

Aus dem Zentrum für Klinisch-Theoretische Medizin 1
Institut für Infektionsmedizin
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. med. Rainer Laufs

Generierung eines rekombinanten Immunoblots als
Bestätigungstest einer Infektion mit *Borrelia burgdorferi*

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Johannes Albrecht Christian Haes

aus Bonn

Hamburg 2003

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am:

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Dekan:

Referent:

Koreferent:

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Die Lyme Borreliose, Geschichte und weltweite Bedeutung	1
1.1.1 Die Geschichte der Erstbeschreibung	1
1.1.2 Ein Überblick über die Prävalenz weltweit	1
1.1.3 Die Lyme Borreliose in Deutschland	2
1.2 Der Erreger der Lyme Borreliose	3
1.2.1 Die Taxonomie der Borrelien	3
1.2.2 Morphologie und Anzucht	3
1.2.3 Genom und Antigene	4
1.2.4 Humanpathogene Subspezies von <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato und deren geographische Verteilung	5
1.3 Die Infektion mit <i>Borrelia burgdorferi</i>	6
1.3.1 Übertragung und Epidemiologie	6
1.3.2 Pathogenese	7
1.3.3 Die Immunantwort	8
1.3.4 Das Krankheitsbild der Lyme Borreliose	9
1.3.5 Subspezies und Erscheinungsformen	12
1.4 Therapie	13
1.5 Diagnostische Möglichkeiten und ihre Schwächen	14
1.6 Zielsetzung und experimentelle Strategie der Arbeit	16
2 Puffer, Medien und Ansätze	18
2.1 Bakterienstämme	18
2.2 Nährmedien zur Bakterienanzucht	18
2.3 Geräte und Materialien	19
2.4 Verwendete Kits und Vektoren	21
2.4.1 Kits	21
2.4.2 Vektoren	21
2.5 Ansätze und Chemikalien	21
2.6 Elektrophoretische Auftrennungen	22
2.6.1 Auftrennung von DNA	22
2.6.2 Auftrennung von Proteinen	22

2.7	Färbungen	23
2.7.1	Färbung von DNA	23
2.7.2	Färbung von Proteinen	23
2.8	Puffer	23
2.8.1	Puffer für die Arbeit mit DNA	23
2.8.2	Puffer für die Arbeit mit Proteinen	24
2.8.3	Puffer zur Herstellung und Durchführung des Immunoblots	25
3	Methoden	26
3.1	Anzucht der Borrelien und deren Ernte	26
3.2	Die Arbeit mit DNA	26
3.2.1	Auswahl spezifisch immunogener <i>Borrelia burgdorferi</i> Proteinabschnitte sowie geeigneter Oligonukleotide	26
3.2.2	Nukleinsäureextraktion	29
3.2.3	PCR	29
3.2.4	Elektrophoretische Auftrennung	30
3.2.5	Nukleinsäureaufreinigung aus dem Agarosegel	30
3.2.6	Sequenzierung	31
3.2.7	Ligation in TOPO-TA	31
3.2.8	Klonierung	32
3.2.9	Plasmidreinigung (wie 3.2.2)	32
3.2.10	Restriktionsenzymverdau	33
3.2.11	Ligation in pGex	33
3.3	Die Arbeit mit Proteinen	33
3.3.1	Proteinexpression in <i>Escherichia coli</i>	33
3.3.1.1	Kontrolle der Proteinexpression	33
3.3.1.2	Großansatz	34
3.3.2	Aufreinigung der Proteine mittels Affinitätschromatographie	34
3.3.3	Größenbestimmung der Fusionsproteine	35
3.3.4	Bradford-Assay-Proteinchargen-Quantifizierung	36
3.4	Auswahl der Seren	36
3.5	Der Immunoblot	37
3.5.1	Herstellung	37
3.5.2	Durchführung	38
3.5.3	Auswertung	39

4 Ergebnis	40
4.1 Auswahl spezifisch immunogener <i>Borrelia burgdorferi</i> Proteine	40
4.2 DNA	40
4.2.1 Auswahl geeigneter Abschnitte dieser Antigene	40
4.2.2 Auswahl geeigneter Oligonukleotide	41
4.2.3 Elektrophoretische Auftrennung und Größenbestimmung der Genomabschnitte	41
4.2.4 Sequenzierung	43
4.3 Proteine	45
4.3.1 Suche und Kontrolle geeigneter Klone	45
4.3.2 Reinigung der Fusionsproteine mittels Affinitätschromatographie	46
4.3.3 Größenbestimmung der Fusionsproteine	47
4.3.4 Gegenüberstellung der Fusionsproteingröße zu den Originalgrößen aus der Literatur	49
4.3.5 Bradfordassay-Proteinchargen-Quantifizierung	50
4.4 Auswahl geeigneter Seren	51
4.5 Immunoblot	52
4.5.1 Herstellung	52
4.5.2 Evaluation des Immunoblots	53
4.5.2.1 Vergleich positiver und negativer Blotergebnisse	53
4.5.2.2 Vergleich des neuen Immunoblots mit dem alten	54
4.5.2.3 Vergleich einer frischen Infektion mit einer alten im rekombinant hergestellten Immunoblot	56
5 Diskussion	57
6 Zusammenfassung	71
7 Anhang	72
8 Abkürzungsverzeichnis	79
9 Literaturverzeichnis	80
10 Quellenverzeichnis	98
10 Danksagung	99
11 Lebenslauf	100
12 Erklärung	101

1 Einleitung

1.1 Die Lyme Borreliose, Geschichte und weltweite Bedeutung

1.1.1 Die Geschichte der Erstbeschreibung.

Die Lyme Arthritis wurde erstmals 1975 in der Ortschaft Lyme in Connecticut, USA, beschrieben. Dort fiel ein gehäuftes Auftreten von Gelenksbeschwerden bei Jugendlichen auf, dem eine charakteristische Hauteffloreszenz vorausgegangen war^{181,195}. Bei der Suche nach einer möglichen infektiösen Ursache konnten Willy Burgdorfer und Kollegen 1982 den Erreger, ein spiralförmiges Bakterium, aus einer Zecke (*Ixodes scapularis*) in Long Island, N.Y., isolieren³². Zwei Jahre später wurde diese Spirochäte zu Ehren des Erstbeschreibers nach diesem, *Borrelia burgdorferi*, benannt¹⁷².

Der ätiologische Zusammenhang zwischen Erreger und Erkrankung wurde durch Nachweis spezifischer Antikörper bei betroffenen Patienten in Immunfluoreszenztesten (IFT) nachgewiesen¹⁸⁴. Später konnten die Erreger auch aus Haut-, Blut- und Liquorproben von Patienten mit dieser Infektion kultiviert werden^{20,192}. Zu diesem Zeitpunkt wurde *Borrelia burgdorferi* auch erstmals in Europa bei Patienten mit Erythema migrans (EM), Meningoradiculoneuritis-Garin-Bujadoux-Bannwarth, Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA) und Lyme Arthritis isoliert^{6,7,15,152,186}.

Auch wenn die Erkrankung in den siebziger Jahren in Nordamerika beschrieben und aufgeklärt wurde, so waren die Symptome in Europa doch schon seit über 100 Jahren bekannt¹⁸¹. So wurde ein Erythema chronicum migrans bereits 1909 in Schweden beschrieben¹. Einige Jahre später beschrieben Garin und Bujadoux⁶⁶ sowie Bannwarth¹² ein Syndrom aus lymphozytärer Meningitis, schmerzhafter Radikulitis und Hirnnervenausfällen. Bereits damals vermutete man eine zugrunde liegende Infektionserkrankung⁸⁶.

1.1.2 Ein Überblick über die Prävalenz weltweit

Die Lyme Borreliose ist eine vornehmlich auf der nördlichen Hemisphäre endemisch auftretende Erkrankung¹⁶³ (siehe Abbildung 1.1). Sie ist

mittlerweile die häufigste von Zecken übertragene Infektion in Nordamerika^{39,188} und Eurasien^{139,219}. 1996 wurden mehr als 16.000 Fälle in den USA gemeldet³⁹. In Europa nimmt man ein Auftreten von etwa 50.000 Fällen pro Jahr an¹³⁹.

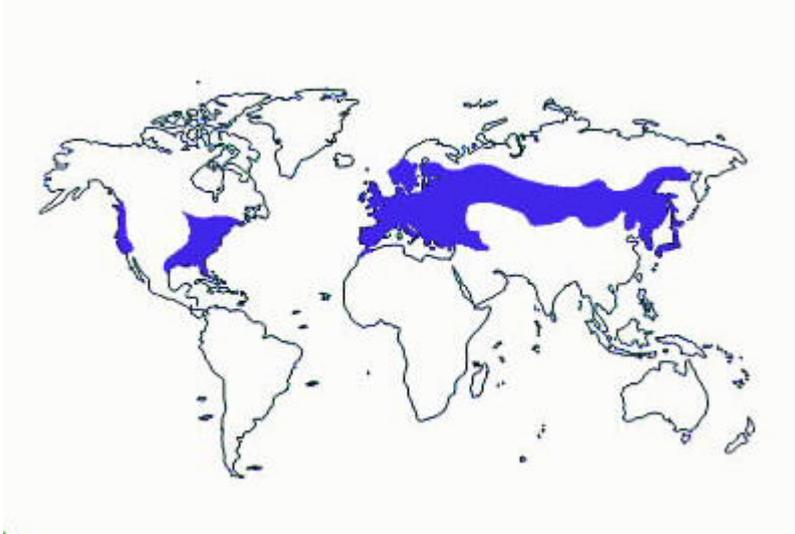


Abbildung 1.1 zeigt die weltweite Verbreitung der Lyme Borreliose auslösenden Spirochäte *Borrelia burgdorferi*²²⁰.

1.1.3 Die Lyme Borreliose in Deutschland

Borrelia burgdorferi ist bundesweit verbreitet. In Mecklenburg–Vorpommern, wo von 1992–1994 ausgedehnte Studien zum Befall der Zecken durch Borrelien durchgeführt wurden, fand man eine mittlere Besiedlungsrate von 7%⁹⁰. In der weiteren Umgebung von Berlin konnte der Erreger durch Kultur in 22,8%⁷⁴, in Brandenburger Studien in 21–27%¹¹¹ der untersuchten Zecken nachgewiesen werden. Im süddeutschen Raum um Heidelberg und Stuttgart wurden borrelienhaltige Zecken, je nach Sammelort und Entwicklungsstadium der Zecken, mittels PCR in 8–36% festgestellt⁹⁶. Ähnliches ergab eine Studie aus dem Jahr 2002, in der eine mittlere Besiedlungsrate der Zecken um Konstanz mittels PCR von 35% (20–57%) festgestellt wurde¹⁵⁶.

In Relation hierzu steht die Zahl der Neuerkrankungen. In den 5 neuen Bundesländern und Berlin wurden im Jahr 1998 durch Infektionsstatistik 1.531, im Jahre 1999 1.411 Erkrankungsfälle durch Meldung erfaßt. Auch hier fallen regionale Unterschiede in der Inzidenzrate auf; dabei führt Brandenburg vor Sachsen, Mecklenburg-Vorpommern, Berlin, Sachsen-Anhalt und Thüringen bei der Häufigkeit von Neuerkrankungen^{163,164}. Die

Prävalenz kann zur Zeit aber aufgrund der fehlenden bundesweiten Meldepflicht nicht abgeschätzt werden. Es ist jedoch in allen Teilen Deutschlands von einer Infektionsgefährdung auszugehen¹⁶³. Hierbei wirken sich die unterschiedliche Verteilung von Zeckenbiotopen, ökologische Faktoren, die direkt die Zeckenpopulation beeinflussen, sowie das Freizeitverhalten der Menschen auf die Häufigkeit der Übertragung aus¹⁶⁴.

1.2 Der Erreger der Lyme Borreliose

1.2.1 Die Taxonomie der Borrelien

Borrelien gehören zur Familie der *Spirochaetaceae*. Für den Menschen sind hieraus vor allem die Gattungen *Treponema*, der Erreger der Syphilis (*Treponema pallidum*), *Leptospira*, der Erreger der Leptospirose (*Leptospira interrogans*), sowie die Gattung *Borrelia* zu nennen.

Borrelien werden in 2 Spezies aufgeteilt, *Borrelia recurrentis*, der Erreger des Rückfallfiebers und *Borrelia burgdorferi*, das auslösende Agens der Lyme Borreliose²⁰⁷. Eine weitere Unterteilung erfolgt anhand von serologischen (z.B. monoklonale Antikörper) und genetischen (z.B. Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) Merkmalen¹⁷. Aufgrund der Heterogenität der Spezies *Borrelia burgdorferi* bezeichnet man die Gesamtheit der so ermittelten Subspezies als *Borrelia burgdorferi* sensu lato.

Innerhalb dieser wurden bis heute 10 unterschiedliche Subspezies beschrieben: *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia japonica*, *Borrelia valaisiana*, *Borrelia lusitaniae*, *Borrelia andersonii*, *Borrelia tanukii*, *Borrelia turdi* (neuerdings *Borrelia turdae*) und *Borrelia bissetti*²⁰⁷.

1.2.2 Morphologie und Anzucht

Borrelia burgdorferi, ein mikroaerophiles gramnegatives Schraubenbakterium, ist 8–30µm lang und besitzt einen Durchmesser zwischen 0,2–0,3µm¹⁸⁴. Die Spiralen sind unregelmäßig gewunden und haben einen Windungsabstand von 2–4µm¹²⁵. Borrelien haben, wie andere

Spirochäten auch, eine äußere Zellmembran, die einen protoplasmatischen Zylinder umschließt. Dieser besteht aus einer inneren Zellmembran und Zytoplasma¹⁸⁴.

Die Flagellen, auch Endoflagellen genannt, liegen im periplasmatischen Raum und sind an den gegenüberliegenden Enden der äußeren Zellmembran verankert¹⁰.

Die Anzucht von *Borrelia burgdorferi* ist nur in Flüssigkultur möglich und erfolgt bei 33°C in einem Barbour-Stoenner-Kelly-Medium (BSK-Medium)¹⁴.

Die mittlere Generationszeit von Borrelien in Kultur beträgt zwischen 6 und 20 Stunden¹⁸⁴.

1.2.3 Genom und Antigene

Borrelia burgdorferi gehört zu den wenigen Bakterien, deren Gensequenz vollständig bekannt ist. Zur Sequenzierung diente der *Borrelia burgdorferi* sensu stricto Stamm B31⁶⁰.

Das Genom von *Borrelia burgdorferi* besteht aus einem linearen Chromosom von etwa 950.000 Nukleotiden¹⁸⁴ sowie 9 zirkulären und 12 linearen Plasmiden¹⁹⁰. Es kodiert für Strukturproteine, z.B. Hüllproteine, die für die Diagnostik von besonderer Bedeutung sind und Nicht-Strukturproteine, z.B. Enzyme.

Die Proteine können mittels SDS-PAGE (Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) aufgetrennt und anhand eines Größenmarkers bestimmt werden. So bekamen sie anfangs einen Namen bestehend aus „p“ für Protein und dem entsprechenden Molekulargewicht in Kilodalton [kD], z.B. p37. Erst später, als man etwas über die Funktion der Proteine lernte, bekamen diese dann Eigennamen, z.B. OspA für „outer surface protein A“.

Die wichtigsten bisher beschriebenen Proteine von *Borrelia burgdorferi* sind im Folgenden aufgeführt.

Bis heute wurden mehrere Membranlipoproteine beschrieben, dazu gehören die Outer Surface Proteine OspA bis OspF^{19,21,23,31,62,138}. Weitere Polypeptide umfassen das 41kD große Flagellen-Antigen¹⁸ und 60-, 66- und 73kD „Heat Shock Proteine“^{5,79,112}. Dies sind Proteine, die bei hoher Temperatur exprimiert werden, an die DNA binden und die Gen-Expression

verändern¹⁰. Weiterhin sind ein 83/100kD großes Antigen des protoplasmatischen Zylinders¹¹³, sowie p75 auch DNak, p39¹⁶⁶ ein *Borrelia* Membran Protein (BmpA), p37⁷⁰ auch FlaA, vermutlich ein äußeres Hüllprotein der Flagelle⁶⁷, sowie p17 bekannt. Letzteres wird vornehmlich von *Borrelia afzelii* exprimiert. Diese Proteine werden ebenso zur serologischen Diagnostik herangezogen^{70,82}.

Bis heute wurden am intensivsten die Osp A, –B und –C Proteine¹⁸⁴ untersucht. Insbesondere für OspA ist in den USA ein kommerzieller Impfstoff entwickelt worden^{84,100}.

In vergleichenden Studien stellten sich diese „outer surface Proteine“ als durchaus unterschiedlich heraus. Von OspA kann man bis heute acht verschiedene Serotypen unterscheiden^{210,214}; unter japanischen Isolaten von *Borrelia burgdorferi* sensu lato wurden weitere Serotypen J1-J11 beschrieben^{122,215}.

1.2.4 Humanpathogene Subspezies von *Borrelia burgdorferi* sensu lato und deren geographische Verteilung

Nicht alle erwähnten *Borrelia* Subspezies sind für den Menschen pathogen. Nur *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* und *Borrelia afzelii* wurden häufig aus Patienten mit Lyme Borreliose isoliert^{34,108,123,133,197,202,214}.

Borrelia burgdorferi sensu stricto ist die häufigste humanpathogene *Borrelia*-Subspezies in den USA³⁹. In Europa ist *Borrelia burgdorferi* sensu stricto hauptsächlich in Westeuropa vertreten²⁰⁷. Im übrigen Europa zeigt sich ein anderes Bild: Hier werden *Borrelia garinii* und *Borrelia afzelii* am häufigsten isoliert^{89,168}. Diese beiden Subspezies wurden auch in China^{107,199,218}, Japan^{63,135}, Korea¹⁴² und dem östlichen Russland^{121,151,169} gefunden.

Neuere Studien ergaben, daß *Borrelia bissettii* sp.nov. eventuell eine vierte humanpathogene Subspezies sein könnte. Wie *Borrelia burgdorferi* sensu stricto wurde diese Subspezies sowohl in der alten wie auch in der neuen Welt dokumentiert^{148,198}.

Borrelia valaisiana ist weit verbreitet in Europa und Asien²⁰⁶. Da für diese Subspezies spezifische DNA mittels PCR bei Patienten mit Lyme Borreliose

gefunden wurde¹⁶⁰, ist für diese ebenfalls eine Pathogenität für den Menschen nicht auszuschließen.

Gleiches gilt auch für ein Isolat aus einer Hautbiopsie bei einem Patienten mit Erythema migrans in den Niederlanden, das Borrelienisolat A14S²⁰⁵.

1.3 Die Infektion mit *Borrelia burgdorferi*

1.3.1 Übertragung und Epidemiologie

Die Lyme Borreliose ist eine vornehmlich auf der nördlichen Hemisphäre (Nordamerika, Europa und Asien) endemische Zoonose. Die Infektion des Menschen erfolgt durch den Stich einer mit Borrelien infizierten Zecke. In Europa werden die Erreger der Lyme Borreliose von *Ixodes ricinus* übertragen, während in den USA *Ixodes scapularis* sowie *Ixodes pacificus*, in Asien *Ixodes persulcatus* als Vektor dienen^{3,49,95}.

Obwohl *Borrelia burgdorferi* auch in anderen Zeckenarten nachgewiesen wurde¹⁷³, sowie in Mosquitos und Rotwildfliegen, scheinen nur die oben genannten Zecken bei der Übertragung auf den Menschen eine Rolle zu spielen¹⁸⁹.

In Westeuropa schwankt die Besiedlung der Zecken zwischen 5% und 35%¹⁶³. In den Vereinigten Staaten tragen zwischen 2% der Zecken in Kalifornien²⁵ und 50% der Zecken auf Shelter Island, N.Y.¹⁰⁴ *Borrelia burgdorferi*.

In einer Studie in Westeuropa, die 1.263 Borrelienisolate aus Zecken, humanen Specimen und wilden Säugetieren untersuchte, dominierte *Borrelia garinii* (39,7%) vor *Borrelia afzelii* (37,1%), *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (15,9%), *Borrelia valaisiana* (6,7%) und *Borrelia lusitaniae* (0,6%)⁸⁹.

Weiter östlich in Russland fand man *Borrelia garinii* in 56,1%, *Borrelia afzelii* in 32,9% der untersuchten Zecken *Ixodes persulcatus*, *Ixodes ricinus* und *Ixodes trianguliceps* sowie in kleinen Säugetieren¹⁶⁸.

Nach dem Stich einer borrelienhaltigen Zecke betrug die Übertragungszeit im Tierexperiment 24 Stunden und mehr¹⁴⁹. Bisherigen Erkenntnissen zufolge, ist in Deutschland nach einem Zeckenstich bei 3–6% der Betroffenen mit einer Infektion (Serokonversion) und in 0,3–1,4% mit einer

manifesten Erkrankung zu rechnen^{162,163}. Der Stich einer borrelienhaltigen Zecke führt bei 20–30% der Betroffenen zur Serokonversion¹⁶³. Die Infektion erfolgt in aller Regel zwischen März und Oktober. Ein Gipfel besteht in den Monaten Juni und Juli¹⁶³.

Als Erregerreservoir gelten kleine Nagetiere und Vögel. Andere Tiere wie Hirsche und Rehe spielen eine Rolle als Wirtstiere für Zecken. Mehrere hundert Wirbeltierspezies können von der Schildzecke *Ixodes ricinus* befallen werden¹⁶³.

1.3.2 Pathogenese

Während der Blutmahlzeit des Überträgers wandert die Spirochäte vom Darm der Zecke in die Speicheldrüsen, von wo aus sie den neuen Wirt befällt¹⁷⁶. Exprimierte *Borrelia burgdorferi* innerhalb der Zecke vornehmlich OspA und OspB so ändert sich dieses Expressionsmuster mit dem Wirtswechsel. Hierbei wird die Expression von OspC hochreguliert, während die von OspA und OspB nachlässt¹⁷⁶.

Nach der Infektion verteilen sich die Bakterien zunächst lokal in der Haut. Zeichen dieser Primärinfektion ist das Erythema migrans (siehe 1.3.4). Von dieser lokalen Infektion können sie sich über Blut- und Lymphbahnen im gesamten Körper ausbreiten¹⁸⁹. So wurden Tage bis Wochen nach Infektion Borrelien in Erythema migrans (EM) Hautläsionen, Blut und Liquor gefunden^{20,22,134,192}, darüber hinaus wurden sie auch in kleinerem Umfang aus Myokard, Retina, Muskel, Knochen, Milz, Leber, Meningen und Gehirn⁵³ isoliert.

Es konnte gezeigt werden, daß der Speichel der Zecken eine Infektion mit *Borrelia burgdorferi* unterstützt. Dieser ist reich an Stoffen, die die Entzündung und die Gerinnungskaskade des Wirtes hemmen. Diese Substanzen können die Immunantwort des Wirtes gegenüber *Borrelia burgdorferi* beeinflussen^{157,158,159}. Ursache ist womöglich eine Abnahme der Produktion von Zytokinen durch den Wirt; so wurden Tiere, denen exogen Zytokine gegeben wurden, weniger häufig durch Zeckenbisse infiziert²¹⁷.

Der Erreger aktiviert das Komplementsystem über den klassischen und den alternativen Weg, ist aber resistent gegenüber dessen bakterizider Wirkung in Abwesenheit von spezifischen Antikörpern⁹⁷. Diese scheinen das

Verhalten des Membranangriffskomplexes zu der Borrelienmembran zu verändern⁹⁸.

