Agarosegelmatrix, die aus vernetzten linearen Polymeren aus D-Galactose und 3,6-anhydro-L-Galactose besteht.

Das Wanderungsverhalten wird in der Regel nur über die Änderung der Agarosekonzentration, also die Änderung der Geldichte, moduliert:

Größe der Nukleinsäurefragmente	Konzentration an Agarose
0,2- 3 kb	1,5 %
0,5-10 kb	1,0 %
0,8-12 kb	0,7 %

Nach erfolgter Gelelektrophorese werden die Nukleinsäuren durch Ethidiumbromid, welches zwischen die Nukleinsäurestränge interkaliert, sichtbar gemacht. Ethidiumbromid lässt sich durch UV-Licht (Absorption bei 302 nm) zur Fluoreszenz im sichtbaren Wellenlängenbereich anregen.

Über den Vergleich von im Gel mitgeführten Längenstandards (Marker) kann eine Abschätzung der Nukleinsäurefragmentlängen sowie eine semiquantitative Konzentrationsbestimmung der einzelnen Fragmente durchgeführt werden. Dazu wurden zur Abschätzung von DNA-Fragmenten folgende kommerzielle Standards verwendet:

1 kb-DNA-Ladder (Life Technologies, Eggenstein):

Fragmentgrößen in bp: 12216, 11198, 10180, 9162, 8144, 7126, 6108, 5090, 4072, 3054, 2026, 1636, 1018, 506, 344, 298, 201, 154, 134, 75

Das Fragment mit 1636 entspricht 10 % der Gesamtmenge an aufgetragenem DNA-Marker.

$\lambda$ -Hind III-Marker (Life Technologies, Eggenstein):

Fragmentgröße in bp:	DNA-Menge in 1 $\mu$ g Marker in ng:
(23130)	(480), nicht zur Mengenabschätzung geeignet
9416	195
6557	135
(4316)	(89), nicht zur Mengenabschätzung geeignet
2322	48
2027	41
564	10

100 bp-Ladder (MBI Fermentas):

Fragmentgrößen von 80 – 1031 bp in 100 bp Abständen, dabei besonders prominente Bande bei 500 bp.

Die DNA wurde mit 5x GEBS (final 1x GEBS) versetzt und in einer Flachbettgelkammer bei ungefähr 5V pro cm Elektrodenabstand im Gel in TAE-Puffer aufgetrennt. Die Agarose wurde dazu in gewünschter Konzentration in TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und anschließend die Agaroselösung in eine entsprechende Gelkammer zum Aushärten gegeben.

Die Visualisierung der DNA-Fragmente durch Ethidiumbromid erfolgte durch anschließende 15 minütige Inkubation in einer Ethidiumbromid-Lösung (400  $\mu$ g Ethidiumbromid in 300 ml Wasser) mit angeschlossenen Waschschrift im Wasserbad zur Entfernung überschüssigen Ethidiumbromids.

### 2.9.3 Phenol-Chloroform-Extraktion

Zum Entfernen von Proteinen aus DNA-Lösungen, die dort störend wirken würden, wird die Lösung mit einem gleichen Volumen einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1) versetzt und gut durchmischt. Anschließend wird zur Auftrennung von wässriger und organischer Phase eine Zentrifugation bei 13000 rpm (Biofuge 15R, Heraeus Sepatech, Osterode) und 4 °C für 3 min angeschlossen. Die obere wässrige Phase, die die DNA enthält, wird nun vorsichtig abgenommen. Zur Entfernung verbliebenen Phenols kann eine

Nachextraktion mit einem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) angeschlossen werden.

## **2.9.4 Präzipitation von Nukleinsäuren**

Um Nukleinsäuren anzukonzentrieren oder sie in ein anderes Lösungsmittel zu überführen, können sie mit Alkohol (Ethanol oder Isopropanol) gefällt werden. Dabei nutzt man die sehr geringe Löslichkeit von Nukleinsäuresalzen in diesen Flüssigkeiten.

### **2.9.4.1 Ethanolische Fällung**

Bei der ethanolischen Fällung mit Natriumacetat werden in Lösung befindliche Nukleotide ausgefällt; sie wurde hier zur Fällung von DNA verwendet.

Die DNA-Lösung wird mit 1/10 ihres Volumens an 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und dem 2,5fachen Volumen an eiskaltem 96 %igem Ethanol versetzt. Zusätzlich kann noch als Fällhilfe Glykogen (1 µl einer 20 g/l Lösung) zugegeben werden. Nach 30 min bei -70 °C werden die gefällten Nukleinsäuren bei 13000 rpm (Biofuge 15R, Heraeus Sepatech, Osterode) und 4 °C für 30 min sedimentiert. Das Pellet wird anschließend mit eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen, um noch vorhandene Salze zu entfernen. Nach dem Trocknen in der Speedvac wird die DNA in Ampullen-Wasser oder TE-Puffer wieder gelöst.

### **2.9.4.2 Isopropanolfällung**

Die Isopropanolfällung hat den Vorteil, dass sie nur ein geringes Fällungsvolumen benötigt. Der Nachteil liegt darin, dass Isopropanol einen relativ hohen Siedepunkt hat und so die Trocknung der Nukleinsäure recht lange dauert. Diese Fällung wurde für RNA-Lösungen verwendet, wobei ausschließlich mit RNase-freien Materialien gearbeitet wurde.

Die Fällung der Nukleinsäuren erfolgte bei Raumtemperatur durch die Zugabe eines Probenvolumens an Isopropanol (2-Propanol). Zusätzlich wurde hier 1 µl Glykogen (1µl einer 20g/l Lösung) als Fällhilfe zugesetzt. Nach dem guten Durchmischen der Probe wird diese 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 15 min bei 13000 rpm (Biofuge 15R, Heraeus Sepatech) und 4 °C zentrifugiert. Es folgt ein Waschschrift mit 70%igem Ethanol. Die RNA wird im Heizblock bei 37 °C getrocknet und in DEPC-Wasser gelöst, wozu sie 10 min bei 60 °C inkubiert wird.

### 2.9.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

DNA und RNA absorbieren durch die in ihnen enthaltenen Purin- und Pyrimidinbasen ultraviolette Licht im Bereich zwischen 250 und 270 nm. Über diese Eigenschaft lassen sich Nukleinsäurekonzentrationen nach folgender Formel bestimmen:

$$c = E_{260} \times (d \times \varepsilon)^{-1}$$

mit  $c$  = Konzentration der Nukleinsäure  
 $E_{260}$  = Extinktion bei 260 nm  
 $d$  = Schichtdicke der Quarzküvette (1 cm)  
 $\varepsilon$  = Extinktionskoeffizient der Nukleinsäure

Im neutralen pH-Bereich stellen sich die Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon$  der einzelnen Basen und ihre Absorptionsmaxima wie folgt dar:

Adenin	$15158 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (259nm)
Cytosin	$7345 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (271 nm)
Guanin	$11615 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (253 nm)
Thymin	$8500 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (260 nm)
Uracil	$10100 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (260 nm)

Geht man davon aus, dass die einzelnen Basen zu gleichen Teilen in der Nukleinsäure vorkommen, so ergeben sich für eine  $E_{260} = 1$ , unter Berücksichtigung des hyperchromen Effektes, folgende Nukleinsäurekonzentrationen:

dsDNA	50 $\mu\text{g/ml}$
ssDNA	40 $\mu\text{g/ml}$
RNA	40 $\mu\text{g/ml}$ .

Dabei sollten die Proben immer gegen einen Leerwert mit gleichem Lösungsmittel gemessen werden.

Um Aufschluß über eventuelle Verunreinigungen der Nukleinsäure durch Proteine zu erhalten, wird die Extinktion der Probe bei 280 nm bestimmt. Der Quotient aus  $E_{260}$  und  $E_{280}$  sollte für reine DNA zwischen 1,8 und 1,9 und für RNA zwischen 1,9 und 2,0 liegen.

### 2.9.6 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)

Diese etablierte Methode wird allgemein vor allem als unkompliziertere Alternative zur Sequenzierung bei Mutationsanalysen eingesetzt. Das Prinzip der RFLP-Analyse gliedert sich in wenige Arbeitsschritte: Zunächst wird ein Restriktionsverdau der zu untersuchenden DNA mit entsprechenden Enzymen durchgeführt. Eine anschließende Auftrennung mittels Gelelektrophorese liefert nach Färbung ein typisches Bandenmuster. Beim Vergleich von

normaler und untersuchter DNA können Unterschiede im Bandenmuster entdeckt werden und somit z. B. auf eine Mutation hinweisen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die RFLP-Analyse zur Differenzierung und Identifizierung von verschiedenen Borrelienspezies benutzt. Diese Anwendungsmöglichkeit basiert auf der Erkenntnis, dass verschiedene Untergruppen von Borrelien nach Restriktionsverdau mit *Mse* I oder *Dra* I ein unterschiedliches Bandenmuster aufweisen. Ebenso zeigen Spezies der gleichen Untergruppe auch das gleiche Bandenmuster [84].

Zur Aufarbeitung wurden als Ausgangsmaterial der verschiedenen Borrelienspezies jeweils 2 ml gut bewachsene Borrelienkultur verwendet, diese 10 min bei 10.000 rpm zentrifugiert, der Überstand vollständig abgenommen und verworfen. Das erhaltene Borreliensediment wurde jeweils in 100 µl Aqua dest. resuspendiert und 10 min bei ca. 100 °C inkubiert.

Von den aufgearbeiteten Proben wurden jeweils 10 µl in einen 100 µl PCR-Ansatz eingesetzt. Die dabei verwendeten Primer P18/P19 sind auf 16S rRNA basierende, genuspezifische Primer zum allgemeinen Borreliennachweis, welche in der Arbeitsgruppe konstruiert wurden [85]. Der optimale Amplifikationsbereich des hier verwendeten Primerpaares liegt bei einer Temperatur von 52 °C und bildet ein ca. 330 bp großes Fragment. Zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen wurde eine Touch-down PCR durchgeführt mit einem ersten Vorzyklus bei 56 °C, einem zweiten Vorzyklus bei 54 °C und mit 45 Hauptzyklen bei der optimalen Annealingtemperatur von 52 °C. Als Endkonzentrationen im Ansatz waren von jedem 200nM Primer, je 2 µM dNTP und 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> vorhanden.

Mit jeweils 5 µl dieser PCR-Produkte wurde anschließend eine Agarosegelelektrophorese mit einem 1%igem Agarosegel durchgeführt. Mit Hilfe eines mitgeführten 1 kb Längenstandards wurde die Menge des PCR-Produktes abgeschätzt, um die Konzentration der DNA zu bestimmen. Mit dem restlichen PCR-Ansatz erfolgte eine ethanolische Fällung mit Natriumacetat (2.9.4.1) zur Aufreinigung und Konzentrierung der DNA für die spätere Restriktionsspaltung (2.9.7). Nach der anschließenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit Ethidiumbromidfärbung (2.9.8) können die unterschiedlichen Bandenmuster der verschiedenen Spezies erkannt, verglichen und gegen den mitgeführten 25 bp Längenstandard definiert werden.

### 2.9.7 Restriktionsspaltung von DNA

Eine Restriktionsspaltung ist das Schneiden von doppelsträngiger DNA (wie z.B. PCR-Produkte), welches durch spezielle Endonukleasen katalysiert wird.

Die häufig verwendeten Typ II Restriktionsenzyme schneiden dabei im Gegensatz zu Typ I Restriktionsenzymen an genau definierten Stellen in der DNA-Sequenz. Sie diffundieren an dem DNA-Doppelstrang entlang und spalten ihn an palindromen, d. h. in 180° rotationssymmetrischen Erkennungssequenzen, die zwischen vier und acht Nukleotide umfassen. Die dadurch entstehenden Schnittstellen können entweder 5'- oder 3'-überhängende (kohäsive oder „sticky“) Enden oder nicht überstehende glatte („blunt“) Enden haben.

Bei den für die RFLP-Analyse in der vorliegenden Arbeit verwendeten Restriktionsenzymen, bildet das Enzym Mse I die 5'-überhängenden Enden, Dra I dagegen nicht überstehende glatte Enden.

Die Enzyme wurden in einer Konzentration von 10 U/μg DNA eingesetzt und die Restriktionsspaltung mit 500 ng DNA in den vom Hersteller (New England Biolabs, Frankfurt a. M.) empfohlenen Puffern für eine Stunde bei 37 °C durchgeführt. Die Reaktionen wurden direkt anschließend durch Zugabe von 5x GEBS abgestoppt.

Bei den Reaktionen wurde darauf geachtet, dass ein Glycerinanteil von 5 % im Reaktionsansatz nicht überschritten wurde. Bei zu hohen Glycerinkonzentrationen und falscher Pufferwahl kommt es zu einer Minderung der Enzymaktivität oder es kann bei einigen Restriktionsenzymen zu einer unspezifischen Schnittaktivität („Staraktivität“) kommen, wodurch unerwünschte DNA-Fragmente entstehen.

### 2.9.8 Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

Zur Auftrennung der durch Restriktionsspaltung von gefällten PCR-Produkten erhaltenen Fragmente wurde eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt.

Für die 9%ige Gellösung wurden 2,25 ml 40%ige [w/v] Acrylamidlösung (Roth), 1 ml 10 x TBE und 6,75 ml Aqua dest. vermischt, mit 10 μl TEMED und 90 μl 10 % [w/v] APS versetzt und in vorbereitete Glasplatten (Abstand 1 mm) gegossen. Nach dem Einsetzen des Kamms und dem Polymerisieren des Gels wurden die 1:2 bis 1:3 mit GEBS verdünnten Proben (Volumen 15-30 μl) mit 1 x TBE als Laufpuffer in der Minigel-Elektrophoresekammer G42 (Biometra) bei 100 V für 2 h aufgetrennt. Zur Visualisierung wurde das Gel für 10 min in einem Ethidiumbromidbad (0,7 μg EtBr/ml Aqua dest.) gefärbt und anschließend

unter UV-Bestrahlung und Verwendung des Herolab-Geldokumentationssystems dokumentiert.

### 2.9.9 DNA-Sequenzierung

Die klassische DNA-Sequenzierung erfolgt nach dem Didesoxynukleotidverfahren [86], bei dem es durch den Einbau von ddNTP's in dem von der DNA-Polymerase neu synthetisierten DNA-Strang zum Abbruch der Synthese kommt.

Man unterscheidet aufgrund der unterschiedlichen Markierungsart zwischen radioaktiver und nicht-radioaktiver Sequenzierung.

Bei der radioaktiven Sequenzierung wird mit  $^{32}\text{P}$  oder  $^{35}\text{S}$  markierten Nukleotiden oder 5'-markierten Primern gearbeitet. Dahingegen erfolgt die Markierung bei der nicht-radioaktiven Sequenzierung am häufigsten mit Fluoreszenzfarbstoffen an den Didesoxynukleotiden. Dies geht meist einher mit dem Einsatz von automatischen Sequenzierern, welche die Fluoreszenzmarkierung während der Elektrophorese mittels Laser anregen und messen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere sequenzspezifische Primerpaare für den Nachweis von bestimmten humanen Genen selbstkonstruiert. Zur Überprüfung der Sequenz von PCR-Fragmenten, die mit diesen Primerpaaren amplifiziert wurden und zur Kontrolle der Zuverlässigkeit von durchgeführten Real-Time-RT-PCR Analysen, wurden diese durch Sequenzierung untersucht.

Die Sequenzierungen erfolgten bei einem kommerziellen Sequenzierunternehmen (SeqLab, Göttingen) basierend auf der nicht-radioaktiven Sequenzierung.

Hierfür wurde die erforderliche Produktion und Aufreinigung der Proben für die Sequenzierung zuvor folgendermaßen durchgeführt:

Zunächst erfolgte zur Fragmentproduktion eine normale PCR mit den üblichen Bedingungen und den Annealingtemperaturen der entsprechenden Primerpaare. Pro Primerpaar wurden für eine genügende Produktausbeute 3 bis 6 der 100  $\mu\text{l}$  Ansätze pipettiert.

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden über Säulenchromatographie mit dem GFX<sup>TM</sup> PCR-DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biotech Inc.) nach entsprechendem Herstellerprotokoll aufgereinigt.

Die in je 12  $\mu\text{l}$  Aqua dest. eluierten mehren Proben jedes Primerpaares wurden gepoolt und je Probenpool 5  $\mu\text{l}$  mit 5 x GEBS im Verhältnis 1:2 gemischt. Die elektrophoretische Analyse erfolgte im 2%igem SeaKem-Agarosegel für 1½ h bei 100 V. Zum ungefähren Abschätzen

der DNA Konzentration wurden drei verschiedene Mengen (1 µg, 0,5 µg, 0,1 µg) des λ-Hind III-Marker (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) parallel aufgetragen (2.9.2 ).

Die gewonnene DNA und die entsprechenden Primer wurden mit Konzentrationsangabe der Firma SeqLab zugeschickt.

### **2.9.10 Arbeiten mit RNA**

Bei Arbeiten mit RNA müssen besondere Vorsichtsmaßnahmen eingehalten werden, da es sehr leicht zu einer Kontamination mit ubiquitären Ribonucleasen (RNasen) kommen kann, die in sehr kurzer Zeit sämtliche freie RNA abgebaut haben können. Daher sollte nur mit entsprechender Schutzkleidung (Kittel, Handschuhe) gearbeitet werden und sämtliches Material sollte RNase-frei sein und ausschließlich für diese Arbeiten genutzt werden. RNasen können durch DEPC (final 0,2 % [v/v]) zerstört werden. Lösungen sollten nach Zugabe und erfolgter Wirkung von DEPC autoklaviert werden, um das hochgiftige DEPC zu inaktivieren.

#### **2.9.10.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus adhärennten Zellen**

Bei allen angewendeten Methoden zur Isolierung von Gesamt-RNA aus adhärennten Zellen wurden die Zellkulturen oder Zellinfektionsansätze zuvor mittels Stereolupenmikroskop auf Vitalität der Zellen begutachtet. Diese Qualitätskontrolle erfolgte, da halbverhungerte oder bereits tote Zellen schlechtere RNA-Ausbeuten liefern und die Gefahr von bereits aktiven RNasen größer ist, als in gesunden Zellkulturen. Das durchgeführte Aufbereitungsprotokoll beinhaltet zunächst die Abnahme des Mediums und das anschließende Waschen des Zellrasens in 2 aufeinanderfolgenden Waschschritten mit je 2 ml PBS auf eine Kulturflasche mit 25 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche. Sofort im Anschluß wurde die jeweilige Lysereagenz (2 ml Trizol oder 1 ml RLT-Puffer) auf den Zellrasen gegeben. Bei der gleichzeitigen Bearbeitung von mehreren Ansätzen wurde jeder einzelne Ansatz zügig bis zum Lyseschritt behandelt, um eine Austrocknung der Zellen zu verhindern und somit eine verstärkte Aktivierung von RNasen zu vermeiden und erst danach mit der RNA-Isolierung fortzufahren.

##### *2.9.10.1.1 Isolierung von RNA nach der Trizol-Methode*

Zur Aufreinigung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen [87] wurde Trizol-Reagenz (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) nach dem entsprechenden Protokoll der Firma verwendet.

Trizol ist ein Gemisch aus Phenol und Guadiniumisothiocyanat, welches die Zellen lysiert dabei RNasen hemmt (Guadiniumisothiocyanat) und die Integrität der RNA nicht



beeinträchtigt. An die Lyse der Zellen wird eine Phenol-Chloroform-Extraktion und eine Isolierung der RNA über eine Isopropanol-Fällung angeschlossen.

Für die cDNA-Arrays war hochreine RNA erforderlich, um die Signale nicht durch DNA-Verunreinigungen zu verfälschen. Nach einem Protokoll, das dem Atlas-Array-Kit der Firma Clontech entstammt, wurde deshalb noch ein Verdau mit RNase-freier DNase (RNase-free DNase RQ1, Promega) angeschlossen. Nach erfolgter Inkubation wurde eine erneute Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt.

Das Herstellerprotokoll wurde später für die RNA-Gewinnung zur Durchführung der cDNA-Arrays und nachfolgender *Real-Time*-PCR-Analysen abgewandelt, so wurde die Phenol-Chloroform-Extraktion durch eine Phenol-BCP-Extraktion ersetzt. Hierbei wurden auf 1 ml Trizol statt 500 µl Chloroform nun 200 µl BCP (Bromo-3-Chloro-Propan) gegeben. Durch die so verbesserte Aufreinigung konnte auf den Einsatz der DNase verzichtet werden.

#### 2.9.10.1.2 *Isolierung von RNA mit dem RNeasy-Verfahren*

Für die *Real-Time*-PCR-Analysen wurde teilweise auch die schnellere Aufreinigung mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) mit integriertem DNase-Verdau (RNase-free DNase Set, Qiagen) angewendet. Diese Methode basiert auf den selektiven Bindungseigenschaften einer Silikatgel-Membran in Kombination mit der hohen Geschwindigkeit, die in Mikrozentrifugen erreicht werden kann.

Die Durchführung erfolgte nach Herstellerprotokoll, bei dem zunächst die Zellen in einem stark denaturierenden Guanidiniumthiocyanat-Puffer mit  $\beta$ -Mercaptoethanol lysiert und RNasen inaktiviert wurden. Die anschließende gründliche Homogenisierung ist dabei besonders entscheidend für eine hohe RNA-Ausbeute. Zur Homogenisierung wurde das Lysat mindestens 40 mal in einer Spritze mit einer Kanüle (0,9 mm Durchmesser, 21 G, Sterican/Braun) aufgezogen und mit Druck in ein 12 ml Zentrifugenröhrchen zurückgepresst. Kleinere Kanülen könnten die RNA bei der Homogenisierung schädigen und größere Kanülen würden die DNA nicht ausreichend abtrennen. Nach Auftrag der Probe auf die Mini-Säule bindet die Gesamt-RNA an die integrierte Membran, und Verunreinigungen können gewaschen werden. Im Eluat sind alle RNA-Moleküle über 200 Nukleotiden Länge enthalten, wodurch eine Anreicherung von mRNA entsteht, da alle kleineren RNA-Moleküle (z. B. 5S rRNA u. tRNAs) selektiv entfernt wurden.

### **2.9.10.2 Isolierung von Leukozyten-Gesamt-RNA aus humanem Blut**

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Blut wurde der QIAamp® RNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach dem entsprechenden Protokoll der Firma verwendet.

Das Prinzip basiert auf der nacheinander folgenden, getrennten Lyse von Erythrozyten und Leukozyten. Da humane Erythrozyten keinen Zellkern und somit keine RNA enthalten, sind sie für eine RNA-Isolierung uninteressant. Da jedoch in gesundem humanem Blut die 1000fache Menge an roten Blutkörperchen gegenüber weißen Blutkörperchen vorhanden ist, erleichtert die vorherige Entfernung der Erythrozyten die RNA-Isolierung aus Leukozyten.

Zu den Leukozyten gehören die drei Hauptzelltypen: Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten. Alle diese weißen Blutkörperchen sind das Ziel der RNA-Isolierung, da sie einen Zellkern besitzen und somit RNA enthalten.

Die Abtrennung der Erythrozyten erfolgt im Aufreinigungsprotokoll durch selektive Lyse. Hierbei macht man sich zu Nutze, dass Erythrozyten gegenüber einem hypotonischen Schock anfälliger sind als Leukozyten. Bei Zugabe eines hypotonischen Puffers zerplatzen sie schnell und können durch Zentrifugation von den intakten Leukozyten abgetrennt werden. Da das Prinzip auf dieser physiologischen Eigenschaft der Zellen beruht, ist die Prozedur abhängig von intakten Blutzellen und somit ist die Verwendung von frischem Blut essentiell.

Anschließend werden gezielt die Leukozyten unter stark denaturierenden Bedingungen lysiert. Die RNA-Isolierung erfolgt dann nach dem Prinzip der selektiven Bindungseigenschaften einer Silikatgel-Membran, wie bereits beim RNeasy Mini Kit beschrieben. Ebenso gilt, dass eine vollständige Lyse und Homogenisierung der Zellen für eine hohe RNA-Ausbeute erforderlich ist (2.9.10.1.2).

### **2.9.10.3 Denaturierende RNA-Agarosegele**

Die Elektrophorese von RNA in denaturierenden Agarosegelen verläuft nach dem gleichen Prinzip wie die Gelelektrophorese in nicht denaturierenden Gelen (siehe 2.9.2 )

Da RNA allerdings zur Ausbildung von voluminösen Tertiärstrukturen neigt, die ihre Wandereigenschaften im Gel verändert, wird sie vor dem Auftragen auf das Gel denaturiert und denaturierende Bedingungen während der Gelelektrophorese beibehalten, so dass ein Rückfalten in Sekundär- und Tertiärstrukturen verhindert wird.

Für ein 1%iges Gel (80 ml) wurden 0,8 g Agarose in 61 ml DEPC-Wasser aufgeköcht, auf ca. 60 °C abgekühlt und mit 16 ml des 5x Laufpuffer und 3,3 ml von 37%igem Formaldehyd versetzt, gut durchmischt und in eine entsprechende RNA-Gelkammer gegossen.

Die Proben wurden 1:1 mit Probenauftragspuffer versetzt und für 10-15 Minuten im Wasserbad bei 65 °C denaturiert. Anschließend wurden sie auf das Gel geladen und die Elektrophorese wurde sofort in 1x Laufpuffer gestartet (5 V pro cm Elektrodenabstand). Nach Abschluß der Elektrophorese kann die RNA direkt unter UV-Licht betrachtet werden, da im Probenauftragspuffer Ethidiumbromid enthalten ist.

#### 2.9.10.4 cDNA-Synthese

Bei der cDNA-Synthese wird über eine Reverse Transkription (RT) aus RNA ein komplementärer DNA-Strang (cDNA) erzeugt. Dazu wird eine Reverse Transkriptase verwendet, die genauso wie die DNA-Polymerase an ein kurzes doppelsträngiges Stück bindet (hier aus DNA und RNA) und den komplementären Gegenstrang zur RNA synthetisiert. Als kurzes komplementäres Stück wurde hier ein 16-18 Nukleotide langes Oligo-dT-Stück verwendet, welches an den poly-A-Schwanz von eukaryoten mRNAs binden kann. So konnte sämtliche eukaryote mRNA als Vorlage dienen. Eine Alternative bieten spezifische Primer, die entsprechend nur für eine bestimmte RNA kodieren oder Primer mit zufälligen Basenabfolgen (Random-Hexamer-Primer), die für alle RNAs verwendet werden können.

Die cDNA-Synthese wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Es wurden 4-5 µg RNA mit 1 µl Oligo-dT<sub>15</sub>-Primer (0,5 mg/ml, Promega, Mannheim) versetzt, auf 12,6 µl mit DEPC-Wasser aufgefüllt und 10 min bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurde die Probe 2 min auf Eis abgekühlt und dort der eiskalte Reaktionsmix (4µl 5xSuperscript-Puffer, 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl 10 mM dNTPs, 0,4 µl RNase-Inhibitor 40 U/µl) zugefügt. Das Gemisch wurde 2 min bei 42 °C inkubiert und anschließend 1 µl Superscript Reverse Transkriptase (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) zugefügt. Nach 35 min bei 42 °C wurde das Reaktionsgemisch auf 60 µl mit Wasser bzw. TE 10/1 aufgefüllt und weitere 5 min bei 90 °C zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase inkubiert.

Die cDNA wurde aliquotiert, um schädigende Auftau- und Gefrierzyklen zu vermeiden und bei -70 °C bis zur Verwendung gelagert.

Vor Einsatz der produzierten cDNA in der *Real-Time*-RT-PCR oder im Micro-Array wurde eine Kontroll-PCR auf eine mögliche Verunreinigung mit genomischer DNA durchgeführt.

### 2.9.11 Verwendung von (cDNA-)Micro-Arrays

Micro-Arrays werden verwendet, um die Anwesenheit und Menge einer bestimmten RNA oder DNA in einer Probe zu ermitteln, wobei bei dieser Methode gleichzeitig RNA oder DNA einer großen Anzahl unterschiedlicher Gene in derselben Probe vergleichend untersucht werden kann. Häufig werden Arrays zur Untersuchung von Expressionsmustern auf mRNA-Ebene herangezogen, wobei stimulierte mit nicht-stimulierten Zellen verglichen werden.

Ein Array besteht aus einem Träger aus Glas, Nylon oder Plastik, auf den kurze DNA-Fragmente aufgebracht sind, die eindeutig für ein bestimmtes Gen bzw. eine bestimmte Sequenz kodieren. Aus der zu untersuchenden Zellpopulation wird die mRNA gewonnen und in cDNA umgeschrieben. Diese wird entweder direkt markiert oder aber wieder in markierte mRNA umgeschrieben. Die Markierung erfolgt radioaktiv oder mittlerweile auch über einen Fluoreszenzfarbstoff (U95A-Micro-Array, Affymetrix). Die markierte Probe wird dann mit dem Array hybridisiert und das Signal (Radioaktivität oder Fluoreszenz) ausgelesen, welches proportional zur eingesetzten Menge an entsprechender RNA ist. Nach einem Abgleich der Intensitäten innerhalb der zu vergleichenden Array-Träger können die Signale auf den verschiedenen Array-Trägern miteinander verglichen und so Unterschiede in der Expression einzelner Gene ermittelt werden.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden die auf der radioaktiven Markierung basierenden Atlas-Nylon-cDNA-Arrays der Firma Clontech/BD verwendet. Deren Trägermaterial sind Nylonmembranen, auf die cDNA-Fragmente mit einer Länge von 200-600 bp aufgebracht sind. Die mRNA wird über spezifische Primer in radioaktiv-markierte cDNA umgeschrieben, die in die Hybridisierung eingesetzt wird. Die Detektion erfolgt mittels Phosphoimager. Als Kontrollen sind Fragmente genomischer DNA sowie virale DNA aufgebracht.

#### 2.9.11.1 Durchführung von Atlas-Nylon-cDNA-Arrays

Die Atlas cDNA-Micro-Arrays wurden weitestgehend nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden je Probe 4 µg Gesamt-RNA mit 1 µl des spezifischen Primergemisches mit Superscript II Reverser Transkriptase (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) nach dem Protokoll der Firma Clontech in <sup>32</sup>P-markierte cDNA umgeschrieben. Die so erhaltenen cDNAs wurden im Szintillationszähler im Kanal für <sup>3</sup>H gemessen und bei ausreichender Aktivität (mindestens 2x10<sup>6</sup> cpm pro Probe) zur Hybridisierung verwendet. Die Hybridisierung und das anschließende Waschen der Membranen erfolgten nach Herstellerangaben.

Die Atlas-Array Membranen wurden für wenige Tage bis zu mehreren Wochen auf Phosphoimaging-Platten exponiert und anschließend die Platten mit einem Phosphoimager ausgelesen. Die nun digitalisiert vorliegende Intensität der Signale auf den einzelnen Membranen wurde erst über die Intensität der auf den Membranen befindlichen Haushaltsgene (*housekeeping genes*) normalisiert und dann die Werte für die einzelnen Gene Computer-gestützt verglichen (Array Vision). Die so aufgezeigten Regulationen wurden zusätzlich visuell auf mögliche falsch-positive Ergebnisse durch Kontaminationen oder Artefakte auf den Membranen bzw. überstrahlende Radioaktivität von Nachbarpunkten kontrolliert und anschließend zur weiteren Analyse in eine Excel-Datei überführt.

Es ist möglich, die Nylon-Membranen der Atlas Arrays zu „stripfen“. Als „Stripfen“ bezeichnet man das Entfernen der auf dem Array befindlichen radioaktiv markierten Proben, um die Membranen für ein weiteres Array-Experiment zu verwenden. Laut Angabe des Herstellers kann eine solche Nylon-Membran bis zu viermal verwendet werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Membranen nach Herstellerangaben gestrippt und nur einmal wiederverwendet.

### 2.9.12 Real-Time-RT-PCR

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Menge einer bestimmten mRNA in einer Probe zu ermitteln, um dadurch etwa eine Aussage über die Zu- oder Abnahme der Expression eines bestimmten Gens treffen zu können. Eine neuere Methode ist dabei die *Real-Time*-RT-PCR, bei der nach einer Reversen Transkription (RT) eine PCR erfolgt, in der kontinuierlich die zeitabhängige Entstehung des Amplifikats verfolgt wird. Dabei ist der Zeitraum bis zum Auftreten eines Amplifikates ein Maß für die mRNA-Menge im Ausgangsmaterial.

In der *Real-Time*-PCR wird nach jedem durchlaufenen Zyklus ein Fluoreszenz-Signal aufgezeichnet, das proportional zu der Menge an Doppelstrang-DNA (dsDNA) ist. Der Zeitpunkt, d.h. die Zykluszahl, an dem dieses Fluoreszenz-Signal aus dem Hintergrund (*threshold*) austritt und meßbar wird, wird *Threshold-Cycle* ( $C_T$ ) genannt. Über eine Eichkurve aus einer Verdünnungsreihe von Ausgangsmaterial (cDNA) oder einem Plasmid mit einem Insert, welches das zu quantifizierende Gen oder ein entsprechendes Teilstück enthält, kann nun der  $C_T$ -Wert der Probe abgeglichen und somit eine Quantifizierung vorgenommen werden. Dabei kann entweder bei Verwendung einer Verdünnungsreihe aus cDNA eine relative Menge, das Äquivalenzvolumen, ermittelt werden oder aber bei Verwendung von einem Plasmid direkt die Kopienzahl des Gens in der Ausgangsprobe

bestimmt werden. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte der Abgleich mit einer parallelen cDNA-Verdünnungsreihe (2.9.12.2).

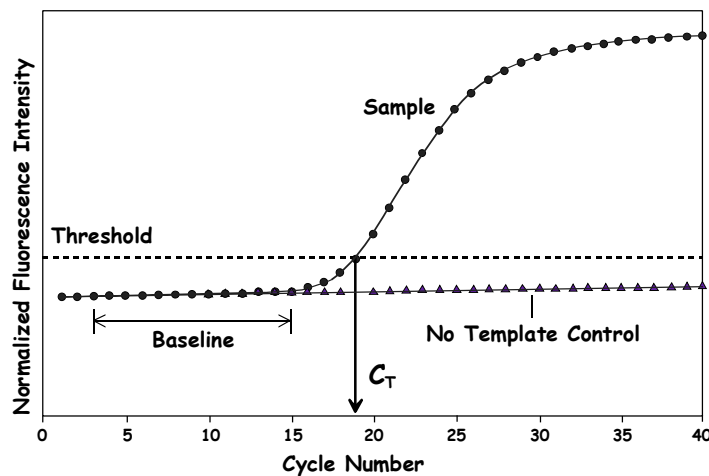


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Ergebnisses einer Fluoreszenz-Messung während einer *Real-Time-PCR*. Aufgetragen ist die Zyklenzahl der PCR (*Cycle Number*) gegen die normalisierte Fluoreszenz-Intensität (*Normalized Fluorescence Intensity*) für eine Probe (*Sample*) und eine Negativ-Kontrolle ohne cDNA (*No Template Control*, NTC). Der  $C_T$ -Wert, die Zyklenzahl bei der das Fluoreszenz-Signal der Probe aus dem Hintergrund (*Threshold*) heraustritt, wurde hier durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Das Fluoreszenz-Signal in einer *Real-Time-PCR* kann entweder spezifisch für ein bestimmtes Gen sein oder aber nur die Menge an entstandener dsDNA angeben. Für ein spezifisches Signal wird ein dritter Primer (Sonde) für das gewünschte Gen benötigt, der ein Fluoreszenz-Signal mitführt. Für dieses Verfahren gibt es verschiedene Methoden, die alle auf dem Prinzip des Fluoreszenz Resonanzenergie Transfers (FRET) beruhen. Dabei werden Oligonukleotid-Sonden verwendet, an die zwei Fluorophore gekoppelt sind. Diese Fluorophore verhalten sich anders, wenn sie in enger räumlicher Nähe, hier gekoppelt an die Sonde, vorliegen, als wenn sie weiter voneinander entfernt sind. Nach Bindung der Sonde an die Einzelstrang-DNA wird die Sonde durch die DNA-Polymerase, die in der PCR-Reaktion den Gegenstrang erzeugt, zerstört. Dabei werden die beiden Fluorophore getrennt und die Fluoreszenz ändert sich. Die Änderung dieses Fluoreszenzsignals wird gemessen, wobei die Fluoreszenz des freien Fluorophores ein Maß für die entstandene Doppelstrang-DNA darstellt. Dies wird ermöglicht durch die spezifische Bindung der Sonde an die entsprechende Sequenz der entstandenen Doppelstrang-DNA.