Ein weiterer Pathogenitätsfaktor des Erregers bei der Penetration fremden Gewebes ist die Fähigkeit von OspA, humanes Plasminogen zu binden, das dadurch beschleunigt in das proteolytisch aktive Plasmin umgewandelt wird¹⁰². Dadurch ist es in der Lage, Komponenten extrazellulärer Matrices abzubauen⁶¹, was das Eindringen des Erregers vereinfachen könnte¹⁹⁰. Es konnte experimentell gezeigt werden, daß das so gebundene Plasmin Fibronectin spaltet⁶¹. Dieses Protein vermittelt bei Zellen ohne Basalmembran, z.B. Fibroblasten, deren Haftung an Kollagenfasern. Ferner besitzt *Borrelia burgdorferi* die Fähigkeit, an kultivierte Endothelzellen zu binden und diese sowohl durch Passage zwischen den Zellen als auch transzytotisch zu überwinden¹⁰². Auch dies erleichtert die Invasion der Spirochäte in das Wirtsgewebe.

In vitro wurde gezeigt, daß *Borrelia burgdorferi* der Elimination durch Phagozyten widerstehen kann, was die Infektiosität des Erregers erhöht. Auch wenn der genaue Mechanismus noch nicht bekannt ist, wird angenommen, daß die Spirochäte entweder die Anlagerung der Mono- und Phagozyten an das Bakterium oder die Phagozytose selbst inhibiert⁶⁸.

Die Multisysteminfektion kann durch die Fähigkeit von *Borrelia burgdorferi* erklärt werden, sich an viele Säugetierzellklassen anzuheften⁶⁵. Hier scheint es, daß die Erreger in bestimmten Nischen der Gelenke, des Nervensystems oder der Haut persistieren können^{8,170,183}.

1.3.3 Die Immunantwort

Grundsätzlich gibt es zwei Arten der Immunreaktion, die angeborene unspezifische und die erworbene spezifische. Diese stützen sich auf unterschiedliche Mechanismen. Träger der angeborenen Abwehrreaktion sind das Komplementsystem und die phagozytierenden Zellen. Diese erkennen einen Fremdkörper auch ohne vorhergehenden Kontakt und führen zur Aktivierung der spezifischen Abwehr. Diese ist nun spezifisch gegen den Erreger gerichtet. Hier sind besonders die T- und B-Lymphozyten zu nennen. Letztere bilden spezifische Antikörper gegen das Agens. Diese können zur serologischen Diagnostik (siehe 1.5)

herangezogen werden. Die initiale IgM-Antwort wird im Verlauf der Infektion durch IgG-Antikörper abgelöst.

Nach einer Infektion mit *Borrelia burgdorferi* lässt sich nach Ablauf einiger Wochen im peripheren Blut von Patienten eine erhöhte Aktivität mononukleärer Zellen auf *Borrelia burgdorferi*-Antigene nachweisen^{128,182}.

Der Gipfel spezifischer IgM-Antikörper ist hierbei zwischen der 3. und 6. Woche nach Infektion zu finden. Häufig wird dieser begleitet von einer polyklonalen B-Zell-Stimulation mit erhöhtem Gesamt-IgM¹⁹³, zirkulierenden Immunkomplexen⁸⁰ sowie Kryoglobulinen¹⁹³. Dominante Antigene dieser Phase sind das OspC-Protein, p39 und p41¹⁹⁰.

Die spezifische IgG-Antwort entwickelt sich zwischen der 6. und 12. Woche nach Infektion und ist gegen eine wachsende Anzahl von Antigenen²⁰⁸ der Borrelien gerichtet.

Im Folgenden sind häufig nachweisbare Antigenbanden im Immunoblot aufgelistet: p83/100, p75, Heatshockproteine p60, p66 und p73, p41, p39, p37, OspA (31kD), OspB (34kD), OspC (23kD) und p17^{70,166,190}. Die IgG-Antwort gegen die unterschiedlichen Borrelienantigene ist individuell unterschiedlich. In der Regel ist diese noch Jahre nach Erkrankung und Behandlung nachweisbar^{58,171} und bietet in Europa keinen ausreichenden Schutz vor einer Neuinfektion zumindest mit einem anderen Erreger der Lyme Borreliose^{59,71}. Aufgrund der langen Nachweisbarkeit der IgG-Titer, selbst nach adäquater antibiotischer Therapie, sind diese weder als Verlaufsparemeter der Behandlung noch als Prognosefaktor einer chronischen Erkrankung zu werten⁵⁸.

Neben der spezifischen humoralen Immunantwort ist auch eine zelluläre Reaktion zu beobachten. Histologisch zeigen die infizierten Gewebe eine Infiltration von Lymphozyten und Plasmazellen⁵³.

1.3.4 Das Krankheitsbild der Lyme Borreliose

Wie andere Spirochäteninfektionen auch, verläuft die manifeste Infektion mit *Borrelia burgdorferi* in Stadien mit Remissionen und Exazerbationen, die je nach Stadium durch unterschiedliche Symptome gekennzeichnet sind. Die frühe Erkrankung besteht aus einer lokalen Infektion (Stadium 1) gefolgt von einer Verteilung des Erregers im Wirt innerhalb der nächsten

Tage bis Wochen (Stadium 2). Stadium 3, oder die späte Infektion, kann Monate bis Jahre nach Erstmanifestation auftreten.

Die klinische Symptomatik ist sehr variabel und reicht von asymptomatischen Infektionen^{56,136} über eine kurze Beteiligung nur eines Organsystems bis hin zu einer chronischen Multisystemerkrankung¹⁹⁰.

Da die Einteilung der Symptome von verschiedenen Autoren unterschiedlich auf die Stadien verteilt werden, folgt die Arbeit im Weiteren der Einteilung nach Mandell¹⁹⁰.

Stadium 1: Die typische Erstmanifestation ist das Erythema (chronicum) migrans (EM) am Ort des Zeckenstichs. Nach einer Inkubationszeit von 3–32 Tagen¹⁹⁰ entsteht an der Stelle des Zeckenstichs aus einer initialen Papel ein scharf abgegrenztes, sich zentrifugal ausbreitendes Erythem, das zentral oft abbläßt. Das Erythem ist warm bei Berührung, häufig schmerzlos und verschwindet in der Regel nach 3–4 Wochen wieder. Bis zu 25% der Patienten entwickeln aber nicht diese charakteristische Hautmanifestation.

Stadium 2: Zeichen einer generalisierten Infektion können unspezifische Allgemeinerscheinungen wie Fieber, Konjunktivitis, Kopfschmerzen, Myalgien, Arthralgien und Lymphknotenschwellungen sein. Auch kann es zu Hautveränderungen ähnlich dem EM kommen, nur sind diese häufig kleiner und zeigen nicht die Tendenz sich auszubreiten.

Leitsymptom des Stadium 2 in Europa ist die Meningopolyneuritis Garin-Bujadoux-Bannwarth. Wochen bis Monate nach einem Zeckenstich treten brennende radikuläre Schmerzen auf, die häufig in lokaler Beziehung zur Zeckenstichstelle bzw. zum vorangegangenen EM stehen. Während des initialen Schmerzsyndroms werden in über 90% der Fälle asymmetrische und unsystematisch verteilte schlaffe Lähmungen beobachtet. In über 60% der Fälle treten zusätzlich sensible Ausfälle auf. Die neurologischen Ausfälle betreffen in etwa 60% der Fälle Hirnnerven, vorwiegend als ein- oder beidseitige Fazialisparese. Meningitische und enzephalitische Krankheitsbilder sind bei Erwachsenen in Europa relativ selten. Bei Kindern werden vorwiegend meningitische Verläufe oder auch isolierte Fazialis paresen beobachtet. Weitere häufige Symptome sind Müdigkeit und Lethargie der Patienten. Daneben klagen sie über wechselnde Schmerzen der Gelenke, oft ohne Schwellung, der Sehnen, Muskeln oder Knochen.

Typisch ist dabei das phasenhafte Auftreten der Beschwerden, die Stunden bis Tage andauern können, bevor sie verschwinden und gegebenenfalls dort rezidivieren oder an anderer Stelle neu auftreten können. Weiterhin wird über eine milde Hepatitis, generalisierte Lymphadenopathie oder Splenomegalie berichtet¹⁹⁰.

Etwa 5% der unbehandelten Patienten entwickeln eine Beteiligung des Herzens in Form von Myo-, Peri- oder Pankarditis. Diese ist gekennzeichnet durch atrioventrikuläre Überleitungsstörungen bis hin zum vollständigen AV-Block, Veränderungen des S-T-Segments, Vorhofflimmern, ventrikuläre Extrasystolen, Tachykardien, oder selten Kardiomegalie. Ebenso wurden eine eingeschränkte linksventrikuläre Funktion, manifeste Herzinsuffizienz und Synkopen beschrieben. Als relativ seltene Hautmanifestation gilt die Lymphadenosis cutis benigna Bäfverstedt (Borrelien-Lymphozytom). Dabei handelt es sich um einen rötlich-lividen Tumor, der bevorzugt an Ohrläppchen (v.a. bei Kindern), Mamillen oder Skrotum auftritt.

Stadium 3: Manifestationen dieses Stadiums sind die chronische Lyme-Arthritis (LA), die Akrodermatitis chronica atrophicans Herxheimer (ACA) oder chronisch neurologische Manifestationen (NB). Sie treten Monate bis Jahre nach der Infektion auf.

Die Lyme Arthritis ist eine schubweise oder chronisch verlaufende mono- oder oligoartikuläre Arthritis. Am häufigsten sind die Kniegelenke betroffen, danach in abnehmender Häufigkeit Sprung-, Ellenbogen-, Finger-, Zehen- und Handwurzelgelenke sowie Kiefergelenke. Die periodischen Schmerzattacken, die von einer Gelenkschwellung und Erwärmung begleitet sind, können einige Wochen bis Monate dauern. Die einzelnen Attacken werden von Phasen kompletter Remission unterteilt. Ein kleiner Prozentsatz unbehandelter Patienten entwickelt jedoch eine chronische Arthritis, die definiert ist als eine durchgehende Entzündung der Gelenke von mindestens einem Jahr.

Die Akrodermatitis chronica atrophicans ist gekennzeichnet durch ein initial infiltratives Stadium, das zur Atrophie der Haut („zigarettenspapierdünn“) mit livider Verfärbung führt. Die Veränderungen treten bevorzugt an den distalen Streckseiten der Extremitäten auf. Im weiteren Verlauf können

Arthropathien und Polyneuropathien an den betroffenen Extremitätenabschnitten entstehen.

Die häufigste neurologische Manifestation des Stadiums 3 ist die subakute Enzephalopathie, die das Gedächtnis, die Stimmung und/oder den Schlaf der Patienten beeinträchtigen kann. Daneben können Symptome seitens des peripheren Nervensystems auftreten wie z.B. Parästhesien oder spinaler Wurzelschmerz^{77,78,109,110}. Eine sehr seltene Spätmanifestation der Lyme Borreliose ist die chronische Enzephalomyelitis mit Para- und Tetraparesen¹⁶³.

1.3.5 Subspezies und Symptom

Auffällig ist das Auftreten bestimmter Erscheinungsformen der Lyme Borreliose bei Infektion mit einer bestimmten *Borrelia burgdorferi* sensu lato Subspezies. Während aus Erythema migrans-Hautläsionen alle 3 humanpathogenen Unterarten isoliert wurden²⁰⁷, scheint die Lyme Arthritis besonders mit einer Infektion mit *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, die Neuroborreliose mit einer Infektion mit *Borrelia garinii* vor allem Serotyp 4¹¹⁹ und die Akrodermatitis chronica atrophicans mit einer *Borrelia afzelii*-Infektion assoziiert zu sein^{11,13,35,123,140,144,147,150,202,209,214}. Diese Beobachtung wird durch in vitro Experimente, die den Gewebetropismus einzelner Borrelien-Subspezies untersuchen sollten, gestützt, bei denen *Borrelia garinii* Nervengewebe wesentlich effizienter penetrierte als *Borrelia burgdorferi* sensu stricto oder *Borrelia afzelii*²¹⁶.

Die Kenntnis der geographischen Verteilung der drei Subspezies (siehe 1.3.1) der Borrelien erklärt so auch das unterschiedliche Erscheinungsbild der Erkrankung in Europa und Amerika, wo einmal die Neuroborreliose im Vordergrund steht, einmal arthritische Verläufe überwiegen¹⁹⁰.

Stamm	Osp A	Osp C	Vorkommen Anteil (%)	Vektor Besiedlung (%)	Sonstige Wirte	Symptome der Erkrankung
<i>Borrelia burgorferi</i> sensu stricto	Typ 1	B31	USA	<i>Ixodes scapularis</i> & <i>Ixodes pacificus</i> (2–50%)	Säugetiere	EM
		279	(100%)			LA
		Pstm		Vögel	NB	
		B.pac	Europa	<i>Ixodes ricinus</i> (1–7%)		Karditis
		T255	(19%)			
		Pbre	Asien ?	<i>Ixodes persulcatus</i>		
<i>Borrelia afzelii</i>	Typ 2	Pko	Europa	<i>Ixodes ricinus</i> (1–10%)	kleine Säugetiere	EM
		Ple	(27%)			LA
		Plud			ACA	
		PLj7	Asien	<i>Ixodes persulcatus</i>		
<i>Borrelia garinii</i>	Typ 3	PBr	Europa	<i>Ixodes ricinus</i> (2–15%)	kleine Säugetiere	EM
	Typ 4	Pbi	(44%)			LA
	Typ 5	WABSou				NB
	Typ 6	TN			Vögel	
			N34			
	Typ 7	T25	Asien	<i>Ixodes persulcatus</i>		
	Typ 8					
	J1–J9					

Tabelle 1.1 zeigt die drei für diese Studie herangezogenen humanpathogenen Stämme im Zusammenhang. Die fett konturierten Abkürzungen bei den Symptomen der Erkrankung stehen für die besonders mit dieser Subspezies verbundenen Manifestationsformen²⁰⁷. EM: Erythema migrans, LA: Lyme Arthritis, NB: Neuroborreliose, ACA: Akrodermatitis chronica atrophicans

1.4 Die Therapie

Die frühzeitige Entfernung von Zecken innerhalb einiger Stunden schützt weitgehend vor einer Infektion.

Stadium 1: Hier empfiehlt sich Doxycyclin (z.B. Vibramycin 2 x 100mg) oder Erythromycin (3–4 x 500mg) für 7-14 Tage. Ebenso kann man Amoxicillin (4x/d 500mg) verabreichen¹⁷⁹.

Stadium 2 und 3: Hier wird Ceftriaxon (z.B. Rocephin 1–2 x 2 g i.v.) über einen Zeitraum von 21 Tagen gegeben¹⁷⁹.

Arthritische Verlaufsformen sprechen auch gut auf eine orale Therapie mit Doxycyclin an, während die Neuroborreliose eine intravenöse Therapie wie oben beschrieben erfordert¹⁹⁰.

Das Ergebnis einer antibiotischen Behandlung ist in aller Regel exzellent, vor allem in der frühen Phase der Erkrankung⁶⁹. Dennoch zeigen einige Patienten nach durchgemachter Lyme Borreliose Symptome wie Müdigkeit, Athralgien, Myalgien, Kopfschmerzen oder kognitive Defizite, die dem Chronic-Fatigue-Syndrom oder der Fibromyalgie sehr ähneln können. Diese Manifestationen scheinen nicht auf eine antibiotische Therapie anzusprechen^{50,180}.

1.5 Diagnostische Möglichkeiten und ihre Schwächen

Die Diagnose der Lyme Borreliose stützt sich auf die Symptome des Patienten zusammen mit den entsprechenden Laborbefunden²⁰⁷. Hier existieren mehrere Möglichkeiten des Nachweises:

Direkter Nachweis lebender Erreger: Die Kultivierung von Borrelien aus Patientenmaterial ist ätiologisch beweisend, jedoch zeit- und arbeitsaufwendig. Häufig lassen sich die Erreger erst nach mehrwöchiger Bebrütung nachweisen¹⁶³. Ein weiteres Problem hierbei ist die mangelnde Sensitivität, die zwischen 30% und 70% für die Hautbiopsie schwankt⁷ und weniger als 5% für eine Kultur aus Liquor beträgt⁹⁴.

DNA-Nachweis: Die Sensitivität der PCR ist höher als die der Kultur¹⁷⁸, jedoch schließt eine negative PCR eine Infektion nicht aus. Eine Borreliämie besteht nur vorübergehend. In anderen Spezimen können die Spirochäten zum Zeitpunkt der Entnahme evtl. noch nicht oder noch nicht in ausreichender Anzahl vorhanden sein¹⁷¹. Eine positive PCR beweist ebenfalls keine aktive Lyme Borreliose¹⁷¹. Ferner kann die Methode nicht zur Klärung unspezifischer Symptome empfohlen werden, da das Ergebnis der Borrelien-PCR auch bei Patienten mit eindeutiger Neuroborreliose (typische Klinik, entzündlicher Liquor, intrathekale spezifische Antikörpersynthese) in Abhängigkeit von Methode und Krankheitsstadium stark variiert¹⁶¹.

Antikörpernachweis: Für den serologischen Nachweis von Antikörpern stehen Methoden wie ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), Immunfluoreszenztests oder Western blotting zur Verfügung.

Um den heute gängigen Immunoblot mittels eines Borrelientotallysates herzustellen, müssen zuerst die Bakterien angezüchtet werden. Dabei besteht permanente Kontaminationsgefahr der angelegten Borrelienkulturen durch einen schneller proliferierenden Keim, was den gesamten Ansatz zunichte machen kann. Zur Herstellung eines Totallysates werden komplette Bakterien eines *Borrelia burgdorferi* Stammes durch aufkochen in SDS lysiert, denaturiert und mit Ladungsträgern versehen. Danach ist es möglich, die Proteine elektrophoretisch ihrer Größe entsprechend zu separieren. Bei dieser Art des Nachweises ist die geringe Spezifität ein großes Problem^{85,201}. Bei Seren von Patienten mit Lyme Borreliose können mehr als 10 Antigenbanden detektiert werden^{52,114}. Darunter fallen solche Antigene wie die omnipräsenten „Heat-Shock-Proteine“ 60–73kD^{79,112} oder die Flagelle 41kD. Letztere wird sowohl von der Gruppe der Lyme Borreliose verursachenden Borrelien, bei Spirochäten wie *Borrelia hermsii*¹⁸, einer Borrelie der Rückfallfiebergruppe, sowie *Treponema pallidum*, dem Erreger der Syphilis¹¹⁴, exprimiert.

So sind im Wesentlichen vier Probleme des serologischen Nachweises denkbar: Erstens können kreuzreaktive Antikörper zu falsch positiven Testergebnissen führen. Diese sind insbesondere bei anderen Spirochäteninfektionen, anderen bakteriellen Endokarditiden, Epstein-Barr-Virus Infektionen, der rheumatoiden Arthritis oder dem systemischen Lupus Erythematoses nachzuweisen^{115,117}. Zweitens ist die genetische Heterogenität der unterschiedlichen *Borrelia burgdorferi* sensu lato Subspezies zu nennen. Dies gilt vor allem in Europa, wo mindestens 3 pathogene Subspezies mit mindestens 8 verschiedenen OspA bereits dokumentiert sind^{210,214}. Drittens kann die passageabhängig unterschiedliche Expression von Antigenen des Erregers der Lyme Borreliose eine Rolle bei dem schwierigen serologischen Nachweis mittels Borrelien-Totallysat spielen^{2,36,174}. Viertens limitiert die hohe Anzahl seronegativer Patienten – 20–50% wohl in Abhängigkeit vom Stadium der

Erkrankung und der Therapie – die Aussagekraft serologischer Tests^{2,81,85,197}.

Mit den heutigen Methoden lassen sich die in Tabelle 1.2 dargestellten positiven Befunde je nach Stadium und Material erwarten:

Erregernachweis			Antikörpernachweis		
Material	Nachweisrate	Methode	Stadium	seropositiv	IgM/IgG
Haut (EM, ACA)	50–70%	Kultur/PCR	1: lokalisierte Infektion	20–50%	vorwiegend IgM
Liquor (NB)	10–20%	Kultur/PCR	2: disseminierte Infektion	70–90%	vorwiegend IgG
Gelenkpunktat* (LA)	50–70%	PCR (Kultur selten positiv)	3: chronische Infektion	99–100%	in der Regel nur IgG

Tabelle 1.2: Zu erwartende positive Befunde bei der Labordiagnostik einer Lyme Borreliose¹⁶¹

* höhere Sensitivität des Erregernachweises aus Synovialis-Biopsie

In der heutigen Routinediagnostik hat sich ein zweistufiger Antikörpernachweis durchgesetzt.

1. Stufe: ELISA: Falls dieser Test positiv ausfällt folgt

2. Stufe: Immunoblot als Bestätigungstest.

Ein positiver Antikörperbefund gilt nur im Zusammenhang mit entsprechenden klinischen Symptomen als beweisend für eine manifeste Lyme Borreliose.

1.6 Zielsetzung der Arbeit und experimentelle Strategie

Die Probleme des bestehenden Immunoblots aus einem Totallysat mit einer Vielzahl an unspezifischen Banden, deren unklare Zuordnung, kreuzreaktive Antikörper bei einer Reihe anderer Infektionen, sowie die Problematik der Anzucht des Erregers, führten zu dem Bestreben, einen möglichst reliablen serologischen Nachweis der *Borrelia burgdorferi* Infektion zu entwickeln. Ziel war es, einen rekombinanten Immunoblot herzustellen, der sich nur aus den spezifischen Antigenen des Erregers

zusammensetzt. Dieser sollte als Bestätigungstest einer bestehenden Infektion aufgebaut werden.

Dazu war es nötig, sensitive und spezifische *Borrelia burgdorferi* Proteine der drei humanpathogenen Subspezies *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* und *Borrelia afzelii* in *Escherichia coli* rekombinant herzustellen. Voraussetzung war die Anzucht der in Frage kommenden Borrelienspezies *Borrelia burgdorferi* sensu stricto B31, *Borrelia afzelii* pKo und *Borrelia garinii* pBi.

Ihre Proteine wurden hinsichtlich ihrer hydrophilen sowie immunogenen Eigenschaften mittels „Chou Fasman Predictions“⁴¹ auf ihre Eignung zu einem rekombinanten Immunoblot untersucht.

Zu der Auswahl der Abschnitte gehörte die Wahl geeigneter Primer zur gentechnischen Amplifikation dieser Gensequenzen. Nach Vervielfältigung, elektrophoretischer Auftrennung und Reinigung wurden die DNA-Fragmente in einen ersten Amplifikationsvektor ligiert und die Abfolge der Nucleinsäurebausteine mittels Sequenzierung kontrolliert. Um möglichst viel des reinen Fragmentes zu erhalten, wurde *Escherichia coli* damit transfiziert und vermehrt. Nach Präparation des Vektors und dessen Restriktionsverdau konnten die amplifizierten Sequenzen in Expressionsvektoren kloniert werden.

Durch geeignete Restriktionsenzymststellen für KpnI und Sall geschah dies zielgerichtet. Als Fusionsprotein wurde ein Glutathion-S-Transferaseprotein verwendet.

Die Proteine wurden affinitätschromatographisch aufgereinigt und mittels SDS-PAGE hinsichtlich ihrer Größe analysiert.

Für die weitere Arbeit wurde je eines der sieben unterschiedlichen Proteine eines jeden Stammes und p17 aus *Borrelia afzelii* ausgesucht und exemplarisch auf ihre Immunogenität und Verwendbarkeit auf einem Immunoblot getestet.