Die andere Technik, die ein unspezifisches Signal für alle dsDNA ergibt, beruht auf einem Fluoreszenz-Farbstoff, der erst bei Einlagerung in die dsDNA fluoresziert, wofür SYBR<sup>®</sup>-Green verwendet wird. Dabei ist während des PCR-Laufs keine Unterscheidung zwischen einem gewünschten Amplifikat und einem unerwünschten Produkt möglich, so dass nach ei-

nem PCR-Lauf eine Überprüfung auf mögliche weitere Produkte erfolgen sollte. Dies kann über ein anschließendes Agarosegel zur Überprüfung der Amplifikatlänge, sowie über eine zusätzlich aufgezeichnete Schmelzkurve geschehen. Eine solche Schmelzkurve kann von dem *Real-Time*-PCR-Gerät aufgezeichnet werden. Es kann über den Verlauf der Schmelzkurve unterschieden werden, ob nur ein Amplifikat oder mehrere entstanden sind, wobei die am häufigsten auftretenden unerwünschten Produkte durch die Verlängerung von sich teilweise überlappenden Primerteilstücken als „*Primerdimer*“ entstehen. Diese weisen einen niedrigeren Schmelzpunkt als die eigentlichen Produkte auf.

*Real-Time*-PCR-Geräte werden von verschiedenen Herstellern angeboten, wobei zwei Systeme unterschieden werden können: das TaqMan<sup>®</sup>-System (Applied Biosystems, Weiterstadt) sowie das LightCycler<sup>®</sup>-System (Roche, Mannheim), die sich durch Unterschiede in der Wahl der spezifischen Sonden, der Datengewinnung und Anzahl der gleichzeitig zu bearbeitenden Proben und Volumen dieser Proben auszeichnen.

Die hier vorgestellten Daten wurden mit einem TaqMan<sup>®</sup>-Gerät unter Verwendung von SYBR-Green gewonnen.

### 2.9.12.1 Primergenerierung und Austestung der Primer

Für die Generierung der Primer für die *Real-Time*-PCR in einem TaqMan<sup>®</sup>-Gerät gibt es bestimmte Vorgaben, so sollte der zu amplifizierende Bereich zwischen 90 bis 150 bp liegen, wobei die Primer eine Länge von 17 bis 25 Nukleotiden haben sollten. Zusätzlich sollte der zu amplifizierende Bereich eher im „hinteren“ Teil des Gens, d.h. im 3'-Bereich liegen, da die Reverse Transkriptase von dieser Seite her die cDNA synthetisiert und die Synthese häufig nach 1500 bis 2000 bp abbricht. Außerdem ist es wünschenswert, dass in diesem Bereich eine Intron-Exon-Grenze liegt, so dass ein Amplifikat aus genomischer DNA eine andere Länge aufweist als ein Amplifikat aus cDNA. So kann in der PCR eine Verunreinigung mit genomischer DNA schnell detektiert werden. Weiterhin ist es nützlich, wenn die generierten Primer alle eine ähnliche Annealing-Temperatur besitzen (hier möglichst um 60 °C), da so mehrere Gene im gleichen PCR-Lauf untersucht werden können.

Bevor die Primer in der quantitativen *Real-Time* PCR eingesetzt werden können, muss überprüft werden, ob sie bei der gewünschten Annealing-Temperatur verwendbar sind und dabei keine unerwünschten zusätzlichen Produkte entstehen.

Im nächsten Schritt muss das beste Verhältnis der Primerkonzentrationen im PCR-Ansatz ermittelt werden. Dabei wird angestrebt, eine möglichst große Differenz der  $C_T$ -Werte von der Probe mit cDNA und der Probe ohne cDNA im Ansatz zu erhalten, was einem hohen Signal-

Rauschabstand entspricht. Bei ungünstigen Primerverhältnissen wird das Genstück wesentlich schlechter amplifiziert und es können sogar unerwünschte Nebenprodukte aus Primer-selbstamplifikationen entstehen.

Die Bestimmung des besten Verhältnisses an Primern im Ansatz wurde durch eine sogenannte Primermatrix nach Herstellerangaben durchgeführt.

Von der im Pipettierschema (siehe Tabelle 6) erstellten Probe werden dabei Doppelansätze mit je 20 µl eines Oligonukleotidgemisches in bestimmtem Verhältnis pro Ansatz mit 30 µl Mastermix (Enzyme, Nukleotide, Puffer, etc.) versetzt und in der *Real-Time-PCR* eingesetzt.

Primer-Verhältnis [3':5' Primer]	Template-Menge	5'-Primer [5 pmol/µl]	3'-Primer [5 pmol/µl]	ddH <sub>2</sub> O
50 : 50 K	—	1,25 µl	1,25 µl	47,5 µl
50 : 50	2,5 µl	1,25 µl	1,25 µl	45 µl
50 : 300 K	—	1,25 µl	7,5 µl	41,25 µl
50 : 300	2,5 µl	1,25 µl	7,5 µl	38,75 µl
50 : 900 K	—	1,25 µl	22,5 µl	26,25 µl
50 : 900	2,5 µl	1,25 µl	22,5 µl	23,75 µl
300 : 50 K	—	7,5 µl	1,25 µl	41,25 µl
300 : 50	2,5 µl	7,5 µl	1,25 µl	38,75 µl
300 : 300 K	—	7,5 µl	7,5 µl	35 µl
300 : 300	2,5 µl	7,5 µl	7,5 µl	32,5 µl
300 : 900 K	—	7,5 µl	22,5 µl	20 µl
300 : 900	2,5 µl	7,5 µl	22,5 µl	17,5 µl
900 : 50 K	—	22,5 µl	1,25 µl	26,25 µl
900 : 50	2,5 µl	22,5 µl	1,25 µl	23,75 µl
900 : 300 K	—	22,5 µl	7,5 µl	20 µl
900 : 300	2,5 µl	22,5 µl	7,5 µl	17,5 µl
900 : 900 K	—	22,5 µl	22,5 µl	5 µl
900 : 900	2,5 µl	22,5 µl	22,5 µl	2,5 µl

**Tabelle 6: Pipettierschema für die Primermatrix, wobei in Spalte eins das Primerverhältnis im Ansatz in fmol/Ansatz angegeben ist.**

### 2.9.12.2 Quantitative Bestimmung von cDNA mittels *Real-Time-PCR*

Zur Quantifizierung einer bestimmten cDNA in einer Probe und dem anschließenden Vergleich dieser cDNA-Menge mit der cDNA-Menge in einer zweiten Probe (hier in der Regel cDNA von Borrelien-infizierten Zellen im Vergleich mit nicht-infizierten Zellen) wird erst das Äquivalenzvolumen der cDNA in der Probe über eine Standardreihe mit einer cDNA-Verdünnungsreihe ermittelt und anschließend die Menge über ein *Housekeeping-Gen* normiert. Hierbei werden die  $C_T$ -Werte der Verdünnungsreihe (Standard) gegen den Logarithmus



der Probenkonzentration (eingesetztes Volumen oder Kopienzahl) aufgetragen und daraus eine Geradengleichung ermittelt. Die Menge des nachzuweisenden Gens in einer unbekannt Probe kann nun anhand dieser Geradengleichung bestimmt werden.

Laut Applied Biosystems ist die Steigung der Geradengleichung der Verdünnungsreihe ein Maß für die Güte der *Real-Time*-PCR und der Primer, wobei über die Steigung die Effizienz (E) der Reaktion ermittelt werden kann mit:

$$E = 10^{-1/S} - 1$$

mit S = Steigung der Standardkurve, semilogarithmisch.

Eine gute Steigung liegt bei  $-3$  bis  $-3,5$  und beschreibt eine Effizienz der Amplifikationsreaktion um 100 %.

Für eine Probe wird immer sowohl das Äquivalenzvolumen des gewünschten Gens, als auch das für ein *Housekeeping*-Gen, hier Ribosomales Protein 9 (RPS9) ermittelt. Über das Äquivalenzvolumen des *Housekeeping*-Gens, welches theoretisch bei allen Proben gleich sein sollte, da die gleiche Menge an RNA zur cDNA-Synthese eingesetzt wurde und ein gleiches Probenvolumen in die *Real-Time*-PCR eingesetzt wurde, kann eine Normalisierung der einzelnen zu vergleichenden Proben stattfinden. Anschließend können die Proben zueinander ins Verhältnis gesetzt werden, um mögliche Regulationen der Genexpression, zum Beispiel in einer zeitabhängigen Kinetik, zu ermitteln.

## 2.10 Proteinbiochemische Methoden

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

Proteinlösungen wurden in einer denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli aufgetrennt, wobei die Proteine zuerst in einem oberen Sammelgel konzentriert und dann im unteren Trenngel aufgetrennt wurden.

#### 12 %iges Trenngel (Volumina für zwei Minigele)

8	ml SDS-Gellösung A
5	ml SDS-Gellösung B
7	ml Aqua dest.
200	µl SDS-Gellösung C
180	µl 10% APS
20	µl TEMED

### 3 %iges Sammelgel

5	ml Sammelgellösung
20	µl 10% APS
5	µl TEMED

Die Elektrophorese wurde in der Minigel-Elektrophoresekammer G42 (Biometra) durchgeführt. Das 12%ige Trenngel wurde bis ca. 1 cm unter den oberen Rand in die vorbereiteten Glasplatten (1 mm Abstand) gegossen und mit n-Butanol überschichtet. Nach Polymerisation wurde das Butanol mit Aqua dest. entfernt, die Oberfläche des Trenngels mit Filterpapier getrocknet und mit dem 3 %igen Sammelgel überschichtet. Vor der Polymerisation wurde der Probenkamm eingesetzt. Die Proteinproben wurden mit dem gleichen Volumen SDS-Aufschlußpuffer versetzt, für 5 min bei 100°C denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Als Molekulargewichtsmarker wurden entweder 2 - 5 µl SDS-PAGE Molecular Weight Standard, Low Range (Bio-Rad) aufgetragen oder 10 µl Prestained SDS Molecular Weight Marker (Sigma). Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V, bis die Bromphenollaufbande das Trenngel erreicht hat, und anschließend bei 200 V bis zum Auslaufen der Lauffront in den SDS-Laufpuffer. Die SDS-Gele wurden entweder mit Silberlösung (2.10.2) gefärbt oder geblottet (2.10.3).

#### **2.10.2 Silberfärbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamid-Gelen**

Nach der SDS-PAGE wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel mindestens 45 min bei RT oder über Nacht bei 4 °C in einer Fixierlösung (50% [v/v] Methanol, 12% [v/v] Essigsäure, 0,02% Formaldehyd) inkubiert. Anschließend wurde zur Entfernung der Säure dreimal 10-15 min mit 50% [v/v] Ethanol gewaschen. Um die Sensitivität der Silberfärbung zu erhöhen, wurde das Gel dann 1 min mit 0,02%iger [w/v] Na-Thiosulfatlösung behandelt und nach dreimaligem Waschen mit Aqua dest. 20 min in der Silbernitratlösung (0,2% [w/v] AgNO<sub>3</sub>, 0,03% Formaldehyd) gefärbt. Nach zweimaligem Waschen mit Aqua dest. erfolgte die Entwicklung in der reduzierenden Entwicklerlösung (0,56M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,02% Formaldehyd, 0,0004% [w/v] Na-Thiosulfatlösung) so lange, bis die Banden sichtbar waren. Dann wurde die Entwicklerlösung mit Aqua dest. abgespült und das Gel zum Beenden der Reduktion 10 min mit Stopplösung (50% [v/v] Methanol, 12% [v/v] Essigsäure) versetzt. Nach 20- bis 30minütigen Inkubationen in 50% [v/v] Methanol, 30% [v/v] Methanol und 3%

[v/v] Glycerin, folgte die Vakuumtrocknung des auf Whatman 3MM-Filterpapier fixierten Gels, bei 80 °C für 75 min im Geldryer.

### 2.10.3 Westernblot

Mittels Westernblot wurden Proteine nach elektrophoretischer Auftrennung (2.10.1 ) auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Durch anschließende Immunofärbung konnten Proteine spezifisch identifiziert werden.

Auf die anodische Graphitplatte der Fast Blot B33 Blotkammer (Biometra) wurden luftblasenfrei und Blotpuffer-getränkt folgende Materialien gelegt: Zwei Lagen Whatman 3MM-Filterpapier, die Zellulosenitratmembran (Schleicher & Schüll), das Trenngel und abschließend erneut zwei Lagen Whatman 3MM-Filterpapier. Die Blotkammer wurde mit der Kathodengraphitplatte geschlossen, beschwert und der Proteintransfer für 45-180 min bei 150 mA/Gel (2 mA/cm<sup>2</sup>) durchgeführt. Der Prestained SDS Molecular Weight Marker (Sigma) diente als optische Kontrolle für den Transfer der Proteine auf die Membran.

### 2.10.4 Immunofärbung von Zellulosenitratmembranen

Nach dem Westernblot (2.10.3 ) erfolgte die Immunofärbung der geblohteten Zellulosenitratmembran. Zuerst wurden freie Bindungsstellen der Zellulosenitratmembran in 5% [w/v] Magermilch-Ampli-Puffer für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C abgesättigt. Alle folgenden Schritte wurden bei RT auf dem Taumelschüttler durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen mit Amplipuffer wurde die Membran in dem mit 1 - 2% [w/v] Magermilch-Ampli-Puffer verdünnten Primäantikörper für 1 - 1,5 h oder über Nacht inkubiert. Anschließend wurde erneut dreimal gewaschen. Die Inkubation mit dem in 1% [w/v] Magermilch-Ampli-Puffer verdünnten Peroxidase-gekoppelten Sekundäantikörper erfolgte für 1-1,5 h. Die Membran wurde dreimal mit TBS gewaschen und dann durch Zugabe der Substratlösung (5 ml Chloronaphthol-Stammlösung, 20 ml TBS und 25 µl Wasserstoffperoxid) entwickelt. In Bereichen der Antigen-Antikörperbindung wurde ein dunkelviolettes Präzipitat sichtbar. Zum Abstoppen der Reaktion wurde der Blot mit Aqua dest. gewaschen und zwischen Filterpapieren getrocknet.

## 2.11 Zell- und immunbiologische Methoden

### 2.11.1 Kultivierung eukaryoter Zellen

Bei allen verwendeten Zellen handelte es sich um adhärenente Zellen, die unter sterilen Bedingungen bei 37 °C in einer feuchtigkeitsgesättigten Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> in Standardzellkulturflaschen (Greiner, Frickenhausen) im Brutschrank kultiviert wurden (Zelllinien/primäre Zellen und Kulturmedien siehe Tabelle 2).

Als adhärent bezeichnet man Zelllinien, die sich in Kultur an die Oberfläche des Kulturgefäßes anhaften, vornehmlich an den Gefäßboden. Für die humanen Endothelzellen (HUVEC) musste zur besseren Anheftung der Gefäßboden kurz vor der Aussaat mit 1%iger Gelatine für 30 min bei 37 °C beschichtet werden. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage kurz vor der Konfluenz der Zellen (ca. 10<sup>7</sup> Zellen bei Zellkulturflasche mit 75 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche), erneut in geringerer Zelldichte in neuem Medium ausgesät (passagiert), um ihnen optimale Wachstumsbedingungen zu liefern. Für das Passagieren müssen die Zellen vorher von den Zellkulturflaschen abgelöst werden. Dies geschieht hier durch Inkubation mit Trypsin, einer Protease, die die Zellvernetzungen mit dem Kulturflaschenboden abspaltet. Da die Aktivität des Trypsins in Zellkulturmedium stark abgemindert ist, wurden die Zellen zuerst zweimal mit 10 ml PBS gewaschen und dann mit 5ml Trypsin-EDTA (Biochrome, Berlin) für maximal eine Minute inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde durch Beklopfen des Bodens der Kulturflasche unterstützt und die Zellen in 10 ml Stoppmedium (DMEM + 20% FCS) aufgenommen. Anschließend wurde die Zellsuspension für 10 min bei 1000 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in frischem EGM-2 Medium resuspendiert. Zur Weiterkultivierung der Zellen wurde etwa 1/4 der Zellsuspension erneut in Medium ausgesät, der Rest der Zellen wurde in Experimenten eingesetzt oder eingefroren.

### 2.11.2 Bestimmung der Zellzahl

Vor dem Einsatz von Zellen wurde deren Konzentration bestimmt. Dazu wurden die Zellen in Suspension gebracht, ein abgenommenes Aliquot mit Trypanblau-Lösung im Verhältnis von 1:2 verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer mit definiertem Volumen unter dem Lichtmikroskop (100fache Vergrößerung) gezählt. Tote Zellen wurden hierbei vom Trypanblau markiert, da dieser saure Farbstoff durch defekte Zellmembranen diffundiert.

Die Bestimmung der Zellzahl wurde folgendermaßen durchgeführt:

Die Anzahl der lebenden Zellen in einem Großquadrat multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor und dem Faktor  $10^4$  ergab die Zellzahl pro Milliliter Suspension.

### **2.11.3 FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting)**

Zur Untersuchung der Expression von ICAM-1 in humanen Endothelzellen (HUVEC) wurden FACS-Analysen durchgeführt.

Die nach dem Prinzip der Durchflusszytometrie funktionierende FACS-Analyse basiert auf der Vermessung von Einzelzellen mittels eines bzw. zweier Laserstrahlen. Die Zellen werden aus einer Zellsuspension in einen laminaren Flüssigkeitsstrom überführt, wo sie ausgedünnt und vereinzelt werden. Anschließend passieren sie eine Messzelle, in der sie an einem Laserstrahl vorbeigeleitet werden. Das Licht des Laserstrahls bzw. der Laserstrahlen trifft auf die vorbeifließenden Zellen und wird durch die Beugungs- und Brechungseigenschaften der Zellen in verschiedene Winkel abgelenkt. Ein Lichtstrahl, der von der Zelle nicht gebrochen wird und diese geradlinig passiert, trifft auf den FSC-, „forward scatter light“-Photodetektor. Im FSC-Detektor wird durch die Vielzahl der einfallenden Lichtstrahlen die Größe der Zelle ermittelt. Lichtstrahlen, die von den Kompartimenten der Zelle abgelenkt werden, gelangen auf einen zweiten SSC-, „side scatter light“-Photodetektor. Aus der Anzahl der Lichtstrahlen, die von diesem Detektor eingefangen werden, wird die Information über die Granularität der Zellen zusammengesetzt. Ähnlich wie beim Streulicht eines SSC-Photodetektors wird auch das Fluoreszenzlicht gemessen. Trifft der Laserstrahl auf eine fluoreszenzmarkierte Zelle, so wird das Licht durch die jeweiligen Fluorophore teilweise absorbiert und in einem längerwelligeren Spektralbereich in alle Richtungen emittiert. Das emittierte Licht wird je nach Wellenlänge von weiteren Photodetektoren aufgefangen.

#### **2.11.3.1 Probengewinnung für die FACS-Messung**

Die Infektionsansätze aus HUVEC und Borrelien sowie die mitgeführten Kontrollansätze wurden 24 h post infectionem gestoppt. Hierzu wurden die Zellen nach Mediumabnahme zweimal mit je 2 ml PBS gewaschen und anschließend in je 1 ml CDS (Cell-Dissoziation-Solution, Sigma) für 20 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die danach möglichst schonend abgelösten Zellen wurden in 5 ml kaltem PBS aufgenommen, für 10 min bei 4 °C mit 4000 rpm abzentrifugiert und nach Abgießen des Überstandes in je 1100 µl kaltem PBS/2%FCS resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde zur Verminderung weiterer Zellaktivität sofort auf Eis gelagert. Die verwendete PBS/2%FCS-Lösung war zuvor mit

einem Membranfilter von 0,22 µm Porengröße filtriert worden, um störende Partikel aus dem FCS, zur Vermeidung von verfälschten FACS-Ergebnissen abzutrennen. Zur Bestimmung der gewonnenen Zellzahl wurde ein Aliquot entnommen und in einer Neubauer Kammer ausgezählt.

### **2.11.3.2 Durchführung des FACS-Protokolls**

Für den Nachweis und die Quantifizierung von Oberflächenmarkern auf HUVEC Zellen wurden monoklonale Antikörper zur Färbung der Zellen verwendet. Die an den entsprechenden Oberflächenmolekülen gebundenen Antikörper lassen sich durchflusszytometrisch nachweisen. Um die unspezifische Bindung von Antikörpern an Oberflächenrezeptoren der Zellen einzuschätzen, wurden jeweils Isotyp-Kontrollen mitgeführt.

Die Färbung der Zellen mit den Fluorophor-gekoppelten Antikörpern wurde in 96-Rundlochplatten auf Eis vorgenommen. Für jeden Färbeansatz pro Well wurden 50µl Antikörperlösung vorgelegt und  $1,5 \times 10^5$  Zellen in 100µl filtriertem, kaltem PBS/2%FCS dazugegeben. Die Inkubation erfolgte 1 h auf Eis. Anschließend wurde die Rundlochplatte mit den Proben bei 400g für 3 min bei 4°C abzentrifugiert und die Lösung abgeschlagen.

Für die durchflusszytometrische Messung wurden die mit Antikörper markierten Proben- und Kontrollansätze in einem Volumen von 150µl PBS/2%FCS aufgenommen und in FACS-Probenröhrchen überführt. Zur Differenzierung der lebenden von den abgestorbenen Zellen wurden 200µl FACS-Puffer (PBS/2%FCS mit 1µM Propidiumiodid) hinzugesetzt, da Propidiumiodid in tote Zellen eindringt und den Zellkern (DNA) anfärbt. Während der gesamten Messung am FACS-Calibur-System (Becton Dickinson) wurden die Proben auf Eis inkubiert. Um die statistische Relevanz zu gewährleisten, wurden für jede Einzelmessung mindestens  $10^4$  lebende HUVEC Zellen aufgenommen.

Für die Detektion der Fluoreszenzfarbstoffe wurden entsprechende Wellenlängenfilter des verwendeten FACS-Calibur-Systems gewählt FL1: 530±30nm Bandpassfilter (für FITC) und FL2: 585±42nm Bandpassfilter (für Phycoerythrin, PE). Sämtliche Messungen konnten freundlicherweise mit Unterstützung von Dr. Kurt Dittmar am FACS-Calibur-System (Becton Dickinson) der GBF (Gesellschaft für biologische Forschung, Braunschweig) durchgeführt werden.

Die Auswertung der Ergebnisse in Histogrammen und sogenannter Dot Plots erfolgte mit Hilfe der CELLQuest™-Software (Becton Dickinson, Heidelberg). Die Histogramme geben die zahlenmäßige Verteilung der gemessenen Zellen bei den unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten an. In jedem Histogramm ist zur Abschätzung der Menge unspezifisch an den Zellen gebundenen Antikörper die Isotypkontrolle in die entsprechende Kurve mit eingezeichnet.

Bezeichnung	Name	Markierung	Klon	Isotyp
CD54	ICAM-1	FITC	84H10	IgG <sub>1</sub>
CD31	PECAM-1	PE	1F11	IgG <sub>1</sub>
CD4	T-Zell Oberflächenglycoprotein T4	PE	13B8-2	IgG <sub>1</sub>
CD3	Negativmarker	FITC	UCHT-1	IgG <sub>1</sub>
CD19	B-Lymphozyt CD19 Antigen	FITC	J4-119	IgG <sub>1</sub>
MHC Klasse I	HLA-ABC Klasse I	PE	G46-2-2-6	IgG <sub>1</sub>
Isotyp-Kontrolle	IgG <sub>1</sub> Isotype Standard	FITC	MOPC-21	IgG <sub>1</sub>
Isotyp-Kontrolle	IgG <sub>1</sub> Isotype Standard	PE	MOPC-21	IgG <sub>1</sub>

**Tabelle 6: Verwendete Antikörper zur FACS-Analyse von Oberflächenmolekülen der HUVEC**

#### 2.11.4 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Das ELISA ist ein Verfahren zum Nachweis einer bestimmten Substanz durch Antikörper, die mit einem Enzym verbunden sind, welches eine detektierbare Reaktion katalysiert, z.B. eine Farbentwicklung.

Hierbei wird ein Reaktionsgefäß mit einem meist monoklonalen Antikörper (*capture antibody*) für die nachzuweisende Substanz beschichtet. Anschließend wird die Lösung mit der nachzuweisenden Substanz in das Reaktionsgefäß gegeben und die Antikörpermoleküle binden spezifisch an diese Substanz. Unspezifische Bindungsstellen werden anschließend mit BSA abgesättigt. Nun erfolgt eine Inkubation mit einem zweiten Antikörper (*detection antibody*), der an ein Enzym gekoppelt ist. In einer anschließenden Nachweisreaktion wird das entsprechende Substrat für das Enzym zugesetzt und der Umsatz dieses Substrates gemessen. Waschschrte nach jedem Inkubationsschritt entfernen nicht gebundene Substanzen, daher sollte der Substratumsatz direkt proportional zur Menge des eingesetzten Enzyms, also auch zur Menge der nachzuweisenden Substanz sein. Für solche Nachweise werden häufig Enzyme verwendet, die eine Farbreaktion auslösen (z.B. alkalische Phosphatase), da solche Reaktionen sehr gut detektierbar sind. Zur Konzentrationsabschätzung wird eine Eichreihe mit bekannten Konzentrationen der nachzuweisenden Substanz verwendet.

#### **2.11.4.1 Probengewinnung für den ELISA**

Die Proben wurden nach den Zeitpunkten 6 h, 12 h, und 24 h post infectionem entnommen. Das abgenommene Medium wurde sofort bei  $-80\text{ °C}$  eingefroren und dort bis zur Durchführung des ELISA gelagert.

#### **2.11.4.2 Durchführung des ELISA**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der ELISA-Kit zur Bestimmung von humanem GRO- $\beta$  (synonym auch MIP-2alpha genannt) von der Firma Immuno-Biological Laboratories (Hamburg) verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die ELISA-Platte ist bei diesem kommerziellen Kit bereits mit dem monoklonalen Antikörper (Anti-human GRO- $\beta$  Rabbit IgG) beschichtet und wird im Protokollverlauf mit dem enzymgekoppelten Detektionsantikörper (HRP conjugated Anti human GRO  $\beta$  Rabbit IgG) inkubiert.

Für die Durchführung des ELISA wurden die aufgetauten Proben zur Abtrennung möglicherweise mitgeführter Zellen für 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert und aus dem erhaltenen Überstand je 100  $\mu\text{l}$  Probenmenge in den ELISA eingesetzt.

### **2.12 Methoden zum Arbeiten mit Borrelien**

Alle Kultivierungs- und Infektionsarbeiten mit lebenden Borrelien wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt.

#### **2.12.1 Herstellung von Borrelienkultur in großem Maßstab**

Bei der Kultivierung erfordern alle verwendeten Borrelienspezies die gleichen Anzuchtungsbedingungen. Sie wachsen in dem sehr komplexen BSK-H complete Medium mit mehr als 60 enthaltenen Komponenten. Darunter sind viele verschiedene Aminosäuren (z.B. L-Alanin, L-Serin, L-Tryptophan usw.) und quantitativ größere Komponenten, wie Bovines Albumin, Kaninchenserum, D-Glucose und Glutamin.

Zu 3 ml BSK-H Medium im 5 ml Sterilröhrchen wurden im allgemeinen 100  $\mu\text{l}$  der Stammkultur hinzugefügt. Die Animpfmenge kann je nach Wachstumsgrad der Stammkultur variiert werden. Die frisch angeimpften Borrelienkulturen werden im Brutschrank bei  $33\text{ °C}$  für ca. 3-5 Tage inkubiert, wobei die Inkubationszeit ebenfalls vom Zustand der Vorkultur und der angeimpften Menge abhängt.



Aufgrund dieser Variabilität der Wachstumszeit ist es nötig, täglich eine visuelle Zustandskontrolle vorzunehmen. Mit zunehmender Zellzahl vollzieht das Medium einen Farbwechsel von rot-orange zu gelb-orange, so dass diese makroskopische Beurteilung in der Regel ausreichend ist, um festzulegen, ob die Inkubation beendet werden kann. Ist dies der Fall, können die Kulturen, sofern sie nicht frisch benötigt werden, für ca. 4 Wochen bei 4 °C gehalten werden. Unter diesen Bedingungen ist das Wachstum extrem verlangsamt, bis eine erneute Überimpfung nötig ist, um eine Überalterung der Stammkultur zu verhindern. Zur dauerhaften Lagerung können Borrelien in entsprechendem Einfriermedium (Tabelle 2) in Stickstofftanks eingefroren werden.

Für die parallelen Infektionsansätze von humanen Zellen war die Produktion einer ungewöhnlich großen Menge an Borrelien nötig. Hierzu mussten je nach geplantem Versuchsansatz 0,6–1,0 Liter Kultur angesetzt werden. Die erforderliche Menge an BSK-H Medium wurde auf die entsprechende Anzahl von 50 ml Sterilröhrchen aufgeteilt. Bei diesen Kulturen in großem Maßstab blieb jedoch das Volumenverhältnis der Normalkulturen bestehen, indem 30 ml Kulturvolumen pro 50 ml Sterilröhrchen zugewiesen wurden. Diese Großkulturansätze wurden mit je 800 – 1000 µl einer zuvor angelegten, frischen Vorkultur angeimpft und bei 33 °C im Brutschrank inkubiert.

### **2.12.2 Dunkelfeldmikroskopie**

Die Dunkelfeldmikroskopie ist eine Methode zur Beobachtung kleiner, kontrastarmer und regelmäßig periodischer Strukturen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde sie zur Beobachtung nativer Borrelien genutzt. In das Objektiv gelangt nur vom Objekt (Mikroorganismus) gebeugtes, d.h. also gestreutes Licht. Aus diesem Grund erscheinen die beobachteten Strukturen hell auf dunklem Hintergrund. Mit einfachen Mitteln ist dieser Effekt auch durch Ausblenden der Strahlen mittels einer Zentral- oder einer Sternblende zu erreichen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch mit einem Trockendunkelfeldkondensator gearbeitet, da dieser wesentlich lichtstärkere Bilder liefert. Diese auch Kardiodkondensoren genannten mikroskopischen Zusatzgeräte erzielen die besagte Bildqualität, indem sie das einfallende Licht durch integrierte Spiegelflächen seitlich auf das Objekt konzentrieren. Die so seitlich angestrahlten Borrelien werden nicht durchleuchtet, sondern strahlen das Licht von ihrer Oberfläche zurück und erscheinen auf diese Weise leuchtender.

Zur Bestimmung der Borrelienzahl in Kulturen oder Borreliensuspensionen zur Infektion wurden ca. 10 µl der Proben in einer Neubauer-Zählkammer bei 160 facher Vergrößerung (16 x Objektiv, 10 x Okular) ausgezählt. Zugleich konnte hierbei die Vitalität der Borrelien überprüft werden.

Die nativen Borrelien sind trotz ihres schmalen Habitus und ihrer geringen Größe (8-30 µm lang und 0,2-0,5 µm dick) im mikroskopischen Bild des Dunkelfeldmikroskops gut zu erkennen, da sie vor dem dunklen Hintergrund hell erscheinen. Die Differenzierung zu anderen fädigen Mikroorganismen erfolgt durch die typisch spiralige Morphologie und Bewegungsweise der Spirochaeten. Ebenso ist die eindeutige Abgrenzung zu winzigen Fremdpartikeln (wie Fusseln oder Kristalle) möglich, aufgrund des stärker lichtbrechenden Effektes dieser Objekte im Vergleich zu den kontrastärmeren Borrelien.

### **2.12.3 Infektion von adhärennten Zellen mit Borrelien**

Zur Vorbereitung der Infektion wurden die Zellen 24 h vorher in kleinen Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche) so ausgesät, dass sie nach Anheftung an das Kulturgefäß einen Monolayer ergeben mussten. Am Tag der Infektion wurde der Zustand der Zellkultur mittels Stereolupenmikroskop begutachtet und die Zellen mit neuem Medium versorgt.

Kurz vor Beginn der Infektion wurden die Borrelien frisch aus dem Großkulturansatz geerntet. Hierzu wurden alle gut bewachsenen 50 ml Kulturröhrchen für 10 min bei 5000 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Borreliensediment in einem verbliebenen Mediumrest wieder resuspendiert. Die einzelnen Borreliensuspensionen wurden in einem Röhrchen vereint und erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vollständig abgenommen und das große Borreliensediment im Kulturmedium der eukaryotischen Zellen resuspendiert. Aus dieser stark konzentrierten Borreliensuspension wurde ein kleines Aliquot steril entnommen, eine Verdünnungsreihe durchgeführt und die höchste Verdünnungsstufe zur Bestimmung der Zellzahl mittels Dunkelfeldmikroskopie (2.12.2 ) verwendet. Bei den ersten Infektionen für die Fluoreszenzfärbung und den Array wurde versehentlich Zellkulturmedium verwendet, dass Antibiotika (1% Pen./Step) enthielt. Alle späteren Infektionen für Array, Real-time-RT-PCR und Proteinnachweise wurden mit Medium ohne Antibiotika-Zusatz durchgeführt.

Für jede geplante Infektionszeit (6 h, 12 h, 24 h) wurden parallel folgende 3 Ansätze angesetzt: 1.) Zellen mit lebenden Borrelien, 2.) Zellen mit toten Borrelien 3.) Zellen als Negativkontrolle. Nach Infektion der eukaryotischen Zellen mit der entsprechenden Borrelienanzahl, wurde zur Beschleunigung des Kontaktes der Borrelien mit den adhärenen Zellen eine Aufzentrifugation der Borrelien auf den Zellrasen vorgenommen. Die Infektionsansätze wurden bei 3900xg und 35 °C für 55 min zentrifugiert. Diese Art der Infektion hat den Vorteil, dass der Zeitpunkt der Infektion sehr genau bestimmt wird und die Infektionsrate verbessert werden kann. Die weitere Inkubation der infizierten Zellen erfolgte für die entsprechende Infektionszeit bei 37 °C im Brutschrank.