2 Puffer, Medien und Ansätze

2.1 Bakterienstämme:

Stamm	Quelle
<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto, pKa2	PD Dr. med. Bettina Wilske, Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie, München
<i>Borrelia burgdorferi</i> ssp <i>garinii</i> , pBi	PD Dr. med. Bettina Wilske, Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie, München
<i>Borrelia burgdorferi</i> ssp <i>afzelii</i> , pKo	PD Dr. med. Bettina Wilske, Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie, München
<i>Escherichia coli</i> Top 10 F ⁻ Genotyp: F ⁻ { <i>lacIq</i> , Tn10(Tet ^R)} <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 deoR recA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>) 7697 <i>galU galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen, Groningen, Niederlande

2.2 Nährmedien zur Bakterienanzucht

BSK H Komplettmedium (mit 6% Kaninchenserum)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Luria Bertani Medium (LB-Medium) (1 Liter)	-10g Trypton -5g Hefe-Extrakt -10g NaCl -ddH ₂ O ad 1000ml
LB-Ampicillin-Medium:	-LB-Medium -Ampicillin, Endkonzentration:50μg/ml

Luria Bertani Agarplatten+Ampicillin	-Luria Bertani Medium -15g/l Bacto-Agar -Ampicillin, Endkonzentration: 50µg/ml
Induktionsplatten	-LB-Agarplatten+Ampicillin -40µg/ml X-Gal -0,3mM IPTG
X-Gal Stamm-Lösung	-5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid -2% in Dimethylformamid
SOC-Medium	-2% Trypton -0,5% Hefe-Extrakt -0,05% NaCl -2,5mM KCl -10mM MgCl ₂ -20mM Glukose

2.3 Geräte und Materialien

PCR-Cycler	Primus 96 plus, MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland
Sequenzierer	ABI Prism™ 310Genetic Analyzer, PE Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Bakterienschüttler	New Brunswick, Scientific, Edison, N.J., USA
Sonifizierer	Labsonic 1510, B. Braun, Sheffield, Großbritannien
Kapillarsystem	The Convertible™ Filtration Manifold System, Gibco BRL Technologies, Inc. Gaithersburg, MD, USA
Zentrifugen	- Biofuge A (für Plastikgefäße 1,5ml oder 2ml), Heraeus, Osterode, Deutschland

	- Megafuge 3.0R (für Plastikgefäße bis zu 50ml), Heraeus Osterode, Deutschland
Kühlzentrifuge	Mikro Rapid, Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Taumler	Polymax 20404, Biometra, Göttingen, Deutschland
Filter	Minisart NML (Porengröße:0.2µm), Sartorius, Göttingen, Deutschland
Chromatographie-Säulen	Econo-Pac Disposable Chromatography Columns, Biorad, Hercules, CA, USA
Matrix zur affinitäts-chromatographischen Aufreinigung der Fusionsproteine	Glutathion Sepharose® 4B, Amersham Pharmacia Biotech AB, Freiburg, Deutschland
Blotmembran	Polyvinylidendifluorchlorid (PVDF), Immobilon-P Transfer Membrane, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA
Photometer	DU-62 Spectrophotometer, Beckmann, Hannover, Deutschland
Küvetten	Plastibrand® Einmal-Küvetten 1,5ml, Brand GmbH und Co KG, Wertheim, Deutschland
Pufferpapier	Schleicher & Schuell, Zuschnitte 120*160mm, Dassel, Deutschland
Halbtrocken-Blot	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
IgG-Standard („Behring Protein Standard Serum“) 14g IgG/l	Behring, Marburg, Deutschland
Trockenmilchpulver	Bacto Skim Milk dehydrated, Difco Laboratories, Detroit, USA

Anti-human-IgG	Alkaline Phosphatase conjugated Affini Pure Rabbit Anti-Human IgG (H+L), Dianova, Hamburg, Deutschland
Substrat	Western Blue™ Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase, Promega Corporation, Madison, USA

2.4 Verwendete Kits und Vektoren

2.4.1 Kits

- DyNAzyme™ DNA Polymerase Kit, Biometra, Göttingen, Deutschland
- ABI Prism® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Version 2.0 Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
- TOPO TA Seq Kloning Kit, Invitrogen, Groningen, Niederlande
- GeneClean® II Kit, Bio 101, Inc., Vista, CA, USA
- QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland

2.4.2. Vektoren

- TOPO TA, Invitrogen, Groningen, Niederlande
- pGex2T, Amersham Pharmacia Biotech AB, Freiburg, Deutschland

2.5 Ansätze und Chemikalien

Bradfordreagenz	-100mg Coomassie-blue G250 -in 50ml 95% Ethanol auflösen -100ml 85% Phosphorsäure -ddH ₂ O ad 1000 ml
IPTG Stammlösung	1M Isopropyl-β-D- thiogalactopyranosid in ddH ₂ O
Ethanol	Rotipuran =99,8% p.a., Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland

Methanol	Methanol >99%, Merck Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
Acrylamidmix	30% Acrylamid und 0,8% Bisacrylamid in 100 ml H ₂ O (37,5 :1), Rotiphor 30, Roth, Karlsruhe, Deutschland
10%SDS	10g Natriumdodecylsulfat in 100 ml H ₂ O
10% APS	1g Ammoniumperoxodisulfat in 10 ml H ₂ O
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin

2.6 Elektrophoretische Auftrennungen

2.6.1 Auftrennung von DNA

2%iges NuSieve 3:1 Agarosegel, Biozym, Hameln
 Längenstandard 1: λ -DNA-Marker- Hind III/ Hae III
 Längenstandard 2: pBR322, Hae III

2.6.2 Auftrennung von Proteinen

SDS – PAGE (12%)

Trenngel	H ₂ O	3,3	ml
	30% Acrylamidmix	4,0	ml
	1,5 M Tris pH 8,8	2,5	ml
	10% SDS	0,1	ml
	10% APS	0,1	ml
	TEMED	0,01	ml
Sammelgel	H ₂ O	3,3	ml
	30% Acrylamidmix	0,91	ml
	1,0 M Tris pH 6,8	0,57	ml
	10% SDS	0,046	ml
	10% APS	0,1	ml
	TEMED	0,01	ml

- Längenstandard: 1. Gibco BRL prestained protein molecular weight standards, Life Technologies, Inc., Gaithersburgh, MD, USA
2. Roti®-Mark 10-100 Protein molecular weight marker for SDS-PAGE Roth, Karlsruhe, Deutschland
3. SeeBlue® Pre-Stained Standard, Invitrogen LTD, Paisley, Großbritannien

2.7 Färbungen

2.7.1 Färbung von DNA

Ethidiumbromid 0,1mg/ml ddH₂O unter UV-Licht (304nm)

2.7.2 Färbung von Proteinen

Coomassie-Färbung

Färbelösung	Coomassie Blue R-250	25 mg
(100ml)	Methanol	40 ml
	Eisessig (Essigsäure > 99%)	7 ml
	H ₂ O	53 ml
Entfärbelösung	Eisessig	70 ml
(1l)	Methanol	50 ml
	H ₂ O	880 ml

2.8 Puffer

2.8.1 Puffer für die Arbeit mit DNA

10 X PCR-Puffer	Tris-HCl (pH 8,8)	100 mM
	MgCl ₂	15 mM
	KCl	500 mM
	Triton X-100	1 %
dNTP-Mix	dATP	10 mM
	dGTP	10 mM
	dCTP	10 mM
	TTP	10 mM

KpnI-Puffer (2fach)	TrisHCl (pH 7,5)	20 mM
	MgCl ₂	20 mM
	Dithioerythritol	2 mM
	BSA	500 ng/ml
Sall-Puffer (10fach)	TrisHCl (pH 7,5)	500 mM
	MgCl ₂	100 mM
	NaCl	1000 mM
	Dithioerythritol	10 mM
Ligationspuffer (10fach)	TrisAc (pH 7,9)	330 mM
	Mg(Ac) ₂	100 mM
	KAc	660 mM
	Dithiothreitol	5 mM
	ATP	10 mM

2.8.2 Puffer für die Arbeit mit Proteinen

pGex-Puffer:	1M TrisHCl (pH 7,4)	20 mM
	NaCl	200 mM
	EDTA	1 mM
	in ddH ₂ O	
Elutionspuffer:	ddH ₂ O	47,5 ml
	1M TrisHCl (pH 8)	2,5 ml
	doppelt reduziertes Glutathion	10 mM
Reinigungspuffer:	pGex-Puffer	
	NaCl	3 M
SDS-loading Buffer	Tris-HCl (pH 6,8)	100 mM
	1,4-Dithiotreit (DTT)	200 mM
	SDS	4 %
	Bromphenolblau	0,2 %
	Glycerin	20 %
Laemmli-Puffer	Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan: Tris-base	25 mM
	Glycin	250 mM
	SDS	0,1 %

2.8.3 Puffer zur Herstellung und Durchführung des Immunoblots

Anodenpuffer 1	Tris-HCl (pH 10,4)	300 mM
	Methanol	20 %
Anodenpuffer 2	Tris-HCl (pH 10,4)	25 mM
	Methanol	20 %
Kathodenpuffer	6-Aminohexansäure	40 mM
	TrisHCl (pH 9,4)	25 mM
	Methanol	20 %
TBS-Puffer	TrisHCl (pH 7,4)	20 mM
	NaCl	0,15 M
	in ddH ₂ O	
TBS-T-Puffer	TBS-Puffer	
	Tween 20	0,05 %
Blockpuffer	TBS-T Puffer	
	Trockenmilchpulver	3 %
Konjugat	TBS-T Puffer	100 ml
	Anti-human-IgG	20 µl
	Trockenmilchpulver	1 %

3 Methoden

3.1 Anzucht der Borrelien und deren Ernte

Voraussetzung für die rekombinante Herstellung der gewünschten Proteine war die Anzucht der Borrelien. Die Subspezies wurden aus dem nationalen Referenzlabor für die Lyme Borreliose (Max von Pettenkofer-Institut, München) bezogen.

Die Anzucht erfolgte in einem flüssigen BSK H-Medium. Dafür wurde ein 500µl Aliquot des jeweiligen Stammes in 50ml des Flüssigmediums gegeben und bei 33 C inkubiert. Ab dem fünften Tag wurden täglich 50µl entnommen und im Dunkelfeld mikroskopiert. Bei eindeutiger Zunahme der Bakteriendichte wurde der Inhalt in eine 1l Flasche überführt und nach weiteren 5 Tagen 50µl erneut im Dunkelfeld auf Wachstum kontrolliert. Die Keimzahl wurde als ausreichend angesehen, wenn sich dichte Konglomerate gebildet hatten. Ferner sollte es zu diesem Zeitpunkt zu einer deutlichen Gelbfärbung des Mediums gekommen sein.

Nun konnten die Borrelien entweder in 500µl Aliquots bei -80 C eingefroren, oder zur weiteren Arbeit abzentrifugiert werden.

3.2 Die Arbeit mit DNA

3.2.1 Auswahl spezifisch immunogener *Borrelia burgdorferi* Proteinabschnitte sowie geeigneter Oligonukleotide

Die Auswahl erfolgte anhand der Literatur und der laboreigenen Erfahrung mit dem bereits vorhandenen Totallysat (vgl. 1.5). Dabei wurde allen drei humanpathogenen Subspezies Rechnung getragen. Die Proteine p83/100, p75, p39, p37, OspA, OspC und p17 wurden hinsichtlich ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften mittels eines mathematischen Modells (Chou-Fasman-Prediction⁴¹) untersucht. Besonders die hydrophilen Abschnitte wurden zur Amplifikation ausgesucht. Die genetische Information über die Proteine wurde der European Molecular Biology Laboratory Datenbank (EMBL-Datenbank) entnommen.

Für die PCR wurden konservierte Regionen aller untersuchten *Borrelia burgdorferi* Subspezies für die jeweiligen Proteine gesucht, so daß die verwendeten Oligonukleotide (Primer, Tabelle 3.1) unabhängig von der Subspezies zu einem Amplifikat führten. Lediglich für pKo OspA wurde ein separates Oligonukleotid verwandt. Die sense-Primer wurden mit einer KpnI-Schnittstelle und die antisense-Primer mit einer Sall-Schnittstelle versehen, um das entstehende DNA-Amplifikat später in richtiger Orientierung und im richtigen Leserahmen in die Vektoren klonieren zu können. Zur regelgerechten Translationstermination wurde der Sall-Schnittstelle ein Stopcodons vorangestellt (Stopcodons: TGA, TAG und TAA). Jeweils eines dieser Basentriplets geht der Restriktionsendonukleasenschnittstelle des antisense Primers spiegelverkehrt in komplementärer Basenabfolge voraus (Tabelle 3.1).

Oligonukleotide	Quelle: EMBL	Nukleotide
p100-2 s 5`- <u>CAG GTA CCA</u> GAT GAA GAG CAT-3`		940–951
p100-2 as 5`-CCG <u>TCG ACT</u> TAA TCT TTT TCA CGT TCA TA-3`	bbp100.empro1	1779–1762
p100-1 s5`- <u>AGG TAC CGG</u> ACT TTG TTA ATA TGG AT-3`		214–231
p100-1 as 5`-CCG <u>TCG ACT</u> AAT GCT CTT CAT C-3`?	bbp100.empro1	951–940
p75 s 5`- <u>CGG TAC CAT</u> TCG AAC AAA TG-3`		1592–1604
p75 as 5`-CCG <u>TCG ACT</u> ATT TTT TAT CCT CGT C-3`	bbgrpepls	2602–2586
p39 s 5`- <u>AGG TAC CTG</u> ATG GAA CTT TTG ATG ATA-3`		106–124
p39 as 5`-CCG <u>TCG ACT</u> TAA ATA AAT TCT TTA AGA AA-3`	bbbmpa1.empro1	1020–1000
p37 s 5`- <u>AGG TAC CTT</u> GTA AAT TAT ATG AAA-3`		58–73
p37 as 5`-CCG <u>TCG ACT</u> TAT CTA GAG TCC ATA TCT TG-3`	u82106	999–979
ospA s 5`- <u>AGG TAC CAA</u> TAG CAT GTA AGC AAA A-3`		41–60
ospA as 5`-CCG <u>TCG ACT</u> TAA TTT GAG TCG TAT TGT TG-3`	bbpkaopsa	753–736
ospA s 5`-CCG <u>GTA CCT</u> TTG CCT GGT GAA ATG A-3` (pKo)		99–115
ospA as 5`-CCG <u>TCG ACT</u> TAA GTG CCT GAA TTC CA-3` (pKo)	bbpkaopsa	660–646
ospC s 5`- <u>AGG TAC CAT</u> TTA TAT CTT GTA ATA A-3`		47–62
ospC as 5`-CCG <u>TCG ACT</u> TAA GGT TTT TTT GGA CTT TC-3`	bbpkaospc	631–613
p17 s 5`- <u>AGG TAC CTA</u> TTA CAT TTA AAG AAA-3`		220–235
p17 as 5`-CCG <u>TCG ACT</u> TAT TTT TGA TTT TTA GTT TG-3`	baf131967	450–433

Tabelle 3.1: Liste der verwandten Oligonukleotide. Unterstrichen sind die Restriktionsenzymststellen, für sense-Primer (s) Kpn I: GGTACC und für antisense-Primer (as) Sal I: GTCGAC. Fett sind die Stopcodons dargestellt. Aufgrund der späteren Orientierung im Vektor und der Umsetzung primär in mRNA ist die Basenabfolge spiegelverkehrt und komplementär.

3.2.2 Nukleinsäureextraktion

Nach erfolgreicher Borrelienernte wurden 1,2 ml einer Kultur bei 6.000g für 5 Minuten abzentrifugiert und der Überstand abpipettiert.

Daran schloß sich die Elution mittels des Quiagen Spin Miniprep Kit gemäß Angaben des Herstellers an. Alle hier angegebenen Puffer sind im Kit enthalten.

Zuerst wurde das Pellet in 250µl Puffer 1 resuspendiert. Dazu kamen dann 250µl Puffer 2. Der Ansatz wurde durch leichtes Schwenken vermischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wurden 350µl Puffer N3 dazu pipettiert und alles zusammen bei 6.000g für 5 Minuten abzentrifugiert.

Nach Inkubation für 5 Minuten auf Eis folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 6.000g und 4°C.

Der Überstand wurde abpipettiert und auf die im Kit enthaltenen Säulen gegeben. Diese wurden daraufhin für 2 Minuten bei 6.000g abzentrifugiert und die überschüssige Flüssigkeit verworfen.

Dann wurden 500µl des Puffers PB auf die Säulen pipettiert und erneut für 2 Minuten wie oben zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde verworfen und erneut mit 750µl des Puffers PB gewaschen. Jetzt folgten zwei Zentrifugationen für jeweils 2 Minuten bei 6.000g, nach denen jeweils die überschüssige Flüssigkeit verworfen wurde.

Die so aufgereinigte DNA wurde mit 80µl ddH₂O eluiert.

3.2.3 PCR

Der Ansatz einer PCR-Probe erfolgte gemäß der Tabelle 3.2. Zu jedem dieser Ansätze kamen jeweils 5µl der zu untersuchenden Nukleinsäure.

ddH ₂ O	10 X PCR-Puffer	dNTP Mix (jedes Nukleotid:10mM)	sense-Primer (10pmol/µl)	antisense-Primer (10pmol/µl)	DNA-Polymerase (5U/µl)
34,5µl	5µl	1µl	2µl	2µl	0,5µl

Tabelle 3.2: Ansatz einer PCR-Probe. Zu jedem kamen noch 5µl der zu untersuchenden DNA. Die hitzestabile DNA-Polymerase stammt von einem *Thermus brockianus* Bakterienstamm.

Die initiale Denaturierung erfolgte bei 95°C für 2 Minuten. Die Zeiten und Temperaturen der 35 sich daran anschließenden Zyklen sind Tabelle 3.3 zu entnehmen.

Phasen	Denaturierung	Primer-Anlagerung	Extension
Temperaturen	95°C	55°C	72°C
Zeiten	30s	45s	90s

Tabelle 3.3: Zeiten und Temperaturen der jeweils 35 PCR-Zyklen.

Eine finale Extension erfolgte bei 72°C für 8 Minuten.

3.2.4 Elektrophoretische Auftrennung

Das PCR-Produkt wurde in einem 2%igen NuSieve 3:1 Agarosegel für 2 Stunden bei 95V elektrophoretisch aufgetrennt, mit 0,1‰ Ethidiumbromidlösung gefärbt und unter UV-Licht bei 304nm detektiert, dokumentiert und die spezifische Bande ausgeschnitten. Wenn nicht anders angegeben erfolgten alle elektrophoretischen Auftrennungen von DNA ebenso.

3.2.5 Nukleinsäureaufreinigung aus dem Agarosegel

Zur Elution der DNA-Banden aus dem Agarosegelblock wurde das Gene Clean Kit gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Alle hier genannten Reagenzien entstammen dem Kit.

Dazu wurde zu dem ausgeschnittenen Gelstück 100µl TBE-Modifier und 900µl 4M-Natriumiodid pipettiert und dieses Gemisch dann bei 55°C in ein Wasserbad gestellt, bis das Gelstück sich aufgelöst hatte (max. 5 Minuten). Dann wurden 5µl Glasmilch dazu gegeben. Nach leichtem Schütteln wurde dieses dann für 2 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 6000g für 30 Sekunden. Wenn nicht anders angegeben erfolgten alle Zentrifugationen bei Raumtemperatur.

Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet drei mal mit jeweils 700µl der im Kit enthaltenen Waschlösung gewaschen. Vor jeder erneuten Zentrifugation wurde das Pellet resuspendiert und der Überstand nach Zentrifugation bei 6.000g für 30 Sekunden verworfen.

Nach Abschluß des letzten Waschschrilles wurde das Pellet in 10µl ddH₂O-Wasser aufgenommen und bei 55°C im Wasserbad 5 Minuten inkubiert. Es schloß sich eine Zentrifugation bei 6.000g für 30 Sekunden an 2µl bzw. 1µl des Überstandes mit darin enthaltener DNA wurden für die Sequenzierung bzw. die Ligation benutzt.

3.2.6 Sequenzierung

Zur Sequenzierung wurde das ABI Prism® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Version 2.0 eingesetzt. Die einzelnen Proben wurden gemäß Tabelle 3.4 zusammenpipettiert.

ddH ₂ O	Terminator Ready Reaction Mix	Primer (5pmol/µl)	Probe
13µl	4µl	1µl	2µl

Tabelle 3.4: Zusammensetzung einer Sequenzierungsprobe

Um die jeweilige Probe vom 5` und vom 3`-Ende zu sequenzieren, kam zu jeder entweder der sense-Primer oder der antisense-Primer hinzu. Die Sequenzierungsreaktion erfolgte mittels PCR. Die Zeiten und Temperaturen der sich anschließenden 25 Zyklen sind Tabelle 3.5 zu entnehmen.

Phasen	Denaturierung	Anlagerung	Extension
Temperaturen	95°C	55°C	60°C
Zeiten	30s	30s	4min

Tabelle 3.5: Zeiten und Temperaturen der jeweils 25 Sequenzierungs-PCR-Zyklen

3.2.7 Ligation in TOPO-TA

Das TOPO-TA Seq Kloning Kit wurde zur Ligation der PCR-Amplifikate in den Vektor TOPO TA nach Angaben des Herstellers gebraucht.

Dazu wurde 1µl der präparierten DNA zu 1µl der im Kit enthaltenen Salzlösung, 1µl des TOPO® Vektors und 2µl ddH₂O pipettiert. Nach Mischen wurde der Ansatz für 5 Minuten bei Raumtemperatur (22–23°C) inkubiert.

3.2.8 Klonierung

2µl des Ligationsansatzes aus 3.2.7 wurden zu 50µl chemisch kompetenter *Escherichia coli* Top 10 F` gegeben und für 15 Minuten auf Eis belassen. Anschließend wurde der Ansatz 45 Sekunden lang in 42°C warmem Wasser inkubiert und dann erneut 2 Minuten auf Eis belassen. Danach wurden die *Escherichia coli* Stämme im Wasserbad eine Stunde bei 37°C in 350µl SOC-Medium inkubiert und davon 200µl auf einer LB-Ampicillin-Platte ausplattiert. Diese wurde übernacht bei 37°C in einen Brutschrank gestellt und auf Wachstum kontrolliert. Bei erfolgreicher Transformation waren mehr als 30 Bakterienkolonien auf der Agarplatte zu sehen.

3.2.9 Plasmidreinigung

Zur Aufreinigung der Plasmide wurden 1,2ml einer Übernachtskultur aus dem Schritt 3.2.8 bei 6.000g für 5 Minuten abzentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Wenn nicht anders angegeben erfolgten Ansatz und Induktion (s.u.) einer Übernachtskultur immer bei 37°C und 225rpm in einem Bakterenschüttler.

Daran schloß sich die Elution mittels des Quiagen Spin Miniprep Kit gemäß Angaben des Herstellers an. Alle hier angegebenen Puffer sind im Kit enthalten.

Zuerst wurde das Pellet in 250µl Puffer 1 resuspendiert. Dazu kamen dann 250µl Puffer 2. Der Ansatz wurde durch leichtes Schwenken vermischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wurden 350µl Puffer N3 dazu pipettiert und alles zusammen bei 6.000g für 5 Minuten abzentrifugiert.

Nach Inkubation für 5 Minuten auf Eis folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 6.000g und 4°C.

Der Überstand wurde abpipettiert und auf die im Kit enthaltenen Säulen gegeben. Diese wurden daraufhin für 2 Minuten bei 6.000g abzentrifugiert und die überschüssige Flüssigkeit verworfen.

Dann wurden 500µl des Puffers PB auf die Säulen pipettiert und erneut für 2 Minuten wie oben zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde verworfen und erneut mit 750µl des Puffers PB gewaschen.

Jetzt folgten zwei Zentrifugationen für jeweils 2 Minuten bei 6.000g, nach denen jeweils die überschüssige Flüssigkeit verworfen wurde.

Die so aufgereinigte DNA wurde mit 80µl ddH₂O eluiert.

3.2.10 Restriktionsenzymverdau

Für die Restriktionsenzymanalyse und den Nachweis der inserierten *Borrelia burgdorferi* Genomabschnitte wurden 10µl der eluierten DNA aus Schritt 3.2.9 mit 10µl des 2fach Kpn I-Puffers vermischt. Nach Inkubation für eine Stunde bei 37°C wurde für Sall umgepuffert, so daß die Konzentrationen dem Einfachpuffer für Sall entsprachen. Anschließend wurde mit dem Enzym Sall eine weitere Stunde bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Denaturierung der Enzyme erfolgte bei 90°C für 5 Minuten. Danach wurden die Proben 2 Minuten auf Eis gestellt, bevor die DNA mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und gemäß Punkt 3.2.5 präpariert wurde.