#### **2.12.4 Intrazellulärer Borreliennachweis mittels Immunfluoreszenz-Doppelfärbung**

Zum Nachweis intrazellulärer Borrelien nach der Infektion von adhärenen Zellen wurde eine aufeinanderfolgende Doppelfärbung mit FITC (Fluoresceinisothiocyanat)- und TRITC (Tetramethylrhodaminisothiocyanat)-markierten Sekundärantikörpern durchgeführt [60]. Die Differenzierung der intrazellulären von extrazellulären Borrelien wird hierbei durch einen Zwischenschritt mit Methanol ermöglicht, welcher vor dem zweiten Färbungsschritt die Zellmembran durchlässig macht. Auf diese Weise sind die extrazellulären Borrelien durch beide Fluoreszenzfarbstoffe gefärbt und die intrazellulären Borrelien nur durch den zuletzt aufgetragenen Fluoreszenzfarbstoff.

##### **2.12.4.1 Herstellung und Fixierung der Zellpräparate**

Die zu untersuchenden Zellen wurden in Röhrchen mit einem losen, den Boden bedeckenden Glasplättchen ausgesät, so dass sie sich später aus den Kulturgefäßen herausnehmen lassen und unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt werden können. Nach entsprechender Inkubationszeit der Zellen mit Borrelien wurde das Zellkulturmedium abgenommen, zweimal mit 1 ml PBS gewaschen und die Zellen auf dem Glasplättchen mit 4 % Formalin für 20 min bei RT fixiert. Anschließend wurde das Glasplättchen mit Entellan auf einen Objektträger geklebt und luftgetrocknet.

##### **2.12.4.2 Durchführung der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung**

Alle Inkubationsschritte der Färbung wurden auf den zuvor präparierten Objektträgern in einer feuchten Kammer durchgeführt. Als Primärantikörper wurde ein polyklonaler Borrelienantikörper verwendet, welcher aus dem Serum einer mit *Borrelia burgdorferi* immunisierten Ziege stammt (BacTrace™ Antibody, Kirkegaard & Perry Laboratories). Von

diesem wurden je Präparat 100 µl einer 1:100 Verd. (10 µg/ml) aufgetragen, für 30 min bei RT inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gespült. Zunächst wurde der TRITC-markierte Sekundärantikörper gegen Ziege (Rhodamine-conjugated AffiniPure Rabbit Anti-Goat IgG, Jackson ImmunoResearch) eingesetzt. Von diesem wurden ebenfalls je Präparat 100 µl einer 1:100 Verd. (14 µg/ml) aufgetragen, jedoch bei 37 °C für 30 min lichtgeschützt inkubiert und anschließend dreimal in PBS gespült. Danach wurden die Präparate für 2 min in eine lichtgeschützte Färbeküvette mit 70 %igem Methanol gestellt und sofort dreimal in PBS gespült. Nach erneuter Inkubation mit dem Primärantikörper unter den gleichen Bedingungen, jedoch diesmal lichtgeschützt, wurde wieder dreimal mit PBS gespült.

Schließlich wurden vom FITC-markiertem Sekundärantikörper gegen Ziege (Fluorescein-conjugated AffiniPure Rabbit Anti-Goat IgG, Jackson ImmunoResearch) ebenfalls 100 µl einer 1:100 Verd. (15 µg/ml) eingesetzt, lichtgeschützt für 30 min bei RT inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gespült. Zur Lufttrocknung wurden die Präparate lichtgeschützt aufbewahrt. (Die Reihenfolge zur Verwendung der Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper wurde teilweise zur Austestung umgekehrt.)

Anschließend wurden sie mit einem Eindeckmedium versehen, mit einem Deckgläschen abgedeckt und unter dem Fluoreszenz-Mikroskop beurteilt. Es wurden zwei verschiedene Eindeckmedien verwendet, zum einen „Mounting Fluid“ bestehend aus 50% igem Glycerin in 10 mM PBS und zum anderen Mowiol.

Die mit „Mounting Fluid“ angefertigten Präparate sind für ein bis zwei Tage bei Lagerung im Kühlschrank stabil, die Fluoreszenz lässt aber schnell nach. Daher sollte eine Begutachtung der Färbungsergebnisse relativ rasch geschehen. Für länger haltbare Fluoreszenz eignet sich besser das Mowiol.

Für die Detektion der Fluoreszenzfarbstoffe wurden entsprechende Filter des Fluoreszenzmikroskops gewählt (FITC: Excitation bei 490 nm, Emission bei 520 nm; TRITC: Excitation bei 550 nm, Emission bei 570 nm).

### **2.12.5 Abtötung von Borrelien**

Um die passiven Beeinflussungen der Wirtszellen durch extrazelluläre Borrelien zu untersuchen, wie etwa die Zellantwort auf Oberflächenproteine der Borrelien, müssen die Borrelien abgetötet werden.

Es gibt zwei geeignete Möglichkeiten zum Abtöten von Bakterien, erstens die Erhitzung der Borreliensuspension und zweitens die Bestrahlung mit UV-Licht. Die Erhitzung erfolgte im

Reaktionsgefäß für 20 min bei 56 °C im Wasserbad. Bei der Bestrahlung wurde die Borreliensuspension in einem Eppendorfgefäß auf Eis in den UV-Stratalinker (Stratagen, La Jolla, USA) gestellt und mit einer Energie von 10 J bestrahlt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Borrelien immer gekühlt blieben. Anschließend wurden die abgetöteten Borrelien direkt in den Versuch eingesetzt.

Beide Behandlungen führten zu einem vollständigen Abtöten der Bakterien, wie durch Wachstumskontrollen gezeigt werden konnte. Für die späteren Analysen wurde die Erhitzungsmethode durchgeführt.

## **2.13 Tierexperimentelle Methoden**

### **2.13.1 Infektion von C3H/HeN-Mäusen (Tiermodell)**

Zur Rückisolierung eines frischen, niedrigpassagigen Borrelienisolats bzw. zur Wiederherstellung der Infektiosität der Borrelien und zur Prüfung der Infektiosität eines Borrelienstammes wurde der Einsatz eines Tiermodells nötig. Die Durchführung wurde als anzeigepflichtiger Tierversuch nach § 10a des Tierschutzgesetzes genehmigt.

Als Versuchstiere wurden Mäuse des Stammes C3H/HeN verwendet, da sie aufgrund ihrer Anfälligkeit für Arthritis ein Mausmodell für Lyme Borreliose darstellen [88]. Sie bilden eine starke Arthritis aus, die sich vor allem an erkennbar geschwollenen Fußknöcheln messen lässt.

Es gibt mehrere Applikationsmethoden bei der Maus: subcutan (s.c.), intramuskulär (i.m.), intraperitoneal (i.p.), oral/peroral (p.o.) oder intravenös (i.v.). Der Injektionsort entscheidet über die Verteilungsgeschwindigkeit von verabreichten Substanzen im Körper und stark vereinfacht ausgedrückt, nimmt die Geschwindigkeit in folgender Reihenfolge ab: i.v.-i.p.-s.c.-oral. Für das Lyme Borreliose-Mausmodell ist die subcutane oder sogar intradermale Applikation am sinnvollsten, da es die natürliche Infektionsform durch Zecken über die Haut nachahmt. Die eingeführte Kanüle sollte einen maximalen Durchmesser von 0,9 mm haben und bei subcutaner Injektion locker und beweglich unter der Haut liegen. Die Injektionsmenge wird im allgemeinen durch die Größe des Versuchstieres und durch den Applikationsweg bestimmt. Als Richtwert für subcutane Applikationsvolumina bei der Maus gilt eine Injektion von maximal 0,5 ml. Grundsätzlich können Substanzen nur schonend für das Versuchstier verabreicht werden, wenn ihre Konzentration, chemische Zusammensetzung und physikalische Beschaffenheit nicht zu allgemeinen Schädigungen und lokalen Reizungen

führt. Aus diesem Grund müssen Lösungen für Injektionen isoton zur Körperflüssigkeit und von neutralem pH-Wert sein (7,0-7,5), sonst werden Erythrozyten durch Hämolyse geschädigt oder die Injektionen erzeugen Schmerzen und Gewebszerstörung. Eine unverträgliche Substanz die Nekrosen hervorruft ist auch Aqua.dest., während hingegen physiologische Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) zu empfehlen ist. Partikuläre Substanzen werden normalerweise nicht intravenös, sondern risikoloser intraperitoneal oder subcutan injiziert.

### **2.13.1.1 Durchführung der Infektion**

Die Mäuse wurden subcutan in der Bauchleiste infiziert, indem ihnen jeweils ein Applikationsvolumen von 50 µl Lösung injiziert wurde. Hierbei hatten die verwendeten Kanülennadeln einen Durchmesser von 0,4 mm (27G Sterican, Braun). Die Injektionslösung enthielt physiologische Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) mit dem entsprechenden Borrelienstamm in einer Zellzahl von  $1 \times 10^4$  Z/50 µl oder als Negativkontrolle lediglich 0,9%ige NaCl. Während der Injektion wurden die Mäuse im Fixierungsgriff gehalten, d.h im Nacken mit zwei oberen Fingern gehalten und der Schwanz mit zwei unteren Fingern fixiert.

Die einzelnen Mäuse der verschiedenen Versuchstiergruppen wurden durch Filzstiftmarkierungen in Form von Ringen unterschiedlicher Anzahl auf den Schwänzen gekennzeichnet. Da besonders bei Mäusen die Einzeltieridentifizierung in der Tiergruppe schwierig ist und eine sichere Kennzeichnung eine große Bedeutung hat, wurde die Filzstiftmarkierung alle paar Tage nachgezeichnet.

In den folgenden 5 Wochen wurde der Verlauf der Infektion durch tägliche Messung der hinteren Fußknöchel verfolgt. Hierbei wurde mit einem digitalen Mikrometer der Durchmesser der Fußknöchel bei gestrecktem Mausbein gemessen [88].

### **2.13.1.2 Tötung der Versuchsmäuse und Organentnahme**

Zum Versuchsende wurden die Tiere durch kontrollierten Genickbruch getötet. Zur Organentnahme wurde zunächst der ethanolabgeriebene Bauch der Mäuse rasiert, mehrere Hautstücke abpräpariert und sofort in Borrelientransportmedium in einem Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurde durch Entfernen des Brustbeines und der Rippen der Brustkorb eröffnet, die links dorsal neben dem Magen liegende zungenförmige Milz freipräpariert, entnommen und ebenfalls sofort in Borrelientransportmedium überführt. Zur späteren Feststellung des Antikörpertiters gegen Borrelien mittels IFAT (Immunofluoreszenz Antikörpertest) wurde durch Punktion des Herzens eine kleine Menge Blut entnommen. Zum

Schluß wurden beide hinteren Fußknöchel der Maus abgetrennt, von Fell und Haut frei präpariert, kurz mit Ethanol abgespült und in Borrelientransportmedium gegeben.

Bei der gesamten Präparation wurde darauf geachtet unter möglichst sterilen Bedingungen zu arbeiten, um die Rückisolierung der Borrelien nicht durch Kontamination zu erschweren. Die Rückisolierungsprozedur sowie die IFAT-Analysen wurden von Dr. Gabriele Liebisch (ZeckLab, Burgwedel) durchgeführt.





## 3 Ergebnisse

### 3.1 Etablierung eines Infektionsmodells humaner Zellen mit Borrelien

Als Voraussetzung zur Gewinnung von RNA aus Borrelien-infizierten Zellen sollte ein geeignetes Infektionsmodell aufgebaut werden. Hierzu mussten vor allem hoch infektiöse Borrelien gefunden werden, da die Infektiösität der vorhandenen Langzeit-Kultivierungsstämme im Laufe zahlreicher Passagierungen abgeschwächt sein kann. Zudem mussten geeignete humane Zellen ermittelt und ihre Infizierbarkeit ausgetestet werden.

Ein weiterer Abschnitt umfasste die Prüfung einer Reihe von Antikörpern und verschiedener Methoden auf ihre projektbezogene Tauglichkeit zum Borreliennachweis bzw. intrazellulären Infektionsnachweis.

#### 3.1.1 Identifizierung eines Borrelienisolats durch RFLP-Analyse

Als mögliche infektiöse Borrelienprobe wurde ein niedrig-passagiges Borrelienisolat aus einem offensichtlich Borreliose-erkrankten Pferd (Stamm Wendolino) von Dr. G Liebisch (Zecklab, Burgwedel) zur Verfügung gestellt. Da zu diesem Zeitpunkt die isolierte Borrelienspezies noch nicht bestimmt war, musste sie zunächst durch RFLP-Analyse (Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus) (2.9.6 ) identifiziert werden, um einen späteren spezifischen Nachweis zu ermöglichen.

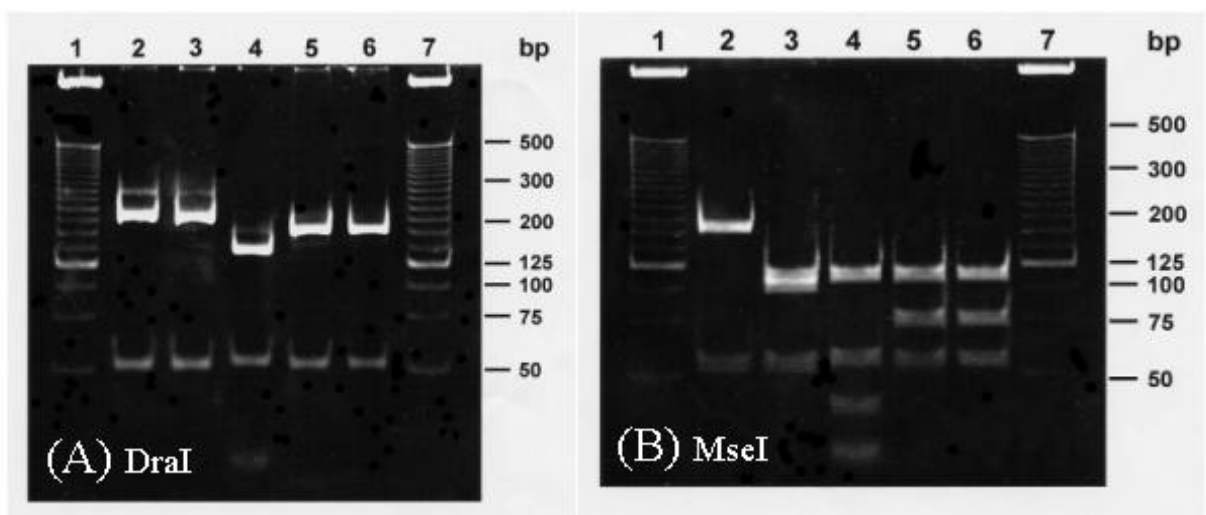


Abbildung 5: RFLP-Analyse zur Borrelienspezies-Identifizierung. Dargestellt sind zwei Polyacrylgele mit charakteristischen Bandenmustern verschiedener Borrelienspezies nach Restriktionsverdau mit DraI (A) oder MseI (B). An Position 1 und 7 wurde als Längenstandard ein 25bp Marker aufgetragen, dazwischen von Position 2 bis 6 die Borrelienspezies: *B. valaisiana* (VS116), *B. garinii* (N34), *B. burgdorferi sensu stricto* (B31), *B. afzelii* (PkO) und das nun als *B. afzelii* zu identifizierende Borrelienisolat aus der Milz eines erkrankten Pferdes.

Hierzu wurden parallele Restriktionsspaltungen mit DraI und MseI von gewonnener DNA verschiedener bekannter Borreliensstämmen, sowie des zu untersuchenden Isolats durchgeführt. Beim Vergleich der charakteristischen Bandenmuster im Polyacrylgel konnte die fragliche Borrelienspezies als *Borrelia afzelii* identifiziert werden.

### **3.1.2 Austestung von Antikörpern zum Borreliennachweis**

Zur Eignungskontrolle von einer Reihe Antikörper zum möglicherweise spezifischen Borreliennachweis wurden diese an verschiedenen Borreliensstämmen mit mehreren Methoden getestet.

#### **3.1.2.1 Immunofärbung mittels monoklonaler Antikörper nach Westernblot**

Nach Auftrennung von frisch hergestellten Kulturlysaten verschiedener Borreliensstämmen in 4 parallelen SDS-Polyacrylgelen und anschließendem Westernblot wurden die zu testenden Antikörper zur Markierung der Nitrocellulosemembran eingesetzt. Es wurden folgende in der Arbeitsgruppe vorhandene Antikörper verwendet: MAB 952 (31 kDa, Osp-A-Antikörper), MAB 954 (34 kDa, Osp-B-Antikörper) und der MAB 964 (19 kDa-Antikörper). Zur Kontrolle, ob für alle Borreliensstämmen ungefähr gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden, erfolgte mit dem zusätzlichen vierten Gel eine Silberfärbung. Nach Beurteilung aller drei Nitrocellulosemembranen mit mitgeführtem Proteinmarker ergab sich nur beim Osp-B-Antikörper (MAB 954; 34 kDa) eine stark gefärbte Bande für *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (B31). Das heißt im Ergebnis, es wurde ein monoklonaler Antikörper für *Borrelia burgdorferi* charakterisiert, allerdings war für die Anwendung aufs Borrelien-Pferdisolats ein monoklonaler Antikörper für *Borrelia afzelii* gewünscht.

#### **3.1.2.2 Fluoreszenzfärbung zum Test von Primärantikörpern**

Zur parallelen Austestung eines Osp-A-Antikörpers (L32 1F11), der freundlicherweise von PD Dr. B. Wilske (Max von Pettenkofer-Institut, München) zur Verfügung gestellt wurde, sowie drei vorhandener Zellüberstände aus Borrelieninfektionen (Med. Mikrobiologie, MHH, C.C. Zöller) wurden diese als Primärantikörper in einer Immunfluoreszenzfärbung eingesetzt. Als Ausgangsmaterial dienten hierbei Objektträger mit formalinfixierten Borrelien, die zuvor zum besseren Halt der Borrelien mit Plasmakoagulase (Kaninchen) beschichtet wurden. Es wurden hierbei parallel *Borrelia afzelii* und *Borrelia burgdorferi* Kulturproben mit den jeweiligen Primärantikörpern inkubiert und später mit Fluorescein (FITC) -markierten

Sekundärantikörpern gefärbt. Die Ergebnisse nach mikroskopischer Beurteilung der einzelnen Präparate ergab für den Osp-A-Antikörper (L32 1F11) einen positiven Nachweis sowohl für *B. afzelii* (VS461) als auch *B. burgdorferi* (B31), während die drei Überstände (LA 18, LA 21, LA 88) alle negativ waren.

### **3.1.3 Austestung des intrazellulären Borreliennachweises**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine geeignete Methode gesucht, um nach erfolgter Borrelieninfektion von eukaryoten Zellen die eventuell vorhandenen intrazellulären Borrelien nachzuweisen. Dabei war die sichere Differenzierung extrazellulärer von intrazellulären Borrelien besonders problematisch. Hierzu wurden verschiedene Nachweisvariationen ausgetestet und die vielversprechendste Methode letztendlich optimiert.

#### **3.1.3.1 Immunfluoreszenzdoppelfärbung (TRITC/FITC) mit Osp-A Antikörper**

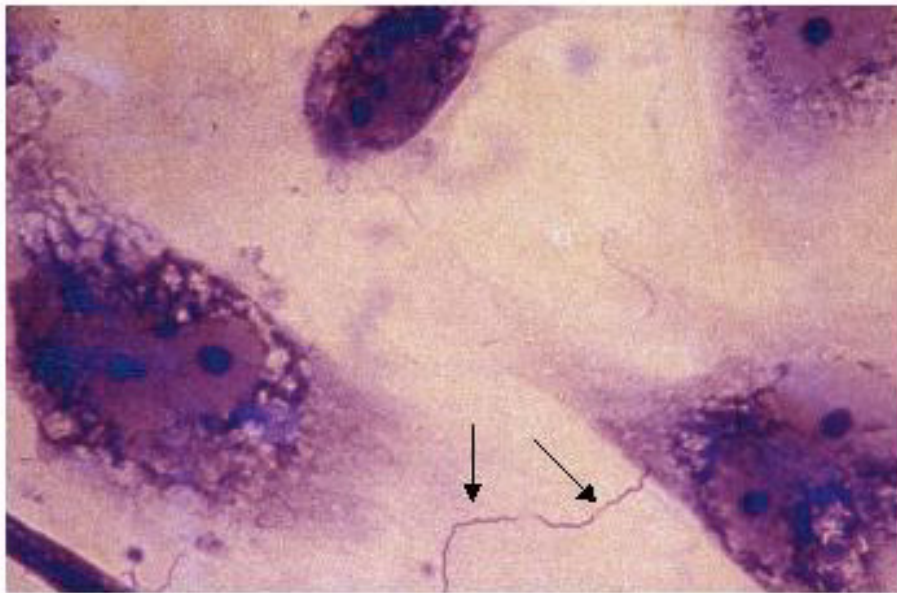
Zur gezielten Anfärbung von ausschließlich intrazellulären Borrelien mit einem Fluoreszenzfarbstoff wurde die Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit FITC- und TRITC-markierten Sekundärantikörpern (2.12.4 ). Hierbei wird ein Zwischenschritt mit Methanol eingefügt, der vor dem zweiten Färbungsschritt die Zellmembran durchlässig macht. Auf diese Weise sind die extrazellulären Borrelien durch beide Fluoreszenzfarbstoffe gefärbt und die intrazellulären Borrelien nur durch den zuletzt aufgetragenen Fluoreszenzfarbstoff.

Das Ergebnis dieser Analyse in Kombination mit dem zuvor ausgetesteten Osp-A Antikörper (L32 1F11) als Primärantikörper ergab bei mikroskopischer Betrachtung in den entsprechenden Fluoreszenzkanälen eine sichtbare Färbung, sowohl von FITC- als auch TRITC. Prinzipiell war hiermit die Doppelfärbung gelungen, jedoch war die Färbungsintensität allgemein zu schwach, um eine deutliche Differenzierung von tatsächlich gefärbten Bereichen und passiv angeregten Anteilen vorzunehmen. Offensichtlich war die Bindung des verwendeten Osp-A-Primärantikörpers für diesen Zweck nicht stark genug.

#### **3.1.3.2 Differenzierung von intra- oder extrazellulären Borrelien durch Giemsa-Färbung nach antibiotischer Behandlung**

Als Alternative zur reinen Immunfluoreszenzfärbung wurde eine Methode aus einer Kombination von antibiotischer Selektierung und anschließender Giemsa-Färbung getestet. Dieser Test basierte darauf, dass nach Inkubation des Infektionsansatzes mit einem Antibiotikum (Ceftriaxon, 1µg/µl) alle extrazellulären Borrelien abgetötet sind und die anschließend sichtbar gefärbten Borrelien als intrazellulär erkannt werden können. Es wurden

mehrere Versuchsansätze mit unterschiedlichen Antibiotikum-Inkubationszeiten von Stunden bis Tagen angesetzt und parallele Negativkontrollen von formalinfixierten Zellen mitgeführt. Nach abschließender Giemsa-Färbung der Präparate konnte keine Differenzierung der intrazellulären Borrelien erfolgen, da die Zellbestandteile der gefärbten eukaryoten Zellen einen zu unruhigen Hintergrund darstellen, um möglicherweise darin enthaltene Borrelien zu erkennen. Allerdings konnten extrazelluläre Borrelien sehr deutlich in ihrer charakteristischen spiraligen Gestalt identifiziert und von den humanen Zellen abgegrenzt werden.



**Abbildung 6: Die mikroskopische Aufnahme zeigt humane Zellen (HUVECs) und charakteristisch spiralige Borrelien (Pfeile) nach Giemsa-Färbung in 1000facher Vergrößerung.**

### **3.1.3.3 Immunfluoreszenzdoppelfärbung (TRITC/FITC) mit einem polyklonalen Borrelienantikörper**

Zur Verbesserung der Intensität der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung wurde ein kommerziell erworbener polyklonaler Borrelienantikörper ((BacTrace<sup>TM</sup> Antibody, Kirkegaard & Perry Laboratories) verwendet.

Zunächst wurde dieser neue polyklonale Borrelienantikörper für die Immunfluoreszenz-Doppelfärbung zum Test des *B. afzelii*-Isolats aus dem Pferd eingesetzt. Es war eine eindeutige Verbesserung der Fluoreszenzintensität im Gegensatz zum früher verwendeten Primäantikörper feststellbar, allerdings war ein eindeutiger intrazellulärer Nachweis hierbei

nicht ersichtlich. Hieraufhin wurde die Infektiösität dieses Borrelienisolats im Mausmodell überprüft, worauf anschließend unter 3.1.4.1 eingegangen wird.

Später durchgeführte Optimierungen des Färbungsprotokolls durch Austestung der optimalen Verdünnungsstufe der einzelnen verwendeten Antikörper, sowie vergleichende Tests von Präparaten mit variierten Zusätzen von Gelatine in der Antikörperverdünnung führten zu einem noch prägnanteren mikroskopischen Färbungsbild.

### **3.1.4 Überprüfung der Infektiösität von Borrelienisolaten**

Um eine noch bestehende Infektiösität von Borrelienisolaten zu überprüfen oder wiederherzustellen, muss ein Tierversuch durchgeführt werden. In diesem Fall wurden als Versuchstiere Mäuse des Stammes C3H/HeN verwendet, da sie aufgrund ihrer Anfälligkeit für Arthritis ein Mausmodell für Lyme Borreliose darstellen [88]. Dieser Mausstamm bildet nach Injektion mit infektiösen Borrelien eine starke Arthritis aus, die sich vor allem an erkennbar geschwollenen Fußknöcheln messen lässt (2.13.1).

#### **3.1.4.1 Überprüfung eines Borrelienisolats aus dem Pferd im Mausmodell**

Zur Überprüfung der Infektiösität eines *B. afzelii*-Isolats aus einem erkrankten Pferd und zur möglichen Rückisolierung von niedrigpassagigen, infektiösen Borrelien wurde ein Mausmodell mit insgesamt 12 Versuchstieren benutzt. Hierbei wurden 2 Versuchsgruppen von je 3 Mäusen zwei verschiedene Passagen des „Wendolino-Isolats“ subcutan injiziert und zusätzlich eine 3-er Kontrollgruppe mit einem hochpassagigen anderen *B. afzelii*-Stamm (PkO) infiziert. Als NaCl-Negativkontrolle wurde eine Versuchsgruppe mit ebenfalls 3 Einzeltieren parallel mitgeführt. Eine Woche nach der Infektion wurden regelmäßige Messungen der Fußknöchel mit einem digitalen Mikrometer vorgenommen. Die Messungen wurden über 5 Wochen dokumentiert und im Vergleich mit den Messwerten vor der Infektion beurteilt. Die gemessenen Werte ergaben teilweise einen Anstieg, teilweise konnten Messfehlerschwankungen am lebenden Objekt nicht ausgeschlossen werden, sodass das Ergebnis nicht so eindeutig ausfiel wie erwartet (Daten siehe Anhang 9.1.1).

Zur Rückisolierung von Borrelien wurden Organproben von Haut, Milz und Knöcheln entnommen und in Borrelienmedium kultiviert. Zusätzlich wurde Blut zur serologischen Antikörperbestimmung im IFAT-Test gewonnen. Die Rückisolierungen sowie die IFAT-Analysen wurden von Dr. G. Liebisch (ZeckLab, Burgwedel) durchgeführt.

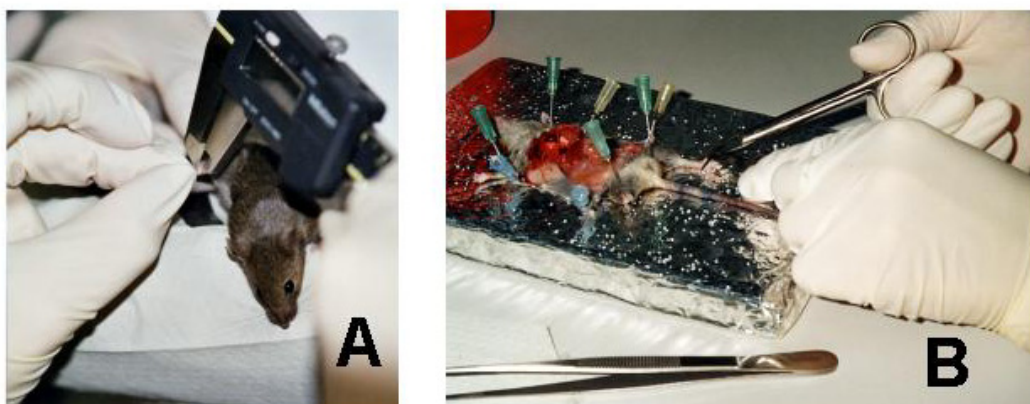
Als Ergebnis der serologischen IFAT-Bestimmungen ergab sich bei den mit dem „Wendolino“-Isolat (*B. afzelii*) infizierten Mäusen ein leicht erhöhter Antikörpertiter von 1:64 oder 1:16, während die Kontrollmäuse mit dem nichtinfektiösen vielpassagigen *B. afzelii*-Stamm (PkO) sowie die NaCl-Negativkontrollen den geringst möglichen Titer zeigten. Aus einer „Wendolino“-Isolat-infizierten Maus konnten Borrelien aus dem Knöchel rückisoliert werden.

Bei einer späteren Wiederholung des Versuchs mit 8 Tieren (3 Gruppen: Wendolino-Isolat, *B. burgdorferi*-Positivkontrolle, NaCl-Negativkontrolle) wurde die Versuchsdauer verdoppelt, also für 10 Wochen beobachtet.

Wendolino ( <i>B. afzelii</i> )	Positivkontrolle N40 ( <i>B. burgdorferi s s</i> )	Negativkontrolle (0,9% NaCL)
1: $5 \times 10^5$ Z/50 $\mu$ l (5. Passage)	1: $5 \times 10^5$ Z/50 $\mu$ l (7. Passage)	1: NaCl/50 $\mu$ l
2: $5 \times 10^5$ Z/50 $\mu$ l (5. Passage)	2: $5 \times 10^5$ Z/50 $\mu$ l (7. Passage)	2: NaCl/50 $\mu$ l
3: $5 \times 10^5$ Z/50 $\mu$ l (5. Passage)	3: $5 \times 10^5$ Z/50 $\mu$ l (7. Passage)	

**Tabelle 7: Infektionsansatz zur Überprüfung eines Borrelienisolats aus dem Pferd im Mausmodell**

Hierbei konnte eine Schwellung der Fußknöchel der „Wendolino“-Isolat- infizierten Mäuse sowie der Positivkontrollen gemessen werden (Daten s. Anhang 9.1.2). Teilweise war eine Hautveränderung mit einhergehendem flächigen Fellverlust zu beobachten. Offenbar zeigt sich erst nach längerer Infektion mit diesem Isolat eine messbare Reaktion bei den Versuchstieren. Für „Wendolino“-Isolat- infizierte Mäuse konnte im serologischen IFAT-Test ein deutlicher Antikörpertiter von 1:256 bestimmt und Borrelien aus der Haut rückisoliert werden [89].



**Abbildung 7: Fotografische Dokumentation der Mausinfektionsversuche. Messung des Fußknöcheldurchmessers mit digitalem Mikrometer an arthritisanfälligen C3H/HeN-Versuchsmäusen (A) und Organentnahme nach Tötung zur Rückisolierung von Borrelien.**

### 3.1.4.2 Überprüfung von Isolaten aus Zecken-Maus-Zyklus im Mausmodell

Als Konsequenz aus der durchgeführten Untersuchung der Infektiösität des Pferdeisolats und der zunächst uneindeutigen schwachen Infektionserscheinungen wurden zusätzlich hochinfektiöse Borrelien aus einem kontrollierten Zecken-Maus-Zyklus eingesetzt. Diese wurden freundlicherweise von Prof. F.-R. Matuschka (Charité, Berlin) zur Verfügung gestellt. Es wurde folgender Versuchsansatz mit 8 sieben Wochen alten Mäusen und zwei erhaltenen *Borrelia burgdorferi* Stämmen (N40, GÖ16) durchgeführt:

1 <i>B. burgdorferi sensu stricto</i> (N40) C3H/HeN- Mäuse	2 <i>B. burgdorferi sensu stricto</i> (GÖ16) C3H/HeN- Mäuse	3 Negativkontrollen (NaCl) C3H/HeN- Mäuse
1: $5 \times 10^5$ Z/50 $\mu$ l (5. Passage) 2: $5 \times 10^5$ Z/50 $\mu$ l (5. Passage) 3: $5 \times 10^5$ Z/50 $\mu$ l (5. Passage)	1: $5 \times 10^5$ Z/50 $\mu$ l (4. Passage) 2: $5 \times 10^5$ Z/50 $\mu$ l (4. Passage) 3: $5 \times 10^5$ Z/50 $\mu$ l (4. Passage)	1: 0,9 % NaCl/50 $\mu$ l 2: 0,9 % NaCl/50 $\mu$ l

Tabelle 8: Infektionsansatz zur Überprüfung von Isolaten aus Zecken-Maus-Zyklus im Mausmodell

Während der Versuchsdauer von 5 Wochen wurden regelmäßig die hinteren Mausfußknöchel gemessen und der Verlauf der Schwellung dokumentiert. Die Mittelwerte dieser Messungen wurden gebildet und die erhaltenen Datenreihen in Abbildung 8 graphisch dargestellt.

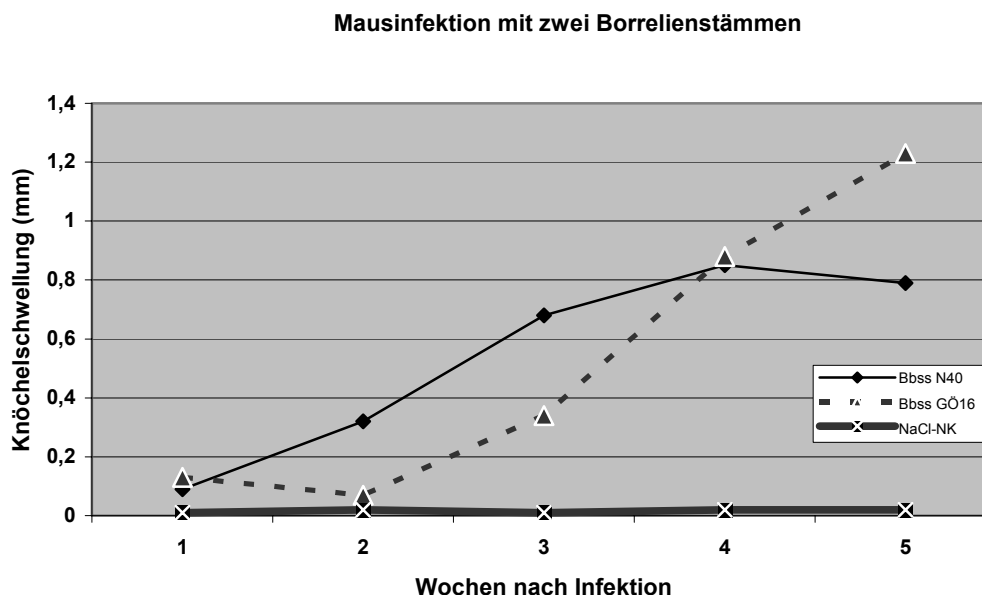


Abbildung 8: Graphische Darstellung der gemessenen Fußknöchelschwellungen bei Borrelien-infizierten bzw. nicht infizierten Mäusen (NaCl-Kontrolle) zur Überprüfung der Infektiösität von zwei *Borrelia burgdorferi sensu stricto* Isolaten (N40, GÖ16) aus einem Zecken-Maus-Zyklus.

Von den drei Mäusen die mit dem Borrelienisolat Bbss GÖ16 infiziert worden waren, zeigte nur eine Maus messbare Fußknöchelschwellungen, diese allerdings erheblich. Aus diesem Grund wurden die Daten der beiden anderen Mäuse dieser Gruppe aus der Mittelwertberechnung herausgelassen, um den Effekt nicht zu verfälschen.

Bei Mäusen die mit dem Borrelienisolat Bbss N40 infiziert wurden, konnte eine Knöchelschwellung von fast 1 mm gemessen werden, beim Borrelienisolat Bbss GÖ16 sogar mehr als 1,2 mm (Abbildung 8). Die teilweise scheinbar geringen Milimeterwerte sind allerdings am Mausknöchel tatsächlich erheblich, denn eine Schwellung von ca. 0,5 mm ist bereits mit bloßem Auge erkennbar und ist ab ca. 0,7 mm als eindeutige Verdickung sichtbar. Wohingegen eine Messfehlerschwankung lediglich im Bereich von ca. 0,1 – 0,2 mm liegt.

Die genommenen Blutproben zeigten in der IFAT-Bestimmung für alle infizierten Mäuse einen Borrelienantikörpertiter von 1:256 und bei einzelnen Tieren des *Borrelia burgdorferi* Stammes N40 sogar 1:512, während die parallel mitgeführten Blutproben der mit NaCl injizierten Negativkontrollmäuse bei einem Wert kleiner als 1:2 lagen.

Aus zahlreichen genommenen Organproben konnten Borrelien rückisoliert werden, hierbei waren die meisten Erfolge mit Hautproben und einige durch Knöchelisolierung erzielt worden.

#### **3.1.4.3 Überprüfung von Isolaten aus Zecken-Maus-Zyklus in Zellkulturen**

Aufgrund der im Mausmodell eindeutig festgestellten Infektiosität der beiden aus dem Zecken-Maus-Zyklus stammenden *Borrelia burgdorferi*-Stämmen N40 und GÖ16 wurde beschlossen, mit ihnen die geplanten Infektionsversuche zur späteren cDNA-Array Analyse durchzuführen. Hierzu musste zunächst geprüft werden, ob sich die Ergebnisse im Mausmodell auch auf ein Zellkulturmodell übertragen lassen.

Für eine erfolgreiche Zellinfektion wurden verschiedene Parameter ausgetestet, um die besten Voraussetzungen für die cDNA-Array Analyse zu erzielen. Hierzu wurden jedes Mal frische primäre Zellkulturen und Borrelienkulturen angesetzt, um möglichst geringpassagige Kulturen zu verwenden, da diese am erfolgversprechendsten für eine Infektion sind. Alle Infektionsansätze wurden in Infektionsröhrchen mit im Boden befindlichen losen Glasplättchen durchgeführt und nach Fixierung und Immunfluoreszenz-Doppelfärbung im mikroskopischen Bild verglichen und beurteilt.



#### 3.1.4.3.1 *Vergleich der Infektionsrate von Borrelia burgdorferi-Stämmen*

Zur endgültigen Auswahl, welcher der beiden im Mausmodell getesteten *Borrelia burgdorferi*-Stämme N40 oder GÖ16 für die cDNA-Array Infektionen verwendet wird, wurde deren Infektionsrate in parallelen Infektionsansätzen verglichen. Allgemein war die Feststellung der Infektionsrate problematisch, da sie nur auf der Grundlage des Doppelfärbungsergebnisses bestimmt werden konnte und deshalb nur als Abschätzung im mikroskopischen Bild vorzunehmen war. Zudem lag die so festgestellte Infektionsrate in der Regel bei 10 % in einzelnen Präparaten maximal bei bis zu 20 %.

Obwohl der *Borrelia burgdorferi*-Stamm GÖ16 im Mausmodell die stärksten Schwellungen verursacht hat, zeigte der *Borrelia burgdorferi*-Stamm N40 im Ergebnis der Zellkulturinfektion von HUVECs in mehreren Präparaten eine etwas bessere Infektionsrate. Aufgrund dessen wurde für die weiteren Versuche der *Borrelia burgdorferi*-Stamm N40 eingesetzt.

#### 3.1.4.3.2 *Vergleichende Analyse der Infizierbarkeit humaner Zellen*

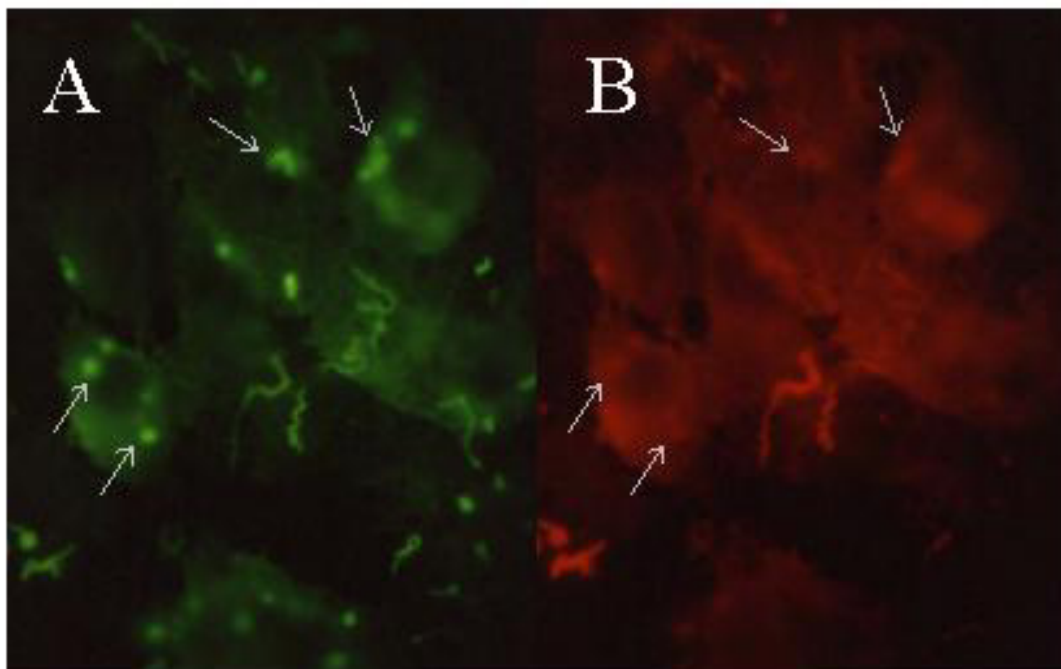
Zur Prüfung, ob andere aus der Literatur bekannte und für Borreliose relevante humane Zellen [65] möglicherweise noch verbesserte Infektionsraten zeigen, wurden in parallelen Infektionsansätzen Endothelzellen (HUVEC) und zur Verfügung gestellte Synovialzellen (K4IM) verglichen. Im Ergebnis konnte bei den Synovialzellen kein besseres Infektionsresultat festgestellt werden, denn lediglich ein Präparat zeigte möglicherweise intrazelluläre Borrelien. Im Unterschied dazu wurden in mehreren Präparaten der Endothelzellen mögliche intrazelluläre Borrelien gesichtet. Aufgrund dieses Unterschiedes der beiden Zelltypen und der Tatsache, dass es sich bei den zur Verfügung stehenden Synovialzellen (K4IM) um eine permanente Zelllinie handelte, wurden für die weiteren Versuche die primären Endothelzellen (HUVEC) bevorzugt, da sie am ehesten einem in vivo-Modell nahe kommen.

#### 3.1.4.3.3 *Optimierung nach Variation der Infektionsdauer und Borrelienzahl*

Zur Optimierung der Infektion wurde eine Variation der Infektionsdauer und Borrelienzahl ausgetestet. Die Infektionsdauer wurde für die verschiedenen Zeiten von 12, 24 und 48 Stunden getestet, wobei sich die 24 Stunden Dauer im Ergebnis am geeignetsten darstellte, da zu diesem Zeitpunkt die Infektionsrate im mikroskopischen Präparat am besten erschien und nach 48 Stunden teilweise bereits eine Ablösung der adhärenen Zellen auftrat. Nach

Variation der Borrelienzellzahl bis zu einem 1000fachen Überschuss wurde ein Infektionsverhältnis von  $1 \times 10^5$  humanen Zellen (HUVECs) mit  $1 \times 10^8$  Borrelien (Bbss N40) als optimal eingestuft.

Nach Optimierung aller erforderlichen Parameter entstanden einige Immunfluoreszenzaufnahmen von möglicherweise intrazellulären Borrelien. Allgemein ist die Beurteilung am Mikroskop mit dem live erhaltenen Bild besser als die Differenzierung in zwei starren Vergleichsbildern mit veränderter Lichtintensität, doch sie kann einen Eindruck vermitteln, wie die Beurteilung durch direkten Vergleich desselben Ausschnitts in den Anregungswellenlängen von abwechselnd FITC oder TRITC möglich ist. Wie bereits erläutert (3.1.3.1), ist eine Differenzierung möglich, da die extrazellulären Borrelien durch beide Fluoreszenzfarbstoffe gefärbt sind und die intrazellulären Borrelien nur durch den zuletzt aufgetragenen Fluoreszenzfarbstoff (hier FITC).



**Abbildung 9:** Mikroskopische Aufnahme der Immunfluoreszenzdoppelfärbung eines fixierten Zellkulturansatzes 24 Stunden nach Infektion mit *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (N40). Differenzierung von intrazellulären leuchtenden Borrelien in der FITC-Aufnahme (A) beim Vergleich desselben Ausschnitts in der TRITC-Aufnahme (B). Ebenso zeigen die sichtbaren Umrisse der eukaryoten Wirtszellen (HUVEC) die Lokalisation der intrazellulären Borrelien im direkten Zellbereich. Eindeutig extrazelluläre Borrelien in ihrer charakteristischen spiraligen Gestalt sind dagegen sowohl im FITC- wie auch im TRITC-Kanal deutlich leuchtend sichtbar.

Im mikroskopischen Bild der Doppelfärbung (Abbildung 9) sind im FITC-Kanal die intrazellulären Borrelien als hell leuchtende Flecken eingerollt im Zellbereich erkennbar,

während sie im gleichen Ausschnitt im TRITC-Kanal nur durch diffuses passives Durchscheinen zu erahnen sind. Eindeutig extrazelluläre Borrelien in ihrer charakteristischen, spiralförmigen Gestalt sind sowohl im FITC- wie auch im TRITC-Kanal deutlich leuchtend sichtbar.

#### *3.1.4.3.4 Austestung zweier Abtötungsmethoden von Borrelien*

Es gibt für dieses Projekt zwei geeignete Möglichkeiten zum Abtöten von Bakterien: erstens die Erhitzung der Borreliensuspension und zweitens die Bestrahlung mit UV-Licht. Es wurde getestet, ob beide Methoden zuverlässig eine vollständige Abtötung der Borrelien garantieren, um sie später als Negativkontrolle in Infektionsversuchen zum cDNA-Array mitzuführen.

Beide Behandlungen führten zu einem vollständigen Abtöten der Bakterien, wie durch anschließende Wachstumskontrollen eindeutig gezeigt werden konnte. Für die späteren Analysen wurde die Erhitzungsmethode für 20 min bei 56 °C durchgeführt.

## **3.2 Untersuchung der Borrelien-induzierten Wirtszell-Genexpression mittels radioaktiver cDNA-Arrays**

Durch den Einsatz von cDNA-Arrays kann gleichzeitig eine große Menge von Genen analysiert werden. Aufgrund dieses Vorteils werden Arrays häufig zur Untersuchung von Expressionsmustern auf mRNA-Ebene herangezogen, wobei stimulierte mit nicht-stimulierten Zellen verglichen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Technologie genutzt, um zunächst auf breiter Ebene mögliche Veränderung der Genexpression der Wirtszelle nach Infektion mit Borrelien aufzudecken. Mit der Etablierung und Optimierung eines Infektionsmodells im ersten Teil dieser Arbeit war die wichtigste Voraussetzung zum Einsatz von cDNA-Arrays geschaffen.

### **3.2.1 Optimierung der RNA-Isolierung aus humanen Zellen**

Zum Erhalt von hochreiner RNA in ausreichender Konzentration zur cDNA-Array Analyse musste die RNA-Isolierung zunächst für die konkreten Versuchsansätze optimiert werden.

#### **3.2.1.1 Austestung der Infektionsansätze für den cDNA-Array**

Die zuvor durchgeführten Infektionsansätze zur Herstellung mikroskopischer Präparate wurden alle im kleinen Maßstab von Kulturröhrchen mit einer Bodenfläche von ca. 1,75 cm<sup>2</sup> durchgeführt. Zur Isolierung einer ausreichenden Menge von Gesamt-RNA mussten die Infektionen auf den größeren Maßstab von Kulturflaschen mit einer Fläche von 25 cm<sup>2</sup> übertragen werden. Dazu wurden die Zell- und Bakterienzahlen um den Faktor 15 erhöht, das Infektionszahlenverhältnis aber möglichst beibehalten.

Die maximal mögliche eukaryotische Zellzahl für HUVECs pro Kulturflasche betrug 1,5 x 10<sup>6</sup> Zellen. Bei dieser Anzahl kommt ein vollständiger Monolayer zustande; gleichzeitig ist auch gewährleistet, dass es in den nächsten 24 – 48 Stunden Inkubationszeit nicht aufgrund von Kulturüberwachung zum Absterben und somit Ablösen der Zellen kommt. Zusätzlich wurde geprüft, ob eine später geplante einstündige Zentrifugation zur Infektion mit Borrelien den Zellen schadet. Die Zellen wiesen, wie vermutet, keine merklichen Änderungen auf.

#### **3.2.1.2 Bestimmung der zu erwartenden Gesamt-RNA-Ausbeute**

Zur cDNA-Array Analyse ist eine RNA-Konzentration von mindestens 2µg/µl erforderlich, um dies zu gewährleisten, musste der zu erwartende Gesamt-RNA-Gehalt der zur Analyse verwendeten humanen Endothelzellen (HUVEC) bestimmt werden. Die durchschnittlichen Erträge von Gesamt-RNA sind zwar für verschiedene Gruppen wie Bakterien, eukaryotische

Zellkulturen oder tierische Gewebe bekannt, jedoch gibt es zum Beispiel innerhalb der Zellkulturen-Gruppe ganz unterschiedlich hohe RNA-Gehalte. Zur Ermittlung des zu erwartenden Gesamt-RNA-Gehaltes von HUVECs wurden hiervon mehrere Zellkulturansätze parallel mit erhaltenen HeLa-Zellen (von Prof. Dr. A. Klos, Med. Mikrobiologie, MHH) nach dem RNA-Isolierungsprotokoll der Trizol-Methode behandelt. Die HeLa-Zellen wurden als Positivkontrolle mitgeführt, da der zu erwartende Gesamt-RNA-Gehalt hier bekannt war und so im Vergleich eine gelungene Protokolldurchführung erkannt und ein korrektes Ergebnis sichergestellt werden konnte.

Es konnte festgestellt werden, dass aus HUVECs teilweise nur halb soviel Gesamt-RNA isoliert werden kann wie aus den verglichenen HeLa-Zellen. Zudem ist die RNA-Ausbeute abhängig vom Alter der primären Zellen, sodass ab der 6. bis max. 7. Passage keine RNA-Isolierung mehr erfolgversprechend ist. Bei den hier verwendeten Zellkulturansätzen mit  $1,5 \times 10^6$  Zellen konnten in der Regel bis zu 10-12  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA isoliert werden und diese RNA-Ausbeute war, bei Aufnahme in einem entsprechend geringen Volumen an RNase-freiem Wasser, ausreichend für die erforderliche Konzentration.

### **3.2.1.3 Optimierung der RNA-Isolierung zur Vermeidung von Degradierung**

Zur cDNA-Array Analyse ist eine hochreine RNA, d.h. ohne DNA-Kontamination behaftete RNA erforderlich. Um dies zu gewährleisten, wurde im allgemeinen ein DNase-Verdau in das RNA-Isolierungsprotokoll der Trizol-Methode integriert. Aufgrund dieses integrierten DNase-Verdau mit RNase-freier DNase (RNase-free DNase RQ1, Promega) kam es aber wiederholt zur Degradierung der RNA.

Zur Austestung wurden diesmal eukaryotische Zellen der in der Arbeitsgruppe zur Verfügung stehenden RBL-Zelllinie (Basophile leukämische Rattenzelllinie) verwendet, um nicht unnötig die stark limitierten primären Zellen (HUVEC) zu vergeuden. Nach verschiedenen Austestungen konnte durch Vorschaltung von zwei aufeinander folgenden Aufreinigungsschritten vor dem DNase-Verdau dieses Problem gelöst werden. Als Nachteil hatten die insgesamt 3 Aufreinigungsschritte, inklusive der üblichen Aufreinigung nach dem Verdau, einen erhöhten Verlust an RNA-Ausbeute zur Folge, so blieben durchschnittlich 7-9  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA übrig. Durch Aufnahme des getrockneten RNA-Sediments in einem noch geringeren Volumen von RNase-freiem Wasser konnte jedoch verhindert werden, dass damit eine Verminderung der erforderlichen RNA-Mindestkonzentration von  $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$  entsteht. Dies war noch ausreichend, da pro Ansatz zur cDNA-Synthese im Arrayprotokoll nur 4  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA benötigt werden.

### 3.2.2 Analyse der Genexpression durch Clontech Atlas Arrays

Mit cDNA-Micro-Arrays kann gleichzeitig die Regulation vieler humaner Gene auf mRNA-Ebene bestimmt werden. In dieser Arbeit wurden zunächst zwei cDNA-Micro-Arrays der Version Atlas Human 1.2 Array von der Firma Clontech/BD eingesetzt, von denen jeder ca. 1200 Gene umfasst. Damit wurde die Beeinflussung der Genexpression epithelialer Wirtszellen durch *B. burgdorferi sensu stricto* (Bbss) 24 Stunden nach Infektion untersucht. Mit einem dritten cDNA-Micro-Array konnten die Ergebnisse später in einem unabhängigen Experiment bestätigt werden.

#### 3.2.2.1 Bearbeitung paralleler Infektionsansätze

Es wurden parallel 3 verschiedene Infektionsansätze angesetzt und im folgenden analog behandelt. Alle 3 kleinen Zellkulturflaschen enthielten einen Monolayer-Rasen von je  $1,5 \times 10^6$  HUVECs (5. Passage). Nach einem Tag der Anheftung der HUVECs wurden sie entsprechend dem Schema mit Borrelien (*B. burgdorferi sensu stricto*; N40) infiziert bzw. nicht infiziert.

Ansatznummer	1	2	3
Bezeichnung	NK HUVEC	Leb. Borr./HUVEC	Tote Borr./HUVEC
Bakterienzugabe	keine Borrelien	$1,5 \times 10^9$ Borrelien	$1,5 \times 10^9$ Borrelien
Eukaryotische Zellen	$1,5 \times 10^6$ HUVECs	$1,5 \times 10^6$ HUVECs	$1,5 \times 10^6$ HUVECs

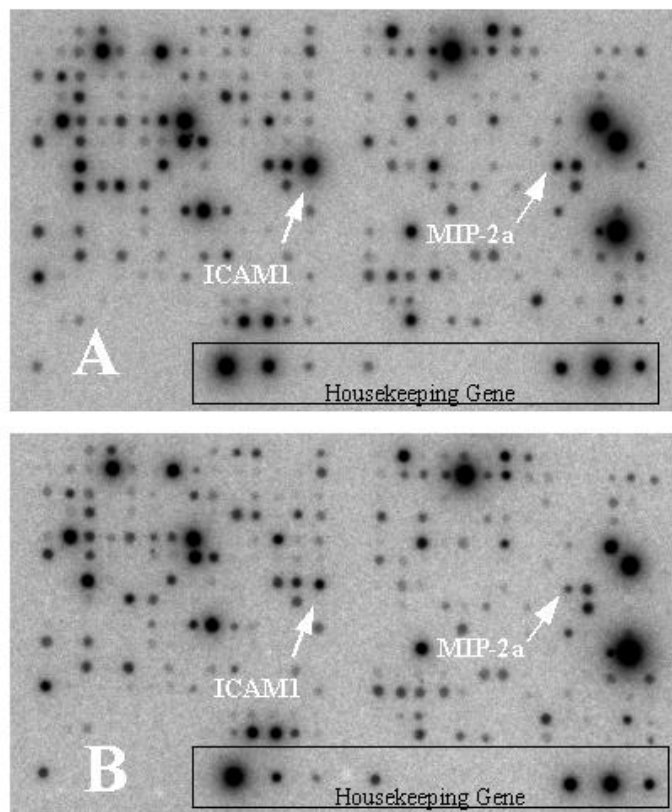
**Tabelle 9: Schema der Infektionsansätze zur Analyse der Genexpression Borrelien-infizierter Endothelzellen (HUVEC) mittels Clontech Atlas Arrays.**

Für Ansatz 3 (Tote Borr./HUVEC) wurde zunächst ein Aliquot der Borreliensuspension hitzeinaktiviert ( $56^\circ\text{C}$ , 20 min) und erst danach erfolgte jeweils die Zugabe der zuvor gewonnenen und ausgezählten Borreliensuspension bzw. der entsprechenden Menge Zellkulturmedium zur Negativkontrolle (NK HUVEC). Letztendlich enthielten alle Ansätze das gleiche Volumen an Medium.

Anschließend wurden die Infektionsansätze zentrifugiert, um den Kontakt der Borrelien mit den eukaryotischen Zellen zu beschleunigen und dann für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach erreichter Infektionsdauer von 24 Stunden wurde eine RNA-Isolierung durchgeführt und die gewonnene RNA nach Konzentrationsbestimmung und Prüfung im denaturierenden Agarosegel bis zur Verwendung im Array bei  $-70^\circ\text{C}$  eingefroren.

### 3.2.2.2 Ergebnisse der cDNA-Array Analyse

Entsprechend des Herstellerprotokolls wurde die gewonnene Gesamt-RNA in  $^{32}\text{P}$ -markierte cDNA umgeschrieben und jede der 3 Proben mit jeweils einer Atlas-Array Membran (human 1.2) der Firma Clontech hybridisiert. Die Membranen wurden ein bis zwei Wochen auf einer Phosphoimaging-Platte exponiert und die radioaktiv verursachten Signale auf der Platte mit einem Phosphoimager ausgelesen. Die erhaltenen digitalisierten Abbildungen der Array-Membranen zeigten ein deutliches 6-Felder Punktmuster der sogenannten Spots aus hybridisierter DNA. Besonders starke Unterschiede zwischen einzelnen Spots der drei Membranen konnten schon makroskopisch im digitalisierten Bild erkannt werden.



**Abbildung 10:** Digitalisierte Abbildungen von zwei Ausschnitten verschieden hybridisierter Array-Membranen nach Auslesung der radioaktiv verursachten Signale auf einer Phosphoimaging-Platte. Beim Vergleich bekannter Positionen für bestimmte Gene zeigen die sogenannten Spots aus hybridisierter DNA ein schwaches oder verstärktes Punktsignal. In den vorliegenden 2-Felder Ausschnitten zeigt sich bei toten Borrelien (A) eine stärkere Genexpression der Endothelzellen für ICAM-1 und MIP-2 alpha im Vergleich mit lebenden Borrelien (B), wobei ICAM-1 stark und MIP-2 alpha schwach reguliert ist.

Die so erhaltenen digitalisierten Daten mussten jedoch computergestützt normalisiert und verglichen werden, um auch schwache Regulationen zu erkennen und die Regulationsstärke in Werten beurteilen zu können. Als Maß für die Regulation wurde das Verhältnis der Genexpression (hier die Stärke des Hybridisierungssignals auf der Micro-Array-Membran bzw. Phosphoimaging-Platte) von infizierten Zellen zu nicht-infizierten Zellen bei positiver Regulation, das heißt bei stärkerer Expression des Gens in infizierten Zellen, bzw. dessen negativer Kehrwert bei negativer Regulation, also bei schwächerer Expression nach Infektion verwendet. Dieses Maß wird im weiteren auch als Faktor der Regulation bezeichnet. Zusätzlich wurde auch immer ein direkter Vergleich zwischen mit lebenden Borrelien oder toten Borrelien versetzten Zellen geführt.

Die Analyse der Veränderung der Genexpression bei humanen Endothelzellen (HUVEC) 24 Stunden nach Infektion mit *B. burgdorferi* sensu stricto ergab eine Anzahl regulierter Gene mit Unterschieden in der Genexpression von infizierten Zellen gegenüber schein-infizierten Zellen. Dieses Experiment wurde zweimal (mit gestrippten Membranen) durchgeführt. Bei dem Vergleich der beiden unabhängigen Experimente waren 14 Gene von 1176 auf dem Array vorhandenen in beiden Experimenten reguliert. Als Grenze für eine vorliegende Regulationen wurden nur Vergleichswerte mit Faktoren von mindestens 1,5 Unterschied akzeptiert. Da für 4 Gene im Vergleich mit den mitgeführten Kontrollen (Tote Borr./HUVEC und NK HUVEC) mögliche Verfälschungen durch Hintergrund-Signale festgestellt wurden, sind sie im weiteren nicht als Endergebnisse aufgeführt.

Die 10 Gene, die eindeutige und korrekte Regulationen in beiden Arrays zeigten, wurden in drei Regulationsgruppen eingeteilt. Hierbei wurde zwischen spezifisch hochreguliert durch lebende Borrelien, spezifisch herunterreguliert durch lebende Borrelien und komplex reguliert (d.h. Regulation bei lebenden und toten Borrelien bzw. indirekte Herunterregulation durch lebende Borrelien) unterschieden.

#### **Spezifisch hochregulierte Gene (durch lebende Borrelien):**

Es konnten 24 Stunden nach *B. burgdorferi* sensu stricto Infektion von humanen Endothelzellen (HUVEC) 5 Gene ermittelt werden, deren Regulation sich gegenüber nicht-infizierten Zellen geändert hat (Tab.10). Die Faktoren der Regulation liegen hierbei im unteren bis mittleren Größenbereich, wobei ein Gen (CD4-Antigen) durch besonders große Faktoren auffällt.



Gen	GenBank-Accession	Exp. 1 Regulationsfaktor (inf./nicht-inf.)	Exp. 2 Regulationsfaktor (inf./nicht-inf.)
ID-1 DNA-binding protein inhibitor	D13889	3,1	4,2
DNA-PK DNA-dependent protein kinase	U35835; U47077	2,2	2,1
CD4 antigen T-cell surface glycoprotein T4	M12807	238	23,5
PRG-1 IEX-1L anti-death protein	AF039067 AF071596	2,3	2,1
LPIC Lysosomal peptstatin-insensitive protease	AF017456	3,8	4,6

**Tabelle 10:** Darstellung der durch lebende Borrelien spezifisch hochregulierten Gene und die Faktoren ihrer Regulation beim Vergleich mittels cDNA-Array (Atlas human 1.2 Array, Clontech/BD) von infizierten humanen Endothelzellen (HUVEC) gegenüber nicht-infizierten Zellen 24 Stunden nach Infektion mit *B. burgdorferi sensu stricto* in zwei unabhängigen Experimenten (Exp. 1 und Exp. 2). In der ersten Spalte steht die Abkürzung und der Name des Gens.

### Spezifisch herunterregulierte Gene (durch lebende Borrelien):

Es konnten in dieser Gruppe nach Borrelien Infektion von humanen Endothelzellen weiterhin 3 Gene ermittelt werden, deren Regulation sich bei Gegenwart von lebenden Borrelien im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen vermindert hat (s. Tabelle 11). Die Faktoren der Regulation liegen hierbei alle im gleichen Größenbereich.

Gen	GenBank-Accession	Exp. 1 Regulationsfaktor (inf./nicht-inf.)	Exp. 2 Regulationsfaktor (inf./nicht-inf.)
ITGB8 Integrin beta 8 precursor	M73780	-4,2	-2,3
VEGFR2 Vascular endothelial growth factor receptor 2 precursor	L04947; X61656	-2,2	-2,0
TGF-beta 2 Transforming growth factor beta precursor	M19154; M22045; M22046; Y00083	-2,5	-2,2

**Tabelle 11:** Darstellung der durch lebende Borrelien spezifisch herunterregulierten Gene und die Faktoren ihrer Regulation beim Vergleich mittels cDNA-Array von Borrelien-infizierten humanen Endothelzellen (HUVEC) gegenüber nicht infizierten Zellen in zwei unabhängigen Experimenten (Exp. 1 und Exp. 2).

### **Komplex regulierte Gene:**

Als komplex regulierte Gene wurden diejenigen Gene bezeichnet, die sowohl in Zellansätzen mit lebenden als auch toten Borrelien hochreguliert waren, jedoch im Vergleich bei den toten Borrelien deutlich stärkere Faktoren aufwiesen. Dies legte die Vermutung auf eine indirekte Herunterregulation dieser Gene durch lebende Borrelien nahe. Es konnten 2 Gene in dieser Gruppe identifiziert werden.

<b>Gen</b>	<b>GenBank Accession</b>	<b>Exp. 1 Leb / Tot</b>	<b>Exp. 2 Leb / Tot</b>
ICAM-1 intercellular adhesion molecule-1 precursor	J03132	2,3 / 16,5	3,0 / 27,7
MIP-2alpha Macrophage inflammatory protein 2 alpha	X53799	2,3 / 5,3	2,9 / 13,3

**Tabelle 12: Zusammenfassung der Regulationsfaktoren für komplex regulierte Gene. Hiermit sind Gene bezeichnet, die sowohl in Zellansätzen mit lebenden als auch toten Borrelien hochreguliert waren, jedoch im Vergleich bei den toten Borrelien deutlich stärkere Faktoren aufwiesen. Das Verhältnis ist hier jeweils als Leb/Tot dargestellt. Leb: Regulationsfaktor (inf./nicht-inf.), Tot: (tote Borr./nicht-inf)**

Eine gesonderte Einteilung der ermittelten Gene in funktionelle Gruppen ist nur in geringem Maße möglich, da sie gestreut aus verschiedenen Bereichen stammen.

Die einzige größere *Gruppe der Zelloberflächenantigene und Adhäsionsproteine* besteht aus folgenden 3 Genen : ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1 precursor), ITGB8 (Integrin beta 8 precursor) und CD4 antigen (T-cell surface glycoprotein T4).

Die zweite *Gruppe der Wachstumsfaktoren, Zytokine und Chemokine* besteht aus den 2 Genen: MIP-2 alpha (Macrophage inflammatory protein 2 alpha) und TGF-beta 2 (Transforming growth factor beta precursor).

Ansonsten konnten Gene ermittelt werden, die folgenden funktionellen Gruppen angehören: *Apoptose assoziierte Proteine* (IEX-1L), *Zellzyklusregulatoren* (ID-1), *Signaltransduktionsregulatoren* (VEGFR2), *DNA-Reparatur Proteine* (DNA-PK) und *Proteinumsatzregulatoren* (LPIC).

### **3.3 Überprüfung der Ergebnisse der Micro-Arrays durch unabhängige Verfahren**

Ein Teil der so ermittelten Veränderungen des Wirtszelltranskriptoms durch eine erfolgte Infektion wurde anschließend mit unabhängigen Methoden überprüft. So wurde zur weiteren Charakterisierung der Ergebnisse der Micro-Arrays zunächst eine Überprüfung auf mRNA-Ebene in der *Real-Time*-RT-PCR angeschlossen, sowie für einige regulierte Gene eine zusätzliche Analyse auf Proteinebene durch ELISA oder FACS-Messungen. Für diese Untersuchungen wurden weitere Analyse-Zeitpunkte hinzugenommen, um eine grobe Regulationskinetik zu erhalten.

#### **3.3.1 Überprüfung der Ergebnisse mittels semiquantitativer *Real-Time*-RT-PCR**

##### **3.3.1.1 Auswahl der zu kontrollierenden Gene**

Für diese Experimente wurden Gene ausgewählt, deren Funktion bekannt ist und die evtl. auch in Zusammenhang mit bakteriellen Infektionen gebracht werden können. Ein weiteres Auswahlkriterium waren besonders hohe Regulationsfaktoren, die auf eine starke Veränderung der Expression nach Borrelieninfektion hoffen ließen. Hierbei wirkten auch die anscheinend komplex regulierten Gene besonders interessant, da die großen Faktorunterschiede zwischen Infektionsansätzen mit lebenden und toten Borrelien auf eine mögliche Herunterregulation von lebenden Borrelien schließen ließ. Insgesamt wurden 4 Gene zur Überprüfung durch eine *Real-Time*-RT-PCR ausgewählt.

##### **3.3.1.2 Konstruktion und Überprüfung der Primer für die *Real-Time*-RT-PCR**

Für einen Teil der zu untersuchenden Gene mußten Primerpaare entworfen und ausgetestet werden. Für zwei der Gene (MIP-2 $\alpha$  und IEX-1L) konnten *Real-Time*-Primer aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J. Buer an der GBF in Braunschweig verwendet werden.

Die Kriterien für die Entwicklung der Primer nach vorheriger Datenbankrecherche zur jeweiligen Gensequenz sind unter (2.9.12.1) angegeben. An dieser Stelle wird exemplarisch für das interzelluläre Adhäsionsprotein ICAM-1 das Verfahren zur Überprüfung der Primer für die Verwendbarkeit in der *Real-Time*-RT-PCR dargestellt.

Zu Beginn wurde ausgetestet, ob die Primer bei der gewünschten Annealing-Temperatur in einer herkömmlichen PCR ein Amplifikat entsprechender Länge ergaben. Nach diesem Test wurde eine Primermatrix erstellt, um die bestmögliche Kombination der Primerkonzentrationen im Ansatz zu ermitteln. In Tabelle 13 ist das Ergebnis der Primermatrix dargestellt.