3.2.11 Ligation in pGex

Von der in Punkt 3.2.9 und 3.2.10 präparierten DNA wurde 1µl in 7µl ddH₂O verdünnt. Dazu wurde 1µl pGex-Vektor (Konz.: 20ng/µl) KpnI und Sall vorgeschnitten pipettiert.

Dann folgten 1µl 10fach Ligationspuffer und 1µl T-4-Ligase (Konz.: 1Unit/Probe) bevor der Ansatz bei 16°C für 2 Stunden inkubiert wurde. Die erneute Transfizierung von *Escherichia coli* Top F⁻ erfolgte wie unter Punkt 3.2.8 beschrieben.

3.3 Die Arbeit mit Proteinen

3.3.1 Proteinexpression in *Escherichia coli*

3.3.1.1 Kontrolle der Proteinexpression

Um Kontamination zu vermeiden, wurde mit Handschuhen gearbeitet. Die Arbeit mit Proteinen erfolgte, wenn nicht anders angegeben, immer auf Eis. Zuerst wurde eine Übernachtskultur einzelner Klone von der LB-Ampicillin-Platte in 3ml LB-Ampicillin-Medium angelegt. Von dieser Übernachtskultur wurden 500µl in 2,5ml LB-Ampicillin-Medium überführt

und durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,3mM) für 3 Stunden bei 37°C und 225rpm induziert.

Danach wurden 1,2ml bei 13.000g abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 100µl ddH₂O resuspendiert. Von dieser Resuspension wurden 10µl mit 10µl SDS-loading Buffer vermischt und 5 Minuten bei 95°C erhitzt. 15µl des Ansatzes wurden zur Auftrennung der Proteine für 90 Minuten bei 20mA auf ein SDS-PAGE gegeben.

Anschließend folgte eine Coomassiefärbung. Dazu wurde das Gel 15 Minuten in die Coomassiefärbelösung und anschließend 2 Stunden in die Entfärbelösung gegeben.

Ein definierter Proteinlängenstandard wurde bei jeder Elektrophorese mitgeführt.

Es folgten die Dokumentation und Auswahl der Stämme, die ein Fusionsprotein von vorausberechneter Größe aufwiesen.

3.3.1.2 Großansatz

Die ausgewählten Klone wurden übernacht in 5ml LB-Ampicillin-Medium vermehrt. Diese wurden dann zu 45ml LB-Ampicillin-Medium gegeben und für 1 Stunde bei 37°C und 225rpm inkubiert. Die Induktion erfolgte hierauf für 3 Stunden mit IPTG (Endkonzentration 0,3mM).

Danach wurde der Großansatz in der Megafuge 3.0R bei 4°C und 1.500g 10 Minuten lang abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 5ml Gex-Puffer resuspendiert.

Die anschließende Sonifizierung erfolgte in 6 Zyklen, in denen die Kulturen jeweils einer Leistung von 100 Watt für 30 Sekunden ausgesetzt und dann 45 Sekunden auf Eis gestellt wurden.

Danach wurden sie für 10 Minuten bei 13.000g in einer Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde dann in eine 10ml Spritze aufgenommen und durch einen 0,2µm-Filter gereinigt.

3.3.2 Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie

Das p-Gex-Fusionsprotein besitzt am n-terminalen Ende eine Glutathion-S-Transferase, welche spezifisch an die Glutathionmatrix bindet und kompetitiv durch Gabe von Glutathion wieder aus dieser Bindung verdrängt werden kann.

Um 2ml der Glutathion Matrix pro Protein zu erlangen, wurden 4ml des 50%igen Matrix-Alkoholgemisches in eine Säule umgefüllt. Diese wurde daraufhin dreimal mit 10ml Gex-Puffer gespült. Danach wurden 2,5ml einer sonifizierten Bakteriencharge zweimal über die Säule gegeben.

Es schlossen sich drei Waschschrirte mit jeweils 20ml Gex-Puffer an. Zum Nachweis von Protein im Eluat wurde ein Bradford-Assay²⁷ verwandt. Diese Reagenz durchläuft nach Zugabe von Protein (ca. 1µg) eine sichtbare Farbänderung von braun nach blau (vgl 3.3.4).

Zuerst wurde der Erfolg der ersten Waschrirte mit dem Assay überprüft, d.h. 0,6ml der Bradford-Reagenz sollten sich nach 3 Tropfen der Waschlösung nicht mehr verfärben.

Eluiert wurden die Fusionsproteine mittels 5ml des Elutionspuffers, wobei Zeitpunkt und Dauer des Auffangens durch erneute Kontrolle mittels Bradford-Assay bestimmt wurden.

Das Eluat wurde dann per SDS-PAGE auf Erfolg der Elution und das richtige Molekulargewicht der Probe hin überprüft, aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

Vor erneutem Gebrauch wurden die Säulen mit 20ml Reinigungspuffer (3M NaCl) gesäubert und zweimal mit 20ml GEX-Puffer gespült.

3.3.3 Größenbestimmung der Fusionsproteine

Zur Kontrolle der Fusionsproteingröße wurde ein Diagramm (Diagramm 4.1) angefertigt, bei dem die Größe der Proteine in kD der Laufstrecke in cm gegenübergestellt wurde. Die Standardlängenkurve wurde mittels eines ungefärbten Proteinmarkers (Roti Mark 10-100) erstellt. Nach Messen der Laufstrecke der eluierten Fusionsproteine konnte deren Größe in Kilodalton dem Diagramm entnommen werden.

Zur Kontrolle der Ergebnisse wurden die graphisch ermittelten Werte den errechneten gegenüber gestellt. Diesen lag folgende Formel zugrunde:

$$(x[b]/3*111[D])+26kD$$

Dabei steht x für die Anzahl der Basen und 111D entspricht dem mittleren Aminosäurenmolekulargewicht. 26kD entspricht dem Molekulargewicht des Glutathiontransferaseproteins (GST) ohne Insert.

3.3.4 Bradford-Assay-Proteinchargen-Quantifizierung

Grundlage dieser Methode sind Absorptionsmessungen. Der Farbumschlag der Bradford-Reagenz (vgl. 3.3.2) kann photometrisch bei 595nm bestimmt werden. Da die Proteinkonzentration mit der Farbveränderung korreliert (Diagramm 4.2) lässt sich mittels Absorptionsmessungen bekannter Proteinkonzentrationen eine Standardkurve erstellen. Dazu wurden 0,5 mg/ml bovines Serumalbumin (BSA) mit 0,2M NaCl ddH₂O und Bradford-Reagenz ²⁷ gemäß der Tabelle 3.6 verdünnt.

Anzahl der Proben	NaCl-Lösung [μ l]	BSA [μ l]	Bradford-Reagenz [ml]
1	100	-	1
2	95	5	1
2	90	10	1
2	85	15	1
2	80	20	1

Tabelle 3.6 Zusammensetzung der Proben zur Erstellung einer Absorptionsstandardkurve

Diese Verdünnungen wurden bei Raumtemperatur 2 Minuten lang inkubiert und dann bei $\lambda = 595\text{nm}$ vermessen. Die daraus resultierenden Werte wurden in ein Diagramm übertragen (vgl Diagramm 4.2), in dem die Extinktion der Proteinmenge gegenüber gestellt wurde. Die Proteinchargen wurden daraufhin ebenso verdünnt und vermessen, bis die photometrisch gewonnenen Werte in dem Bereich lagen, der von der Standardkurve abgedeckt wurde, die Proteinkonzentration abgelesen und dann der Proteingehalt in mg/ml errechnet.

3.4 Auswahl der Seren

Für den halbtrocken hergestellten Immunoblot wurden 25 Proben der institutseigenen Serenbank entnommen und getestet. Davon waren 9 mittels des bereits bestehenden Testverfahrens als aktive Infektionen diagnostiziert worden. 12 weitere Seren wurden entweder rein negativ, oder als Seronarbe klassifiziert. Von den 4 getesteten Liquorproben ließen sich bei einem im herkömmlichen Verfahren Antikörper nachweisen.

3.5 Der Immunoblot

3.5.1 Herstellung

Als nächster Schritt folgte die Herstellung des Immunoblots in der „halbtrocken“-Technik.

Zuerst wurden die Proteine mittels SDS-PAGE bei 30mA/Gel aufgetrennt. Dabei wurden diese zeitlich versetzt aufgetragen, nachdem sie zuvor mit der selben Menge an SDS Loading-Buffer bei 95°C für 5 Minuten erhitzt worden waren. Die Konzentrationen der einzelnen Proteine pro Gel sind Tabelle 3.7 zu entnehmen. Begonnen wurde mit einer Mischung der Proteine p17 und OspC von *Borrelia afzelii*, pKo. Dem Gemisch folgten 15 Minuten später OspA von pKa und p37 von pBi. Nach weiteren 15 Minuten wurde p39 aufgetragen, 25 Minuten später dann p75, beide von *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, pKa. Nach weiteren 15 Minuten wurden die Proteine p100-1 (pKa) und p100-2 (pKo) als Gemisch zugefügt und 30 Minuten lang aufgetrennt, bevor 0,15µg des IgG-Standards für 5 Minuten auf das Gel aufgetragen wurden.

Subspezies	pKo	pka	pKa	pKa	pBi	pKo	pKo	pKo
Protein	p100-2	p100-1	p75	p39	p37	OspA	OspC	p17
Aufgetragene [µl]/Gel	20	15	10	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
[µg] Protein pro Gel	4,45	1,31	1,65	0,79	1,44	1,84	2,08	1,89

Tabelle 3.7 zeigt die Mikroliter der halbtrocken gebloteten Proteine. Weiterhin sind hier die aufgetragenen Proteinmengen in µg/Gel zu entnehmen. Jedes Gel wurde jeweils nur einmal auf ein Papier geblottet. Aus einem Blotpapier konnten ca. 15 Blots gefertigt werden.

Die PVDF-Membran wurde auf die Maße 6*9cm zurecht geschnitten und 10 Sekunden in Methanol geschwenkt, bevor sie dann 2–3 Minuten in doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) gewaschen wurde.

Das Pufferpapier wurde ebenso zurecht geschnitten und in zwei Päckchen à 6 Blatt und eines à 3 Blatt zusammengelegt. Ein 6er Päckchen wurde im Anodenpuffer 1, das andere im Kathodenpuffer getränkt. Das 3er Päckchen wurde solange im Anodenpuffer 2 belassen, bis es ebenfalls gänzlich durchnässt war.

Die Elektroden wurden mit ddH₂O angefeuchtet und die beiden Anodenpäckchen so auf die Anode geschichtet, daß das 6er Anodenpäckchen auf ihr zu liegen kam. Hierbei und bei allen folgenden Arbeitsschritten war darauf zu achten, daß keine Luftblasen entstanden. Darauf wurde dann das 3er-Päckchen geschichtet. Auf diesen Papierstapel wurde nun die PVDF-Membran gelegt. Darauf wurde das ungefärbte SDS-Gel geschichtet, dem die Kathodenblätter und die Kathode folgten. Nach Verschluss der Blotkammer wurden die Proteine bei 20mA/Gel für 1,5 Stunden auf die PVDF-Membran geblottet. Die Lagerung der Membranen erfolgte eingeschweißt bei 4°C im Kühlschrank bis zur Inkubation mit den Patientenseren.

Jedes Gel wurde nur einmal geblottet. Jedes Blotpapier konnte in ca. 15 einzelne Blotstreifen geschnitten werden.

3.5.2 Durchführung

Um unspezifische Bindung von Proteinen an der Membran zu verhindern, wurde diese 30 Minuten in 1ml Blockpuffer auf dem Taumler bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 20µl des zu testenden Serums dazu pipettiert und 30 Minuten auf einem Taumler inkubiert. Es schlossen sich 3 Waschschrte mit jeweils 2ml TBS-T für jeweils 5 Minuten an.

Danach wurde der Blot für 30 Minuten mit 1,5ml des Konjugates (Antihuman-IgG-alkalische Phosphatase) auf dem Taumler inkubiert, worauf 2 Waschschrte mit 2ml TBS-T und einer mit 2ml TBS-Puffer für jeweils 5 Minuten folgten.

Zur Entwicklung des Blots wurde dieser mit 1,5ml des Substrats inkubiert. Die Entwicklungszeit richtete sich nach der Intensität des IgG-Standards.

Das Substrat wurde abgegossen, dreimal mit H₂O gespült und in diesem dann 30 Minuten auf dem Taumler belassen. Der Blotstreifen wurde in Folie eingeschweißt, ausgewertet und archiviert.

3.5.3 Auswertung

Zur Auswertung der Ergebnisse wurden die sichtbaren Banden eingeteilt in solche mit starker Intensitätsmenge, mit „+“ markiert, mit mittlerer, mit „(+“ bezeichnet, oder als negativ gewertet, mit „/“ markiert. Es wurden positive und negative Seren im rekombinanten Immunoblot gegenüber gestellt, sowie der neue mit dem bereits existenten Immunoblot auf Basis eines Totallysates verglichen. Um eine Aussage bezüglich des Krankheitsstadiums zu machen, wurde das Proteinbandenmuster näher in Betracht genommen (vgl 4.5.2.3).

4 Ergebnis

4.1 Auswahl spezifisch immunogener *Borrelia burgdorferi* Proteine

Wie eingangs erwähnt, wurden folgende Proteine ausgewählt: p83/100, p75, p39, p37, OspA, OspC und p17, letzteres nur von *Borrelia afzelii*, pKo. Grundlagen waren zum einen die Literatur (vgl.1.3.3), zum anderen die laboreigene Erfahrung mit dem bereits vorhandenen Totallysat (vgl.1.5).

4.2 DNA

4.2.1 Auswahl geeigneter Abschnitte dieser Antigene

Um geeignete Abschnitte der Proteine zur Amplifikation herauszusuchen, wurden sie mittels einer Chou-Fasman-Prediction⁴¹ untersucht. Dies ist ein mathematisches Modell, mit dem sich Aminosäureabfolgen hinsichtlich ihrer hydrophilen und hydrophoben Eigenschaften vorausberechnen lassen. Abbildung 4.1 zeigt exemplarisch so eine Vorhersage für das *Borrelia burgdorferi* Protein OspC. Dabei liegt der amplifizierte Anteil zwischen den Pfeilen. Man sieht rautenförmig rot hydrophobe Anteile. Achteckig grün eingefasst sind dagegen stärker hydrophile Bereiche, welche besonders zur rekombinanten Herstellung ausgesucht wurden.

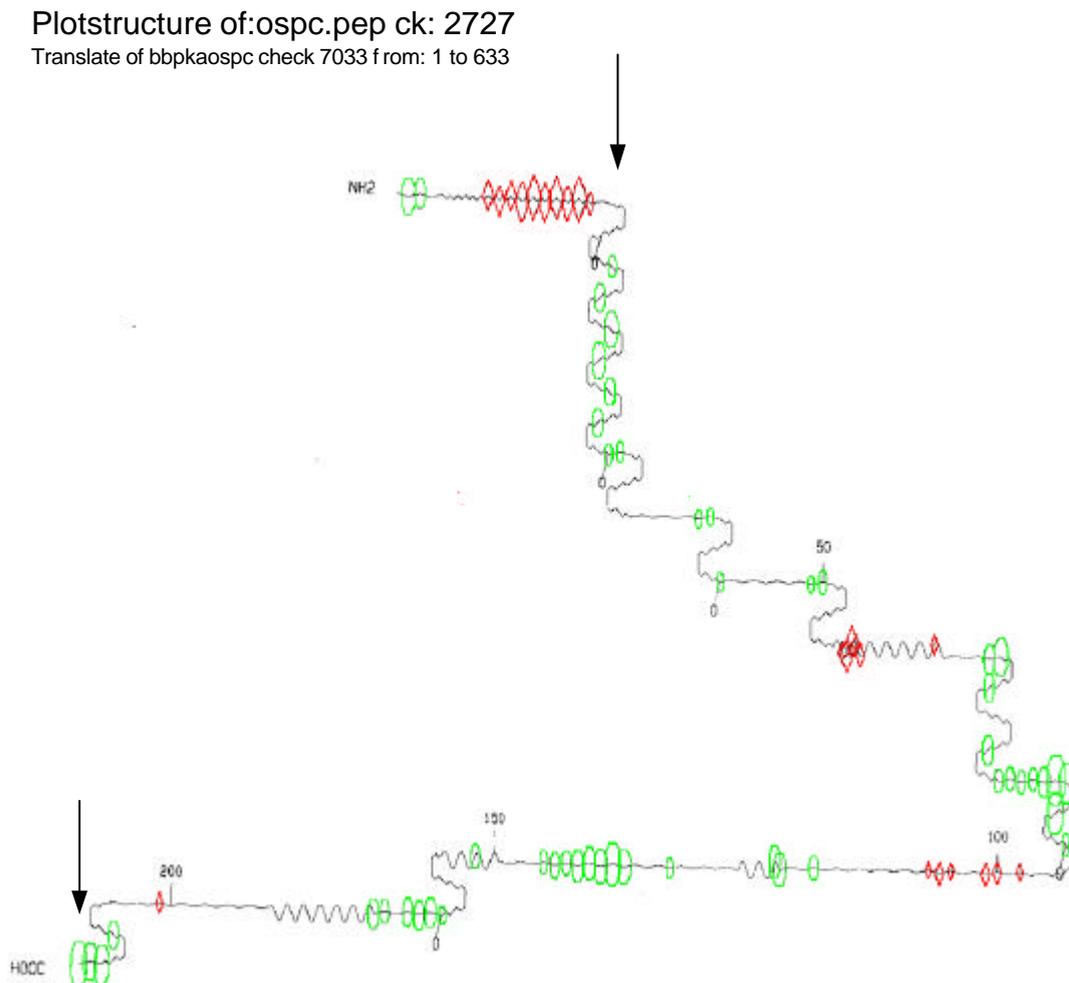


Abbildung 4.1 zeigt eine Chou-Fasman Vorhersage für das Protein OspC. Rot eingefärbt sind die hydrophoben, grün dagegen die hydrophilen Anteile des Proteins. Der zwischen den Pfeilen liegende Bereich wurde rekombinant amplifiziert

4.2.2 Auswahl geeigneter Oligonukleotide

Die Oligonukleotide zur gentechnischen Amplifikation dieser Abschnitte sind im Methodenteil dieser Arbeit im einzelnen aufgeführt (vgl. 3.2.1).

4.2.3 Elektrophoretische Auftrennung und Größenbestimmung der amplifizierten Genomabschnitte

Nach PCR konnten die amplifizierten Fragmente in einem 2% NuSieve 3:1 Agarosegel nach Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht dargestellt werden. Abb 4.2 zeigt so eine Darstellung der Amplifikationsprodukte von *Borrelia afzelii*, pKo. Von links nach rechts sind das die beiden Größenstandarte, p100-2, p100-1, p75, p37, p39, ospA, ospC, p17 und

erneut die Längenstandarte. Ebenso ließen sich die gentechnisch amplifizierten Nukleotidsequenzen der anderen Proteine nachweisen. Aufgrund des mitgelaufenen DNA-Größenmarkers konnte die Größe der propagierten Sequenzen abgeschätzt werden. Tabelle 4.1 stellt die zu erwartenden Werte den durch Sequenzierung ermittelten gegenüber.

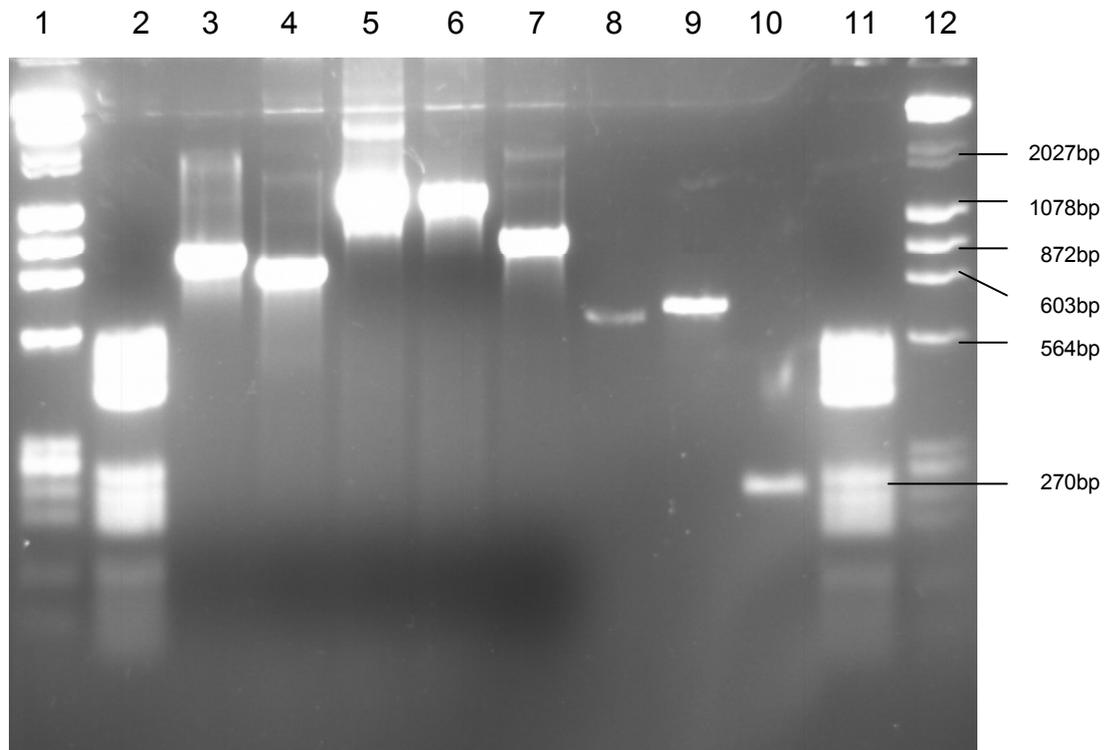


Abbildung 4.2: Ethidiumbromid gefärbtes 2% NuSieve 3:1 Agarosegel, 1: Größenstandard (λ -DNA-Marker- Hind III/Hae III); 2:Größenstandard (pBR322/Hae III); 3: p100-2; 4: p100-1; 5: p75; 6: p37; 7: p39; 8: ospA; 9: ospC; 10: p17; 11: Größenstandard (pBR 322 Hae III), 12: Größenstandard (λ -DNA-Marker- Hind III/Hae III).

Genomabschnitt	p100- 2	p100- 1	p75	p39	p37	ospA	ospC	p17
errechnete Größe [bp]	839	737	1010	914	941	561	584	230
Durch Sequenzierung ermittelte Größe [bp]	844	740	1024	914	944	577	610	230

Tabelle 4.1: Gegenüberstellung der errechneten Kilobasenpaare der einzelnen Proteinfragmente zu den mittels Sequenzierung nachgewiesenen.

4.2.4 Sequenzierung

Zur Kontrolle der genetischen Information wurden die Amplifikate sequenziert. Abbildung 4.3 zeigt exemplarisch einen Teil des p37-Fragmentes des Bakteriums *Borrelia garinii*, pBi. Die größten Unterschiede in den Sequenzabfolgen ließen sich zwischen den Subspezies pKa und pKo nachweisen. Tabelle 4.2 stellt die Homologie der beiden Subspezies dar.

	p100-2	p100-1	p75	p39	p37	ospA	ospC
pKo/pKa [%]	86,3	93,1	94,9	90,9	99,6	81,3	79,6

Tabelle 4.2: Homologievergleich der Basenabfolge zwischen *Borrelia afzelii*, pKo und *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, pKa.

Die Basenabfolgen der Proteine von *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, pKa: p100-1, p75 und p39, von *Borrelia afzelii*, pKo: p100-2, osp A, ospC und p17 und von *Borrelia garinii*, pBi: p37, sind dem Anhang zu entnehmen.