Primerverhältnis	C <sub>T</sub> -Werte	Mittelwert	Standard -abweichung	C <sub>T</sub> -Primer K - C <sub>T</sub> -Primer
ICAM-1 50-50K	40 40	40,00	0,00	4,72
ICAM-1 50-50	35,30 35,25	35,28	0,03	
ICAM-1 50-300 K	40 40	40,00	0,00	8,49
ICAM-1 50-300	31,44 31,58	31,51	0,10	
ICAM-1 50-900 K	39,70 40	39,90	0,21	12,00
ICAM-1 50-900	28,07 27,65	27,90	0,30	
ICAM-1 300-50 K	40 40	40,00	0,00	10,14
ICAM-1 300-50	30,01 29,71	29,86	0,22	
<b>ICAM-1 300-300 K</b>	<b>40</b> <b>40</b>	<b>40,00</b>	<b>0,00</b>	<b>12,83</b>
<b>ICAM-1 300-300</b>	<b>27,18</b> <b>27,15</b>	<b>27,17</b>	<b>0,02</b>	
ICAM-1 300-900 K	39,30 39,32	39,31	0,02	11,95
ICAM-1 300-900	27,56 27,16	27,36	0,23	
ICAM-1 900-50 K	40 40	40,00	0,00	9,99
ICAM-1 900-50	30,10 29,92	30,01	0,07	
ICAM-1 900-300 K	40 40	40,00	0,00	13,04
ICAM-1 900-300	26,79 27,12	26,96	0,23	
ICAM-1 900-900 K	40 40	40,00	0,52	13,18
ICAM-1 900-900	26,88 26,76	26,82	0,08	

**Tabelle 13: Ergebnisse der Primermatrix für ICAM-1. In der ersten Spalte stehen das Primerverhältnis (in pmol/ml im Endansatz) und die Angabe, ob der Ansatz cDNA enthält oder nicht (K=Kontrolle). Es folgen die doppelt bestimmten C<sub>T</sub>-Werte der einzelnen Primerkombinationen, deren Mittelwerte und Standardabweichungen. In der letzten Spalte sind die Differenzen der C<sub>T</sub>-Werte der gleichen Primerkombination mit und ohne cDNA aufgeführt. Für Proben, bei denen kein Amplifikat entstand, ergab sich mit einem Wert von 40 die maximale Zykluszahl. Das als optimal beurteilte Primerkonzentrationsverhältnis ist hervorgehoben.**

Es ergaben sich hierbei 4 günstigste Primerverhältnisse mit einem großen Signal-Rauschabstand ( $\geq 40$  versus 26 bzw. 27 Zyklen). Favorisiert wurde letztendlich die Primerkonzentration von 300 pmol/ml im Endansatz von beiden Primern, da sie den

geringsten Primerverbrauch ermöglicht und das gleiche Primerkonzentrationsverhältnis beider Primer das Pipettierschema bei der Durchführung erleichtert.

Zuvor wurden die einzelnen Matrixansätze im Agarosegel daraufhin überprüft, ob sich außer dem gewünschten Amplifikat noch weitere gebildet haben. Dies ist in der Regel eine unerwünschte Amplifikation der Primer selbst. Als Qualitätskontrolle dienten weiterhin die Dissoziationskurven der PCR-Läufe, die vom TaqMan<sup>®</sup>-Gerät aufgenommen wurden. Aus diesen Dissoziationskurven lässt sich ebenfalls auf das Vorhandensein von unerwünschten, zusätzlichen Amplifikaten schließen. Für das verwendete Primerpaar (AS1+AS2) für ICAM-1 wurden, wie erhofft, keine anderen Amplifikate als das gewünschte 119 bp Amplifikat aus der cDNA gefunden.

Ein Primerpaar zeigte bei den Vortests kein Amplifikationsfragment des Gens (CD4) und zur Abklärung, ob es an der Qualität der konstruierten Primer lag oder ob einfach kein zu amplifizierendes Produkt in den Proben vorlag, wurde eine Positivkontrolle hergestellt. Hierzu wurde Leukozyten-RNA aus frischen Blutproben isoliert (2.9.10.2). Unter Verwendung der konstruierten CD4-Primer konnten Amplifikate aus der Leukozyten-RNA gebildet und somit das optimale Primerverhältnis ermittelt werden. Die Ergebnisse aller Austestungen der Primermatrix sind für die entsprechenden Gene in Tabelle 14 aufgelistet.

Primerpaar (Gen)	Primerverhältnis im Ansatz [pmol/ml]	C <sub>T</sub> -Primer K - C <sub>T</sub> -Primer
ICAM-1	300/300	13
CD4	300/300	12
IEX-1L	50/50	12
MIP-2 $\alpha$	300/300	15

**Tabelle 14: Ergebnisse der Primermatrixes für die verwendeten Primerpaare.**

### 3.3.1.3 Generierung der Proben und optimierte RNA-Isolierung

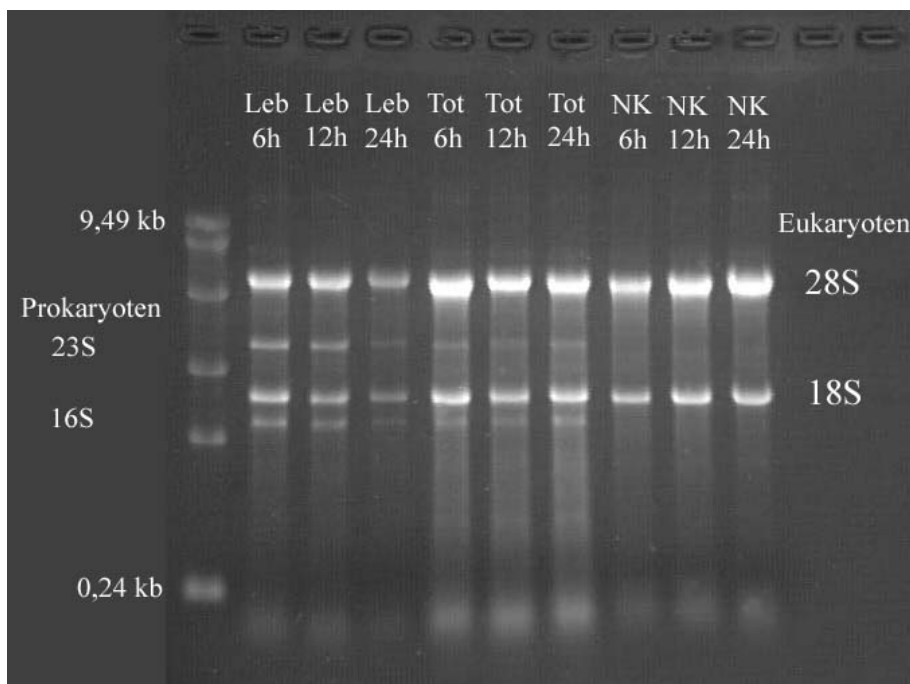
Für die Infektionsansätze zur *Real-Time*-PCR Analyse wurden weitere Zeitpunkte hinzugenommen, um zusätzliche Daten zur Kinetik der Regulationen zu erhalten.

Hierzu wurden für drei gewählte Zeitpunkte insgesamt 9 verschiedene Infektionsansätze parallel angesetzt und im folgenden analog behandelt. Alle kleinen Zellkulturflaschen enthielten hierbei einen Monolayer-Rasen von je  $1,5 \times 10^6$  HUVECs. Ein Tag nach der Aussaat der HUVECs wurden sie entsprechend dem Schema mit Borrelien (*B. burgdorferi*

*sensu stricto*; N40) infiziert bzw. nicht infiziert oder in einem weiteren kompletten Ansatz mit hitze-inaktivierten d.h. toten Borrelien versetzt.

	6h	12h	24h
<b>Leb. Borr./HUVEC</b>	(1) 1,5 x 10 <sup>8</sup> Borrelien	(2) 1,5 x 10 <sup>8</sup> Borrelien	(3) 1,5 x 10 <sup>8</sup> Borrelien
<b>Tote Borr./HUVEC</b>	(4) 1,5 x 10 <sup>8</sup> Borrelien	(5) 1,5 x 10 <sup>8</sup> Borrelien	(6) 1,5 x 10 <sup>8</sup> Borrelien
<b>NK HUVEC</b>	(7) keine Borrelien	(8) keine Borrelien	(9) keine Borrelien

Die RNA aus den Zellen wurde 6, 12 bzw. 24 Stunden nach Infektion isoliert und im Gel auf Degradierung hin überprüft, in cDNA umgeschrieben und in einer PCR mit Primern für das *Housekeeping*-Gen RPS9 amplifiziert, um ihre Güte zu testen. Die so gewonnenen Proben wurden für die Analyse mittels *Real-Time-PCR* verwendet.



**Abbildung 11:** Denaturierendes Agarosegel zur Kontrolle der gewonnenen Gesamt-RNA aus Infektionsansätzen von Borrelien-infizierten bzw. nicht-infizierten humanen Endothelzellen. Zu sehen sind die deutlichen rRNA-Banden, die stärkere 28S-rRNA-Bande entspricht einer Größe von ~5,0 kb und die 18S-rRNA-Bande von ~1,9 kb. Bei den Borrelien-infizierten Ansätzen sind zusätzlich die prokaryotischen rRNA-Banden von 23S (~2,9 kb) und 16S (~1,5 kb) zu erkennen.

### 3.3.1.4 Ergebnisse der Real-Time RT-PCR

Zur Analyse der Proben wurde parallel zur *Housekeeping*-Gen (RPS9)-Standardkurve auch jeweils eine Standardkurve für das zu untersuchende Gen mit einer Verdünnungsreihe aus einer cDNA-Mischung aller Zeitpunkte aufgestellt (2.9.12.2). Diese cDNA-Mischung stammte aus gewonnener RNA von Endothelzellen, nach Infektion mit *B. burgdorferi* sensu stricto und anschließender cDNA-Synthese. So konnte überprüft werden, ob die Verdünnungsreihe im gewählten Bereich linear war und aus der Geradengleichung die Effizienz der Amplifikationsreaktion ermittelt werden. Die Steigung der Standardkurven lag in der Regel im Bereich von  $-3,0$  und stellt damit eine gute Effizienz im Bereich von  $\sim 100\%$  dar.

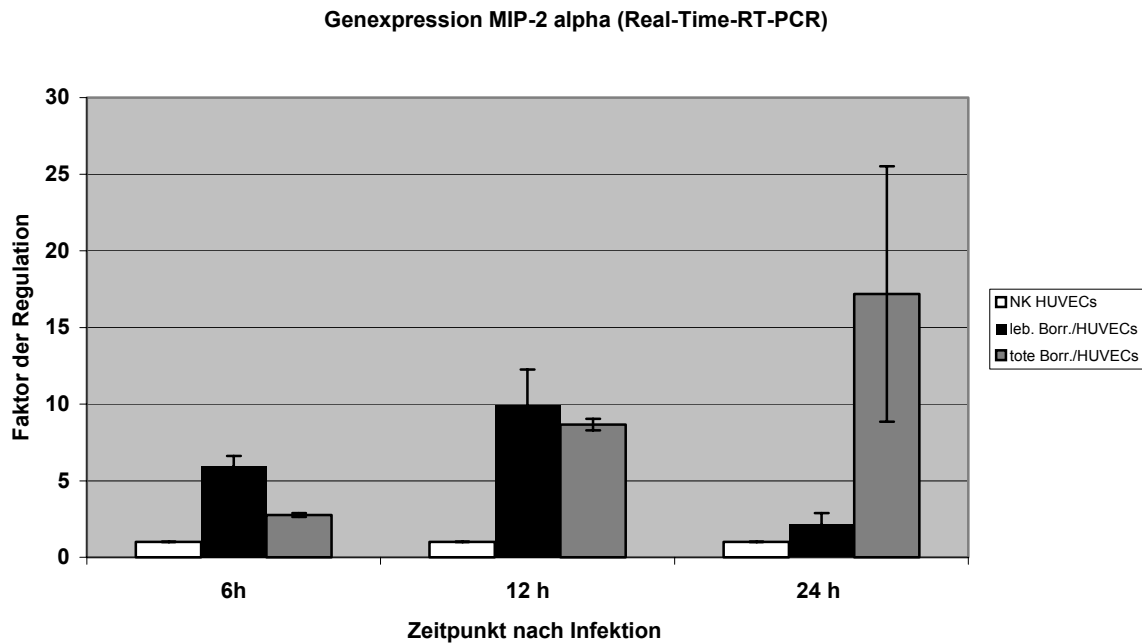
Es wurden vier der zehn Gene mittels *Real-Time* RT-PCR überprüft. Exemplarisch sind hier die Ergebnisse der Wiederholungsexperimente von MIP-2 alpha dargestellt.

	Experiment 1 Regulationsfaktoren	Experiment 2 Regulationsfaktoren
6 h leb. Borr	5,51	6,43
12 h leb. Borr.	8,31	11,58
24 h leb. Borr.	2,66	1,59
6 h tote Borr	2,67	2,85
12 h tote Borr.	8,39	8,92
24 h tote Borr.	23,08	11,30
6 h NK HUVEC	1	1
12 h NK HUVEC	1	1
24 h NK HUVEC	1	1

**Tabelle 15:** Exemplarische Darstellung der Ergebnisse von unabhängigen Experimenten zur *Real-Time*-RT-PCR von MIP-2 alpha. Angegeben sind die ermittelten Regulationsfaktoren nach Normierung gegen das *Housekeeping* Gen (RPS9).

In der graphischen Auftragung der Daten (Abbildung 12) wird die durch lebende oder tote Borrelien erzeugte unterschiedliche Regulation deutlich. So kommt es unter Einfluss von lebenden Borrelien nach einem Maximum bei 12 Stunden Infektionszeit zu einem Abfall der Regulation bis unter das Ausgangsniveau. Im unabhängigen Wiederholungsexperiment zeigte sich die gleiche Tendenz, nur mit einem früheren Erreichen des Maximums der Expression bereits nach 6 Stunden, was durch biologisch unterschiedliche Bedingungen erklärbar ist.

Bei den toten Borrelien hingegen erfolgt ein stetiger Anstieg des mRNA-Nachweises bis zum Maximum des letzten gemessenen Zeitpunktes von 24 Stunden nach Infektion.



**Abbildung 12:** Graphische Darstellung der *Real-Time-RT-PCR* Analyse zur Regulation der Genexpression von MIP-2 alpha. Gezeigt ist ein paralleler Vergleich verschiedener Zeitpunkte nach Infektion von Endothelzellen mit lebenden oder toten Borrelien versus nicht-infizierter, Endothelzellen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen von zwei unabhängigen Messungen.

Als Zusammenfassung der Endergebnisse der *Real-Time-PCR* kann folgendes festgehalten werden: Für zwei der hier überprüften Gene, die im Array-Experiment 24 Stunden nach Infektion reguliert waren, konnte diese Regulation ebenfalls in der *Real-Time-PCR* bestätigt werden. Dies war zum einen das exemplarisch vorgestellte Gen MIP-2 alpha, welches unter Einfluss von lebenden Borrelien sein Maximum bei 12 Stunden Infektionszeit erreicht und danach bis unter das Ausgangsniveau abfällt und unter Einfluss von toten Borrelien sein Maximum nach 24 Stunden erreicht.

Für das andere im Array regulierte Gen ICAM-1 konnte die starke Expression von mRNA nach 24 Stunden bei toten Borrelien im Gegensatz zu lebenden Borrelien ebenfalls bestätigt werden (Daten s. Anhang 9.1.4).

Für die Probenmessung zu CD4 jedoch bestätigten sich die ersten Hinweise bei der Erstellung der Primermatrix, indem auch in der sensitiven *Real-Time-PCR* keine Amplifikate für CD4 nachgewiesen werden konnten. Die Ergebnisse der cDNA-Array Analyse konnten hierfür somit nicht bestätigt werden. Ebenso war die Regulation des Gens IEX-1L auch in der sensitiven *Real-Time-PCR* nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

Das sich bei der tabellarischen Darstellung der Endergebnisse der *Real-Time-PCR* ergebene Muster der Regulationskinetik zeigt bei lebenden Borrelien ein Maximum der Expression



nach 12 Stunden mit anschließendem Abfall und bei toten Borrelien ein Maximum der Expression erst nach 24 Stunden.

Gen- Abkürzung	6 h p.i. Leb. B.	12 h p.i. Leb. B.	24 h p.i. Leb. B.	6 h-24 h p.i. NK HUVEC
IEX-1L	0	0	0	0
CD4	0	0	0	0
MIP-2 alpha	++	+++	+	0
ICAM-1	+	+++	+	0

**Tabelle 16:** Semiquantitative Darstellung der Ergebnisse des Vergleichs der Expression ausgewählter Gene mittels *Real-Time-RT-PCR* von Endothelzellen infiziert mit lebenden *B. burgdorferi* sensu stricto versus nicht-infizierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion (p.i.). Die Faktoren der Genregulation ergeben sich aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen mit Kennzeichnung durch + Faktor 2-3, ++ <5, +++ <10, ++++ <15

Gen- Abkürzung	6 h p.i. Tote B.	12 h p.i. Tote B.	24 h p.i. Tote B.	6 h-24 h p.i. NK HUVEC
IEX-1L	0	0	0	0
CD4	0	0	0	0
MIP-2 alpha	+	+++	++++	0
ICAM-1	+	+	++++	0

**Tabelle 17:** Semiquantitative Darstellung der Ergebnisse des Vergleichs der Expression ausgewählter Gene mittels *Real-Time-RT-PCR* von Endothelzellen infiziert mit toten *B. burgdorferi* sensu stricto versus nicht-infizierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion (p.i.). Die Faktoren der Genregulation ergeben sich aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen mit Kennzeichnung durch + Faktor 2-3, ++ <5, +++ <10, ++++ <15

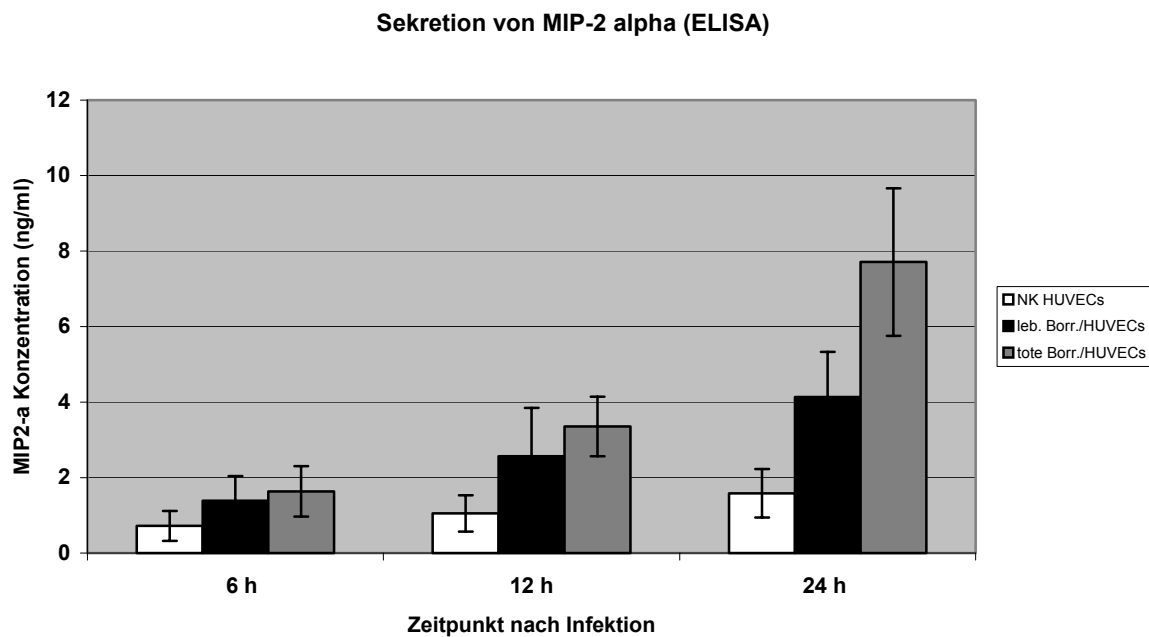
Für die beiden in der Regulation bestätigten Gene, ICAM-1 und MIP-2 alpha, wurde die Amplifikation des korrekten Fragments durch die konstruierten Primer mit Hilfe von Sequenzierungen (SeqLab, Göttingen) bewiesen.

### 3.3.2 Überprüfung der Ergebnisse mittels ELISA für MIP-2 alpha

Für den Zeitpunkt von 24 Stunden nach Infektion mit *B. burgdorferi* s. s. hatte sich bei den untersuchten Endothelzellen in den Analysen, sowohl durch cDNA-Array, als auch durch *Real-Time-RT-PCR* ein Anstieg der mRNA für das Zytokin MIP-2 alpha ergeben. Diese Hochregulation sollte auf Protein-Ebene mittels ELISA überprüft werden.

Für die Analyse wurden die bewahrten Überstände aus den vorherigen Infektionsansätzen zur Isolierung von RNA zur *Real-Time-PCR* verwendet. Somit konnten auch in dieser Analyse die zusätzlichen Zeitpunkte (6h, 12h und 24h) verglichen werden. Es konnte ein deutlicher

Anstieg der MIP-2 alpha Sekretion bei mit toten Borrelien infizierten Zellen gegenüber mit lebenden Borrelien infizierten und nicht-infizierten Endothelzellen gezeigt werden. Dieser Anstieg der Sekretion beginnt ca. 12 Stunden nach Infektion und erreicht sein Maximum nach 24 Stunden (Abbildung 13). Dieser Effekt ergab sich in den Proben zweier unabhängiger Experimente, wobei sich nur die erreichten Konzentrationsbereiche unterschieden (Daten s. Anhang 9.1.5).



**Abbildung 13:** Graphische Darstellung der Konzentrationsbestimmung von MIP-2 alpha auf Proteinebene mittels ELISA. Analysiert wurde der Überstand von Infektionsansätzen aus Endothelzellen mit lebenden oder toten Borrelien versus nicht-infizierter, Endothelzellen für verschiedene Zeitpunkte. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen von zwei unabhängigen Messungen.

### 3.3.3 Überprüfung mittels FACS-Analyse für ICAM-1 und CD4 Antigen

Die Ergebnisse des cDNA-Array und der *Real-Time*-RT-PCR hatten 24 Stunden nach Infektion von Endothelzellen mit *B. burgdorferi* eine Hochregulation für ICAM-1 ergeben. Diese Ergebnisse auf mRNA-Ebene sollten auf Protein-Ebene überprüft werden. Zusätzlich sollte auch für CD4 eine Überprüfung der Ergebnisse stattfinden, obwohl die bisherigen Daten der *Real-Time*-RT-PCR bereits die im cDNA-Array ermittelte Regulation wahrscheinlich nicht bestätigen konnten. Hierzu wurden FACS-Analysen mit entsprechenden Antikörpern durchgeführt.

#### 3.3.3.1 Vergleichende Messungen der Infektionsansätze

Es wurden die gleichen Infektionsbedingungen wie bei den vorhergehenden Untersuchungen im cDNA-Array geschaffen und die 3 verschiedenen Infektionsansätze (Zusatz von Lebenden oder toten Borrelien sowie keine Borrelien) parallel für 24 Stunden angesetzt und im folgenden analog behandelt. Für jeden dieser Infektionsansätze mussten jeweils 3 kleine Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>) mit einem Monolayer-Rasen von je  $1,5 \times 10^6$  HUVECs hergestellt werden, da im Verlauf des späteren Protokolls ( 2.11.3.1 ) durch eine schonende Zellablösung mit Cell-Dissoziation-Solution (CDS) ein großer Zellverlust auftrat. So wurde die erforderliche Gesamtzellzahl von mind.  $2-4 \times 10^6$  Zellen gewonnen, um für eine aussagekräftige FACS-Messung pro Antikörper je  $1,5 \times 10^5$  Zellen einsetzen zu können. Diese durch die schonende Ablösung in CDS statt des aggressiven Enzyms Trypsin in ihrer Oberfläche möglichst unversehrten Zellen dienten als Ausgangsmaterial für die Antikörpermarkierung.

Für den Nachweis und die Quantifizierung von Oberflächenmarkern auf den HUVEC Zellen wurden monoklonale mit Fluorophor-gekoppelte Antikörper zur spezifischen Färbung der Zellen verwendet. Um die unspezifische Bindung von Antikörpern an Oberflächenrezeptoren der Zellen zu messen, wurden jeweils Isotyp-Kontrollen mitgeführt. Zusätzlich wurden parallel verschiedene monoklonale Antikörper als Positiv- bzw. Negativkontrollen für humane Zellen mitgeführt, sodass insgesamt für jeden der drei Infektionsansätze je 9 verschiedene Antikörperansätze parallel hergestellt wurden, sowie drei weitere Doppelansätze (s. Tabelle 18) zur Einstellung des optimalen Messbereichs am FACS-Gerät.

1 <b>NK</b> (ohne AK)	2 <b>CD54</b> FITC IgG <sub>1</sub>	3 <b>CD31</b> PE IgG <sub>1</sub>	4 <b>CD4</b> PE IgG <sub>1</sub>	5 <b>HLA-ABC</b> PE IgG <sub>1</sub>	6 <b>CD3</b> FITC IgG <sub>1</sub>	7 <b>CD19</b> FITC IgG <sub>1</sub>	8 <b>Isotyp</b> <b>FITC</b> IgG <sub>1</sub>
10 NK (ohne AK)	11 CD54 FITC IgG <sub>1</sub>	12 CD31 PE IgG <sub>1</sub>					9 <b>Isotyp</b> <b>PE</b> IgG <sub>1</sub>

**Tabelle 18: Parallele Antikörpermarkierung der Endothelzellen aus Infektionsansätzen**

Es wurde bewusst darauf geachtet, dass nur Antikörper des IgG<sub>1</sub>-Typs verwendet wurden, zum einen um einheitlich nur Immunglobuline der gleichen Klasse zu benutzen und zum anderen diesen speziellen Isotyp, da dieser z.B im Vergleich mit IgG<sub>2a</sub> das niedrigste Hintergrundsignal nach der Färbung zeigt. Allerdings standen nicht für alle Testungen nur mit dem gleichen Fluorophor-gekoppelten Antikörper zur Verfügung, so dass ein Teil mit FITC- und ein Teil mit PE-(Phycoerythrin) gekoppelten Antikörper versetzt wurde. Durch die parallele Verwendung von beiden entsprechenden Kontrollen wurde diese Diskrepanz jedoch ausgeglichen.

Zur spezifischen Untersuchung der Proteinproduktion wurden die monoklonalen Antikörper CD54 (für ICAM-1) und CD4 (für CD4 Antigen) benutzt. Als Positivkontrollen dienten ein Marker der immunologischen MHC-I Klasse (auch ein *housekeeping*-Gen im cDNA-Array) der sich auf allen humanen Zellen befindet (HLA-ABC) und der Endothelmarker PECAM (CD31). Als zusätzliche Negativkontrollen außer der NK ohne Antikörper wurden zwei Antikörper mitgeführt, dessen Antigen in den zu untersuchenden Proben nicht vorhanden sein dürfte. Für das B-Lymphozyt CD19 Antigen (CD19) war im cDNA-Array auch eindeutig keine Regulation festzustellen gewesen.

Vor der Messung wurde FACS-Puffer mit Propidiumiodid den markierten Proben zugesetzt, da Propidiumiodid in tote Zellen eindringt und den Zellkern (DNA) anfärbt. Die so erfolgende Differenzierung der lebenden von abgestorbenen Zellen während der Messung im FACS-Calibur-System ermöglicht die ausschließliche spätere Verwendung der Daten von lebenden Zellen zur Auswertung, da tote Zellen oft einen hohen Anteil an unspezifischer Färbung aufweisen und so die Ergebnisse verfälschen könnten.

### 3.3.3.2 Ergebnisse der FACS-Analysen

Die Auswertung der FACS-Messungen erfolgte mit der CELLQuest™-Software durch Erstellung von korrelierten Zweiparameterdarstellungen (sogenannten Dot Plots) und Darstellungen der Häufigkeitsverteilungen in Form von Histogrammen, sowie die entsprechenden statistischen Daten dazu.

Es wurden jeweils drei unabhängige Infektionsexperimente und anschließende FACS-Messungen durchgeführt. In den Histogrammen wurden die für lebende Zellen gültigen Daten (aus Region 2) in der Auftragung der Zellzahl gegen die entsprechende Fluoreszenz FITC (FL1-Height) oder PE (FL2-Height) halblogarithmisch dargestellt. Exemplarisch werden jeweils die Daten einer Messung für alle drei Infektionsansätze gezeigt. Die Histogramme wurden zur statistischen Auswertung in 4 Markerregionen unterteilt, um die signifikanten Unterschiede in der spezifisch gefärbten Zellzahl zu verdeutlichen. Hierbei zeigen sich die entscheidenden Unterschiede meist am deutlichsten in den Markerregionen M3 und M4.

In der Statistik wurde sowohl der Prozentanteil aller spezifisch gefärbten lebenden Zellen bestimmt als auch der sogenannte Mean-Wert ermittelt. Der Mean-Wert entspricht der Verteilungsklasse, bei der 50% der Werte darüber und 50% darunter liegen. Er gibt eine gute Abschätzung des Signalwertes, da er von Ausreißern am wenigsten beeinflusst wird (Statistische Daten s. Anhang 9.2).

#### 3.3.3.2.1 Ergebnisse der FACS-Analysen zu ICAM-1

Es konnte bei den Untersuchungen in allen Ansätzen 24 Stunden nach Infektion das Oberflächenprotein ICAM-1 nachgewiesen werden. Im Vergleich der verschiedenen Infektionsansätze konnte ein Anstieg von ICAM-1 bei mit toten Borrelien infizierten gegenüber mit lebenden bzw. nicht-infizierten Endothelzellen gezeigt werden (siehe Abbildung 14).

Hierbei konnten 58% der mit toten Borrelien infizierten Zellen als spezifisch mit CD54 markiert ermittelt werden. Desweiteren liegt der Mean-Wert der Histogramme bei mit toten Borrelien infizierten Endothelzellen bei 699, während die der beiden anderen Ansätze weit darunter liegen. Dabei liegt trotz eines im Histogramm kaum sichtbaren Unterschiedes zwischen mit lebenden Borrelien infizierten Endothelzellen gegenüber nicht-infizierten Zellen der mean-Wert bei den lebenden Borrelien mit 366 etwas höher als der Wert von 255 der Negativkontrolle. Dies bestätigt die erhaltenen Ergebnisse des cDNA-Arrays und der *Real-Time*-RT-PCR, sowie eine vermutliche Herunterregulation durch lebende Borrelien.

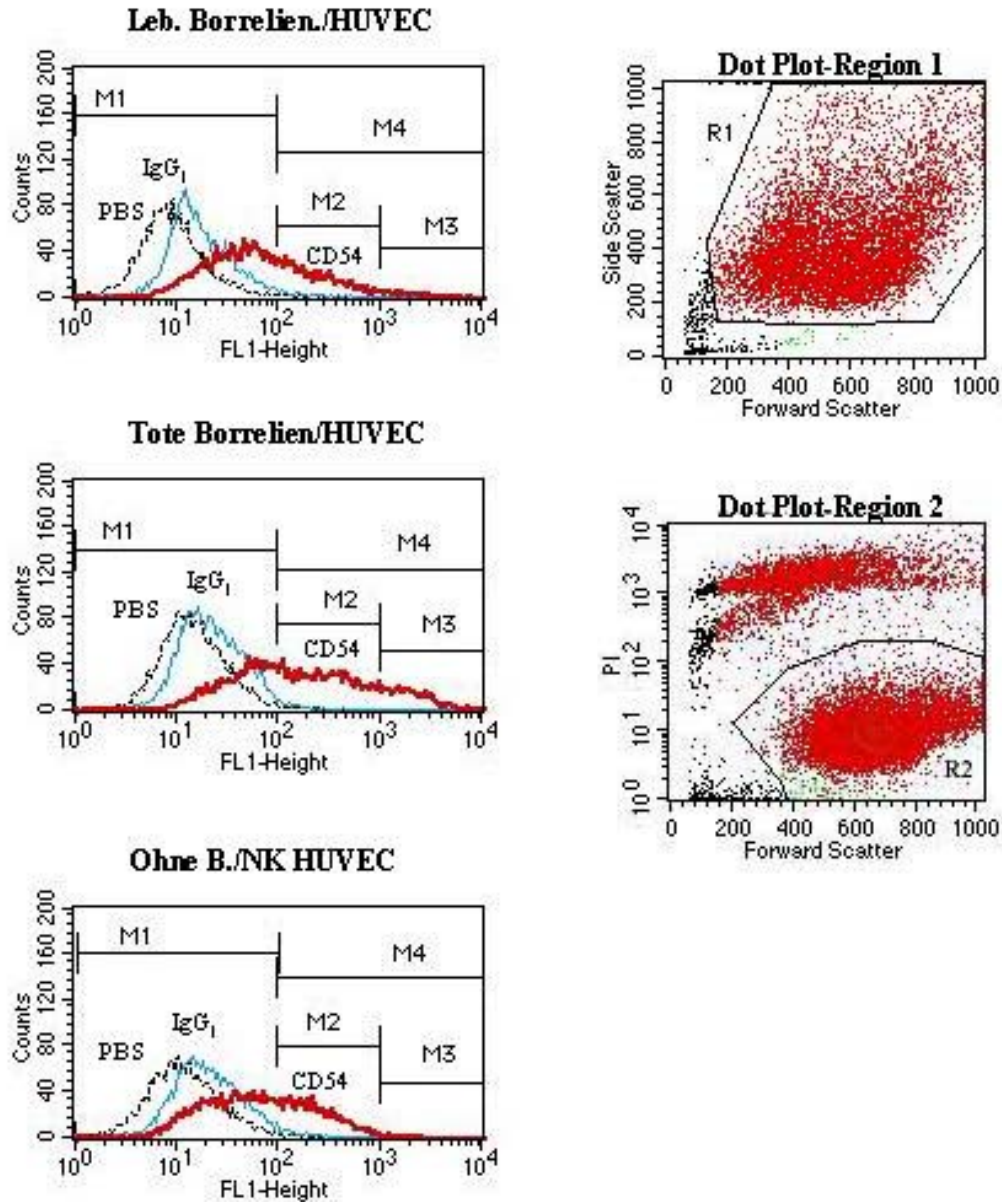
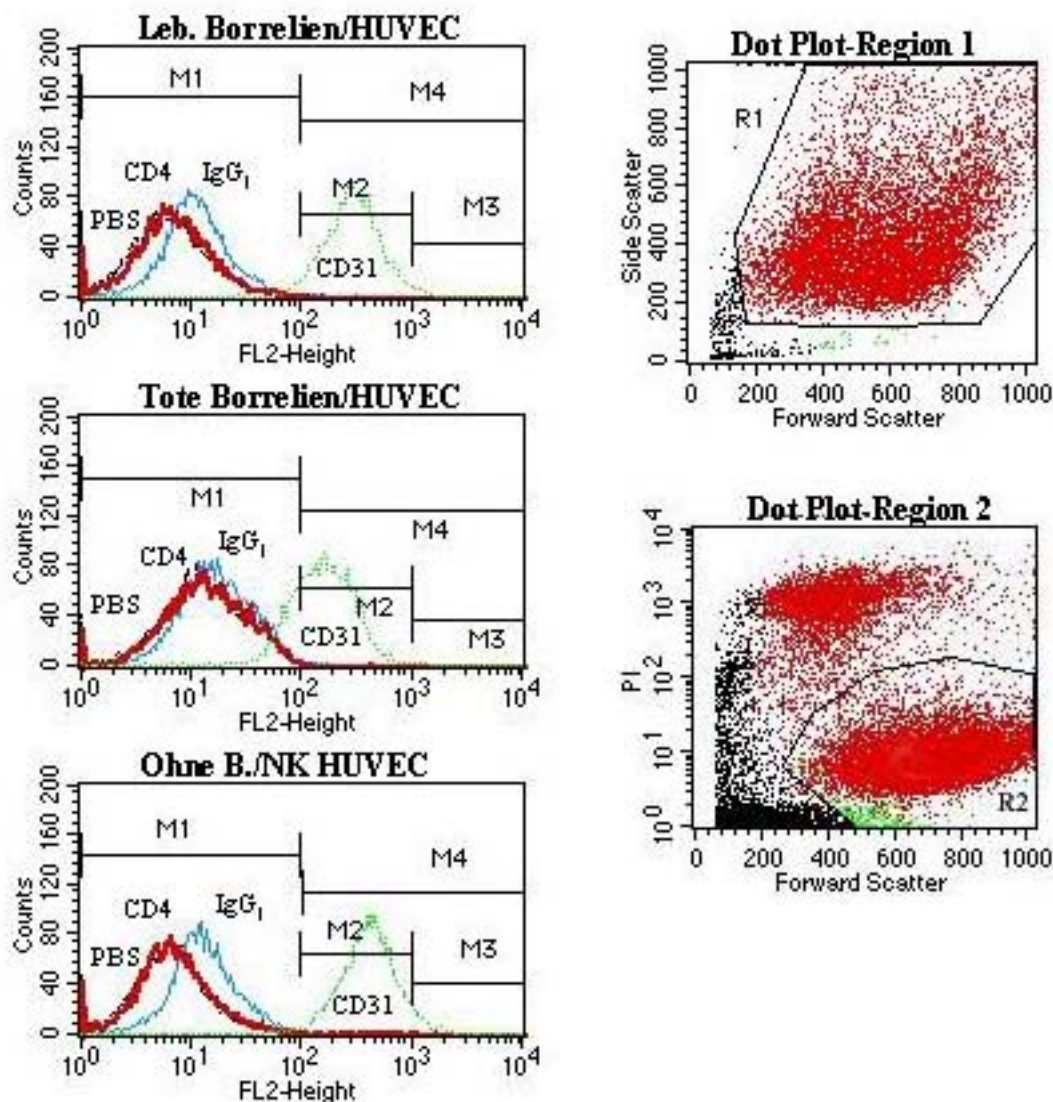


Abbildung 14: Exemplarische Darstellung der ICAM-1-Auswertung mit Histogrammen (Häufigkeitsverteilung) und Dot Plots (Zweiparameterdarstellung) zur FACS-Analyse von, mit lebenden bzw. toten Borrelien infizierten Endothelzellen im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen. Dot Plot-Region 1: Vorwärtsstreulichtdetektor gegen Seitwärtsstreulichtdetektor, zeigt alle gemessenen Zellen (R1); Dot Plot-Region 2: Vorwärtsstreulichtdetektor gegen Propidiumjodidfärbung (PI), differenziert tote von lebenden Zellen (R2). Die Auswertungen beziehen sich auf Daten lebender Zellen.