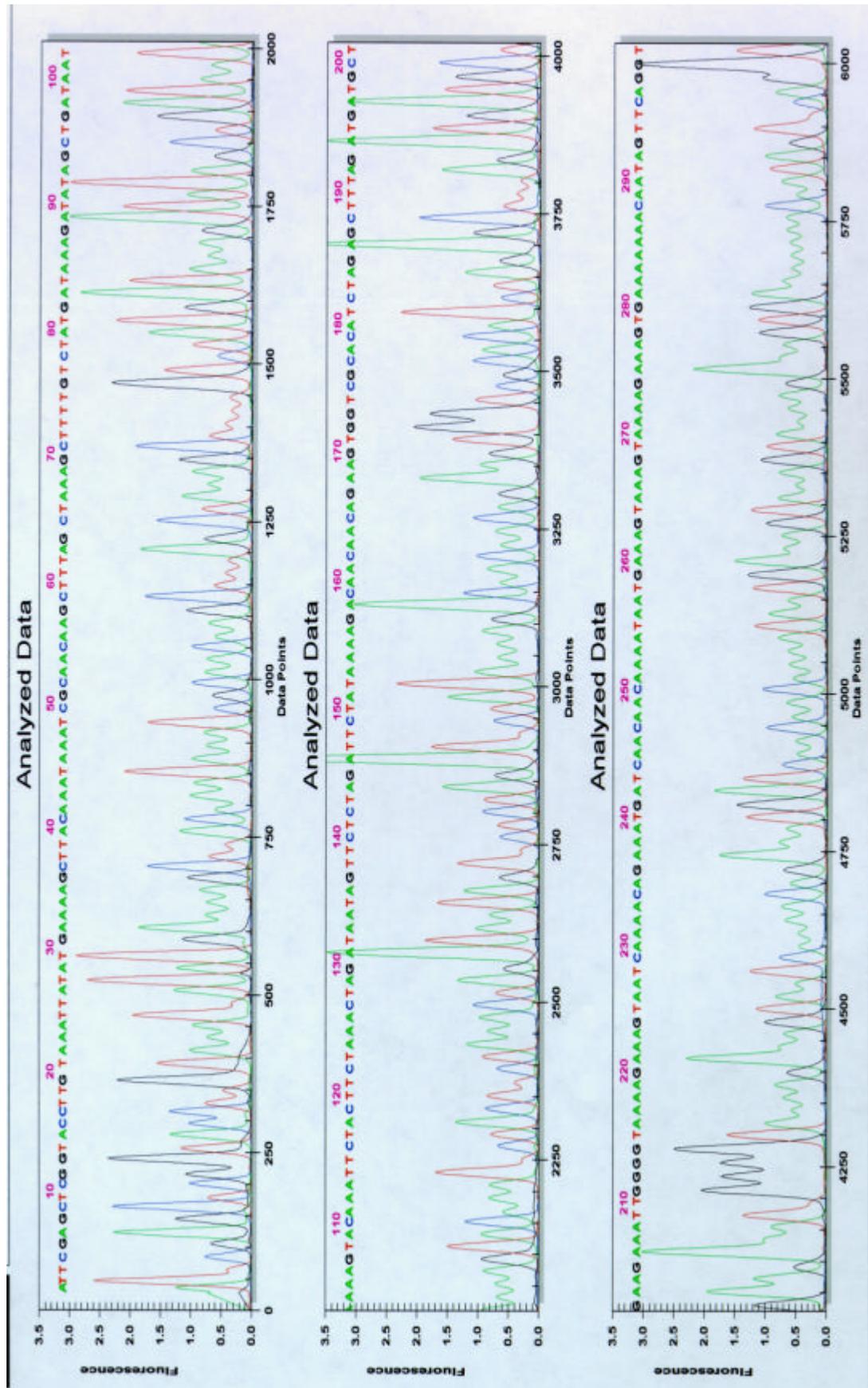


Abbildung 4.3: Ausschnitt der Sequenzierung des Proteins p37 von *Borrellia garinii*, pBi

4.3 Proteine

4.3.1 Suche und Kontrolle geeigneter Klone

Um einen Nachweis über die erfolgreiche Ligation und Expression des rekombinanten Borrelienproteins in pGex zu erhalten, wurden Reihenversuche durchgeführt. Bei erfolgreicher Expression war eine übermäßig starke Proteinbande im Muster des Totallysates zu sehen (vgl. Abbildung 4.4). Diese wurde dann auf die korrekte Größe überprüft.

Auf diese Weise konnten die Klone für die 22 Proteine identifiziert, propagiert und bei -70°C eingefroren werden.

4.3.2 Reinigung der Fusionsproteine mittels Affinitätschromatographie

Das nachgewiesene Fusionsprotein mußte im folgenden Schritt von den übrigen *Escherichia coli* Proteinen getrennt werden. Abbildung 4.4 zeigt exemplarisch 3 Borrelienfusionsproteine von *Borrelia afzelii*, pKo in einem nach Coomassie gefärbten SDS-PAGE-Gel.

Diese sind von links nach rechts auf der ersten Bahn der Proteingrößenstandard, auf der 3. und 4. Bahn das p100-2 Protein, auf Bahn 6 und 7 OspC und auf Bahn 9 und 10 p17. Die jeweils erste Bahn des Paares enthält das *Escherichia coli* Totallysat mit dem Fusionsprotein, die jeweils 2. Bahn nur noch das Fusionsprotein nach Aufreinigung.

Ebenso ließen sich die übrigen Proteine aus dem Totallysat isolieren.

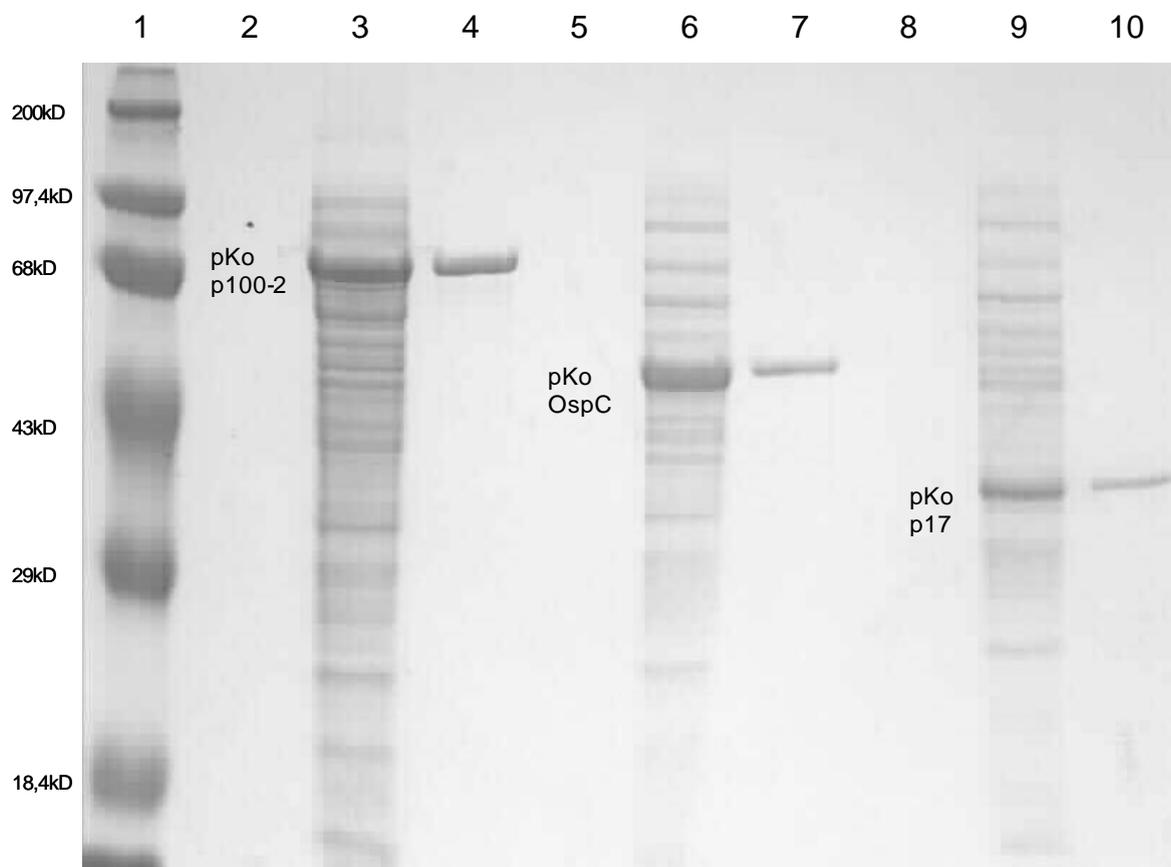


Abbildung 4.4: Coomassie gefärbtes 12%-SDS-PAGE-Gel, 1: Proteingrößenmarker (Gibco BRL, Prestained Protein Molecular Weight Standards); 3: pKo p100-2 vor Reinigung; 4: pKo p100-2 nach Reinigung; 6: pKo OspC vor Reinigung; 7: pKo OspC nach Reinigung; 9: pKo p17 vor Reinigung; 10: pKo p17 nach Reinigung

Abbildung 4.5 zeigt die 8 exprimierten Proteine von *Borrelia afzelii*, pKo nach Auftrennung, SDS-PAGE und Färbung nach Coomassie.

Auf Bahn 1 läuft der Größenstandard, auf Bahn 2 p100-2, auf Bahn 3 p100-1, auf Bahn 4 p75, auf Bahn 5 p39, auf Bahn 6 p37, auf Bahn 7 OspA, auf Bahn 8 OspC und auf der 9. Bahn p17. Man sieht, daß die einzelnen Fusionsproteine weitgehend frei sind von Rückständen. Bei OspA und OspC sind weiterhin jeweils ein Degradationsprodukt einmal bei etwa 35 und einmal bei ca. 40 kD auszumachen.

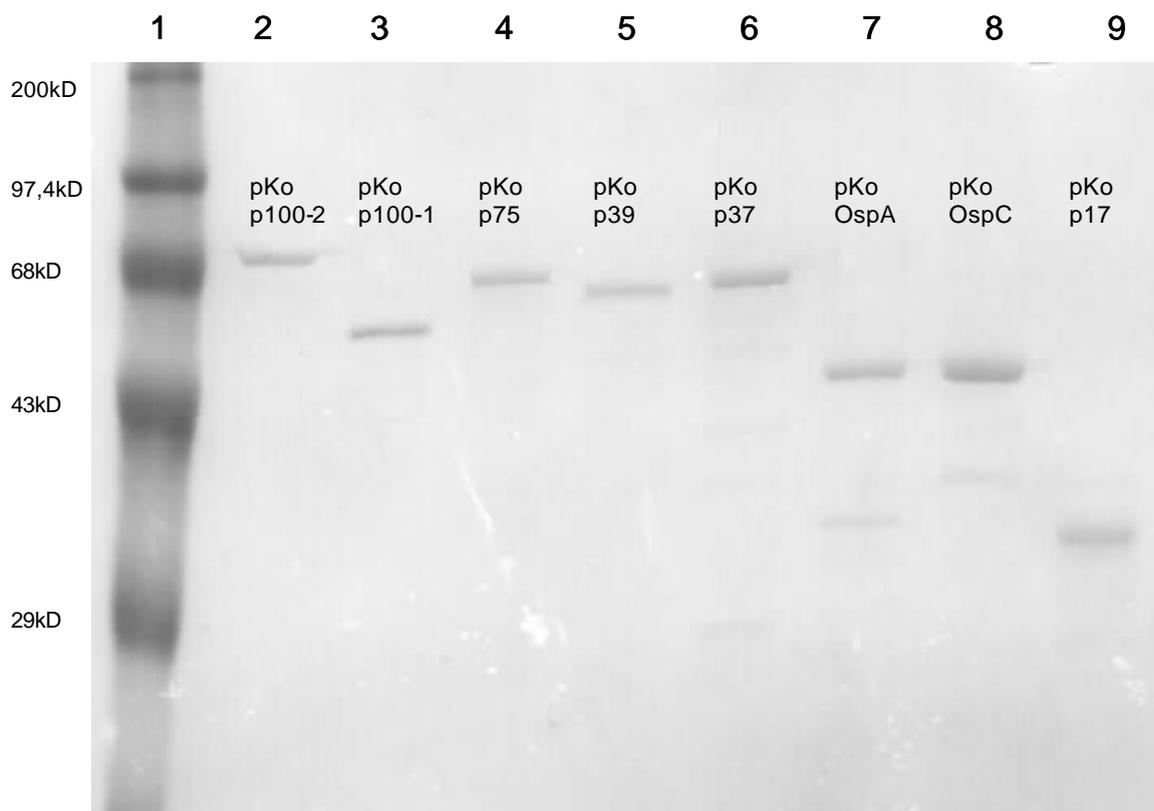


Abbildung 4.5: Coomassie gefärbtes 12%-SDS-PAGE-Gel mit den eluierten Proteinen von *Borrelia afzelii* pKo, 1: Proteingrößenmarker (Gibco BRL, Prestained Protein Molecular Weight Standards), 2: p100-2, 3: p100-1, 4: p75, 5: p39, 6: p37, 7: OspA, 8: OspC, 9: p17

4.3.3 Größenbestimmung der Fusionsproteine

Nach erfolgreicher Elution der Proteine wurden diese auf ihr korrektes Molekulargewicht hin untersucht. In Diagramm 4.1 wurde die Laufstrecke der Markerproteine deren Größe in Kilodalton [kD] gegenübergestellt. Mit Hilfe dieser Standardlängenkurve kann man das Molekulargewicht der Fusionsproteine in [kD] anhand der jeweiligen Laufstrecke im SDS-PAGE ablesen. Eingezeichnet sind exemplarisch die Proteine p100-1, p75, OspC und p17.

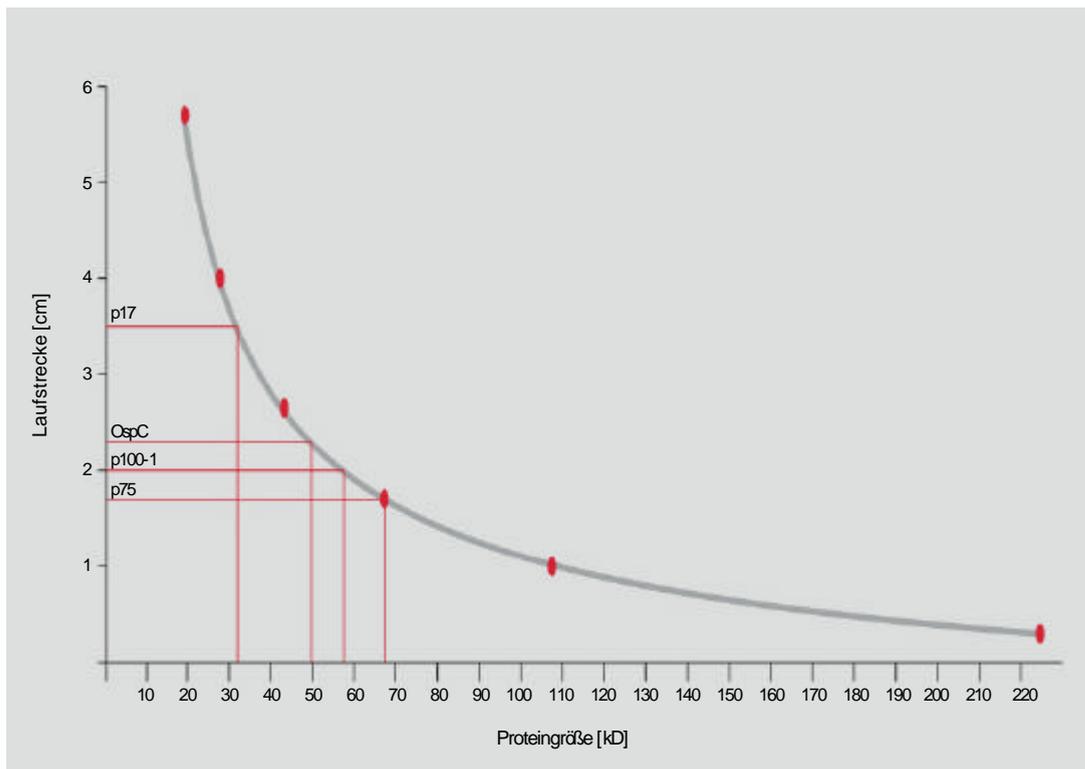


Diagramm 4.1: Bestimmung der Proteingröße in Kilodalton [kD] anhand der Laufstrecke der einzelnen Proteine im SDS-PAGE. Exemplarisch eingezeichnet sind die Proteine p100-1, p75, OspC und p17.

Tabelle 4.3 zeigt die Größe der synthetisierten Proteine, einmal errechnet und einmal wie oben beschrieben bestimmt. Die Abweichung des graphisch ermittelten Molekulargewichtes der Proteine liegt zwischen 0,3kD bei OspA und 14kD bei p100-2.

Protein	p100- 2	p100- 1	p75	p39	p37	OspA	OspA (pKo)	OspC	p17
Molekulargewicht in [kD]	31,0	27,3	37,4	33,8	34,8	26,3	20,8	21,6	8,5
Vektorprotein [kD]	26	26	26	26	26	26	26	26	26
Fusionsprotein [kD]	57,0	53,3	63,4	59,8	60,8	52,3	46,8	47,6	34,5
graphisch ermitteltes Molekulargewicht des Fusionsproteins in [kD]	71	59	67	65	66	55	49	52	34

Tabelle 4.3: Gegenüberstellung der errechneten Molekülgröße in [kD] der einzelnen Proteinfragmente zu der anhand des mitgelaufenen Proteinmarkers graphisch ermittelten.

4.3.4 Gegenüberstellung der Fusionsproteingröße zu den Originalgrößen aus der Literatur

So wie Tabelle 4.3 errechnetes und graphisch ermitteltes Molekulargewicht der propagierten Proteine gegenüberstellt, ist in Tabelle 4.4 das mathematisch anhand der Sequenzierung bestimmte Gewicht gegenüber den aus der Literatur bekannten Originalmassen der *Borrelia burgdorferi* Antigene dargestellt. Hier wird deutlich, daß für die Herstellung des Immunoblots Proteinfragmente zwischen 50% und 98% der Originalgröße der Ursprungsantigene verwandt wurden.

<i>Borrelia burgdorferi</i> -Antigene in [kD]	Molekulargewicht der rekombinant hergestellten Proteine		
	in [kD]	in % der vollständigen Antigene	
p83/100	p100-2: 31,2kD	} 58,6kD	71%–59%
	p100-1: 27,4kD		
p75	37,9kD		51%
p39	33,8kD		87%
p37	34,9kD		94%
OspA (31kD)	26,3kD		85%
	21,4kD (pKo)		69% (pKo)
OspC (23kD)	22,6kD		98%
p17	8,5kD		50%

Tabelle 4.4: Gegenüberstellung der Molekularmasse der Ursprungsantigene von *Borrelia burgdorferi* aus der Literatur^{19,21,23,62,70,82,113,166,190} zu den rekombinant hergestellten Teilstücken. Grundlage bildet die durch Sequenzierung errechnete Größe.

4.3.5 Bradfordassay-Proteinchargen-Quantifizierung

Um später die Proteinkonzentration pro Blotstreifen bestimmen und so reproduzierbare Mengen einsetzen zu können, wurde die Proteinkonzentration der einzelnen Chargen photometrisch ermittelt. Diagramm 4.2 zeigt die Extinktionsstandardkurve des BSA-Konzentrationsstandards bei 595nm gemessen. Anhand dieses Diagramms konnten die Proteinkonzentration der einzelnen Proteinchargen bestimmt werden. Exemplarisch sind die Proteinchargen p100-2, p75 und OspC von *Borrelia.afzelii*, pKo eingezeichnet.

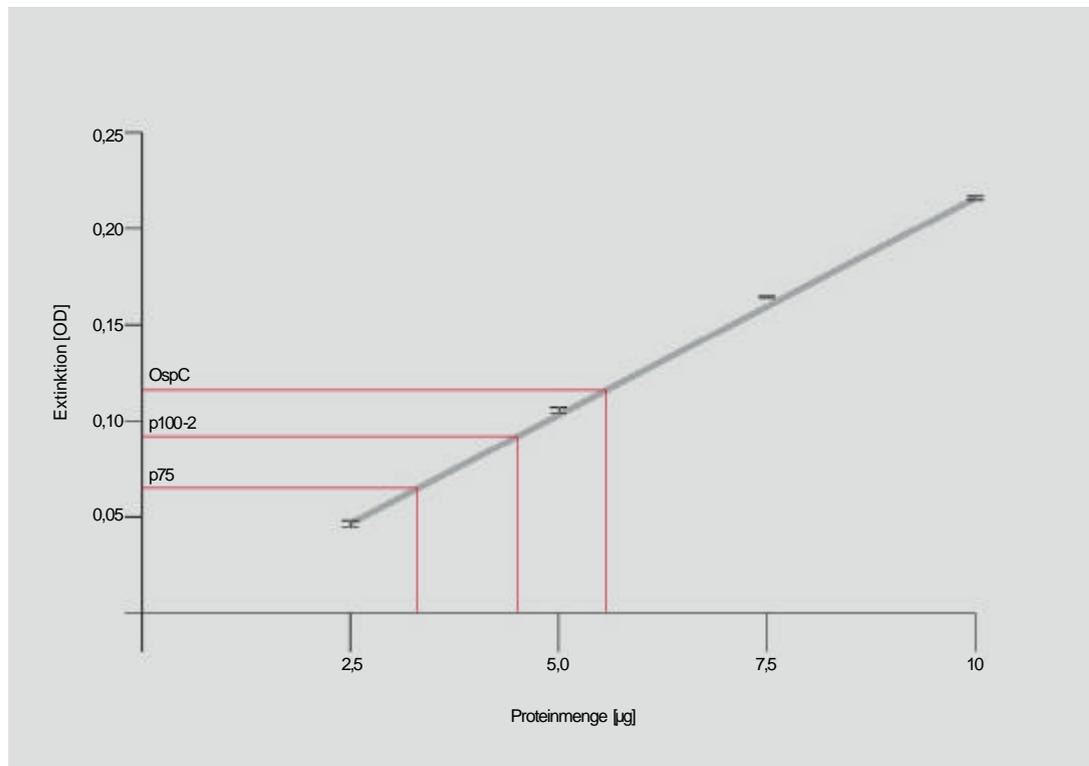


Diagramm 4.2: Photometrische Bestimmung der Proteinmenge in [µg] anhand der gemessenen Extinktionswerte. Exemplarisch sind die Proteine p100-2, p75 und OspC eingezeichnet.

Tabelle 4.5 zeigt die gemessenen Extinktionswerte und die daraus resultierende Proteinmenge in $\mu\text{g/ml}$.

	pKo	pKa	pBi	
p100-2	0,092	0,076	0,255	Extinktionswert(OD)
	222,5	188,75	515	Proteinmenge[$\mu\text{g/ml}$]
p100-1	0,117	0,070	0,033	Extinktionswert(OD)
	278,75	87,5	68,75	Proteinmenge[$\mu\text{g/ml}$]
p75	0,062	0,065	0,057	Extinktionswert(OD)
	158,75	165	147,5	Proteinmenge[$\mu\text{g/ml}$]
p39	0,053	0,086	0,051	Extinktionswert(OD)
	68,75	105,625	66,25	Proteinmenge[$\mu\text{g/ml}$]
p37	0,096	0,122	0,078	Extinktionswert(OD)
	465	290	192,5	Proteinmenge[$\mu\text{g/ml}$]
OspA	0,102	0,189	0,170	Extinktionswert(OD)
	245	436,25	395	Proteinmenge[$\mu\text{g/ml}$]
OspC	0,116	0,158	0,117	Extinktionswert(OD)
	277,5	367,5	278,5	Proteinmenge[$\mu\text{g/ml}$]
p17	0,105	-	-	Extinktionswert(OD)
	252,5	-	-	Proteinmenge[$\mu\text{g/ml}$]

Tabelle 4.5: Bei den Proteinchargen p100-1 der Stämme pKa und pBi, sowie p39 aller 3 Stämme wurde eine Menge von $40\mu\text{l}$ photometrisch vermessen. p100-2 von pBi, p37 von pKo und pGex ohne Insert wurden bei einer Menge von $10\mu\text{l}$ vermessen. Bei allen anderen Proteinchargen wurde ein $20\mu\text{l}$ -Aliquot vermessen.