Zusätzlich zum *B. burgdorferi* Stamm N40 wurde in einem Experiment ein Ansatz mit lebenden *Borrelia afzelii* (Wendolino) parallel mitbehandelt und gemessen. Bei der statistischen Auswertung zeigte sich der Mean-Wert für *Borrelia afzelii* mit 237 deutlich geringer als der Mean-Wert von 366 des sonst verwendeten hochinfektiösen *B. burgdorferi* Stamm N40. Da der Unterschied im Histogramm nicht wesentlich erkennbar ist, wurden die Daten hier nicht gezeigt.

### 3.3.3.2.2 Ergebnisse der FACS-Analysen zum CD4-Antigen

Auch für CD4 bestätigten sich die vorherigen Ergebnisse, indem kein CD4 Antigen auf den infizierten Zellen nachzuweisen war. Im Histogramm (Abbildung 15) ist bereits eindeutig erkennbar, dass die mit CD4 markierte Probe im gleichen Bereich der Negativkontrollen (PBS und Isotyp) liegt und somit kein spezifischer Nachweis vorliegt. Zur Verdeutlichung wurde als Positivkontrolle der Endothelmarker PECAM (CD31) zusätzlich im Histogramm aufgetragen, der im Vergleich zu CD4 einen deutlichen Shift in der Probe gegenüber den Negativkontrollen zeigt.



**Abbildung 15:** Exemplarische Darstellung der CD4-Auswertung mit Histogrammen und Dot Plots zur FACS-Analyse von mit lebenden bzw. toten Borrelien infizierten Endothelzellen im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen. Zusätzlich wurde als Positivkontrolle der Endothelmarker PECAM (CD31) in den Histogrammen aufgetragen. Dot Plot-Region 1: Vorwärtsstreulichtdetektor gegen Seitwärtsstreulichtdetektor, zeigt alle gemessenen Zellen (R1); Dot Plot-Region 2: Vorwärtsstreulichtdetektor gegen Propidiumjodiddetektor, differenziert tote von lebenden Zellen (R2). Die Auswertungen beziehen sich auf Daten lebender Zellen.

Als Überblick zu den erhaltenen Untersuchungsergebnissen zur Borrelien-induzierten Wirtszell-Genexpression nach 24stündiger Infektion kann zusammen gefasst werden, dass von den im cDNA-Array ermittelten 14 Genen, als reproduzierbar und deutlich reguliert 10 Gene bestimmt werden konnten. Diese konnten in drei Regulationsgruppen eingeteilt werden, wobei zwischen spezifisch durch lebende Borrelien hochreguliert, spezifisch durch lebende Borrelien herunterreguliert und komplex regulierte (d.h. Regulation bei lebenden und toten Borrelien bzw. indirekte Herunterregulation durch lebende Borrelien) unterschieden wurde. Diese ermittelten Gene gehören verschiedenen funktionellen Gruppen an, wie zum Beispiel die Gruppe der Wachstumsfaktoren und Zytokine, Apoptose assoziierte Proteine, Zellzyklusregulatoren sowie die Gruppe von Zelloberflächenantigenen und Adhäsionsproteinen, denen eine Reihe von ermittelten Genen angehört.

Für 4 dieser Gene konnte nach Konstruktion entsprechender Primer eine Überprüfung mittels *Real-Time-RT-PCR* durchgeführt und hierbei die 2 Gene MIP-2 alpha und ICAM-1 als deutlich reguliert bestätigt werden. Auf Proteinebene konnten die beiden Zelloberflächenantigene und Adhäsionsproteine ICAM-1 und CD4 mittels FACS-Analysen überprüft und eine vermehrte Produktion von ICAM-1 nachgewiesen werden. Durch ELISA-Messungen erfolgte eine Bestimmung von vermehrter Sekretion des Zytokines MIP-2 alpha.



## 4 Diskussion

Die Lyme Arthritis ist eine der häufigsten klinischen Manifestationen von chronischer Lyme-Borreliose und betrifft vor allem die großen Gelenke im Schulterbereich oder häufig auch das Knie. Bei ca. 50% der unbehandelten Patienten tritt oligoartikuläre Arthritis auf [90]. Generell ist die Erregerdichte bei Borreliose sehr gering im Vergleich zu anderen Erregern, und die Hauptzahl der Borrelien befindet sich im Gewebe und nicht im Blut. Wohl deshalb ist der Kulturnachweis aus Synovialflüssigkeit so wenig erfolgreich [91]. Trotz der geringen Erregerzahl konnte schließlich das Vorliegen von Borrelien in den befallenen Gelenken durch die sensitiveren PCR-Nachweise von *Borrelia burgdorferi*-DNA gezeigt werden [35, 92]. Dabei zeigte sich Borrelien-DNA in Synovialgewebe von mehr als 80% der unbehandelten Patienten mit Lyme Arthritis [92]. Aber auch nach antibiotischer Behandlung treten bei 10% der Patienten noch Symptome der Lyme Arthritis auf. In anderen Studien konnte keine Borrelien-DNA im Zusammenhang mit Antibiotika-resistenter Lyme-Arthritis nachgewiesen werden [93], was wohl den Stellenwert von *Borrelia burgdorferi* als paucibazillärem Erreger unterstreicht.

Zur Erklärung des chronischen Verlaufs insbesondere von Spätstadien der Borreliose – wie etwa der Lyme Arthritis - existieren im wesentlichen zwei Haupthypothesen: erstens intrazelluläre Erreger-Persistenz und zweitens infektionsinduzierte Immunpathologie. Obwohl *Borrelia burgdorferi* sensu lato eher den extrazellulären Erregern zuzuordnen ist, existieren zu der ersten Annahme einige Belege von intrazellulärem Borrelienvorkommen in mehreren Zelltypen, wie Endothelzellen [60], Fibroblasten [64], aber auch speziell für die gelenkspezifischen Synovialzellen [65, 94]. Die hieraus abgeleitete intrazelluläre Persistenz des Erregers auch *in vivo* würde einen Schutz vor den Angriffen des extrazellulären Immunsystems des Wirts bieten, der Erreger könnte aus dieser Nische aber jederzeit reaktiviert werden. Zudem ist auch die Konzentration von Antibiotika innerhalb der Wirtszellen zumeist geringer als extrazellulär. Weitere Daten zu diesem möglichen Pathomechanismus gibt es aber bisher nicht, unklar ist zum Beispiel, ob es sich hierbei wirklich um einen aktiven Eindringprozess der Erreger oder nur um ein passives „Zurückweichen“ handelt.

Zur zweiten Theorie von infektionsinduzierter Immunpathologie gibt es ebenfalls eine Reihe von Anhaltspunkten. So gilt *Borrelia burgdorferi* als potenter Induktor zur Expression von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen in Endothelzellen und Fibroblasten [74]. Auch zeigt

die große Variation von Oberflächenantigenen auf *Borrelia burgdorferi* [14] die mögliche Fähigkeit des Erregers, durch den Wechsel in der Antigenexpression den Zellen des Wirtsimmunsystems zu entgehen [95]. Umstritten ist aber auch diese Interpretation, da gerade die Oberflächenantigene von Borrelien eine starke Immunantwort hervorrufen. So werden Lipoproteine von *Borrelia burgdorferi* als inflammatorische Auslöser angesehen und die Beteiligung von Toll-like-Rezeptoren wie TLR-2 und TLR-6 diskutiert [96, 97]. Als immunrelevante Zellen wurden Neutrophile nachgewiesen, nicht nur bei Erythema migrans, sondern auch in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Lyme Arthritis [91]. Trotzdem wird als weiterer Ansatzpunkt zur Immunpathologie eine Beeinflussung der T-Helfer-Zell Antwort vermutet, da im Gegensatz zu Borrelien-befallenen Gelenken andere Gewebe, wie Nervensystem, Haut und Milz, nur minimale Entzündungsreaktionen aufweisen [73].

In der vorliegenden Arbeit wurden durch Borrelien hervorgerufene Genregulationen in eukaryoten Zellen untersucht und zwar unter experimentellen Bedingungen, die zu einer intrazellulären Lokalisation des Erregers führen können. Im folgenden soll zunächst die biologische Wertigkeit der gefundenen Genregulationen diskutiert werden. Anschließend werden noch einige methodische Aspekte genauer analysiert.

#### **4.1 Biologische Wertigkeit der ermittelten Borrelien-induzierten Genregulationen**

Von den zunächst auf breiter Ebene mittels cDNA-Array erhaltenen Hinweisen auf eine Reihe regulierter Gene konnte nach Überprüfung einiger Gene durch unabhängige Methoden für zwei der Gene eine Bestätigung erbracht werden. So wurden sowohl auf mRNA-Ebene durch Real-time-RT-PCR, als auch auf Proteinebene durch ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) und FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) die Regulationen für das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) und das Makrophagen inflammatorische Protein (MIP-2a) bestätigt.

Diese beiden für die Immunabwehr bedeutungsvollen Proteine zeigten sich in ihrer Genregulation als komplex reguliert. Dies wurde deutlich an den Regulationsunterschieden beim Vergleich von humanen Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC), die mit lebenden oder hitzeinaktivierten Borrelien infiziert wurden: So war bei der Analyse von mRNA der Endothelzellen nach 24-stündiger Infektion mittels Real-time-RT-PCR die Expression dieser Gene unter Einfluss von toten Borrelien sehr viel stärker als unter Einfluss von lebenden

Borrelien. Vor allem für MIP-2a zeigte sich eine deutliche zeitabhängige Regulation bei den drei analysierten Zeitpunkten 6, 12 und 24 h *post infectionem*. So erfolgte unter dem Einfluss von hitzeinaktivierten Borrelien ein kontinuierlicher Anstieg innerhalb des Beobachtungszeitraums von 24 h. Im Gegensatz dazu war bei Infektion mit lebenden Borrelien nach einem Maximum schon bei 12 h eine stark verminderte Genexpression nach 24-stündiger Infektion festzustellen. Das 12 h-Maximum bei lebenden Borrelien wies dabei deutlich geringere Werte der Regulationsfaktoren auf als das 24 h-Maximum bei hitzeinaktivierten Borrelien, während die mitgeführten Negativkontrollen bestehend aus nicht-infizierten HUVEC bei der Real-time-RT-PCR keine Veränderungen in der Genexpression zeigten (s. Ergebnisse Abb.8). Diese komplexe Regulation von MIP-2a und ICAM-1 zeigt eine relative Herunterregulation durch lebende Borrelien, was im Hinblick auf ihre funktionellen Eigenschaften auch biologisch sinnvoll erscheint (s.u.).

Beide Proteine sind beteiligt an Prozessen zur Immunabwehr von Säugerwirten. So gehört MIP-2a zu der großen Zytokin-Familie der Chemokine, welche aufgrund ihrer biochemischen Struktur in vier große Unterklassen eingeteilt werden. Neben der Unterklasse der CXC-Chemokine, zu der auch MIP-2a gehört, werden unter anderem noch CC- und C-Chemokine unterschieden. Die Gene für CXC-Chemokine liegen auf dem humanen Chromosom 4q und die Gene der CC-Chemokine auf dem humanen Chromosom 17q. Alle Chemokine besitzen ähnliche Aminosäuresequenzen, sind kleine Polypeptide (Mw = 8-10 kD) und fungieren hauptsächlich als chemische Lockstoffe für phagozytierende Zellen, indem sie Leukozyten aus dem Blut zu den Infektionsherden locken. Sie werden nicht nur von Phagozyten, sondern auch von anderen Zellen gebildet, wie z.B. Endothelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten. Die CXC-Chemokine, zu deren bekanntesten Vertretern auch Interleukin-8 (IL-8) gehört, fördern im allgemeinen die Wanderung von Neutrophilen, im Gegensatz zu den CC-Chemokinen, die eher die Monozytenwanderung unterstützen. Das Chemokin MIP-2a trägt alternativ auch eine Reihe anderer Bezeichnungen, wobei MIP-2 alpha, MIP-2, GRO-b oder GRO-2 die heute gebräuchlichsten sind. Es ist ein potenter chemotaktischer Mediator für humane Phagozyten [98].

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass humane Endothelzellen bei Kontakt mit hitzeinaktivierten Borrelien vermehrt MIP-2a produzieren. Dies stellt eine sinnvolle Strategie der Wirtszellen dar, um Abwehrzellen des Immunsystems in kontaminiertes Gebiet zu locken. Dieser Effekt ist somit als Teil einer unspezifischen Entzündungsreaktion einzustufen, etwa als Reaktion auf Oberflächenantigene von Borrelien. Die Antigenität dieser Glykoproteine ist

auch nach erfolgter Inaktivierung von Borrelien für 20 min bei 56°C noch weitgehend vorhanden, was die Reaktion auf hitzeinaktivierte Borrelien erklärt.

Bei Infektion mit lebenden Borrelien zeigten die Ergebnisse nach spätestens 24 Stunden eine Gegenregulation zur MIP-2a-Produktion und somit eine Unterdrückung der geschilderten Immunantwort.

Das zweite komplex regulierte Gen, ICAM-1, ist ein bewegliches Oberflächenprotein (90 kD) aus der strukturell mit den Immunglobulinen verwandten Familie der interzellulären Adhäsionsmoleküle (ICAMs). Alle fünf Mitglieder dieser Familie (ICAM-1 bis ICAM-5) sind Liganden für LFA-1 (Lymphozytenfunktion assoziiertes Antigen-1). Es existieren vier strukturelle Hauptklassen von Adhäsionsmolekülen [99, 100]. Abhängig vom vorliegenden Zelltyp (Endothelzellen, Lymphozyten, Monozyten) hat ICAM-1 eine Reihe biologischer Funktionen: bei Zell-Zell-Kontakten während Antigenpräsentation, bei mikrobieller Pathogenese und bei Signaltransduktion. Ebenso wurde die Aktivierung spezifischer Kinasen durch Phosphorylierung dokumentiert, sowie daraus resultierende Transkriptionsfaktoraktivierung, verstärkte Zytokinproduktion und Zellmembranprotein-Expression [101, 102].

Interessanterweise steht ICAM-1 ebenfalls in Zusammenhang mit der Immunabwehr des Säugerwirts. Ebenso wie die Chemokine ist auch dieses Adhäsionsmolekül an der Wanderung von Leukozyten aus dem Blutgefäß in das interstitielle Gewebe beteiligt [103, 104]. Dieser Durchtritt von Leukozyten durch Gefäßwände ist komplex reguliert und lässt sich in mehrere Teilschritte unterteilen. Im ersten Schritt der auch als „rolling cycle“ bezeichnet wird, „rollen“ die Leukozyten aufgrund einer schwachen chemischen Bindung von Selektin auf den Endothelzellen mit bestimmten Glykoproteinen (Mucin) der Leukozyten die Blutgefäßwände entlang. Bei Kontakt von Chemokinrezeptoren der Leukozyten mit den auf Oberflächenstrukturen der Endothelzellen präsentierten entsprechenden Chemokinen erfolgt als zweiter Schritt eine Aktivierung der Leukozyten durch Hochregulation von Integrinen [102]. Erst diese Konformationsänderung der Beta-2-Integrine LFA-1 (CD11a:CD18) und Mac-1 (CD11b:CD18) ermöglicht eine stärkere Bindung an das Adhäsionsmolekül ICAM-1 und somit den dritten Schritt: die feste Adhärenz der Leukozyten an das Endothel. Die Beendigung der Rollbewegung durch diese feste Anheftung bildet schließlich die Voraussetzung für die Leukozyten zur Durchquerung der Blutgefäßwand, welche auch als Diapedese oder Extravasation bezeichnet wird. Bei diesem Durchdrängen der Leukozyten zwischen den Endothelzellen sind weitere adhäsive Wechselwirkungen zwischen den Leukozytenintegrinen beteiligt, jedoch nun mit einem anderen Immunglobulin ähnlichen

Molekül, dem PECAM (CD31). Letztendlich ermöglichen diese Vorgänge den Vorstoß von Phagozyten zu den Infektionsorten im Gewebe. Hierbei orientieren sie sich an einem aufgebauten Chemokingradient innerhalb der Gewebematrix [102].

Normalerweise ist ICAM-1 auf Endothelzellen nur gering exprimiert, kann jedoch durch LPS, bakterielle Lipoproteine oder Zytokine hochreguliert werden [101, 105].

Die in der vorgelegten Arbeit ermittelten Ergebnisse zeigen hiermit übereinstimmend, dass humane Endothelzellen beim Kontakt mit hitzeinaktivierten Borrelien vermehrt ICAM-1 produzieren. Dies stellt eine natürliche Strategie der Wirtszellen dar, um Abwehrzellen des Immunsystems den Eintritt in kontaminiertes Gewebe zu ermöglichen. Ebenso wie bei MIP-2a ist dieser Effekt also als Teil einer unspezifischen Entzündungsreaktion einzuordnen. Im Gegensatz zu hitzeinaktivierten zeigten lebende Borrelien nach 24 Stunden - ebenso wie bei MIP-2a - eine Gegenregulation zur Produktion von ICAM-1.

Diese Herunterregulation von ICAM-1 und MIP-2a in infizierten Zellen ist aus Sicht des bakteriellen Erregers biologisch sinnvoll: Sowohl die chemotaktische Anlockung von Leukozyten durch MIP-2a als auch die durch ICAM-1 vermittelte Adhäsion von Leukozyten mit ggf. nachfolgendem Durchtritt ins infizierte Gewebe wird negativ beeinflusst. So würden durch intrazelluläre Borrelien befallene Wirtszellen keine Signale an Zellen des Immunsystems senden<sup>1</sup>. Die Vermeidung der Erkennung befallener Zellen durch das Wirtsimmunsystem lenkt die unspezifische Entzündungsreaktion auf unbefallene Zellen der Umgebung und verhindert die Eliminierung des intrazellulären Erregers. Diese Ergebnisse legen also eine wichtige pathogenetische Rolle der intrazellulären Lokalisation für die Ausbildung einer chronisch-persistierenden Infektion nahe.

Diese Interpretation nimmt an, dass die gefundenen Regulationen durch intrazellulär vorliegende Borrelien verursacht werden. Natürlich kann aufgrund des experimentellen Designs nicht sicher zwischen extrazellulären und intrazellulären Bakterien unterschieden werden. Immerhin konnte in der vorliegenden Arbeit durch Immunfluoreszenz-doppelfärbungen (FITC/TRITC) gezeigt werden, dass unter den gegebenen experimentellen Bedingungen Borrelien intrazellulär lokalisiert zu sein scheinen. Aufgrund der komplexen Beurteilung der Differenzierung von intra- und extrazellulären Borrelien, basierend auf Parametern der Färbung sowie Form und Struktur der Erreger im direkten Vergleich zweier Wellenlängenbereiche für FITC oder TRITC, wäre ein zusätzliche Absicherung des Färbungsnachweis durch eine andere Methode sinnvoll. Denkbar wäre hier der Einsatz der

---

<sup>1</sup> Zumindest keine Signale die durch diese beiden Gene induziert werden, denn für andere Regulatoren kann hier keine Aussage getroffen werden, da sie nicht untersucht wurden.

konfokalen Mikroskopie, um durch Einblicke in definierte Zellschichten die eindeutige Position der Erreger zu dokumentieren. Im Hinblick auf die dargelegten unterschiedlichen Genregulationen der humanen Endothelzellen nach Behandlung mit hitzeinaktivierten oder lebenden Borrelien liegt jedoch eine spezifische Regulation durch intrazelluläre Borrelien nahe. Neben den schon genannten Hinweisen (Chronizität der Erkrankung mit Rezidivneigung, notwendige langandauernde Antibiotikatherapie - auch wenn diese schon aufgrund der langen Generationszeit von Borrelien geboten scheint -, gute Wirksamkeit intrazellulär wirkender Antibiotika) zeigen auch die scheinbar diskrepanten *in vivo*-Befunde (s.u.), dass unter *in vitro*-Bedingungen, in denen ein hoher Prozentsatz der Zellen befallen ist, andere Regulationen gefunden werden als unter paucibazillären *in vivo*-Bedingungen.

Die Expression von Adhäsionsmolekülen ist auch *in vivo* mit Lyme-Arthritis assoziiert. So konnte in der Synovia von Patienten mit Antibiotika-resistenter Lyme-Arthritis mittels immunohistochemischer Methoden die starke Expression von ICAM-1 und seinem Ligand LFA-1 nachgewiesen werden [75]. Der vermehrte Nachweis von ICAM-1 auf Proteinebene im Gelenk von Lyme-Arthritis Patienten ist nicht verwunderlich, aufgrund der geringen Erregerdichte in befallenen Bereichen. Das hieraus resultierende Vorliegen nur weniger intrazellulär befallener Zellen gegenüber einer Mehrzahl nicht-befallener Zellen erklärt die erhöhte ICAM-1 Expression durch Produktion von nicht-befallenen Zellen. Ein intrazellulärer Befall von wenigen Zellen mit abweichender Genexpression wäre nicht wirklich messbar. So erscheint auch *in vivo* die Persistenz des Erregers in einzelnen Zellen möglich trotz nachgewiesener starker Entzündungsreaktion durch eine generelle Immunantwort.

Die in der vorgelegten Arbeit ermittelten Ergebnisse zu ICAM-1 stimmen mit einer anderen *in vitro* Studie für humane Synovialzellen überein, bei der durch FACS-Messungen bis zu 5 Tage nach Infektion mit *B. burgdorferi* ebenfalls eine signifikante Herunterregulation von ICAM-1 nachgewiesen wurde [80]. Da Synovialzellen die Funktion von lokalen immunologischen Effektorzellen beeinflussen können und eine Schlüsselrolle in der Ausbildung einer Arthritis spielen, könnte dies ebenfalls einen Hinweis auf den Persistenzmechanismus geben. Die biologische Rolle dieser Herunterregulation konnte mittels eines *in vitro* Adhäsionsassays mit mononuklearen Zellen aus peripherem Blut gezeigt werden, indem sich nach Infektion mit *Borrelia burgdorferi* eine signifikant geringere Anzahl von immunologischen Zellen an die Synovialzellschicht anlagerte [80].

Zu den in dieser Arbeit verwendeten Nabelschnur-Endothelzellen existiert eine Veröffentlichung, die eine vermehrte Expression von ICAM-1 auf Proteinebene nach Borrelieninfektion zeigt [78]. Eine Herunterregulation von ICAM-1 wurde hier nicht erwähnt,

da dies nur auf mRNA-Ebene und nicht auf Proteinebene deutlich zu sehen ist, jedoch wird eine maximale Expression nach 12 Stunden und nur geringer Reduzierung nach 24 Stunden sichtbar. Dies stimmt überein mit den Ergebnissen der FACS-Analysen unserer Arbeit, wobei gegenüber unbehandelten Zellen eine vermehrte Expression nachweisbar war, sowohl in Zellen, die mit lebenden als auch mit hitzeinaktivierten Borrelien behandelt worden waren. Der hier gemessene geringe Unterschied nach 24 Stunden zwischen diesen beiden Behandlungsansätzen erklärt sich durch die vorherige Ansammlung des Proteins auf der Zelloberfläche. Lebende Borrelien stoppen nur die weitere Zunahme. Dagegen können die Analysen auf mRNA-Ebene mittels *Real-time*-RT-PCR eine deutliche Herunterregulation des Gens durch lebende Borrelien zeigen. So stellt dies an sich keinen Widerspruch dar, dass zunächst eine verstärkte Expression von ICAM-1 durch die Oberflächenproteine der Borrelien ausgelöst werden kann und möglicherweise erst nach ca. 24 Stunden durch direkten Einfluss auf einzelne Wirtszellen, oder durch nun eventuell intrazelluläre Erreger, eine entgegengesetzte Regulation zustande kommt. Die Ausbildung dieses Suppressionseffekts erst nach 24 Stunden wäre nicht ungewöhnlich, da die Internalisierung und intrazelluläre Genproduktion Zeit braucht.

In dieser Studie wurde ebenfalls ein direkter Vergleich von Borrelien-infizierten HUVECs mit HUVECs geführt, die nur mit hitzeinaktivierten Borrelien versetzt worden waren [78]. Die Autoren beschrieben eine starke ICAM-1 Expression in dem Ansatz, der mit lebenden Borrelien, dagegen keine Expression nach 12-stündiger Behandlung mit hitzeinaktivierten Borrelien; diese letzte Beobachtung steht in klarem Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. So wäre nach erst 12 Stunden *post infectionem* eine gleichstarke Expression nicht verwunderlich, da der Effekt hier erst nach 24h nachgewiesen wurde, aber eine geringere ICAM-1-Expression bei hitzeinaktivierten Borrelien lässt sich mit unseren Ergebnissen nicht vereinbaren. Obwohl dieses diskrepante Ergebnis zur Zeit nicht zu erklären ist, sollte darauf hingewiesen werden, dass in der oben zitierten Arbeit die dort gezeigten Nachweise nur auf Proteinebene geführt wurden, während sich die hier vorgelegten Nachweise sowohl auf mRNA-Ebene als auch Proteinebene stützen.

Bei mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC) konnte in einer weiteren Studie auch auf mRNA-Ebene eine vermehrte Expression von ICAM-1 unter Einfluss des OspA-Oberflächenproteins von Borrelien gezeigt werden [74]. Die dort zugrunde liegenden *in vitro* Experimente wurden jedoch nach kürzeren Infektionszeiten (4 h statt 24 h) als in der vorliegenden Arbeit analysiert, also einen zu frühen Zeitpunkt für eine sichtbare Herunterregulation.

Die zweite ermittelte Regulation der vorliegenden Arbeit betrifft das Gen MIP-2a und zeigte ebenfalls seine relative Herunterregulation nach 24 Stunden Infektion mit lebenden *Borrelia burgdorferi*. Es existieren bis zum jetzigen Zeitpunkt keine Veröffentlichungen, die eine Verbindung von MIP-2a Expression mit Borrelien zeigen. Lediglich für andere Zytokine, die allerdings teilweise der gleichen Chemokin-Familie (CXC) wie MIP-2 alpha angehören, beispielsweise Interleukin-8 (IL-8) wurde ein Zusammenhang mit *Borrelia burgdorferi* dargestellt. So konnte die Induktion von IL-8 durch *B. burgdorferi* bei Untersuchungen zur Genexpression verschiedener Chemokine in humanen Endothelzellen nachgewiesen werden [77], wobei eine zentrale Rolle von Chemokinen in der Regulation von Borrelien-induzierten inflammatorischen Antworten vermutet wird. Als Verbindung zur Pathologie der Lyme-Borreliose konnten in einer anderen Studie in Proben von Patienten mit Erythema migrans ebenfalls Chemokine der CXC-Familie (IL-8) und der CC-Familie (MIP-1a, MIP-1b) nachgewiesen werden.

Zur Zeit sind keine Veröffentlichungen zu Micro-Array-Analysen von Borrelien-infizierten Zellen bekannt. Vorhandene Array-Studien in Bezug auf Borrelien befassen sich mit Genregulationen, die im Erreger selbst stattfinden [50, 51]. Zur weiteren Beurteilung der im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Genregulationen werden deshalb Vergleiche mit Infektionen durch andere bakterielle Erreger herangezogen. Hierbei ist von Interesse, welche Gemeinsamkeiten oder Unterschiede zwischen den ausgelösten Regulationen der Genexpression durch die hier untersuchten Borrelien bestehen im Vergleich zu den durch andere Bakterien hervorgerufenen Wirtszellveränderungen.

Aufgrund der Fülle der insgesamt veröffentlichten Gene wird hier nur ein kleiner Ausschnitt der in dieser Arbeit auch bestätigten Regulationen zur scheinbaren Beeinflussung der Immunabwehr betrachtet. Vor allem wäre interessant, ob die gefundenen Herunterregulationen von ICAM-1 und MIP-2a zu allgemeinen Infektionsreaktionen der Zelle zählen oder ob es sich um Borrelien-spezifische Prozesse handelt. Ein Vergleich mit veröffentlichten Micro-Array-Studien zur Bestimmung von Wirtszell-Antworten auf unterschiedliche Bakterien ist in folgender (Tabelle 19) dargestellt.



Bakterieller Erreger	Infizierter Zelltyp	Infektionszeit	Übereinstimmung regulierter Gene	Literaturverweis
<i>Chlamydia trachomatis</i>	HeLa-Zellen	24 h p.i.	ICAM-1, MIP-2a,	[106]
<i>Salmonella dublin</i>	humane kolorektale Epithelzellen HT-29	3 h p.i.	MIP-2a	[107]
<i>Bordetella pertussis</i>	humane broncho-epitheliale Zelllinie BEAS-2B	3 h p.i.	ICAM-1, MIP-2a,	[108]
<i>Escherichia coli</i> (UPEC, uropathogen)	Zellen der Mausblase	3,5 h p.i.	MIP-2a	[109]
<i>Listeria monocytogenes</i>	humane promyelotische Zelllinie THP1	2 h p.i.	ICAM-1, MIP-2a,	[110]

**Tabelle 19: Auszüge einiger veröffentlichten Micro-Array-Studien mit anderen Bakterien infizierten Wirtszellen.**

Es wurden hier verschiedene Arraysysteme (Clontech, Affymetrix), andere Versuchsbedingungen (Zelltypen, Infektionszeiten) zusammengefasst, jedoch sind alle Ergebnisse mittels *Real-time*-RT-PCR sowie auf Proteinebene bestätigt worden.

Beispielhaft sind hier sowohl gramnegative Bakterien, wie *Escherichia coli*, *Salmonella dublin* und *Bordetella pertussis*, als auch grampositive Bakterien aufgeführt, wie *Listeria monocytogenes* und zusätzlich *Chlamydia trachomatis*. Als intrazelluläre Erreger gelten hiervon *Chlamydia trachomatis*, *Salmonella dublin* und *Listeria monocytogenes*.

Bei allen hier vorgestellten Erregern wurde eine Hochregulation von MIP-2a gezeigt, meist zusammen mit ICAM-1. Hierbei zeigt sich kein Unterschied zwischen intrazellulären und extrazellulären Erregern. Die bei Borrelien im Gegensatz zu den anderen Erregern festgestellte relative Herunterregulation dieser beiden Gene legt also eine Borrelien-spezifische Regulation nahe.

Die ermittelten Genregulationen innerhalb dieser Arbeit, beziehen sich alle auf *in vitro* Experimente. Obwohl hier versucht wurde, durch Verwendung von primären venösen Zellen (HUVEC) statt immortalen Zelllinien sowie des Einsatzes niedrigpassagiger infektiöser Borrelien direkt aus dem Wirt ein möglichst *in vivo*-nahes Infektionsmodell zu erstellen, können die erhaltenen Ergebnisse nur eine Aussage über Regulationen außerhalb des Wirtes treffen. Das Zusammenwirken von verschiedenen Zelltypen und die Interaktion mit Immunmodulatoren des Wirts-Immunsystems ist ein entscheidender Unterschied zwischen *in*

*vitro* und *in vivo* Bedingungen einer Infektion mit *Borrelia burgdorferi*. Vor allem diese Einflüsse von Immunzellen sind im vorliegenden Infektionsmodell nicht berücksichtigt und sollten für umfassendere Aussagen in einem neukonstruierten System integriert werden. Eine aufwendige Möglichkeit wäre die Analyse von Zellen, die innerhalb sogenannter Dialyse-Membrankammern (DMCs) in infizierten Versuchstieren (wie z.B. Ratten) den Einflüssen der Immunabwehr ausgesetzt waren.

## 4.2 Methodische Aspekte

Zur Beurteilung von Micro-Array-Ergebnissen sind unter anderem der Leistungsumfang, die Anwendung und die Art des verwendeten Arrays zu berücksichtigen. Die Anwendungen für Micro-Arrays konzentrieren sich momentan vor allem auf zwei Bereiche, die Expressionsanalyse und den Nachweis von DNA-Varianten, sei es die Suche nach Mutationen oder die Analyse des Genotyps. Der Hauptanteil zur Nutzung dieser Technologie entfällt zur Zeit noch auf den Bereich der Expressionsanalyse, wie auch in dieser Arbeit.

Allgemein ermöglichen es Micro-Arrays, eine breite vergleichende Expressionsanalyse von verschiedenen Zellpopulationen auf mRNA-Ebene durchzuführen. Dabei können beispielsweise durch bestimmte Reagenzien oder bakterielle bzw. virale Erreger stimulierte mit nicht-stimulierten Zellen verglichen werden. Die Anzahl der Gene, die gleichzeitig betrachtet werden kann, variiert zwischen verschiedenen Arraysystemen basierend auf dem verwendeten Trägermaterial, zwischen Hunderten (z.B. Clontech/BD Atlas Human Cell Cycle mit 111) bis zu Tausenden (Affymetrix mit 12.000 bis 30.000) aufgetragenen Genpunkten. Eine ganze Reihe mittlerweile existierender Micro-Array-Produkte verschiedener Firmen mit vielen Variationen in Genanzahl, Probengenerierung und Trägermaterial funktionieren dennoch nach dem gleichen Grundprinzip.