Um auf die Proteinmenge in $\mu\text{g/ml}$ zu kommen, wurden die abgelesenen Ergebnisse mit dem Aliquotanteil eines Milliliters multipliziert.

4.4 Auswahl geeigneter Seren

Die zu testenden Proben wurden der Serenbank des Institutes für Infektionsmedizin der Universität Hamburg entnommen, nachdem diese mittels der bestehenden Diagnostik untersucht worden waren (vgl. 3.4).

4.5 Immunoblot

4.5.1 Herstellung

50 Seren wurden mittels eines Immunoblots, der in Slotblottechnik mit den Proteinen in 4 oder mehr Verdünnungen hergestellt worden war, ausgetestet. Die so gewonnenen Ergebnisse ließen sich jedoch nicht reproduzieren.

Daraufhin wurde zur Überprüfung der Immunogenität der Proteine ein Immunoblot in der „halb-trocken-Technik“ hergestellt und exemplarisch nochmals mit 25 Seren inkubiert.

Abbildung 4.6 zeigt ein SDS-PAGE-Gel nach Coomassie gefärbt, wie es in der „Halb-trocken-Technik“ geblottet wurde. Man erkennt von oben die Banden p100-2, p100-1, p75, p39, p37, OspA, OspC und p17.

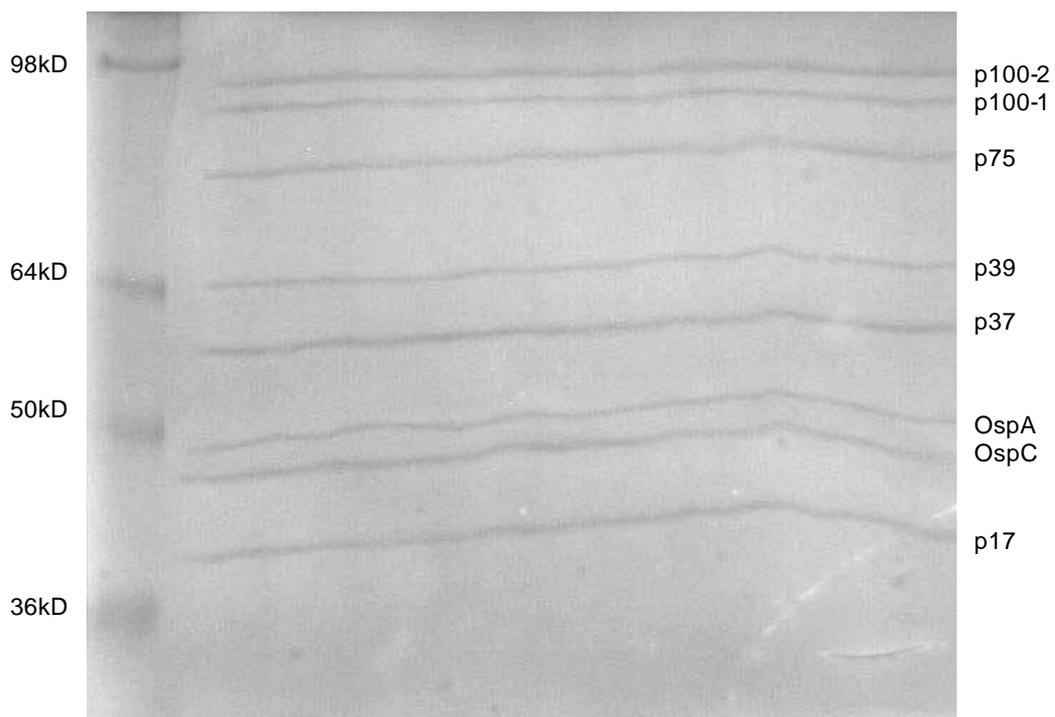


Abbildung 4.6: SDS-PAGE-Gel nach Coomassie gefärbt, bevor es geblottet wurde. Man erkennt den SeeBlue® Pre-Stained Standard links, daneben von oben die Banden p100-2, p100-1, p75, p39, p37, OspA, OspC und p17.

Aufgrund der genetischen Homologie der exprimierten Proteinfragmente (vgl. 4.2.4) wurde hierfür eines der homologen Proteine verwandt. Diese sowie die Konzentrationen sind Tabelle 4.6 zu entnehmen. Aus einem Blotpapier ließen sich ca. 15 einzelne Blotstreifen schneiden.

Protein	p100-2	p100-1	p75	p39	p37	OspA	OspC	p17
Stamm	pKo	pKa	pKa	pKa	pBi	pKo	pKo	pKo
Proteinmenge pro Blotpapier [µg]	4,45	1,31	1,65	0,792	1,444	1,838	2,082	1,892
Proteinmenge pro Blotstreifen [µg]	0,3	0,09	0,11	0,05	0,1	0,12	0,14	0,13

Tabelle 4.6: zeigt die Endkonzentration der Proteine des endgültigen Immunoblots im Überblick.

4.5.2 Evaluation des Immunoblots

4.5.2.1 Vergleich positiver und negativer Blotergebnisse

Abbildung 4.7 zeigt den halbtrocken hergestellten Immunoblot. Auf der linken Seite sind 6 Seren mit rechts daneben 2 Seren ohne spezifische Antikörper gegen *Borrelia burgdorferi* dargestellt. Die genaue Auswertung der Banden ist Tabelle 4.7 zu entnehmen.

	1	2	3	4	5	6
p100-2	+	/	(+)	+	(+)	+
p100-1	(+)	/	/	(+)	(+)	/
p75	+	(+)	+	+	/	+
p39	(+)	/	/	+	(+)	/
p37	/	+	(+)	/	(+)	+
OspA	/	(+)	/	/	/	/
OspC	/	/	+	(+)	+	/
p17	+	/	+	/	/	(+)

Tabelle 4.7: zeigt die Auswertung der einzelnen Proteine der sechs positiven Antikörpernachweise.

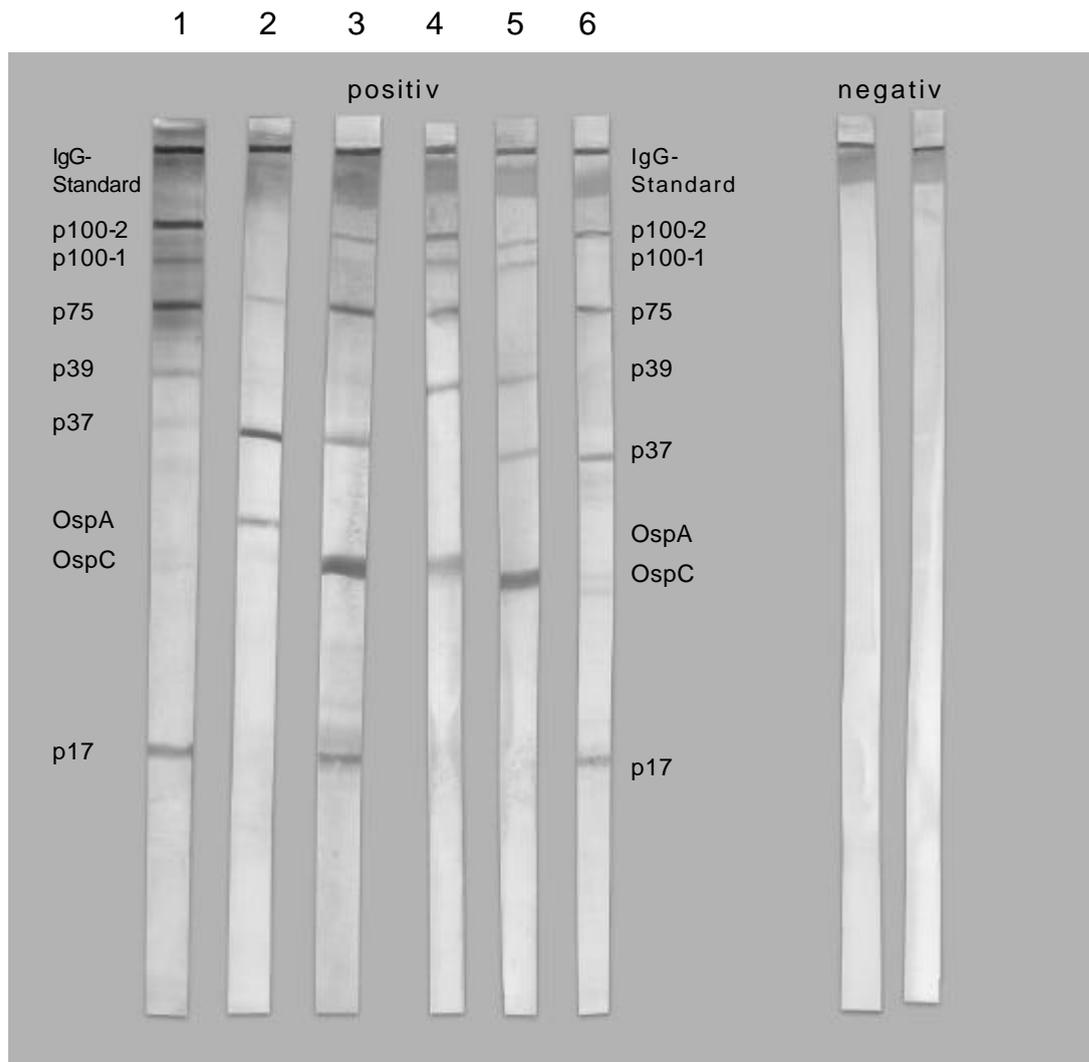


Abbildung 4.7: zeigt links 6 Blotstreifen mit einem positiven Antikörpernachweis und rechts 2 mit negativem.

4.5.2.2 Vergleich des neuen Immunoblots mit dem alten

Abbildung 4.8 stellt positive Ergebnisse im rekombinanten Immunoblot (RekomBlot) den entsprechenden Immunoblots mittels Totallysat gegenüber. Bei der Auswertung des Totallysates fällt das ubiquitäre Auftreten der p60-Proteine und der Flagelle auf (p41).

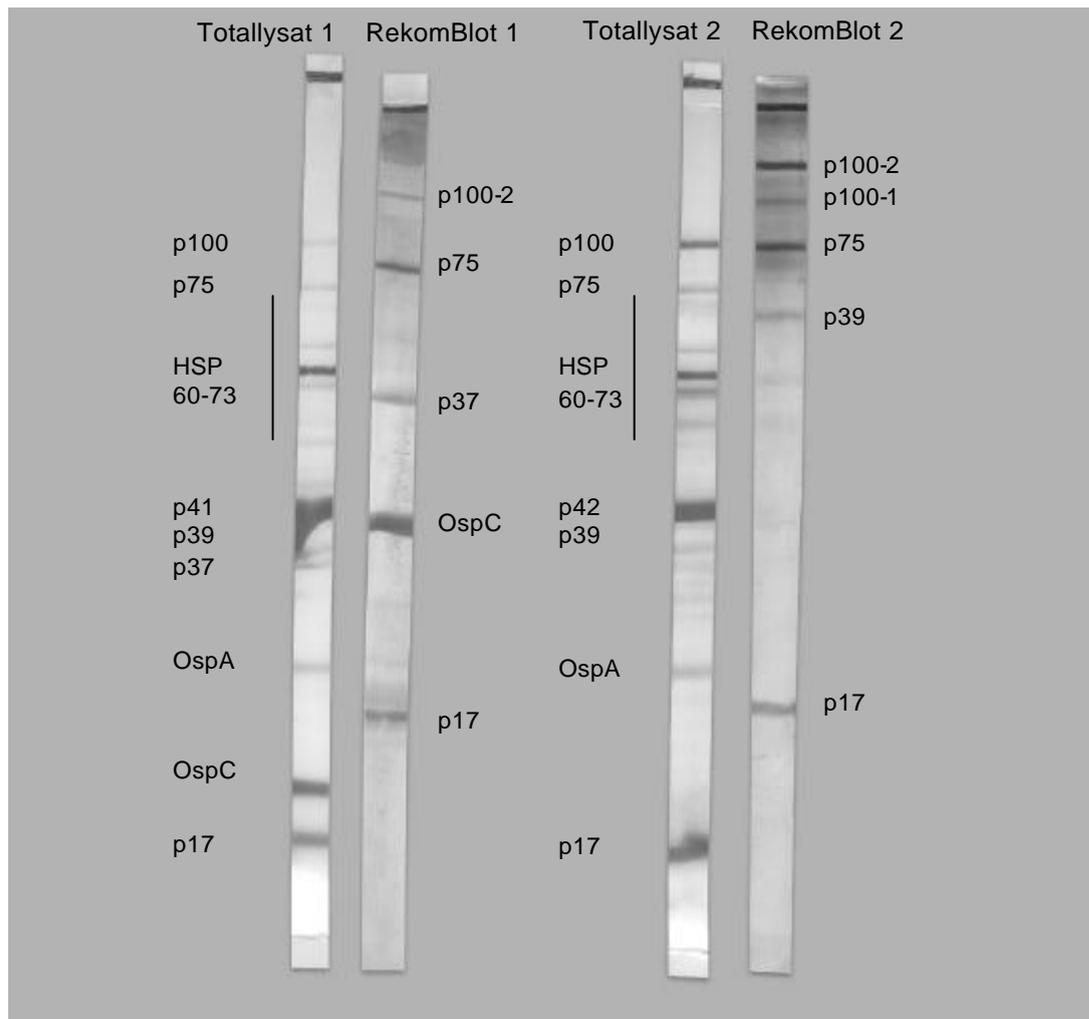


Abbildung 4.8: zeigt den rekombinant hergestellten Immunoblot im Vergleich zum Totallysat anhand zweier Patientenseren

	<i>Totallysat 1</i>	<i>RekomBlot 1</i>	<i>Totallysat 2</i>	<i>Rekomblot 2</i>
p100-2 p100-1	+	+ /	+	+ (+)
p75	+	+	+	+
p60	+	/	+	/
p41	+	/	+	/
p39	(+)	/	(+)	(+)
p37	+	+	(+)	/
OspA	+	/	+	/
OspC	+	+	/	/
p17	+	+	+	+

Tabelle 4.8: zeigt die Auswertung der einzelnen Proteine, einmal im Totallysat und einmal im rekombinanten Blot (RekomBlot).

4.5.2.3 Vergleich einer frischen Infektion mit einer Seronarbe im rekombinant hergestellten Immunoblot

Um nun eine Aussage über die Behandlungsbedürftigkeit des Patienten machen zu können, ist eine Aussage bezüglich des Stadiums der Infektion erforderlich. In Abbildung 4.9 sieht man 4 rekombinante Immunoblotstreifen. Die beiden linken sind von Patienten mit einer frischen Infektion, die rechten weisen den Antikörperbefund einer bereits länger zurückliegende Infektion auf. Vor allem die größeren Proteine wie p100 und p75 bleiben nachweisbar bei Fehlen der kleineren Proteinbanden OspA, OspC, p17, p39.

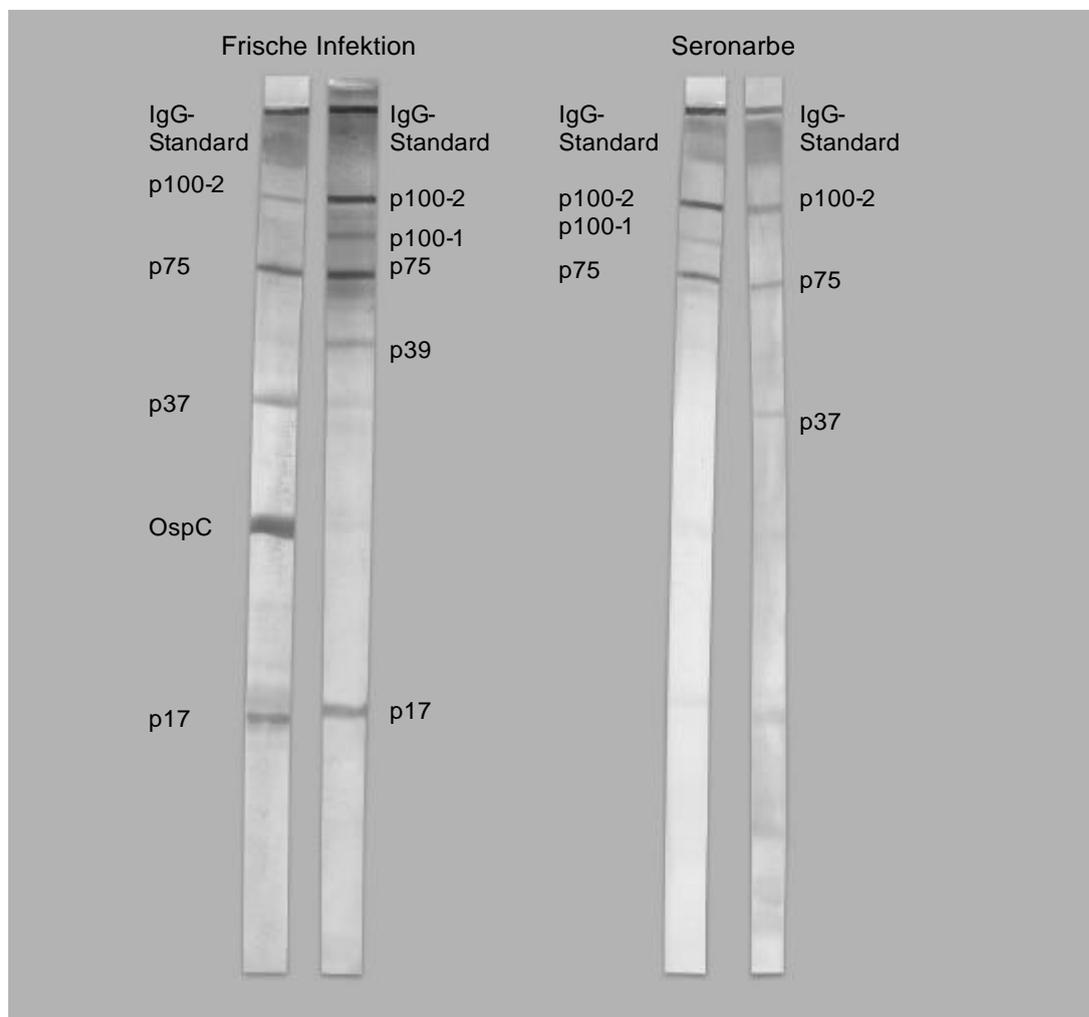


Abbildung 4.9: Gegenüberstellung von 4 Antikörperbefunden im rekombinanten Immunoblot. Die beiden linken sind von Patienten mit einer frischen Infektion, die beiden rechten dagegen weisen einen zu einer Seronarbe passenden Antikörperbefund aus.

5 Diskussion

Die Lyme Borreliose ist die häufigste von Zecken übertragene Krankheit auf der nördlichen Hemisphäre¹⁵³. Aufgrund des vielgestaltigen Krankheitsbildes bei einer symptomatischen Infektion mit *Borrelia burgdorferi*, bei der es zu Manifestationen an der Haut, am Skelettsystem und an der Muskulatur, neurologischen Symptomen sowie einer Beteiligung der Augen und des Herzens kommen kann^{187,190} (vgl. 1.3.4), kommt der Labordiagnostik bei der Differentialdiagnose der Symptome eine besondere Bedeutung zu⁷². Wie eingangs erwähnt, existieren prinzipiell drei methodisch unterschiedliche labordiagnostische Nachweismöglichkeiten: Erstens der direkte Nachweis des Erregers durch Dunkelfeldmikroskopie oder Anzucht; zweitens der Nachweis erregerspezifischer Nukleinsäure mittels PCR und drittens der serologische Nachweis spezifischer Antikörper gegen *Borrelia burgdorferi*.

Geeignete Materialien für den direkten Erregernachweis mittels Anzucht sind Hautbiopsieproben, Serum, Liquor oder Gelenkflüssigkeit. Hierbei liegt die Sensitivität einer Hautbiopsie des Erythema migrans im Stadium 1 zwischen 30–70% und unter 5% für ein Liquorspeziemen bei Vorliegen einer Neuroborreliose^{7,26,94} (vgl.1.5). Bei einer Kulturdauer, die bis zu 5 Wochen betragen kann (vgl.1.5), muß eine Kontamination des Anzuchtmediums durch einen schneller proliferierenden Keim unbedingt vermieden werden²⁶. Für die Dunkelfeldmikroskopie besteht das Problem, daß die Spirochäten in Gewebeproben und Punktaten nur in geringer Zahl vorhanden sind^{161,190}. Aufgrund dieser Problematik wird heutzutage der direkte Erregernachweis nicht zur Routinediagnostik empfohlen^{26,82,161}.

Der Einsatz der PCR bei der Diagnose der Lyme Borreliose wird unterschiedlich bewertet^{115,130,153,161,171,190}. Wie beim direkten Erregernachweis sind Haut, Serum, Urin, Synovialflüssigkeit und Liquor grundsätzlich geeignete Materialien¹⁹⁰. Aber auch wenn die Sensitivität der PCR höher ist als die der Kultur und der Dunkelfeldmikroskopie, so schwankt sie doch erheblich mit der Wahl der Proben, der Zielsequenzen der verwandten Oligonukleotide, dem PCR-Protokoll und dem Stadium der Erkrankung^{28,161,130,153,190}. Wie in Studien gezeigt werden konnte liegt, die Sensitivität für den Nachweis von DNA in Hautbiopsaten zwischen 80% bei

klinisch diagnostiziertem Erythema migrans und 92% bei nachgewiesener Acrodermatitis atrophicans. Diese Ergebnisse gelten für eine Zielsequenz aus dem ospA-Gen¹³⁰. Andere Studien zeigen eine Sensitivität der PCR bei Hautbiopsieproben zwischen 60–90%. Dafür wurde zum Teil mit zwei parallel durchgeführten Oligonukleotidpaaren z.B. für eine Zielsequenz aus dem ospA- und p66-Gen gearbeitet^{28,124,130,131,132,155,203}.

Bei Patienten mit klinisch und serologisch nachgewiesener Lyme Arthritis lag in einer Studie die Sensitivität der PCR für Synovialflüssigkeit zwischen 23% für ein ospA-Oligonukleotid und 39% bei Verwendung einer Zielsequenz aus dem p66-Gen. Durch Paralleltestung mit beiden Primern konnte eine Sensitivitätssteigerung auf 85% erzielt werden. Bei diesem Patientenkollektiv zeigte sich im Urin als Untersuchungsmedium eine Sensitivität von 24% für den ospA-Primer und 42% für das Oligonukleotid aus dem p66-Gen. Auch hier konnte durch Doppeltestung mit beiden Oligonukleotiden eine Sensitivitätssteigerung auf 79% erzielt werden¹⁵³. Für Liquor als Untersuchungsmaterial bei Patienten mit klinisch und serologisch nachgewiesener Neuroborreliose konnte bei Verwendung der oben beschriebenen Oligonukleotide für Zielsequenzen aus dem ospA- bzw. dem p66-Gen eine Sensitivität der PCR von je 32% für die beiden separat getesteten Primer gezeigt werden. Ein falsch negatives Ergebnis erhielt man immerhin noch bei 21% der Fälle, selbst bei Paralleltestung mit beiden Oligonukleotiden¹⁵³. Die Urinproben dieser Patienten ergaben in der gleichen Studie auch bei Paralleltestung zu 55% ein negatives Ergebnis¹⁵³.

Die Spezifität der angeführten Studien lag bei über 99%^{130,153}. Eine Progression der Erkrankung von einem Stadium in ein anderes ist jedoch auch bei positivem PCR-Befund nicht vorauszusetzen¹³⁰, da die Erkrankung selbstlimitierend verlaufen kann²⁶. Deshalb leitet sich allein von einem positiven PCR-Ergebnis auch keine Behandlungsindikation ab^{130,161,171,190}.

Probleme der PCR als verlässliche Nachweismethode der Lyme Borreliose liegen in der fehlenden Standardisierung des PCR-Protokolls sowohl was die Speziemen und deren Aufbereitung, als auch die verwendeten Oligonukleotide betrifft^{28,130,153}. Beides beeinflusst die Güte der Ergebnisse.

Bei den hier angeführten Studien ist anzumerken, dass Sensitivitäten über 50% häufig erst bei paralleler Verwendung zweier unterschiedlicher

Zielsequenzen erreicht wurden. Außerdem schmälert die geringe Fallzahl zwischen 22 und 36 Individuen die Aussagekraft der Arbeiten.

Ein gewichtiges Argument gegen die PCR in der Routinediagnostik ist die umständliche, zeit- und kostenintensive sowie invasive Probengewinnung und Verarbeitung für den Nachweis von borrelieneigener DNA in Liquor, Synovialflüssigkeit oder einer Haubiopsie. Sie wird daher nicht zur Routinediagnostik empfohlen^{26,161,171,190}.

Zur Zeit stützt sich die Routinediagnostik der Lyme Borreliose im Labor im Wesentlichen auf serologische Verfahren zum Nachweis spezifischer Antikörper^{82,161,190}. Hierzu existieren mehrere Methoden, wie ELISA, IFT, oder ein Immunoblot. Alle drei Testformen erlauben eine Unterscheidung der Immunantwort spezifisch für IgM oder IgG. Wie vom Robert Koch Institut (RKI) in Deutschland²¹¹ und in den USA vom Center of Disease Control (CDC)^{37, 38} empfohlen, soll die serologische Diagnostik stufenweise erfolgen. Dabei sind als sensitiver Suchtest sowohl ELISA als auch ein IFT möglich. Bei positivem Ergebnis des Suchtests soll ein Immunoblot als Bestätigungstest durchgeführt werden^{4,9,29,40,163,200}. Aufgrund der maschinellen Abarbeitung des ELISAs ist er als Suchtest zur Routinediagnostik der Lyme Borreliose insbesondere bei großen Probenzahlen dem IFT überlegen und deshalb weiter verbreitet^{26,73}.

Bei einem Antikörpersuchtest mittels ELISA wird das Antigen oder ein Antigengemisch an eine feste Phase (z.B. eine Plastikplatte) kovalent gebunden. Danach wird das Patientenserum hinzu gegeben. Die Antikörper, sofern vorhanden, binden an die Antigene. Diese können mittels eines Zweitantikörpers detektiert werden. An diesen Zweitantikörper ist ein Enzym gekoppelt, welches nach Zugabe eines Substrates zu einer Farbreaktion führt, deren Intensität photometrisch bestimmt wird. Bei einem quantitativen ELISA geschieht dies proportional zu der Menge an gebundenem Zweitantikörper^{93,125}.

Die Antigenfraktion beim Borrelien-ELISA besteht entweder aus Ultrasonikat des Erregers (Ganzzell-ELISA) oder aus einem Gemisch gereinigter Proteine wie z.B. p100, p41, p39, OspC oder p17^{26,73}. Hierbei gewinnt die rekombinante Herstellung der Antigene zunehmend an Bedeutung^{72,105,118}. Die serologische Diagnostik in Europa wird mangels einheitlicher Kriterien

bezüglich Stammauswahl, Antigenpräparationen, Techniken, Reagenzien und Definitionen eines positiven Ergebnisses erschwert^{81,196}. In einer Studie, in der 6 verschiedene kommerzielle ELISAs einander gegenübergestellt wurden, ergaben sich Sensitivitäten für den Nachweis von IgM-Antikörpern zwischen 31% und 81% sowie 47–92% für IgG-Antikörper⁷³. Die Spezifität lag zwischen 75% und 90% für IgM und 84–100% für den Nachweis von IgG-Antikörpern⁷³.

Diese Ergebnisse wurden anhand von 229 Serumproben erzielt, von denen 52 von Patienten stammten, die an unterschiedlichen Symptomen der Lyme Borreliose erkrankt und klinisch diagnostiziert worden waren (26 frühe LB: EM und Geschichte eines Zeckenbisses bzw. erfolgreiche Kultur, 13 späte LB: 4ACA, 9 NB). Die Kontrollgruppe bestand dabei aus 62 gesunden und 128 an anderen Krankheiten leidenden Patienten (24 EBV, 12 CMV, 24 rheumatoide Arthritis, 24 ANA, 23 Syphilis und 21 HIV).

Ein Problem des Antikörpernachweises mittels ELISA oder anderer Suchtests ist die fehlende Information, gegen welche Antigene die nachgewiesenen Antikörper gerichtet sind. Dafür ist in einem zweiten Schritt ein Immunoblot als Bestätigungstest notwendig, der eine Differenzierung der vorhandenen Immunantwort gegen die erregerspezifischen Antigene erlaubt^{73,93,118}.

Wie bei der Antigenpräparation für den ELISA, existieren auch bei einem Immunoblot die beiden Möglichkeiten. Zum einen kann das ganze Bakterium als Antigen verwendet werden, indem es in SDS aufgekocht, die Proteine entsprechend ihrer Größe gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine feste Matrix geblottet werden. Zum anderen können einzelne spezifische Proteine für den Nachweis einer Infektion mit *Borrelia burgdorferi* ausgewählt und rekombinant hergestellt werden.

Obwohl bei einem Immunoblot auf der Basis eines Ganzzelllysates die gesamte Bandbreite der Borrelienantigene vorhanden ist, hat dieser doch erhebliche Nachteile: Es ergibt sich eine Fülle unspezifischer Banden^{52,79,112,114}, die der Diagnose der Lyme Borreliose nicht dienen, die jedoch die Interpretation des Immunoblots erschweren^{82,213}. So konnte in mehreren Studien gezeigt werden, daß es bei einer Reihe von Proteinen zu einer unspezifischen Reaktion kommt. Hier sind insbesondere die Proteine

p41, die Heatshockproteine p60-73 und nicht näher charakterisierte Proteine der Größe von 33kD und 20kD zu nennen^{30,79,81,91,118,165}. Bei der Auswertung des Immunoblots auf der Basis eines Ganzzelllysates müssen diese unspezifischen Banden von den eine Infektion beweisenden Reaktionen unterschieden werden. Hinzu kommt die Schwierigkeit der Erregeranzucht bei der Verwendung eines Totallysates (vgl. 1.2.2, 1.5). Hier stellt sich das Problem, daß es bei der in vitro Kultivierung von *Borrelia burgdorferi* passageabhängig zu Veränderungen der Antigenexpression und zu einem Verlust von wichtigen Oberflächenproteinen wie z.B. OspC kommen kann^{2,36,145,174}. Dies ist aber ein wichtiges Antigen v.a. in der frühen Phase der Infektion^{2,82,190}, welches in vivo mit dem Wirtswechsel noch verstärkt vom Bakterium exprimiert wird¹⁷⁶. So verliert *Borrelia burgdorferi* ihre Pathogenität während längerer Kultur in BSK-Medium^{17,68,129}.

Außerdem ist wegen der langen Generationszeit dieses Verfahren sehr zeitaufwändig, und es besteht immer die Kontaminationsgefahr durch einen schneller wachsenden Keim²⁶ (vgl.1.5). Für Europa mit mindestens drei unterschiedlichen humanpathogenen Subspezies (vgl. 1.2.4), ist ferner darauf hinzuweisen, dass diese aufgrund ihrer teils heterogenen Epitope (vgl. 1.2.3) durchaus zu unterschiedlichen Reaktivitäten im Immunoblot führen können^{51,81,137,207}. Die Bedeutung für die Diagnostik bei der Auswahl des Stammes wird jedoch noch diskutiert^{73,81,137}.

So konnte wiederholt gezeigt werden, daß Antikörper von Seren europäischer Patienten besser mit Westernblots von *Borrelia garinii* und *afzelii* reagieren, als mit einem Immunoblot auf der Basis eines *Borrelia burgdorferi* sensu stricto Stammes^{42,81,137}. Hierbei ist aber nicht nur die geographische Verteilung der Patienten, sondern auch deren klinisches Erscheinungsbild von Bedeutung. In Europa fand man eine höhere Reaktivität der Seren von Patienten mit einer Neuroborreliose mit *Borrelia garinii* und von Patienten mit einer Manifestation an der Haut mit *Borrelia afzelii*^{51,81,137}. Bei der Gesamtbewertung führte die eine Studie jedoch *Borrelia afzelii*⁸¹ als sensitivste Subspezies auf, eine andere Studie erhielt die reliabelsten Ergebnisse mit einem *Borrelia garinii*-Stamm¹³⁷. Eine neuere Studie konnte dagegen keine Sensitivitätsunterschiede zwischen amerikanischen und europäischen Borrelienstämmen zur Herstellung von

Immunoblots zur Detektion europäischer Patientenserum feststellen. Hier zeigten sich allerdings Spezifitätsunterschiede. Der positiv prädiktive Wert war bei Immunoblots von europäischen Stämmen besser⁷³.

Dem gegenüber liegt der Vorteil rekombinanter Proteine in der frei wählbaren Auftragung einzelner Antigene auf die Blotmembran. Dabei können sensitive und spezifische Antigene unterschiedlicher Subspezies auf einem Blot vereinigt werden^{72,81,83,212}. Außerdem läßt sich eine Überlagerung ähnlich großer Proteine wie z.B. p58 und p60 leichter verhindern als beim gelelektrophoretisch aufgetrennten Totallysat^{81,145}. Der rekombinante Immunoblot erlaubt ferner eine standardisierte und reproduzierbare Proteinkonzentration zu verwenden, was bei der unterschiedlichen Antigenexpression von *Borrelia burgdorferi* in Kultur nicht garantiert ist^{36,145,174,177}. Die geeignete Proteinkonzentration auf der Blotmembran kann dabei für jedes Protein getrennt bestimmt werden, um so die Sensitivität und Spezifität des Tests zu erhöhen. Außerdem ist die Interpretation des Immunoblots durch das Fehlen häufig kreuzreagierender Proteine, wie z.B. p41 oder den Heatschockproteinen^{30,72,81,91,118,165} vereinfacht, was sich vor allem bei großen Fallzahlen bemerkbar macht^{82,213} (s.o.).

Trotz dieses Zweistufenprotokolls mit einem ELISA als Suchtest und einem Immunoblot als Bestätigungstest zum serologischen Nachweis der Lyme Borreliose ergeben sich einige Probleme. Falsch negative Ergebnisse lassen sich häufig auf die verzögerte Antikörperantwort gegen den Erreger zurückführen¹⁹⁰. So lassen sich IgM-Antikörper teilweise erst 6 Wochen nach Infektion nachweisen¹⁸⁹; die IgG Antwort entwickelt sich in der Regel erst zwischen der sechsten und zwölften Woche nach Infektion¹⁵⁴ (vgl.1.3.3). Deshalb ist bei Infektionsverdacht im Anfangsstadium der Erkrankung mit noch negativem Antikörperbefund eine Folgeuntersuchung des Patienten im Abstand von zwei bis vier Wochen angezeigt, um anhand eines Anstieges des Antikörpertiters während dieses Zeitraumes auf eine erfolgte Infektion schließen zu können^{2,26}.

Eine frühe antibiotische Intervention kann die Antikörperproduktion aber auch gänzlich unterbinden^{2,26,154}.

Falsch positive Ergebnisse können von kreuzreaktiven oder unspezifischen Antikörpern gegen andere Mikroorganismen oder von Autoimmunsyndromen

herrühren¹⁵⁴ (vgl.1.5). Dies ist vor allem ein Problem bei serologischen Tests, insbesondere einem Immunoblot mittels Totallysat (s.o.) (vgl.1.5). Besonders sind hier die Infektionen mit EBV und CMV zu nennen, die bereits zu Vorschlägen geführt haben, in Regionen, in denen die Lyme Borreliose eine Prävalenz von 20% oder geringer aufweist, eine EBV- und/oder eine CMV-Ausschlußdiagnostik zusätzlich zum Borrelien-Immunoblot vorzunehmen. Dies gilt insbesondere für die frühe Borrelieninfektion mit positivem IgM-ELISA⁷³.

Aussagen zur Behandlungsbedürftigkeit allein auf der Basis eines positiven Immunoblots und ELISAs sind ähnlich dem positiven PCR-Nachweis nicht möglich, weil ein positiver Antikörperbefund nicht zwangsläufig eine aktive Erkrankung bedeutet. So ließen sich in einer gesunden Population zwischen 5–20% asymptomatisch seropositive Antikörpertiter nachweisen^{73,81,103,136,190}. Hier besteht die Möglichkeit, daß eine zurückliegende subklinisch selbstlimitierende oder austerapierte Infektion mit *Borrelia burgdorferi* vorliegt; es sich also lediglich um den Nachweis einer persistierenden Immunantwort („Seronarbe“) handelt^{26,56,57,71,75,136}. Das Vorliegen entsprechender klinischer Symptome im Zusammenhang mit dem positiven Antikörperbefund ist ausschlaggebend zur Diagnosestellung einer behandlungsbedürftigen Erkrankung¹⁸⁵.

Die Diagnose einer akuten Infektion, bei der dem Beweis von spezifischen IgM-Antikörpern eine besondere Bedeutung zukommt, wird durch die lange Nachweisbarkeit dieser Antikörperklasse, die teilweise noch über ein Jahr und länger nach Infektion mit *Borrelia burgdorferi* besteht^{2,26,58,93}, erschwert. Weiterhin wird die serologische Diagnosestellung einer frischen Infektion dadurch kompliziert, daß Mehrfachinfektionen mit unterschiedlichen Erregern der Lyme Borreliose beschrieben sind und dies zu einem Zeitpunkt, an dem die Persistenz der initialen Immunantwort noch sehr wahrscheinlich war^{59,70,71} (vgl.1.5).

Abgesehen von den klinischen Symptomen bieten hier Antikörperverläufe der gezielt nachgewiesenen Antikörperklassen (IgM und IgG), sowie der Nachweis spezifischer Antikörper gegen bestimmte Antigene von *Borrelia burgdorferi* weitere Information, da sich das Muster der nachzuweisenden Antikörper im Verlauf der Infektion ändert^{2,54,81,114}.

Im Anfangsstadium lassen sich besonders häufig OspC und p41 mittels IgM-Immunoblot nachweisen^{2,81,82,165,190}. Die Aussagekraft eines positiven Ergebnisses beim Antikörpernachweis gegen p41 ist jedoch aufgrund von unspezifischen Reaktionen eingeschränkt^{52,55,73,81,114}. Weiterhin sind p37, p39 und p17(pKo) als sensitive und spezifische Antigene zum Nachweis der Erkrankung mittels IgM-Immunoblot beschrieben worden^{2,70,81,82,83,114,165,190}. Zu einem späteren Zeitpunkt können noch weitere Antigene wie p83/100, p60, p58 und p21 durch IgM-Antikörper erkannt werden².

IgG-Antikörper der frühen Phase sind häufig gegen p41, OspC und p39 gerichtet^{2,55,190}. Mit Fortschreiten der Infektion können dann immer mehr Antikörper gegen die Spirochätenantigene nachgewiesen werden. Hier wurden die Polypeptide p83/100, p75 (DNak), p60-66, p58, p37, OspA, p21 und p17 häufig beschrieben^{2,44,70,81,82,83,114,137,165,166,190,213} und fanden Beachtung in den unterschiedlichen Vorschlägen zu Interpretationskriterien eines Immunoblots von Dressler⁵², Engstrom⁵⁵ und der Arbeitsgruppe um Frau B. Wilske^{81,82,83}. Die Proteine p83/100 und OspA gelten als besonders gute Marker für die späte Lyme Borreliose im Stadium III^{47,48,114}.

Um einen rekombinanten Immunoblot herzustellen, wurden die folgenden in der Literatur bereits als sensitiv und spezifisch beschriebenen Proteine ausgewählt. P83/100, p75, p39, p37, OspA und OspC aller drei als humanpathogen erkannten Subspezies, sowie p17 von *Borrelia afzelii*, pKo wurden rekombinant in *Escherichia coli* exprimiert. Aufgrund der stark kreuzreaktiven Eigenschaften des Flagellenantigens p41 und der Heatshockproteine p60-73^{52,55,73,81,114} wurden diese nicht zur Generierung des Immunoblots verwandt.

Proteine bestehen aus durch Peptidbindungen verknüpften Aminosäuren. Ihre Konformationsebenen werden mit den Termina Primär-, Sekundär-, Tertiär und Quartärstruktur beschrieben. Die reine Abfolge der Aminosäuren bezeichnet man als Primärstruktur. Aufgrund sterischer Begünstigung treten bestimmte Konformationen dieser Aminosäurekette besonders häufig auf und werden durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. Eine so angeordnete Aminosäurenabfolge wird als Sekundärstruktur bezeichnet. Hier sind insbesondere drei verschiedene Konformationstypen zu nennen:

Als erstes die sogenannte α -Helix, bei der die Aminosäuresequenz schraubenförmig gewunden und durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert ist. Längere unpolare oder amphipatische α -Helices dienen häufig der Verankerung von Proteinen in biologischen Membranen.

Eine weitere häufige Konformation zweier nebeneinander liegender Aminosäuresequenzen ist das β -Faltblatt. Hier sind die Peptidebenen wie auf einem gleichmäßig gefalteten Papierblatt angeordnet, so daß eine fast gestreckte Konformation entsteht, die durch Wasserstoffbrückenbindungen ihre Stabilität erhält.

An Stellen, an denen sich die Richtung der Peptidkette ändert, findet man häufig β -Schleifen. Vier Aminosäuren sind so angeordnet, daß sich der Verlauf der Kette um etwa 180° in die Gegenrichtung umkehrt. Dabei bildet sich die Wasserstoffbrücke zwischen der 1. und 4. Aminosäure aus.

In den meisten globulären Proteinen sind diese Strukturelemente nebeneinander anzutreffen.

Die dreidimensional gefaltete biologisch aktive Konformation eines Proteins wird als Tertiärstruktur bezeichnet.

Lagern sich nun einzelne Proteinmoleküle durch nicht kovalente Wechselwirkung aneinander, so entsteht die Quartärstruktur eines Proteins. Hierbei wird jedes einzelne Molekül als Monomer, die Gesamtheit als Oligomer bezeichnet.

Die Information über die biologisch aktive Konformation eines Proteins ist häufig bereits allein durch die Aminosäuresequenz festgelegt und entsteht oft spontan innerhalb weniger Minuten⁹⁹. Diese ist unter anderem durch die hydrophilen (Wasser liebenden) und hydrophoben (Wasser meidenden) Eigenschaften der Aminosäuren bedingt. Nur an die hydrophilen, dem Plasma zugewandten Determinanten können die Antikörper binden. Deshalb sind diese Bereiche immunologisch am interessantesten und zur Verwendung auf einem Immunoblot besonders geeignet. Aussagen über die zu erwartende Sekundär- und Tertiärstruktur bzw. der Hydrophilie und der Hydrophobie eines Proteins lassen sich mittels der Chou-Fasman-Predictions⁴¹ machen. Dies ist ein mathematischer Algorithmus, der den einzelnen Aminosäuren einen festen Wert zuordnet, anhand derer eine

Vorhersage zur räumlichen Anordnung der gegebenen Aminosäureabfolge gemacht werden kann.

Wie in Abbildung 4.1 exemplarisch für OspC gezeigt, konnten so die immunologisch interessantesten Bereiche ausgewählt und rekombinant hergestellt werden.

Aufgrund der Homologie der einzelnen Proteine (vgl. Tabelle 4.2), sowie durch die Auswahl konservierter Regionen, war es möglich, die benötigten Oligonukleotide unabhängig von der Subspezies zur Amplifikation zu nutzen. Dies gelang bei allen Proteinen bis auf OspA, bei dem zwei unterschiedliche Oligonukleotidsätze verwendet wurden (vgl. Tabelle 3.1). Es wurde versucht, die Proteine möglichst vollständig darzustellen, damit sie möglichst viele spezifische Epitope umfassen.

Das Protein p83/100 wurde zur Amplifikation in zwei Hälften geteilt, um ein möglichst großes Teilstück dieses spezifischen Proteins^{81,82,165} für den Immunoblot rekombinant herzustellen. Der Versuch, das Protein in einem Stück zu exprimieren, scheiterte. Zwar ließen sich eine erfolgreiche Ligation und Transfektion von *Escherichia coli* mittels PCR nachweisen, jedoch konnte das Protein nicht eluiert werden. Erfahrungsgemäß lassen sich große Proteine schlechter in *Escherichia coli* exprimieren. Da es sich aber um ein sehr spezifisches Antigen handelt^{81,83,114,213}, konnte auf diese Weise ein Fragment von etwa 71% bzw. 59% des Originalantigens hergestellt werden (vgl. Tabelle 4.4). Die beiden Fragmente überlappen einander, um einen Verlust von Epitopen zu minimieren (vgl. Tabelle 3.1).

Die erfolgreiche Amplifikation der Genomabschnitte konnte, wie in Abbildung 4.2 gezeigt, visualisiert und die entstandenen Genomfragmente den zu erwartenden Kilobasenpaaren gegenüber gestellt werden (Tabelle 4.1). Zur weiteren Kontrolle der entstandenen Fragmente wurden diese sequenziert (vgl. Abbildung 4.3). Die Sequenzen sind dem Anhang zu entnehmen. Es ergaben sich die größten Unterschiede homologer Proteine der drei humanpathogenen Subspezies zwischen *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, pKa und *Borrelia afzelii*, pKo, deren Sequenzen in Tabelle 4.2 verglichen werden. Immunologisch fanden sich jedoch keine Unterschiede zwischen den homologen Proteinen, so dass zur weiteren Prüfung nur jeweils eines der drei homologen Proteine verwandt wurde.

Die erfolgreiche Transfektion von *Escherichia coli* mit dem Vektor pGex konnte durch Anzucht auf einem ampicillinhaltigen Medium kontrolliert werden. Das Bakterium ist ampicillinsensibel, der Vektor enthält jedoch ein Ampicillinresistenzgen. Nach Induktion der Klone mit IPTG konnte im SDS-PAGE eine erfolgreiche Ligation des Genomamplifikates in den GST-Vektor dokumentiert und ein solcher Klon zur weiteren Arbeit ausgewählt werden, wenn, wie in Abbildung 4.4 gezeigt, eine übermäßig starke Proteinbande nachweisbar war, die mit dem vorher bestimmten Molekulargewicht übereinstimmte. So wurden die 22 Klone identifiziert, propagiert und bei -70°C eingefroren.

Die Isolierung der gewünschten Proteine erfolgte mittels Affinitätschromatographie. Diese wurde durch SDS-PAGE kontrolliert. Wie in Abbildung 4.4 zu sehen, ließen sich die Fusionsproteine weitgehend rückstandslos von den *Escherichia coli*-Proteinen trennen. Abbildung 4.5 zeigt alle 8 gereinigten Proteine von *Borrelia afzelii*, pKo. Unsichtbare Kontaminationen der Borrelienproteine sowie Degradationsprodukte wie bei OspA und OspC in Abbildung 4.5, fallen erfahrungsgemäß aufgrund der geringen Mengen auf dem Immunoblot nicht durch unspezifische Reaktionen ins Gewicht.

Zur erneuten Kontrolle der isolierten Proteine wurde deren Größe graphisch, wie in Diagramm 4.1 exemplarisch dargestellt, bestimmt. Tabelle 4.3 stellt die so gewonnenen Werte den rechnerisch zu erwartenden gegenüber. Dabei zeigt sich eine maximale Abweichung vom errechneten Wert von 14kD bei dem Protein p100-2. Dieser Unterschied zu dem vorhergesagten Wert ist wohl auf eine Insertion oder eine Deletion zurückzuführen. Die Sequenzierung als Goldstandard zur eindeutigen Identifizierung der Proteine ergab aber zweifelsfrei das Protein p83/100 (vgl. Sequenz im Anhang).