Im allgemeinen werden Träger verwendet, auf denen DNA-Fragmente, die eindeutig die zu untersuchenden Gene repräsentieren, in definiertem Abstand aufgebracht sind. Die zu untersuchende mRNA wird meist in eine markierte cDNA, teilweise auch cRNA umgeschrieben und mit den Trägern hybridisiert. Die Intensität der markierten Proben auf dem Träger wird gemessen und der Intensität der Proben auf dem Vergleichs-Träger gegenübergestellt. Durch das Verhältnis der beiden Intensitäten zueinander kann bestimmt werden, ob ein Gen in einer Zellpopulation gegenüber der Kontrollpopulation vermehrt oder vermindert exprimiert wird.

Die Hauptunterschiede zwischen den einzelnen Array-Systemen bestehen in der Generierungsart der Proben und des Aufbaus der verwendeten Träger. Einige Variationen der Probengenerierung können sein: Umschreibung der mRNA mit spezifischen Primern, oligo(dT) oder random Hexamer-Primern, Umschreibung in cDNA oder erst cDNA, dann cRNA, Verwendung von gesamt RNA oder poly A<sup>+</sup> RNA sowie durch die Markierung der Proben durch Radioaktivität (<sup>32</sup>P oder <sup>33</sup>P) oder Fluoreszenz (häufig Phycoerythrin). Die verwendeten Träger unterscheiden sich im Material (Nylon, Glas oder Plastik), der Anzahl der Gene, Art der DNA-Fragmente als Oligonukleotide oder PCR- sowie cDNA-Fragmente und schließlich in der Art und Anzahl der Kontrollen auf den Trägern.

In dieser Arbeit wurden Micro-Arrays der Firma Clontech/BD (human 1.2 Atlas-Array) mit 1176 Genen eingesetzt, was nur einen Ausschnitt der zu betrachtenden Gene darstellt. Dieses Arraysystem wurde hier verwendet, da es zum Zeitpunkt der begonnenen Forschungsarbeiten (2000/2001) eine populäre, zukunftssträchtige Technologie darstellte, die in dieser Version für unsere Zwecke noch bezahlbar war. Heute existierende größere Chips, die mittlerweile auch bezahlbar sind, könnten ein noch vollständigeres Bild der vermittelten Genregulationen zeigen.

Die Gene des hier verwendeten humanen 1.2 Atlas-Array sind auf Nylon-Trägern durch 200-600 bp lange cDNA-Fragmente repräsentiert und werden mit spezifisch umgeschriebener, <sup>32</sup>P-markierter cDNA hybridisiert.

Die Problematik zur Beurteilung von Array-Analysen besteht in der großen Menge an Detaildaten, die in nur einem Arrayexperiment geliefert werden. Bedingt durch den Einzelexperiment-Charakter dieser Methode kann bei den Ergebnissen ein relativ hoher statistischer Fehler entstehen [111]. Zudem können systematische Fehler für die Regulationen einzelner Gene vorliegen. Die Beurteilung des statistischen Fehlers kann durch Vergleich mehrerer Micro-Array Experimente untereinander erfolgen, systematische Fehler lassen sich nur durch den Vergleich mit anderen Methoden aufdecken. Dabei ist zu berücksichtigen, dass bei biologischen Experimenten die Versuchsbedingungen nicht völlig konstant gehalten werden können. Bedingt durch die Verwendung primärer Zellen statt stabiler Zelllinien konnte beispielsweise auch in dieser vorliegenden Arbeit nicht für alle Experimente auf dieselben Zellfraktionen oder Zellen gleicher Passage zurückgegriffen werden. Obwohl natürlich versucht wurde, alle Versuchsparameter so konstant wie möglich zu halten, können kleine, unvermeidbare Unterschiede der Bedingungen zu einer leichten Verschiebung der Infektionskinetik und somit zu Verschiebungen in der Kinetik der Regulationsvorgänge führen.

Von Bedeutung bei der Bewertung der im Array ermittelten Regulationen der Genexpression ist auch der ermittelte Regulationsfaktor. Dabei ist die Festlegung nötig, ab welchem Faktor die aufgezeigten Regulationen mit hoher Wahrscheinlichkeit als signifikant aufzufassen und nicht mehr nur Ausdruck der statistischen Schwankung sind. Hierfür gibt es keine allgemein gültigen Richtlinien, als praktikabel erwies sich hier zur ersten Betrachtung eines Gens die Bestimmung eines unteren Grenzwertes von mindestens Faktor 2 für positive oder negative Regulationen.

Es wurden drei unabhängige Arrayexperimente durchgeführt und miteinander verglichen. Für die beiden letztendlich hier hauptsächlich betrachteten Gene, das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) und das Makrophagen inflammatorische Protein (MIP-2a) konnte in allen drei Experimenten eine Regulation bestätigt werden. Für eine Reihe weiterer Gene konnten nur Übereinstimmungen in zwei Experimenten festgestellt werden oder tauchten als vermutliche Artefakte nur einmal auf. Dieser Vergleich war schon deshalb wichtig, da der Clontech-Array eher anfällig für statistische Fehler ist. Dies ist vor allem durch seinen Aufbau bedingt, wobei jedes Gen nur durch ein cDNA-Stück repräsentiert wird. Im Vergleich dazu bietet der Affymetrix-Array schon eine höhere Sicherheit, da für jedes Gen mehr als 10 unterschiedliche Oligonukleotide auf den Chip aufgetragen werden.

Zur Beurteilung der Genregulationen jedes einzelnen Arrays für sich allein wurden ebenfalls mehrere Auswahlkriterien angesetzt, um möglichst nur aussichtsreiche Kandidaten zur Überprüfung der Regulationen mit unabhängigen Methoden zu erhalten. Hierbei wurden die jeweils drei Membranen jedes Arrayexperimentes miteinander verglichen und so Regulationen ausgeschlossen, die wahrscheinlich durch Hintergrund-Signale verfälscht wurden. Diese Überprüfung per Hand verhinderte künstlich produzierte Regulationsfaktoren aufgrund von Signalen im Bereich der Hintergrundsignale. Hierbei diente der Ansatz mit nicht-infizierten Zellen als Negativkontrolle zum Vergleich von infizierten Zellen mit lebenden oder hitzeinaktivierten Borrelien.

Häufig lassen sich nicht alle gefundenen Gene einer Array-Analyse bestätigen. Dies macht den Screening-Charakter als grobes Hinweistraster deutlich, sowie die nötige Überprüfung der Arrayergebnisse durch unabhängige, molekularbiologische Methoden offensichtlich [112].

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden mehrere unabhängige Überprüfungen mit *Real-Time-RT-PCRs* durchgeführt, um einerseits die in den Arrays ermittelten Ergebnisse mit einer zweiten unabhängigen Methode zu verifizieren und andererseits eine zeitabhängige Regulationskinetik durch das Hinzufügen von weiteren Analyse-Zeitpunkten zu erhalten.

Durch die Amplifikation des nachzuweisenden Gens ist diese Methode um einiges sensitiver als ein Micro-Array. So ist möglich, dass mit der *Real-Time*-RT-PCR schon Regulationen nachweisbar sind, die nahe der Nachweisgrenze des Arrays liegen. Allerdings können durch diese Überprüfung in der *Real-Time*-PCR auch mögliche falsch positive Ergebnisse aufgedeckt werden. Diese entstehen beim Micro-Array meist durch unvermeidbare Partikelanhaftungen, die trotz gründlichem Waschen der markierten Membranen bestehen bleiben und die Signale an einigen Punkten verfälschen können. Ebenso können Überstrahlungen von stark exprimierten Proben zur Beeinflussung der tatsächlichen Signalstärke benachbarter Probenpunkte führen.

Die Überprüfung von vier ausgesuchten Genen durch die *Real-Time*-RT-PCR ergab für die zwei Gene (ICAM-1 und MIP-2a) eine Bestätigung der Ergebnisse der drei Arrays. Für die beiden anderen überprüften Gene (IEX-1L, CD4) ergaben sich keine Regulationen: Es handelt sich damit um Artefakte! Dies macht wieder die Notwendigkeit einer unabhängigen Überprüfung von Array-Ergebnissen deutlich.

Im Vergleich hierzu zeigte sich die *Real-Time*-RT-PCR als zuverlässigere Methode, so konnten Wiederholungsexperimente der selben RNA stets eine Übereinstimmung erbringen. Unabhängige Wiederholungsexperimente mit anderer RNA aus neuen Infektionsansätzen erbrachten zwar teilweise eine Verschiebung der Zeitkinetik um einen Zeitpunkt, was allerdings mit den Unregelmäßigkeiten innerhalb biologischer Systeme erklärbar ist. Für alle Experimente der *Real-Time*-RT-PCR ergab sich dennoch eine Übereinstimmung in der Tendenz der Regulationskinetik.

Als weitere unabhängige Methode zur Bestätigung der durch den Einsatz von Micro-Arrays ermittelten Veränderungen der Genexpression wurden im Rahmen dieser Arbeit mehrere Untersuchungen für drei ausgesuchte Gene auf Proteinebene durchgeführt. Hierfür wurden zwei unterschiedliche Methoden eingesetzt, zum einen der ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) und zum anderen die FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting).

Für das Gen MIP-2a bzw. GRO-b (Makrophagen inflammatorisches Protein) konnte ein ELISA-Test durchgeführt werden. Hierzu wurde in Zellkulturüberständen von infizierten und nicht-infizierten Zellen der Gehalt an freigesetztem Chemokin gemessen. Dabei wurde eine weitere Besonderheit der Zytokine ausgenutzt, die direkte Korrelation zwischen Genregulation und Produkt (Ausnahme: TNF-alpha). Die erhaltenen Ergebnisse erbrachten

eine Bestätigung sowohl der veränderten Genexpression der Micro-Arrays als auch der Regulationskinetik der *Real-Time*-RT-PCR.

Für die im Micro-Array regulierten Gene ICAM-1 (interzelluläre Adhäsionsmolekül-1) und CD4 (T-Zellantigen 4) wurden FACS-Analysen zum Proteinnachweis durchgeführt. Die Erstellung einer Zeitkinetik durch Messung verschiedener Infektionszeitpunkte war hier nicht praktikabel, da dabei ohnehin eine große Menge lebender Zellen bearbeitet werden musste. Bei konstanter mRNA-Produktion und ohne Abbau des Proteinproduktes sammelt sich ICAM-1 auf der Endothelzelloberfläche an. Die Regulation dieses Vorgangs erfolgt entweder im Fließgleichgewicht oder durch negative Regulation, indem bei viel vorliegendem Protein die mRNA-Produktion gestoppt wird. Wie schnell das Produkt abgebaut wird, ist unbekannt und hätte zur Ermittlung einer Reihe von weiteren Zeitpunkten bedurft. Jedoch konnte für ICAM-1 eine Übereinstimmung der Regulation nach 24 Stunden Infektion mit *Borrelia burgdorferi* im Vergleich mit toten Borrelien-infizierten und nicht-infizierten Zellen gezeigt werden. Dies erbrachte somit eine Bestätigung der sowohl durch den Array als auch durch die *Real-Time*-PCR auf mRNA-Ebene ermittelten ICAM-1-Regulationen. Für CD4 konnte erwartungsgemäß (nach den Ergebnissen der *Real-Time*-PCR) kein Proteinnachweis erbracht werden.

## 5 Literatur

1. Steere, A. C., S. E. Malawista, D. R. Snyderman, R. E. Shope, W. A. Andiman, M. R. Ross, and F. M. Steele. 1977. Lyme Arthritis - Epidemic of Oligoarticular Arthritis in Children and Adults in 3 Connecticut Communities. *Arthritis and Rheumatism* 20:7-17.
2. Burgdorfer, W. 1982. Spirochete isolated in tick vectors of Lyme disease. *Hosp.Pract.(Off Ed)* 17:46, 54-46, 55.
3. Hayes, S. F., W. Burgdorfer, and A. G. Barbour. 1983. Bacteriophage in the Ixodes dammini spirochete, etiological agent of Lyme disease. *J.Bacteriol.* 154:1436-1439.
4. Steere, A. C., E. Taylor, M. L. Wilson, J. F. Levine, and A. Spielman. 1986. Longitudinal assessment of the clinical and epidemiological features of Lyme disease in a defined population. *J.Infect.Dis.* 154:295-300.
5. Zung, J. L., S. Lewengrub, M. A. Rudzinska, A. Spielman, S. R. Telford, and J. Piesman. 1989. Fine-Structural Evidence for the Penetration of the Lyme-Disease Spirochete Borrelia-Burgdorferi Through the Gut and Salivary Tissues of Ixodes-Dammini. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne de Zoologie* 67:1737-1748.
6. Kimsey, R. B. and A. Spielman. 1990. Motility of Lyme disease spirochetes in fluids as viscous as the extracellular matrix. *J.Infect.Dis.* 162:1205-1208.
7. Hovind-Hougen, K., E. Asbrink, G. Stiernstedt, A. C. Steere, and A. Hovmark. 1986. Ultrastructural differences among spirochetes isolated from patients with Lyme disease and related disorders, and from Ixodes ricinus. *Zentralbl.Bakteriol.Mikrobiol.Hyg.[A]* 263:103-111.
8. Adam, T., G. S. Gassmann, C. Rasiah, and U. B. Gobel. 1991. Phenotypic and genotypic analysis of Borrelia burgdorferi isolates from various sources. *Infect.Immun.* 59:2579-2585.
9. Wilske, B., U. Busch, V. Fingerle, S. Jauris-Heipke, M. Preac, V. D. Rössler, and G. Will. 1996. Immunological and molecular variability of OspA and OspC. Implications for Borrelia vaccine development. *Infection* 24:208-212.
10. Wilske, B., V. Preac-Mursic, U. B. Gobel, B. Graf, S. Jauris, E. Soutschek, E. Schwab, and G. Zumstein. 1993. An OspA serotyping system for Borrelia burgdorferi based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis. *J.Clin.Microbiol.* 31:340-350.
11. Wang, G., A. P. van Dam, A. Le Fleche, D. Postic, O. Peter, G. Baranton, R. de Boer, L. Spanjaard, and J. Dankert. 1997. Genetic and phenotypic analysis of Borrelia valaisiana sp. nov. (Borrelia genomic groups VS116 and M19). *Int.J.Syst.Bacteriol.* 47:926-932.

12. Lee, S. H., B. J. Kim, J. H. Kim, K. H. Park, S. J. Kim, and Y. H. Kook. 2000. Differentiation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato on the basis of RNA polymerase gene (rpoB) sequences. *J.Clin.Microbiol.* 38:2557-2562.
13. Wang, G., A. P. van Dam, and J. Dankert. 1999. Phenotypic and genetic characterization of a novel *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolate from a patient with Lyme borreliosis. *J.Clin.Microbiol.* 37:3025-3028.
14. Fraser, C. M., S. Casjens, W. M. Huang, G. G. Sutton, R. Clayton, R. Lathigra, O. White, K. A. Ketchum, R. Dodson, E. K. Hickey, M. Gwinn, B. Dougherty, J. F. Tomb, R. D. Fleischmann, D. Richardson, J. Peterson, A. R. Kerlavage, J. Quackenbush, S. Salzberg, M. Hanson, R. van Vugt, N. Palmer, M. D. Adams, J. Gocayne, J. C. Venter, and . 1997. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 390:580-586.
15. Theisen, M., M. Borre, M. J. Mathiesen, B. Mikkelsen, A. M. Lebech, and K. Hansen. 1995. Evolution of the *Borrelia burgdorferi* outer surface protein OspC. *J.Bacteriol.* 177:3036-3044.
16. Marti, R. N., D. Postic, M. Foretz, and G. Baranton. 1997. *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, a bacterial species "made in the U.S.A."? *Int.J.Syst.Bacteriol.* 47:1112-1117.
17. Liebsch, A. 1991. Biologie und Ökologie der Zecke. In *Einheimische Zeckenborreliose (Lyme-Krankheit) bei Mensch und Tier*. H. Horst, ed. Perimend-Fachbuch-Verlagsgesellschaft, Erlangen, pp. 31-47.
18. Walter, G. *Untersuchungen zur Ökologie und Biologie von Ixodes ricinus (Linnaeus 1758) und Ixodes trianguliceps (Birula 1895)(Ixodidea, Ixodidae) in Norddeutschland*. Hannover, Univ., Fachber. Biologie, Diss., Hannover.
19. Bauch, R. J. 1971. Zur Bionomie von *Ixodes ricinus*. I. Der Entwicklungszyklus im DDR-Bezirk Magdeburg. *Angew.Parasitol.* 12:144-149.
20. Wilske, B., R. Steinhuber, H. Bergmeister, V. Fingerle, G. Schierz, V. Preac-Mursic, E. Vanek, and B. Lorbeer. 1987. [Lyme borreliosis in South Germany. Epidemiologic data on the incidence of cases and on the epidemiology of ticks (*Ixodes ricinus*) carrying *Borrelia burgdorferi*]. *Dtsch.Med.Wochenschr.* 112:1730-1736.
21. Stanek, G., I. Burger, A. Hirschl, G. Wewalka, and A. Radda. 1986. *Borrelia* transfer by ticks during their life cycle. Studies on laboratory animals. *Zentralbl.Bakteriol.Mikrobiol.Hyg.[A]* 263:29-33.
22. Burgdorfer, W. 1989. *Borrelia burgdorferi*: its relationship to tick vectors. *Zbl.Bakt. Suppl.* 18, Lyme Borreliosis II:8-13.
23. Olbrich, S. and A. Liebisch. 1991. [Epidemiological studies of the infection of ticks with borreliosis agents in small mammals from north Germany]. *Dtsch.Tierarztl.Wochenschr.* 98:228-230.
24. Steere, A. C., V. K. Sikand, F. Meurice, D. L. Parenti, E. Fikrig, R. T. Schoen, J. Nowakowski, C. H. Schmid, S. Laukamp, C. Buscarino, and D. S. Krause. 1998. Vaccination against Lyme disease with recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface



- lipoprotein A with adjuvant. Lyme Disease Vaccine Study Group. *N.Engl.J.Med.* 339:209-215.
25. Sigal, L. H., J. M. Zahradnik, P. Lavin, S. J. Patella, G. Bryant, R. Haselby, E. Hilton, M. Kunkel, D. Adler-Klein, T. Doherty, J. Evans, P. J. Molloy, A. L. Seidner, J. R. Sabetta, H. J. Simon, M. S. Klempner, J. Mays, D. Marks, and S. E. Malawista. 1998. A vaccine consisting of recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface protein A to prevent Lyme disease. Recombinant Outer-Surface Protein A Lyme Disease Vaccine Study Consortium. *N.Engl.J.Med.* 339:216-222.
  26. Barbour, A. G., R. A. Heiland, and T. R. Howe. 1985. Heterogeneity of major proteins in Lyme disease borreliae: a molecular analysis of North American and European isolates. *J.Infect.Dis.* 152:478-484.
  27. Vandam, A. P., H. Kuiper, K. Vos, A. Widjojokusumo, B. M. Dejongh, L. Spanjaard, A. C. P. Ramselaar, M. D. Kramer, and J. Dankert. 1993. Different Genospecies of *Borrelia-Burgdorferi* Are Associated with Distinct Clinical Manifestations of Lyme Borreliosis. *Clinical Infectious Diseases* 17:708-717.
  28. Liebisch, G., G. Assmann, and A. Liebisch. 1999. Infection with *Borrelia burgdorferi* s.l. causes disease (Lyme borreliosis) in horses in Germany. *Praktische Tierarzt* 80:498-516.
  29. Barthold, S. W., M. S. de Souza, J. L. Janotka, A. L. Smith, and D. H. Persing. 1993. Chronic Lyme borreliosis in the laboratory mouse. *Am.J.Pathol.* 143:959-971.
  30. Moody, K. D., S. W. Barthold, G. A. Terwilliger, D. S. Beck, G. M. Hansen, and R. O. Jacoby. 1990. Experimental chronic Lyme borreliosis in Lewis rats. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 42:165-174.
  31. Goodman, J. L., P. Jurkovich, C. Kodner, and R. C. Johnson. 1991. Persistent cardiac and urinary tract infections with *Borrelia burgdorferi* in experimentally infected Syrian hamsters. *J.Clin.Microbiol.* 29:894-896.
  32. Straubinger, R. K., B. A. Summers, Y. F. Chang, and M. J. Appel. 1997. Persistence of *Borrelia burgdorferi* in experimentally infected dogs after antibiotic treatment. *J.Clin.Microbiol.* 35:111-116.
  33. Roberts, E. D., R. P. Bohm, Jr., F. B. Cogswell, H. N. Lanners, R. C. Lowrie, Jr., L. Povinelli, J. Piesman, and M. T. Philipp. 1995. Chronic lyme disease in the rhesus monkey. *Lab Invest* 72:146-160.
  34. Kuiper, H., A. P. van Dam, L. Spanjaard, B. M. de Jongh, A. Widjojokusumo, T. C. Ramselaar, I. Cairo, K. Vos, and J. Dankert. 1994. Isolation of *Borrelia burgdorferi* from biopsy specimens taken from healthy-looking skin of patients with Lyme borreliosis. *J.Clin.Microbiol.* 32:715-720.
  35. Nocton, J. J., F. Dressler, B. J. Rutledge, P. N. Rys, D. H. Persing, and A. C. Steere. 1994. Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by polymerase chain reaction in synovial fluid from patients with Lyme arthritis. *N.Engl.J.Med.* 330:229-234.
  36. Schwan, T. G. 1996. Ticks and *Borrelia*: model systems for investigating pathogen-arthropod interactions. *Infect.Agents Dis.* 5:167-181.

37. Barthold, S. W., M. deSouza, and S. Feng. 1996. Serum-mediated resolution of Lyme arthritis in mice. *Lab Invest* 74:57-67.
38. Barthold, S. W., S. Feng, L. K. Bockenstedt, E. Fikrig, and K. Feen. 1997. Protective and arthritis-resolving activity in sera of mice infected with *Borrelia burgdorferi*. *Clin.Infect.Dis.* 25 Suppl 1:S9-17.
39. Barthold, S. W., S. A. Levy, E. Fikrig, L. K. Bockenstedt, and A. L. Smith. 1995. Serologic responses of dogs naturally exposed to or vaccinated against *Borrelia burgdorferi* infection. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 207:1435-1440.
40. Fikrig, E., L. K. Bockenstedt, S. W. Barthold, M. Chen, H. Tao, P. Ali-Salaam, S. R. Telford, and R. A. Flavell. 1994. Sera from patients with chronic Lyme disease protect mice from Lyme borreliosis. *J.Infect.Dis.* 169:568-574.
41. Wallich, R., M. D. Kramer, and M. M. Simon. 1996. The recombinant outer surface protein A (lipOspA) of *Borrelia burgdorferi*: a Lyme disease vaccine. *Infection* 24:396-397.
42. Padula, S. J., F. Dias, A. Sampieri, R. B. Craven, and R. W. Ryan. 1994. Use of recombinant OspC from *Borrelia burgdorferi* for serodiagnosis of early Lyme disease. *J.Clin.Microbiol.* 32:1733-1738.
43. Akins, D. R., S. F. Porcella, T. G. Popova, D. Shevchenko, S. I. Baker, M. Li, M. V. Norgard, and J. D. Radolf. 1995. Evidence for in vivo but not in vitro expression of a *Borrelia burgdorferi* outer surface protein F (OspF) homologue. *Mol.Microbiol.* 18:507-520.
44. Das, S., S. W. Barthold, S. S. Giles, R. R. Montgomery, S. R. Telford, III, and E. Fikrig. 1997. Temporal pattern of *Borrelia burgdorferi* p21 expression in ticks and the mammalian host. *J.Clin.Invest* 99:987-995.
45. Gilmore, R. D., Jr., K. J. Kappel, M. C. Dolan, T. R. Burkot, and B. J. Johnson. 1996. Outer surface protein C (OspC), but not P39, is a protective immunogen against a tick-transmitted *Borrelia burgdorferi* challenge: evidence for a conformational protective epitope in OspC. *Infect.Immun.* 64:2234-2239.
46. Zhang, J. R. and S. J. Norris. 1998. Kinetics and in vivo induction of genetic variation of vlsE in *Borrelia burgdorferi*. *Infect.Immun.* 66:3689-3697.
47. Wallich, R., C. Brenner, M. D. Kramer, and M. M. Simon. 1995. Molecular cloning and immunological characterization of a novel linear-plasmid-encoded gene, pG, of *Borrelia burgdorferi* expressed only in vivo. *Infect.Immun.* 63:3327-3335.
48. Diterich, I., L. Harter, D. Hassler, A. Wendel, and T. Hartung. 2001. Modulation of cytokine release in ex vivo-stimulated blood from borreliosis patients. *Infect.Immun.* 69:687-694.
49. Diterich, I., C. Rauter, C. J. Kirschning, and T. Hartung. 2003. *Borrelia burgdorferi*-induced tolerance as a model of persistence via immunosuppression. *Infect.Immun.* 71:3979-3987.

50. Revel, A. T., A. M. Talaat, and M. V. Norgard. 2002. DNA microarray analysis of differential gene expression in *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99:1562-1567.
51. Brooks, C. S., P. S. Hefty, S. E. Jolliff, and D. R. Akins. 2003. Global analysis of *Borrelia burgdorferi* genes regulated by mammalian host-specific signals. *Infect.Immun.* 71:3371-3383.
52. Bruck, D. K., M. L. Talbor, R. G. Cluss, and J. T. Boothby. 1995. Ultrastructural characterization of the stages of spheroplast preparation of *Borrelia burgdorferi*. *J.Microbiol.Methods* 23:219.
53. Hulinska, D., P. Bartak, J. Hercogova, J. Hancil, J. Basta, and J. Schramlova. 1994. Electron microscopy of Langerhans cells and *Borrelia burgdorferi* in Lyme disease patients. *Zentralbl.Bakteriol.* 280:348-359.
54. Mursic, V. P., G. Wanner, S. Reinhardt, B. Wilske, U. Busch, and W. Marget. 1996. Formation and cultivation of *Borrelia burgdorferi* spheroplast-L-form variants. *Infection* 24:218-226.
55. Brorson, O. and S. H. Brorson. 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* 26:144-150.
56. Schaller, M. and U. Neubert. 1994. Ultrastructure of *Borrelia burgdorferi* after exposure to benzylpenicillin. *Infection* 22:401-406.
57. MacDonald, A. B. 1998. Concurrent neocortical borreliosis and Alzheimer's disease. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 539:468-470.
58. Garon, C. F., D. W. Dorward, and M. D. Corwin. 1989. Structural features of *Borrelia burgdorferi*--the Lyme disease spirochete: silver staining for nucleic acids. *Scanning Microsc.Suppl* 3:109-115.
59. Shoberg, R. J. and D. D. Thomas. 1995. *Borrelia burgdorferi* vesicle production occurs via a mechanism independent of immunoglobulin M involvement. *Infect.Immun.* 63:4857-4861.
60. Ma, Y., A. Sturrock, and J. J. Weis. 1991. Intracellular localization of *Borrelia burgdorferi* within human endothelial cells. *Infect.Immun.* 59:671-678.
61. Gross, D. M., T. Forsthuber, M. Tary-Lehmann, C. Etling, K. Ito, Z. A. Nagy, J. A. Field, A. C. Steere, and B. T. Huber. 1998. Identification of LFA-1 as a candidate autoantigen in treatment-resistant Lyme arthritis. *Science* 281:703-706.
62. Dickman, S. 1998. Possible cause found for Lyme arthritis. *Science* 281:631-632.
63. Zajkowska, J. M. and T. Hermanowska-Szpakowicz. 2002. [New aspects of the pathogenesis of lyme disease]. *Przegl.Epidemiol.* 56 Suppl 1:57-67.
64. Klempner, M. S., R. Noring, and R. A. Rogers. 1993. Invasion of human skin fibroblasts by the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *J.Infect.Dis.* 167:1074-1081.

65. Girschick, H. J., H. I. Huppertz, H. Russmann, V. Krenn, and H. Karch. 1996. Intracellular persistence of *Borrelia burgdorferi* in human synovial cells. *Rheumatol.Int.* 16:125-132.
66. Comstock, L. E. and D. D. Thomas. 1991. Characterization of *Borrelia burgdorferi* invasion of cultured endothelial cells. *Microb.Pathog.* 10:137-148.
67. Pachner, A. R., J. Basta, E. Delaney, and D. Hulinska. 1995. Localization of *Borrelia burgdorferi* in murine Lyme borreliosis by electron microscopy. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 52:128-133.
68. Montgomery, R. R. and S. E. Malawista. 1996. Entry of *Borrelia burgdorferi* into macrophages is end-on and leads to degradation in lysosomes. *Infect.Immun.* 64:2867-2872.
69. Franz, J. K., O. Fritze, M. Rittig, G. Keysser, S. Priem, J. Zacher, G. R. Burmester, and A. Krause. 2001. Insights from a novel three-dimensional in vitro model of lyme arthritis: standardized analysis of cellular and molecular interactions between *Borrelia burgdorferi* and synovial explants and fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 44:151-162.
70. Preac-Mursic, V., K. Weber, H. W. Pfister, B. Wilske, B. Gross, A. Baumann, and J. Prokop. 1989. Survival of *Borrelia burgdorferi* in antibioticly treated patients with Lyme borreliosis. *Infection* 17:355-359.
71. Fischer, J. R., N. Parveen, L. Magoun, and J. M. Leong. 2003. Decorin-binding proteins A and B confer distinct mammalian cell type-specific attachment by *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100:7307-7312.
72. Defosse, D. L., P. H. Duray, and R. C. Johnson. 1992. The NIH-3 immunodeficient mouse is a model for Lyme borreliosis myositis and carditis. *Am.J.Pathol.* 141:3-10.
73. Barthold, S. W., D. H. Persing, A. L. Armstrong, and R. A. Peeples. 1991. Kinetics of *Borrelia burgdorferi* dissemination and evolution of disease after intradermal inoculation of mice. *Am.J.Pathol.* 139:263-273.
74. Ebnet, K., K. D. Brown, U. K. Siebenlist, M. M. Simon, and S. Shaw. 1997. *Borrelia burgdorferi* activates nuclear factor-kappa B and is a potent inducer of chemokine and adhesion molecule gene expression in endothelial cells and fibroblasts. *J.Immunol.* 158:3285-3292.
75. Akin, E., J. Aversa, and A. C. Steere. 2001. Expression of adhesion molecules in synovia of patients with treatment-resistant lyme arthritis. *Infect.Immun.* 69:1774-1780.
76. Boggemeyer, E., T. Stehle, U. E. Schaible, M. Hahne, D. Vestweber, and M. M. Simon. 1994. *Borrelia burgdorferi* upregulates the adhesion molecules E-selectin, P-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 on mouse endothelioma cells in vitro. *Cell Adhes.Commun.* 2:145-157.
77. Ebnet, K., M. M. Simon, and S. Shaw. 1996. Regulation of chemokine gene expression in human endothelial cells by proinflammatory cytokines and *Borrelia burgdorferi*. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 797:107-117.

78. Sellati, T. J., M. J. Burns, M. A. Ficazzola, and M. B. Furie. 1995. *Borrelia burgdorferi* upregulates expression of adhesion molecules on endothelial cells and promotes transendothelial migration of neutrophils in vitro. *Infect.Immun.* 63:4439-4447.
79. Sellati, T. J., L. D. Abrescia, J. D. Radolf, and M. B. Furie. 1996. Outer surface lipoproteins of *Borrelia burgdorferi* activate vascular endothelium in vitro. *Infect.Immun.* 64:3180-3187.
80. Girschick, H. J., S. Meister, H. Karch, and H. I. Huppertz. 1999. *Borrelia burgdorferi* downregulates ICAM-1 on human synovial cells in vitro. *Cell Adhes.Commun.* 7:73-83.
81. Schaible, U. E., D. Vestweber, E. G. Butcher, T. Stehle, and M. M. Simon. 1994. Expression of endothelial cell adhesion molecules in joints and heart during *Borrelia burgdorferi* infection of mice. *Cell Adhes.Commun.* 2:465-479.
82. Bianchi, A., C. Dosquet, S. Henry, M. C. Couderc, F. Ferchal, and C. Scieux. 1997. *Chlamydia trachomatis* growth stimulates interleukin 8 production by human monocytic U-937 cells. *Infect.Immun.* 65:2434-2436.
83. Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
84. Postic, D., M. V. Assous, P. A. Grimont, and G. Baranton. 1994. Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of rrf (5S)-rrl (23S) intergenic spacer amplicons. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 44:743-752.
85. Liebisch, G., B. Sohns, and W. Bautsch. 1998. Detection and typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks attached to human skin by PCR. *J.Clin.Microbiol.* 36:3355-3358.
86. Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 74:5463-5467.
87. Chomczynski, P. and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.* 162:156-159.
88. Brown, J. P., J. F. Zachary, C. Teuscher, J. J. Weis, and R. M. Wooten. 1999. Dual role of interleukin-10 in murine Lyme disease: regulation of arthritis severity and host defense. *Infect.Immun.* 67:5142-5150.
89. Liebisch, G., A. Schlotzhauer, B. Sohns, G. Assmann, and A.Liebisch. 2002. Isolation of *Borrelia afzelii* from a horse with Lyme borreliosis. IX International Conference on Lyme Borreliosis and other tick-borne diseases. P-109. Abstract
90. Steere, A. C. 1989. Lyme disease. *N.Engl.J.Med.* 321:586-596.
91. Steere, A. C., P. H. Duray, and E. C. Butcher. 1988. Spirochetal antigens and lymphoid cell surface markers in Lyme synovitis. Comparison with rheumatoid synovium and tonsillar lymphoid tissue. *Arthritis Rheum.* 31:487-495.

92. Priem, S., G. R. Burmester, T. Kamradt, K. Wolbart, M. G. Rittig, and A. Krause. 1998. Detection of *Borrelia burgdorferi* by polymerase chain reaction in synovial membrane, but not in synovial fluid from patients with persisting Lyme arthritis after antibiotic therapy. *Ann.Rheum.Dis.* 57:118-121.
93. Carlson, D., J. Hernandez, B. J. Bloom, J. Coburn, J. M. Aversa, and A. C. Steere. 1999. Lack of *Borrelia burgdorferi* DNA in synovial samples from patients with antibiotic treatment-resistant Lyme arthritis. *Arthritis Rheum.* 42:2705-2709.
94. Chary-Valckenaere, I., B. Jaulhac, J. Champigneulle, Y. Piemont, D. Mainard, and J. Pourel. 1998. Ultrastructural demonstration of intracellular localization of *Borrelia burgdorferi* in Lyme arthritis. *Br.J.Rheumatol.* 37:468-470.
95. Seiler, K. P. and J. J. Weis. 1996. Immunity to Lyme disease: protection, pathology and persistence. *Curr.Opin.Immunol.* 8:503-509.
96. Hirschfeld, M., C. J. Kirschning, R. Schwandner, H. Wesche, J. H. Weis, R. M. Wooten, and J. J. Weis. 1999. Cutting edge: inflammatory signaling by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins is mediated by toll-like receptor 2. *J.Immunol.* 163:2382-2386.
97. Bulut, Y., E. Faure, L. Thomas, O. Equils, and M. Ardit. 2001. Cooperation of Toll-like receptor 2 and 6 for cellular activation by soluble tuberculosis factor and *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A lipoprotein: role of Toll-interacting protein and IL-1 receptor signaling molecules in Toll-like receptor 2 signaling. *J.Immunol.* 167:987-994.
98. Wolpe, S. D., B. Sherry, D. Juers, G. Davatelis, R. W. Yurt, and A. Cerami. 1989. Identification and characterization of macrophage inflammatory protein 2. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86:612-616.
99. Janeway, C. A. 1999. T-cell mediated immunity. In *Immunobiology:the immune system in health and disease*. P. Austin, E. Lawrence, B. Goatly, and E. Hunt, eds. Elsevier Science Ltd., London, pp. 266-268.
100. McMurray, R. W. 1996. Adhesion molecules in autoimmune disease. *Semin.Arthritis Rheum.* 25:215-233.
101. Hubbard, A. K. and R. Rothlein. 2000. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic.Biol.Med.* 28:1379-1386.
102. Luster, A. D. 1998. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N.Engl.J.Med.* 338:436-445.
103. Smith, C. W. 1993. Endothelial adhesion molecules and their role in inflammation. *Can.J.Physiol Pharmacol.* 71:76-87.
104. Bhatia, S. K., M. R. King, and D. A. Hammer. 2003. The state diagram for cell adhesion mediated by two receptors. *Biophys.J.* 84:2671-2690.

105. Van Kampen, C. and B. A. Mallard. 2001. Regulation of bovine intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) on cultured aortic endothelial cells. *Vet.Immunol.Immunopathol.* 79:129-138.
106. Hess, S., C. Rheinheimer, F. Tidow, G. Bartling, C. Kaps, J. Lauber, J. Buer, and A. Klos. 2001. The reprogrammed host: Chlamydia trachomatis-induced up-regulation of glycoprotein 130 cytokines, transcription factors, and antiapoptotic genes. *Arthritis Rheum.* 44:2392-2401.
107. Eckmann, L., J. R. Smith, M. P. Housley, M. B. Dwinell, and M. F. Kagnoff. 2000. Analysis by high density cDNA arrays of altered gene expression in human intestinal epithelial cells in response to infection with the invasive enteric bacteria Salmonella. *J.Biol.Chem.* 275:14084-14094.
108. Belcher, C. E., J. Drenkow, B. Kehoe, T. R. Gingeras, N. McNamara, H. Lemjabbar, C. Basbaum, and D. A. Relman. 2000. From the cover: the transcriptional responses of respiratory epithelial cells to Bordetella pertussis reveal host defensive and pathogen counter-defensive strategies. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97:13847-13852.
109. Mysorekar, I. U., M. A. Mulvey, S. J. Hultgren, and J. I. Gordon. 2002. Molecular regulation of urothelial renewal and host defenses during infection with uropathogenic Escherichia coli. *J.Biol.Chem.* 277:7412-7419.
110. Cohen, P., M. Bouaboula, M. Bellis, V. Baron, O. Jbilo, C. Poinot-Chazel, S. Galiegue, E. H. Hadibi, and P. Casellas. 2000. Monitoring cellular responses to Listeria monocytogenes with oligonucleotide arrays. *J.Biol.Chem.* 275:11181-11190.
111. Rao, J. S. and M. Bond. 2001. Microarrays : managing the data deluge. *Circ.Res.* 88:1226-1227.
112. Kato-Maeda, M., Q. Gao, and P. M. Small. 2001. Microarray analysis of pathogens and their interaction with hosts. *Cell Microbiol.* 3:713-719.





## 6 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Laserscan-mikroskopische Aufnahme von *Borrelia burgdorferi* (Wallich, Hofmann; Biospektrum 4/99). ----- 1
- Abbildung 2: Schematische Darstellung der Ordnung *Spirochaetales* mit sechs bekannten Gattungen ----- 2
- Abbildung 3: Schematische Darstellung der Gattung *Borrelia*. Als eindeutig mit Lyme-Borreliose assoziiert gelten bislang drei Spezies des *Borrelia burgdorferi* sensu lato Komplexes: *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* und *B. afzelii*.----- 4
- Abbildung 4: Schematische Darstellung des Ergebnisses einer Fluoreszenz-Messung während einer *Real-Time-PCR*. Aufgetragen ist die Zyklenzahl der PCR (*Cycle Number*) gegen die normalisierte Fluoreszenz-Intensität (*Normalized Fluorescence Intensity*) für eine Probe (*Sample*) und eine Negativ-Kontrolle ohne cDNA (*No Template Control, NTC*). Der  $C_T$ -Wert, die Zyklenzahl bei der das Fluoreszenz-Signal der Probe aus dem Hintergrund (*Threshold*) heraustritt, wurde hier durch einen Pfeil gekennzeichnet. -----40
- Abbildung 5: RFLP-Analyse zur Borrelienspezies-Identifizierung. Dargestellt sind zwei Polyacrylgele mit charakteristischen Bandenmustern verschiedener Borrelienspezies nach Restriktionsverdau mit *DraI* (A) oder *MseI* (B). An Position 1 und 7 wurde als Längenstandard ein 25bp Marker aufgetragen, dazwischen von Position 2 bis 6 die Borrelienspezies: *B. valaisiana* (VS116), *B. garinii* (N34), *B. burgdorferi* sensu stricto (B31), *B. afzelii* (PkO) und das nun als *B. afzelii* zu identifizierende Borrelienisolat aus der Milz eines erkrankten Pferdes. -----59
- Abbildung 6: Die mikroskopische Aufnahme zeigt humane Zellen (HUVECs) und charakteristisch spiralförmige Borrelien (Pfeile) nach Giemsa-Färbung in 1000facher Vergrößerung.-----62
- Abbildung 7: Fotografische Dokumentation der Mausinfektionsversuche. Messung des Fußknöcheldurchmessers mit digitalem Mikrometer an arthritisanfälligen C3H/HeN-Versuchsmäusen (A) und Organentnahme nach Tötung zur Rückisolierung von Borrelien. -----64
- Abbildung 8: Graphische Darstellung der gemessenen Fußknöchelschwellungen bei Borrelien-infizierten bzw. nicht infizierten Mäusen (NaCl-Kontrolle) zur Überprüfung der Infektiosität von zwei *Borrelia burgdorferi* sensu stricto Isolaten (N40, GÖ16) aus einem Zecken-Maus-Zyklus. -----65
- Abbildung 9: Mikroskopische Aufnahme der Immunfluoreszenzdoppelfärbung eines fixierten Zellkulturansatzes 24 Stunden nach Infektion mit *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (N40). Differenzierung von intrazellulären leuchtenden Borrelien in der FITC-Aufnahme (A) beim Vergleich desselben Ausschnitts in der TRITC-Aufnahme (B). Ebenso zeigen die sichtbaren Umrisse der eukaryoten Wirtszellen (HUVEC) die Lokalisation der intrazellulären Borrelien im direkten Zellbereich. Eindeutig extrazelluläre Borrelien in ihrer charakteristischen spiralförmigen Gestalt sind dagegen sowohl im FITC- wie auch im TRITC-Kanal deutlich leuchtend sichtbar. -----68
- Abbildung 10: Digitalisierte Abbildungen von zwei Ausschnitten verschieden hybridisierter Array-Membranen nach Auslesung der radioaktiv verursachten Signale auf einer Phosphoimaging-Platte. Beim Vergleich bekannter Positionen für bestimmte Gene zeigen die sogenannten Spots aus hybridisierter DNA ein schwaches oder verstärktes Punktsignal. In den vorliegenden 2-Felder Ausschnitten zeigt sich bei toten Borrelien (A) eine stärkere Genexpression der Endothelzellen für ICAM-1 und MIP-2 alpha im Vergleich mit lebenden Borrelien (B), wobei ICAM-1 stark und MIP-2 alpha schwach reguliert ist.-----73
- Abbildung 11: Denaturierendes Agarosegel zur Kontrolle der gewonnenen Gesamt-RNA aus Infektionsansätzen von Borrelien-infizierten bzw. nicht-infizierten humanen Endothelzellen. Zu sehen sind die deutlichen rRNA-Banden, die stärkere 28S-rRNA-Bande entspricht einer Größe von ~5,0 kb und die 18S-rRNA-Bande von ~1,9 kb. Bei den Borrelien-infizierten Ansätzen sind zusätzlich die prokaryotischen rRNA-Banden von 23S (~2,9 kb) und 16S (~1,5 kb) zu erkennen. -----80
- Abbildung 12: Graphische Darstellung der *Real-Time-RT-PCR* Analyse zur Regulation der Genexpression von MIP-2 alpha. Gezeigt ist ein paralleler Vergleich verschiedener Zeitpunkte nach Infektion von Endothelzellen mit lebenden oder toten Borrelien versus nicht-infizierter, Endothelzellen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen von zwei unabhängigen Messungen. -----82

- Abbildung 13: Graphische Darstellung der Konzentrationsbestimmung von MIP-2 alpha auf Proteinebene mittels ELISA. Analysiert wurde der Überstand von Infektionsansätzen aus Endothelzellen mit lebenden oder toten Borrelien versus nicht-infizierter, Endothelzellen für verschiedene Zeitpunkte. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen von zwei unabhängigen Messungen. ----- 84
- Abbildung 14: Exemplarische Darstellung der ICAM-1-Auswertung mit Histogrammen (Häufigkeitsverteilung) und Dot Plots (Zweiparameterdarstellung) zur FACS-Analyse von, mit lebenden bzw. toten Borrelien infizierten Endothelzellen im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen. Dot Plot-Region 1: Vorwärtsstreulichtdetektor gegen Seitwärtsstreulichtdetektor, zeigt alle gemessenen Zellen (R1); Dot Plot-Region 2: Vorwärtsstreulichtdetektor gegen Propidiumjodidfärbung (PI), differenziert tote von lebenden Zellen (R2). Die Auswertungen beziehen sich auf Daten lebender Zellen. ----- 88
- Abbildung 15: Exemplarische Darstellung der CD4-Auswertung mit Histogrammen und Dot Plots zur FACS-Analyse von mit lebenden bzw. toten Borrelien infizierten Endothelzellen im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen. Zusätzlich wurde als Positivkontrolle der Endothelmarker PECAM (CD31) in den Histogrammen aufgetragen. Dot Plot-Region 1: Vorwärtsstreulichtdetektor gegen Seitwärtsstreulichtdetektor, zeigt alle gemessenen Zellen (R1); Dot Plot-Region 2: Vorwärtsstreulichtdetektor gegen Propidiumjodiddetektor, differenziert tote von lebenden Zellen (R2). Die Auswertungen beziehen sich auf Daten lebender Zellen. 89

## 7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Publierte Borrelien-induzierte Veränderungen der Expression von Adhäsionsmolekülen sowie der Sekretion von Zytokinen bei verschiedenen Wirtszellen-----	15
Tabelle 2: Verwendete Zelllinien und primäre Zellen mit Angaben zu den eingesetzten Kulturmedien-----	18
Tabelle 3: Verwendete Bakterienstämme mit Angaben zu den eingesetzten Kulturmedien-----	19
Tabelle 4: Primer für die spezifische Amplifikation von Teilstücken von cDNA in der <i>Real-Time</i> -PCR, angegeben sind die Namen der Gene (Abkürzung) für die Primer entwickelt wurden, die Primersequenz (in Richtung 5' → 3') sowie der zugehörige Primername, die Produktlänge und die Temperatur, die für das Annealing in der PCR verwendet wurde.-----	20
Tabelle 5: Verwendete Lösungen mit ihren Zusammensetzungen-----	22
Tabelle 6: Pipettierschema für die Primermatrix, wobei in Spalte eins das Primerverhältnis im Ansatz in fmol/Ansatz angegeben ist.-----	42
Tabelle 7: Infektionsansatz zur Überprüfung eines Borrelienisolats aus dem Pferd im Mausmodell-----	64
Tabelle 8: Infektionsansatz zur Überprüfung von Isolaten aus Zecken-Maus-Zyklus im Mausmodell-----	65
Tabelle 9: Schema der Infektionsansätze zur Analyse der Genexpression Borrelien-infizierter Endothelzellen (HUVEC) mittels Clontech Atlas Arrays.-----	72
Tabelle 10: Darstellung der durch lebende Borrelien spezifisch hochregulierten Gene und die Faktoren ihrer Regulation beim Vergleich mittels cDNA-Array (Atlas human 1.2 Array, Clontech/BD) von infizierten humanen Endothelzellen (HUVEC) gegenüber nicht-infizierten Zellen 24 Stunden nach Infektion mit <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto in zwei unabhängigen Experimenten (Exp.1 und Exp.2). In der ersten Spalte steht die Abkürzung und der Name des Gens.-----	75
Tabelle 11: Darstellung der durch lebende Borrelien spezifisch herunterregulierten Gene und die Faktoren ihrer Regulation beim Vergleich mittels cDNA-Array von Borrelien-infizierten humanen Endothelzellen (HUVEC) gegenüber nicht infizierten Zellen in zwei unabhängigen Experimenten (Exp.1 und Exp.2).---	75
Tabelle 12: Zusammenfassung der Regulationsfaktoren für komplex regulierte Gene. Hiermit sind Gene bezeichnet, die sowohl in Zellansätzen mit lebenden als auch toten Borrelien hochreguliert waren, jedoch im Vergleich bei den toten Borrelien deutlich stärkere Faktoren aufwiesen. Das Verhältnis ist hier jeweils als Leb/Tot dargestellt. Leb: Regulationsfaktor (inf./nicht-inf.), Tot: (tote Borr./nicht-inf)-----	76
Tabelle 13: Ergebnisse der Primermatrix für ICAM-1. In der ersten Spalte stehen das Primerverhältnis (in pmol/ml im Endansatz) und die Angabe, ob der Ansatz cDNA enthält oder nicht (K=Kontrolle). Es folgen die doppelt bestimmten C <sub>T</sub> -Werte der einzelnen Primerkombinationen, deren Mittelwerte und Standardabweichungen. In der letzten Spalte sind die Differenzen der C <sub>T</sub> -Werte der gleichen Primerkombination mit und ohne cDNA aufgeführt. Für Proben, bei denen kein Amplifikat entstand, ergab sich mit einem Wert von 40 die maximale Zykluszahl. Das als optimal beurteilte Primerkonzentrationsverhältnis ist hervorgehoben.-----	78
Tabelle 14: Ergebnisse der Primermatrizes für die verwendeten Primerpaare.-----	79
Tabelle 15: Exemplarische Darstellung der Ergebnisse von unabhängigen Experimenten zur <i>Real-Time</i> -RT-PCR von MIP-2 alpha. Angegeben sind die ermittelten Regulationsfaktoren nach Normierung gegen das <i>Housekeeping</i> Gen (RPS9).-----	81
Tabelle 16: Semiquantitative Darstellung der Ergebnisse des Vergleichs der Expression ausgewählter Gene mittels <i>Real-Time</i> -RT-PCR von Endothelzellen infiziert mit lebenden <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto versus nicht-infizierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion (p.i.). Die Faktoren der Genregulation ergeben sich aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen mit Kennzeichnung durch + Faktor 2-3, ++ <5, +++ <10, ++++ <15-----	83
Tabelle 17: Semiquantitative Darstellung der Ergebnisse des Vergleichs der Expression ausgewählter Gene mittels <i>Real-Time</i> -RT-PCR von Endothelzellen infiziert mit toten <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto versus nicht-infizierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion (p.i.). Die Faktoren der Genregulation ergeben sich aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen mit Kennzeichnung durch + Faktor 2-3, ++ <5, +++ <10, ++++ <15-----	83
Tabelle 18: Parallele Antikörpermarkierung der Endothelzellen aus Infektionsansätzen-----	86
Tabelle 19: Auszüge einiger veröffentlichten Micro-Array-Studien mit anderen Bakterien infizierten Wirtszellen.-----	99



## 8 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
Aqua dest.	Aqua destilata (destilliertes Wasser)
BCP	1-Bromo-3-Chloro-Propan
Borr	Borrelien
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	„cluster of differentiation“
CD4	T-cell surface glycoprotein T4
cDNA	Komplementäre DNA
$C_T$	<i>Threshold-Cycle</i>
CTP	Cytidintriphosphat
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dsDNA	Doppelstrang-DNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzym-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung 9,81m/s <sup>2</sup>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GBF	Gesellschaft für Biotechnologische Forschung
GEBS	Glycerin, EDTA, Bromphenolblau, Sarcosyl
GTP	Guanosintriphosphat
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IEX	<i>anti-death protein</i>
IFN	Interferon
IFAT	Immunofluoreszenz Antikörpertest

IL	Interleukin
kb	Kilobasen
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
MAB	<i>monoclonal antibody</i>
MHH	Medizinische Hochschule Hannover
μ	micro (10 <sup>-6</sup> )
min	Minuten
MIP	<i>macrophage inflammatory protein</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
Oligo	Oligonukleotid
PE	Phycoerythrin
p.i.	<i>post infectionem</i> , nach Infektion
PBS	phosphate buffered saline
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonen-Konzentration
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i> , transformierender Wachstumsfaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTP	Thymidintriphosphat
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
U	unit (Einheit der Enzymaktivität)
UV	ultraviolett
V	Volt
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
v/v	Volumen pro Volumen bei Prozentangaben
w/v	Masse pro Volumen bei Prozentangaben

## 9 Anhang

### 9.1 Messdaten der Mausinfektionsversuche

#### 9.1.1 Mausinfektion mit Borrelien des „Wendelino“-Isolates

Die Micrometer-Messung der Fußknöchel ergab nach 5 Wochen keine messbaren Schwellungen (siehe Ergebnisse 3.1.4.1).

<b>Zeitpunkte p.i.</b>	<b>PKo (&gt;100 P.) (B. afzelii) 1x10<sup>4</sup> Borr./50µl</b>	<b>Wendelino 5P. (B. afzelii) 1x10<sup>4</sup> Borr./50µl</b>	<b>Wend. 27 P. (B. afzelii) 1x10<sup>4</sup> Borr./50µl</b>	<b>NK (0,9 % NaCl) 50µl NaCl</b>
<b>Infektionstag</b>	<b>Tier 1: 3,09 mm Tier 2: 2,98 mm Tier 3: 2,97 mm</b>	<b>Tier 1: 2,94 mm Tier 2: 2,97 mm Tier 3: 2,95 mm</b>	<b>Tier 1: 2,96 mm Tier 2: 2,94 mm Tier 3: 2,93 mm</b>	<b>Tier 1: 3,05 mm Tier 2: 2,93 mm Tier 3: 3,10 mm</b>
<b>1. Woche</b>	1: 3,12 mm 2: 2,99 mm 3: 2,99 mm	1: 2,92 mm 2: 2,98 mm 3: 2,92 mm	1: 2,96 mm 2: 2,91 mm 3: 2,93 mm	1: 3,07 mm 2: 2,95 mm 3: 3,14 mm
<b>2. Woche</b>	1: 2,99 mm 2: 2,79 mm 3: 2,95 mm	1: 2,89 mm 2: 2,90 mm 3: 2,95 mm	1: 2,91 mm 2: 2,90 mm 3: 2,92 mm	1: 2,94 mm 2: 2,92 mm 3: 3,05 mm
<b>3. Woche</b>	1: 2,92 mm 2: 2,89 mm 3: 2,88 mm	1: 3,14 mm 2: 3,10 mm 3: 3,15 mm	1: 3,09 mm 2: 3,08 mm 3: 3,03 mm	1: 3,08 mm 2: 2,92 mm 3: 3,09 mm
<b>4. Woche</b>	1: 3,17 mm 2: 2,95 mm 3: 2,97 mm	1: 3,06 mm 2: 3,08 mm 3: 3,04 mm	1: 3,09 mm 2: 2,97 mm 3: 3,10 mm	1: 3,01 mm 2: 2,98 mm 3: 3,01 mm
<b>5. Woche</b>	1: 3,08 mm 2: 3,00 mm 3: 2,99 mm	1: 3,01 mm 2: 3,11 mm 3: 3,05 mm	1: 3,19 mm 2: 3,08 mm 3: 3,09 mm	1: 3,05 mm 2: 3,07 mm 3: 3,06 mm

### 9.1.2 Mauseinfektion: Wiederholung mit „Wendelino“-Isolat

Die Micrometer-Messung der Fußknöchel ergab nach 10 Wochen messbare Schwellungen (siehe Ergebnisse 3.1.4.1).

Zeitpunkte p.i.	Wendelino 5P. ( <i>B. afzelii</i> ) ( $5 \times 10^5$ Borrelien/50 $\mu$ l)	N40 7P. PK ( <i>B. burgdorferi</i> ss) ( $5 \times 10^5$ Borrelien /50 $\mu$ l)	NK (0,9% NaCl) (NaCl/50 $\mu$ l)
Infektionstag	Tier 1: 2,79 mm Tier 2: 2,80 mm Tier 3: 2,77 mm	Tier 1: 2,80 mm Tier 2: 2,82 mm Tier 3: 2,81 mm	Tier 1: 2,81 mm Tier 2: 2,79 mm
1. Woche	1: 2,82 mm 2: 2,83 mm 3: 2,81 mm	1: 2,80 mm 2: 2,83 mm 3: 2,83 mm	1: 2,78 mm 2: 2,77 mm
2. Woche	1: 2,85 mm 2: 2,86 mm 3: 2,84 mm	1: 3,12 mm 2: 3,14 mm 3: 3,11 mm	1: 2,80 mm 2: 2,81 mm
3. Woche	1: 2,83 mm 2: 2,87 mm 3: 2,83 mm	1: 3,13 mm 2: 3,55 mm 3: 3,25 mm	1: 2,78 mm 2: 2,78 mm
4. Woche	1: 2,87 mm 2: 2,82 mm 3: 2,87 mm	1: 3,52 mm 2: 3,77 mm 3: 3,75 mm	1: 2,78 mm 2: 2,80 mm
5. Woche	1: 2,84 mm 2: 3,00 mm 3: 2,88 mm	1: 3,80 mm 2: 4,19 mm 3: 3,98 mm	1: 2,83 mm 2: 2,82 mm
6. Woche	1: 2,83 mm 2: 3,00 mm 3: 2,88 mm	1: 3,60 mm 2: 4,16 mm 3: 3,51 mm	1: 2,85 mm 2: 2,84 mm
7. Woche	1: 2,84 mm 2: 2,85 mm 3: 2,90 mm	1: 3,67 mm 2: 3,90 mm 3: 4,02 mm	1: 2,87 mm 2: 2,86 mm
8. Woche	1: 2,85 mm 2: 2,85 mm 3: 2,89 mm	1: Tötung: Blut- u. Organentnahme 2: “ 3: “	1: 2,83 mm 2: 2,85 mm
9. Woche	1: 2,90 mm 2: 2,92 mm 3: 2,85 mm	1: AK: 1:1024 2: AK: 1:1024 3: AK: 1:1024	1: 2,90 mm 2: 2,89 mm
10. Woche	1: 2,87 mm 2: 3,16 mm 3: 2,90 mm		1: 2,84 mm 2: 2,86 mm
	Tötung: Blut- u. Organentnahme		Tötung: Blutentnahme
	1: AK: 1:16/ 32 2: AK: 1:256 3: AK: 1:128		1: AK: 1:16 2: AK: 1:16/ 32



### 9.1.3 TaqMan Ergebnisse (MIP-2a) [Diagrammdaten]

	Experiment 1	Experiment 2	Mittelwerte	Standardabweichung
6 h leb. Borr	5,51	6,43	5,97	0,65
12 h leb. Borr.	8,31	11,58	9,95	2,31
24 h leb. Borr.	2,66	1,59	2,13	0,76
6 h tote Borr	2,67	2,85	2,76	0,13
12 h tote Borr.	8,39	8,92	8,66	0,37
24 h tote Borr.	23,08	11,30	17,19	8,33
6 h NK HUVEC	1	1	1	0
12 h NK HUVEC	1	1	1	0
24 h NK HUVEC	1	1	1	0

### 9.1.4 TaqMan Ergebnisse (ICAM-1)

	Experiment 1	Experiment 2
6 h leb. Borr	1,30	2,01
12 h leb. Borr.	2,07	3,52
24 h leb. Borr.	2,72	5,47
6 h tote Borr	1,22	2,12
12 h tote Borr.	2,83	4,46
24 h tote Borr.	13,24	27,89
6 h NK HUVEC	1	1
12 h NK HUVEC	1	1
24 h NK HUVEC	1	1

### 9.1.5 ELISA Ergebnisse (MIP-2a)

	Experiment 1	Experiment 2	Mittelwerte	Standardabweichung
6 h leb. Borr	0,93	1,85	1,39	0,651
12 h leb. Borr.	3,47	1,66	2,57	1,279
24 h leb. Borr.	4,98	3,29	4,14	1,195
6 h tote Borr	1,16	2,11	1,64	0,672
12 h tote Borr.	3,91	2,80	3,36	0,785
24 h tote Borr.	9,09	6,33	7,71	1,951
6 h NK HUVEC	0,44	1,00	0,72	0,397
12 h NK HUVEC	0,71	1,39	1,05	0,480
24 h NK HUVEC	1,13	2,04	1,58	0,646

## 9.2 Statistiken zur FACS-Analyse von ICAM-1

### 9.2.1 Statistik zu Endothelzellen mit lebenden Borrelien

Marker	Ereignisse (Zellzahl)	Gezählte Zellen Prozent (%)	Gesamte Zellen Prozent (%)	Mean-Wert
Alle	10232	100,00	59,43	140
M1	7111	69,50	41,30	40
M2	2930	28,64	17,02	256
M3	215	2,10	1,25	1876
M4	3142	30,71	18,25	366

### 9.2.2 Statistik zu Endothelzellen mit toten Borrelien

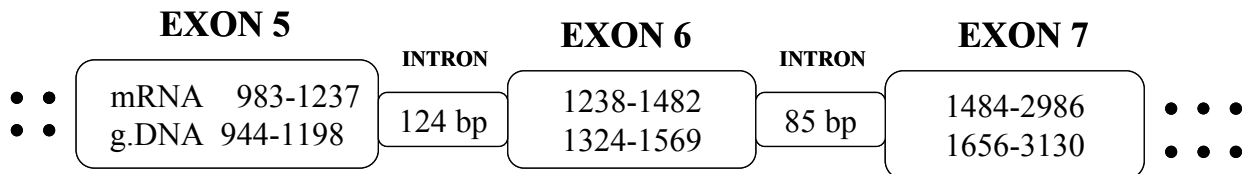
Marker	Ereignisse (Zellzahl)	Gezählte Zellen Prozent (%)	Gesamte Zellen Prozent (%)	Mean-Wert
Alle	12499	100,00	53,14	426
M1	5265	42,12	22,38	46
M2	5747	45,98	24,43	336
M3	1535	12,28	6,53	2061
M4	7272	58,18	30,91	699

### 9.2.3 Statistik zu Endothelzellen ohne Borrelien

Marker	Ereignisse (Zellzahl)	Gezählte Zellen Prozent (%)	Gesamte Zellen Prozent (%)	Mean-Wert
Alle	10190	100,00	54,40	108
M1	6966	68,36	37,19	39
M2	3210	31,50	17,14	239
M3	44	0,43	0,23	1434
M4	3253	31,92	17,37	255

### 9.3 Position der generierten Primer

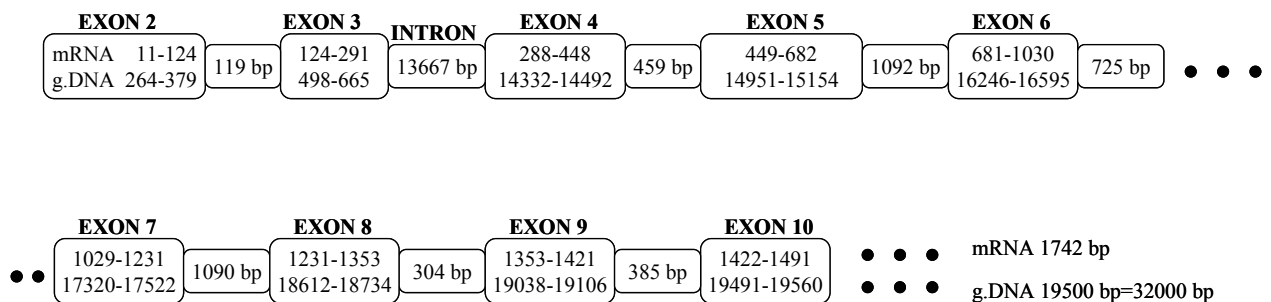
#### Align-Schema-ICAM1



Ermittelte Intron/Exon-Grenzen in der ICAM-1-Sequenz nach Alignment der mRNA und genomischen DNA-Sequenz.

Generierte Primer AS1+ AS2 bilden ein 119 bp Fragment über die Intron/Exon-Grenze von Exon 5 und 6.

#### Align-Schema-CD4



Ermittelte Intron/Exon-Grenzen in der CD4-Sequenz nach Alignment der mRNA und genomischen DNA-Sequenz.

Generierte Primer AS5 + AS6 bilden ein 108 bp Fragment über Exon 8 und 9.



# Lebenslauf

von Dipl.-Biol. Anja Schlotzhauer, geb. 16.06.1971 in Laatzen

Schulbildung:	1977-1981	Grundschule Bonnerstraße, Hannover
	1981-1983	Orientierungsstufe Altenbekener Damm, Hannover
	1983-1990	Gymnasium Tellkampfschule, Hannover
Schulabschluss:	5/1990	Allgemeine Hochschulreife
Ausbildung:	8/91-6/93	Berufsfachschule, S. Blindow-Schulen, Hannover
Abschluss:	6/93	Biologisch-technische Assistentin (BTA)
Studium:	ab 10/1993	Studium an der Universität Hannover im Diplomstudiengang Biologie
	7/1995	Vordiplom
	7/1998	Diplomprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Zoologie, Biochemie und Parasitologie
	9/1998-11/1999	Diplomarbeit am Institut für medizinische Mikrobiologie der Med. Hochschule Hannover u. am Institut für Parasitologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover mit dem Thema: <i>Optimierung und Austestung eines PCR- Nachweisverfahrens für Borrelia burgdorferi sensu lato aus Zecken der Art Ixodes ricinus</i>
Studienabschluss:	11/1999	Diplom in der Fachrichtung Biologie
Beschäftigung:	1/2000-2/2000	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Parasitologie der Tierärztl. Hochschule Hannover
Promotion:	ab 3/2000	Förderung durch das Graduiertenstipendium der Med. Hochschule Hannover, anschließend Wissenschaftliche Hilfskraft im Institut für medizinische Mikrobiologie der MHH, Thema der Dissertation: <i>Untersuchungen zur Genregulation eukaryoter Gene in Borrelien- infizierten Endothelzellen</i>
Abschluss:	12/2003	Doktorprüfung in den Fächern Biochemie u. Mikrobiologie am Fachbereich Chemie der Universität Hannover



## **Eigene Publikation**

### **Abstract:**

Liebisch G., **Schlotzhauer A.**, Sohns B., Assmann G., Liebisch A.: Isolation of *Borrelia afzelii* from a horse with Lyme Borreliosis. IX International Conference on Lyme Borreliosis and other tick-borne diseases, New York, USA, August 2002





## Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. D. Bitter-Suermann für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der MHH anfertigen zu können.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Müller für die Übernahme der Doktorvaterschaft und für seine stets freundliche Hilfe bei bürokratischen Angelegenheiten.

Bei meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Dr. Wilfried Bautsch möchte ich mich herzlich für seine kontinuierliche Unterstützung trotz Auszugs in die "Ferne" und seine schwingvoll, sympathische Art bedanken, die fachliche Besprechungen sehr ergiebig macht.

Herrn Prof. Dr. A. Liebisch und Frau Dr. G. Liebisch danke ich für die freundliche Unterstützung meiner Forschungsarbeit und die erfolgreiche Kooperation.

Herrn Prof. Dr. Andreas Klos und seiner ganzen Arbeitsgruppe danke ich für die herzliche Aufnahme als Adoptiv-Doktorandin und die vielfältigen fachlichen Unterstützungen.

Allen Mitgliedern der AG Klos: Claudia Rheinheimer, Simone Hess, Myriam Schaefer, Jan Peters, Gerda Bartling, Katja Endlich und Stephanie Konrad möchte ich für das einmalige Arbeitsklima und die gemeinschaftlich verbrachten sportlichen oder kulinarischen Freizeitausflüge danken.

Special thanks gehen an:

Simone für ihre stets freundliche Hilfsbereitschaft, geduldige Beantwortung aller fachlichen Fragen und vor allem für ihre dynamische Einführung in die Welt der Micro-Arrays mit so mancher Zugfahrt zur GBF nach Braunschweig.

Claudia für ihre Hilfe zum Rechnungswesen der MHH, so dass ich meine eigene TA sein konnte.

Jan Peters für die hilfsbereiten Einweisungen am TaqMan-Gerät, den Disco-Fox-Crash-Kurs und die Einrichtung meines Internet-Anschlusses.

Ganz lieber Dank gilt Myriam für ihre Freundschaft, wertvollen Ratschläge, die gute Team-Arbeit bei Array-Auswertungen an der GBF und ihre unerschöpfliche Hilfe bei PC-Anwendungen.

Ich danke meinen beiden ehemaligen Kolleginnen der AG Bautsch: Melanie Grove und Bettina Sohns, die zu Beginn meiner Arbeit als wir noch die „Bautsch-Babes“ genannt wurden, mich besonders bei den Mausinfektionsversuchen unterstützt haben.

Meinen ebenfalls ehemaligen Laborgefährtnen der AG Köhl danke ich für die familiäre Atmosphäre im Drei-Mädel-Labor: Michaela Friedrichsen für ihre freundschaftlich fröhliche Anteilnahme und Lihua Wang für ihre mütterliche Fürsorge und die großzügige Einladung ein Forschungslabor in den USA zu besichtigen.

Dank auch an weitere Köhls: Nicole Flemme für ihre Gelassenheit, Heiko Hawlisch für seine seriöse Kompetenz und Magnus Otto für seine augenzwinkernden Kommentare.

Prof. Dr. Jan Buer danke ich für seine ausgesprochene Hilfsbereitschaft und die Nutzung der „Auswertungszentrale“ für Micro-Arrays seiner Arbeitsgruppe „Mucosale Immunität“ an der GBF.

Ebenfalls mein Dank an Dr. Kurt E. J. Dittmar für die Unterstützung bei den FACS-Messungen in seinen „heiligen Hallen“ der GBF.

Besonderer Dank gilt schließlich meinen Eltern für die immer währende liebevolle Unterstützung und meinen Großeltern für ihr bewunderndes Erstaunen über die Unendlichkeit von Forschung.



## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel "Untersuchungen zur Genregulation eukaryoter Gene in Borrelien-infizierten Endothelzellen" selbstständig verfasst, sowie alle benutzten Hilfsmittel und Institutionen vollständig angegeben habe. Weiterhin versichere ich, dass die Dissertation nicht bereits als Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit verwendet wurde.

Hannover, Dezember 2003

(Anja Schlotzhauer)