Wie unter Punkt 4.3.4, Tabelle 4.4 beschrieben, konnten so Fragmente der Borrelienantigene, die 50%–98% der Originalgröße umfassen, rekombinant in *Escherichia coli* hergestellt werden. Als Referenzwerte wurden die aus der Literatur bekannten Größen verwandt^{19,21,23,62,70,82,113,166,190} und den errechneten Größen der rekombinant erzeugten Proteine gegenüber gestellt. Da ein von einem Antikörper erkanntes Protein-Epitop in der Regel zwischen 8–14 Aminosäuren groß ist¹²⁵, kann bei einer Größe von minimal 50% der

Ursprungsgröße der Borrelienantigene von einer ausreichenden Anzahl an sensitiven und spezifischen Epitopen ausgegangen werden. Selbst das kleinste Protein p17 umfasst mehr als 70 Aminosäuren.

Um einen reproduzierbaren, verlässlichen Immunoblot herzustellen, mussten die Borrelienproteine im SDS-PAGE getrennt und mittels Westernblot-Technik auf eine feste Membran transferiert werden. Auch wenn durch dieses Verfahren Konformationsepitope (Epitope, die durch die räumliche Faltung der Proteine erst entstehen) der Proteine verloren gehen, ergab die Auftragung der nativen Proteine in der Slot-Blot-Technik weniger sensitive und spezifische Ergebnisse, als der „halbtrocken“ hergestellte Immunoblot. Ein Grund hierfür könnte eine unspezifische Bindung *Escherichia coli* eigener Glykoproteine an die rekombinanten Borrelienantigene sein. Dieser Theorie zufolge werden die Proteine durch Denaturierung in SDS, Auftrennung mittels SDS-PAGE sowie Übertragung auf die Blotmembran von diesen unspezifischen Zusätzen gereinigt. Hierzu würde auch das graphisch ermittelte Gewicht der Proteine gut passen (vgl. Tabelle 4.3), die bis auf p17 alle einige Kilodalton größer erscheinen, als sie vorausberechnet wurden. Dies scheint insbesondere ein Problem bei einem *Borrelia burgdorferi*-Immunoblot zu sein, da diese aufwendige Blotherstellung bereits von anderen Forschergruppen zur Herstellung eigener *Borrelia burgdorferi* Immunoblots vorgenommen wird^{166,213}. Auch kommerzielle Anbieter solcher rekombinanter Testverfahren wie z.B. Mikrogen¹²⁶ bedienen sich dieser Methode.

Ein Problem des Immunoblots mittels Totallysat ist die Mindereexpression einiger Proteine während der Kultivierung und dem damit verbundenen Verlust evtl. wichtiger Oberflächenantigene^{2,36,174}. Die Proteinkonzentrationsbestimmung der einzelnen Chargen war deshalb eine weitere Voraussetzung zur Herstellung eines reproduzierbaren Immunoblots. Die Konzentrationen konnten mittels eines Bradfordassays photometrisch bestimmt werden, nachdem zuvor Proben bekannten Proteingehalts vermessen worden waren, um ein Extinktions-Konzentrations-Diagramm (vgl. Diagramm 4.2) zu erstellen. Die so ermittelten Konzentrationen der Chargen sind Tabelle 4.5 zu entnehmen.

Aufgrund der in dieser Studie festgestellten Homologie unter den drei humanpathogenen *Borrelia burgdorferi* Subspezies (vgl. Tabelle 4.2), der uneinheitlichen Literatur ob ihrer Bedeutung^{42,73,81,137}, sowie des Verlustes an Konformationsepitopen durch die Halbtrocken-Herstellung des Immunoblots, wurde für die weitere Arbeit nur jeweils eines der acht unterschiedlichen Proteine ausgewählt, wobei jede Subspezies mit mindestens einem Protein vertreten ist. Die eingesetzten Proteinmengen sind Tabelle 4.6 zu entnehmen.

Durch sukzessive Auftragung der Proteine auf das Gel konnten, wie in Abbildung 4.6 demonstriert, Überlagerungen der Proteine vermieden und so ein weiteres Problem des Totallysates^{81,145} umgangen werden.

Abbildung 4.7 zeigt nun sechs positive und zwei negative Blotstreifen. Hierbei lässt sich gut eine Unterscheidung zwischen seropositiv und seronegativ treffen. Um nun eine Korrelation zwischen rekombinantem Immunoblot und Totallysat herzustellen, sind in Abbildung 4.8 exemplarisch zwei rekombinante Blotstreifen den entsprechenden Austestungen mittels Totallysat gegenüber gestellt. Bei letzteren fällt die starke Antigenität der Proteine p41 und HSP 60-73 auf, während die spezifischen Banden p100, p75, p39, p37, OspA, OspC, p17 wesentlich schwächer nachzuweisen sind. Dies ließ sich regelhaft bei den getesteten Seren mittels Totallysat nachweisen. Wie auch schon von anderen Gruppen vorher beschrieben, fällt die exakte Zuordnung und Interpretation der Antigenbanden im Totallysat schwer^{30,72,81,82,91,118,165,213}, v.a. bei den Antigenen, die eine ähnliche Molekülgröße besitzen wie z.B. p41 zu p39 und p37.

Wichtiger als der reine Nachweis von Antikörpern ist aber das zu beobachtende Muster. Abbildung 4.9 stellt nun jeweils zwei Blotstreifen einer klinisch diagnostizierten und im Totallysat bestätigten frischen Infektion zwei Blotstreifen eines späteren Stadiums gegenüber. Hierbei ließen sich die Ergebnisse anderer Forschergruppen bestätigen, wonach sich das Antigenmuster im Laufe der Infektion ändert^{2,54,81,114}. Während bei der frischen Infektion vermehrt die Antigene OspC und p17 nachzuweisen sind^{2,81,82,165,190}, werden in späteren Stadien vorwiegend große Proteine wie das p83/100 erkannt^{2,70,81,82,83,114,137,165,166,190,213}.

Es wurde gezeigt, dass es möglich ist, einen reliablen sensitiven und spezifischen Immunoblot als Bestätigungstest für die Lyme Borreliose anhand der ausgesuchten Proteine zu entwickeln. Dennoch ist einschränkend anzumerken, dass die Anzahl der getesteten Proben nicht ausreicht, eine weitergehende Aussage bezüglich des positiv und des negativ prädiktiven Wertes zu machen. Diese sind aber hinsichtlich der klinischen Entscheidungsfindung relevanter, da sie die Prävalenz der Krankheit in einer bestimmten Bevölkerungsgruppe mit berücksichtigen⁷³. Hierzu werden noch weitere Testergebnisse und epidemiologische Daten über die Verbreitung von Antiborreliaantikörpern in der gesunden Bevölkerung benötigt. Das Auftreten asymptomatischer seropositiver Patienten, das bei etwa 5–20% liegt^{73,81,103,136,190}, beeinträchtigt natürlich die Aussagekraft bezüglich der Behandlungsindikation jeder serologischen Nachweismethode. Hierbei besteht die Gefahr, dass unspezifische Symptome fälschlicherweise einer Infektion mit *Borrelia burgdorferi* zugeschrieben und entsprechend behandelt werden⁹³.

Ferner wurden in dieser Arbeit die Veränderungen von Antikörpertitern in Follow up Studien nicht untersucht, so daß die Aussage bezüglich des Stadiums der Erkrankung anhand des Testergebnisses noch fraglich erscheint.

Auch wird sich in der diagnostischen Anwendung des Tests noch herausstellen müssen, inwieweit die ausgewählten Proteine wirklich zur Qualität des Nachweises beitragen, oder ob einige weggelassen bzw. gegen ein homologes Protein einer anderen Subspezies ausgetauscht werden müssen.

Es ist in Zukunft auch zu überlegen, ob weitere Proteine wie p58^{81,82,213} oder p14⁸² ebenfalls rekombinant exprimiert und dem Immunoblot zugeführt werden sollten, um hier noch eine Verbesserung der Aussagekraft zu erhalten.

6 Zusammenfassung

Die Lyme Borreliose ist eine Infektionskrankheit, bei der der Labordiagnostik eine besondere Bedeutung zukommt. Dabei stützt sie sich im Wesentlichen auf serologische Nachweisverfahren, da der direkte Erregernachweis durch Mikroskopie, Anzucht oder PCR derzeit nur ungenügende Ergebnisse erbringt.

Ziel der Arbeit war die Generierung eines rekombinanten Immunoblots als Bestätigungstest einer erfolgten Infektion.

Dazu wurden einige sensitive und spezifische Proteine anhand der Literatur ausgesucht und in *Escherichia coli* rekombinant propagiert. Durch Sequenzierung der amplifizierten Abschnitte konnte der genaue Nachweis über die propagierte genetische Information erbracht werden. Durch Ligation dieser Teilstücke in pGex und Transfektion von *Escherichia coli* konnten diese Fusionsproteine rekombinant hergestellt und durch Affinitätschromatographie rückstandslos von den *Escherichia coli* Proteinen getrennt werden.

Um reproduzierbare Proteinkonzentrationen auf dem Immunoblot einstellen zu können, mussten die Proteinkonzentrationen der einzelnen Chargen photometrisch gemessen werden. Da das „Slotblotverfahren“ keine reliablen Testergebnisse lieferte, wurden die Immunoblots in der „Halbtrockentechnik“ hergestellt. Dazu wurden lediglich 8 der 22 propagierten Proteine verwendet, da durch die vorhergegangenen Sequenzanalysen und Vergleiche eine hohe Homologie der Abschnitte festgestellt worden war.

Die zur Evaluation des Immunoblots benötigten Proben wurden der Serenbank des Mikrobiologischen Institutes der Universität zu Hamburg entnommen.

Die Evaluation erfolgte in drei Schritten. Zunächst wurden positive und negative Seren im rekombinanten Blot einander gegenübergestellt. Es folgte der Vergleich des neuen Immunoblots mit dem herkömmlichen Testverfahren mittels Totallysat. Abschließend wurde versucht, anhand des nachzuweisenden Bandenmusters Rückschlüsse auf das Stadium der Erkrankung zu ziehen. Diese für die Klinik bedeutsamen Anwendungen erwiesen sich als möglich. So konnte ein aussagekräftiger neuer Immunoblot hergestellt werden.

7 Anhang

Borrelia afzelii, pKo, p100-2

1 GGTACCAGATGAAGAGCATAAAAAAGAGATTGAAAGTCAGGTTGATGCTAAAA
V P D E E H K K E I E S Q V D A K
54 AGAAACAAAAGGAAGAATTAGATAAAAAGGCAATTGATCTTGATAAAGCTCAA
K K Q K E E L D K K A I D L D K A Q
107 CAAAAATTAGATTTTGCTGAAGATAATCTAGATATTCAAAGGGATACTGTTAG
Q K L D F A E D N L D I Q R D T V R
160 AGAGAAGCTTCAAGAAAATATTAACGAGACTAATAAGGAAAAGAATTTACCAA
E K L Q E N I N E T N K E K N L P
213 AGCCTGGTGATGTAAGTTCTCCTAAGGTTGATAAGCAGTTGCAGATAAAAGAG
K P G D V S S P K V D K Q L Q I K E
266 AGTCTAGAAGATTTGCAAGAGCAGCTTAAAGAAGCTAGTGATGAAAATCAAAA
S L E D L Q E Q L K E A S D E N Q K
319 AAGAGAAATAGAAAAGCAAATTGAAATCAAAAAAATGATGAAGAACTTTTTTA
R E I E K Q I E I K K N D E E L F
372 AAAATAAAGATCATAAAGCATTAGATCTTAAGCAAGAATTAATTCTAAAGCT
K N K D H K A L D L K Q E L N S K A
425 TCTAGTAAAGAAAAAATTGAAGGCGAAGAAGAGGATAAAGAATTAGATAGTAA
S S K E K I E G E E E D K E L D S K
478 AAAAAATTTAGAGCCTGTTTCTGAGGCTGATAAAGTAGATAAAAATTTCCAAGT
K N L E P V S E A D K V D K I S K
531 CTAACAACAATGAGGTTAGTAAATTATCCCCGTTAGATGAGCCTTCTTATAGC
S N N N E V S K L S P L D E P S Y S
584 GACATTGATTGCAAAGAGGGTGTAGATAACAAAGATGTTGATTGCAAAAAC
D I D S K E G V D N K D V D L Q K T
637 TAAACCCCAAGTTGAAAGTCAACCTACTTCGTTAAATGAAGATTTGATTGATG
K P Q V E S Q P T S L N E D L I D
690 TGTCTATAGATTCCAGTAATCCTGTCTTTTTAGAGGTTATCGATCCGATTACA
V S I D S S N P V F L E V I D P I T
743 AATTTAGGAACGCTTCAACTTATTGATTTGAATACCGGTGTTAGACTTAAAGA
N L G T L Q L I D L N T G V R L K E
796 AAGTGCTCAACAAGGTATTCAGCGATATGGAATTTATGAACGTGAAAAAGATT
S A Q Q G I Q R Y G I Y E R E K D
849 AAGTCGAC
. V D

Borrelia burgdorferi sensu stricto, pKa, p100-1

1 GGTACCGGACTTTGTAAATATGGATCTTGAGTTTGTAATTATAAAGGCCCTT
V P D F V N M D L E F V N Y K G P
54 ATGATTCTACAAATACATATGAACAAATAGTGGGTATTGGGGAGTTTTTAGCA
Y D S T N T Y E Q I V G I G E F L A
107 AGACCGTTGACCAATTCCAATAGCAACTCAAGTTATTATGGTAAATATTTTAT
R P L T N S N S N S S Y Y G K Y F I
160 TAATAGATTTTATTGGTGATCAAGATAAAAAAGCAAGCGTTGATGTTTTTTCTA
N R F I G D Q D K K A S V D V F S
213 TTGGTAGTAAGTCAGAGCTTGACAGTATATTGAATTTAAGAAGAATTCTTACA
I G S K S E L D S I L N L R R I L T
266 GGGTATTTAATAAAGTCTTTCGATTATGACAGGTCTAGTGCAGAATTAATTGC
G Y L I K S F D Y D R S S A E L I A
319 TAAGGTTATTACAATATATAATGCTGTTTATAGAGGAGATTTGGATTATTATA
K V I T I Y N A V Y R G D L D Y Y
372 AAGGGTTTTATATTGAGGCTGCTTTAAAGTCTTTAAGTAAAGAAAATGCAGGT
K G F Y I E A A L K S L S K E N A G
425 CTTTCTAGGGTTTATAGTCAGTGGGCTGGAAAGACACAAATATTTACTCCTCA
L S R V Y S Q W A G K T Q I F T P H
478 TAAAAGGATATTTTGTCTGGAAATATTGAGTCTGACATTGATATTGACAGTT
K K D I L S G N I E S D I D I D S
531 TAGTTACAGATAAGGTGGTGGCAGCTCTTTTAAGTGAAAATGAAGCAGGTGTT
L V T D K V V A A L L S E N E A G V
584 AACTTTGCAAGAGATATTACAGATATTCAAGGCGAAACTCATAAGGCAGATCA
N F A R D I T D I Q G E T H K A D Q
637 AGATAAAATTGATATTGAATTAGACAATATTCATGAAAGTGATTCCAATATAA
D K I D I E L D N I H E S D S N I
690 CAGAACTATTGAAAATTTAAGGGATCAGCTTGAAAAAGCTACAGATGAAGAG
T E T I E N L R D Q L E K A T D E E
743 CATTAGTCGAC
H . S ?

Borrelia burgdorferi sensu stricto, pKa, p75

1 GGTACCATTTCGAACAAATGGTAGACCACTTAGTTCAAAAAACAAAAGAACCATG
V P F E Q M V D H L V Q K T K E P C
55 CCCTAAGGCTATTAAGATGCTGGGCTTAAAGCTTCCGATATCAATGAAGTAAT
P K A I K D A G L K A S D I N E V I
109 ACTTGTAGGTGGATCAACAAGAATTCCTGCTATTCAAAAAATTGTAAAAGATAT
L V G G S T R I P A I Q K I V K D I
163 ATTTGGACAAGATCCTAACAAAGGAGTAAATCCAGATGAAGCTGTAGCAATTGG
F G Q D P N K G V N P D E A V A I G
217 AGCTGCTATTCAGGGTGGCATTCTAACAGGAGAACTAAAGACATGGTACTCCT
A A I Q G G I L T G E T K D M V L L
271 TGACGTTACTCCGCTCTCACTAGGAATAGAAACACTAGGCGGGGTTATGTCTAA
D V T P L S L G I E T L G G V M S K
325 ACTTATTGAACGAAACACCACAATTCCTACAAAAAAGTCAGGTATTCTCAAC
L I E R N T T I P T K K S Q V F S T
379 AGCTGCTGACAATCAAACCTCTGTTGATATTAAAGTCCTTCAAGGTGAACGTGA
A A D N Q T S V D I K V L Q G E R E
433 AATGGCAGCACAAAACAGAATACTTGGTAATTTTATACTTGATGGAATACCAGC
M A A Q N R I L G N F I L D G I P A
487 AGCACCAAGAGGAGTGCCTCAAATTGAAGTTAGCTTTGACATTGATGCTAATGG
A P R G V P Q I E V S F D I D A N G
541 AATAGTTCATGTGTCTGCAAAAGATATGGGAACGGGCAAAGAACAAAAATTAG
I V H V S A K D M G T G K E Q K I R
595 AATTGAATCATCATCAGGACTCTCTGAATCAGAAATAGATCGAATGGTAAAAGA
I E S S S G L S E S E I D R M V K D
649 TGCAGAAGCTCATGCGGAAGAAGATAAAAAATTAAAAGAAAATATTGAAGCAAA
A E A H A E E D K K L K E N I E A K
703 AAATACAGCTAATTCTTTAATTTATCAAACAGAAAAATCATTAAAAGAATATTC
N T A N S L I Y Q T E K S L K E Y S
757 TGAAAAAATTTCAAGCGAAGACAAAGAAGCTATTGAAAGTAAAATAAAAGAATT
E K I S S E D K E A I E S K I K E L
811 AAAAGAAAGTCTTGAAAAAGAAGACATTTCACTTATAAAATCTAGAACAGAAGA
K E S L E K E D I S L I K S R T E E
865 ACTTCAAAAAGCTTCTTACAAAATAGCTGAGATGATGTATAAAGATTCTTCCCA
L Q K A S Y K I A E M M Y K D S S Q
919 GCAAAATGCAAACAGCCAACAAGAAAATGGCCCACAAAGCAATACAAGCGAAGA
Q N A N S Q Q E N G P Q S N T S E E
973 GGGTAAAGAGGCTGATTATGAGGTTGTTGACGAGGATAAAAAATAGTCGAC
G K E A D Y E V V D E D K K . S T

Borrelia burgdorferi sensu stricto, pKa, p39

1 GGTACCTGATGGAACCTTTGATGATAAATCTTTAATGAGAGTGCTTTAAATGG
V P D G T F D D K S F N E S A L N G
55 CGTAAAAAAGTTAAAGAAGAATTTAAAATTGAGCTTGTTTTAAAAGAATCCTC
V K K V K E E F K I E L V L K E S S
109 ATCAAATTCTTATTTATCTGATCTTGAAGGGCTTAAGGATGCGGGCTCAGATTT
S N S Y L S D L E G L K D A G S D L
163 AATTTGGCTTATTGGGTATAGATTTAGCGATGTGGCCAAGGTTGCGGCTCTTCA
I W L I G Y R F S D V A K V A A L Q
217 AAATCCCGATATGAAATATGCAATTATTGATCCTATTTATTCTAACGATCCTAT
N P D M K Y A I I D P I Y S N D P I
271 TCCTGCAAATTTGGTGGGCATGACCTTTAGAGCTCAAGAGGGTGCATTTTTAAC
P A N L V G M T F R A Q E G A F L T
325 GGGTTATATTGCTGCAAACCTTTCTAAAACAGGTAAAATTGGATTTTTAGGGGG
G Y I A A K L S K T G K I G F L G G
379 AATAGAAGGCGAGATAGTAGATGCTTTTAGGTATGAGTATGAAGCTGGTGCTAA
I E G E I V D A F R Y E Y E A G A K
433 GTATGCTAATAAAGATATAAAGATATCTACTCAGTATATTGGTAGTTTTGCTGA
Y A N K D I K I S T Q Y I G S F A D
487 CCTTGAAGCTGGTAGAAGCGTTGCAACTAGGATGTATTCTGATGAGATAGACAT
L E A G R S V A T R M Y S D E I D I
541 TATTCATTATGCTGCAGGCCCTGGAGGAATTGGGGCTATTGAGGTTGCAAAGA
I H Y A A G P G G I G A I E V A K E
595 ACTTGGTTCTGGGCATTACATTATTGGAGTTGATGAAGATCAAGCATATCTTGC
L G S G H Y I I G V D E D Q A Y L A
649 TCCTGACAATGTAATAACATCTACAATAAAGATGTTGGTAGAGCTTTAAATAT
P D N V I T S T T K D V G R A L N I
703 TTTTACATCTAACCATTTAAAACTAATACTTTCGAAGGTGGCAAATTAATAAA
F T S N H L K T N T F E G G K L I N
757 TTATGGCCTTAAAGAAGGAGTTGTGGGGTTTGTAAGAAATCCTAAAATGATTTT
Y G L K E G V V G F V R N P K M I S
811 CTTTGAACCTGAAAAAGAAATTGACAATCTTTCTAGCAAATAATCAACAAAGA
F E L E K E I D N L S S K I I N K E
865 AATTATTGTTCCATCTAATAAAGAAAGTTATGAGAAGTTTCTTAAAGAATTTAT
I I V P S N K E S Y E K F L K E F I
919 TTAAGTCGAC
. V D

Borrelia garinii, pBi, p37

1 GGTACCTTGTA AATTATATGAAAAGCTTACAAATAAATCGCAACAAGCTTTAGC
 V P C K L Y E K L T N K S Q Q A L A
 55 TAAAGCTTTTGTCTATGATAAAGATATAGCTGATAATAAAAGTACAAATTCTAC
 K A F V Y D K D I A D N K S T N S T
 109 TTCTAAACTAGATAATAGTTCTCTAGATTCTATAAAAGACAACAACAGAAGTGG
 S K L D N S S L D S I K D N N R S G
 163 TCGCACATCTAGAGCTTTAGATGATGCTGAAGAAATTGGGGTAAAAGAAAGTAA
 R T S R A L D D A E E I G V K E S N
 217 TCAAAACAGAAATGATCAACAACAAAATAATGAAAGTAAAGTAAAAGAAAGTGA
 Q N R N D Q Q Q N N E S K V K E S E
 271 AAAAAACAATAGTTCAGGTATACAAGCAGATGATAGTGTTTTAGACACAGCTCA
 K N N S S G I Q A D D S V L D T A H
 325 TTCCGATGCTAGTGAAGTAGAAAACAAGAAACATGATACTAGCAGACAACCTCA
 S D A S E V E N K K H D T S R Q P Q
 379 ACTACTTAATAAGGACTCTAGTGAAGCTAGAGAAGCTAGTAAAATTATACAAAA
 L L N K D S S E A R E A S K I I Q K
 433 AGCTTCTACCTCTTTAGAAGAAGCTGAGAAAGTAAATGCAGCTTTAAAGGAAAC
 A S T S L E E A E K V N A A L K E T
 487 AAGATCAAAACTTGATAAGATAAAAAGATTAGCTGATAGCGCTAAATCTTATTT
 R S K L D K I K R L A D S A K S Y L
 541 AAATAATGCTAGAAAAAATTCTAGA ACTAATGGTTCTATACTAGAAATATTGCC
 N N A R K N S R T N G S I L E I L P
 595 TAACCTTGATAAAGCAATTGAAAAGGCTATTAGTAGTTATGCCTCTCTTAATGT
 N L D K A I E K A I S S Y A S L N V
 649 TTGCTATACTGATGCAATTGCTGCTTTAGCAAAAGCTAAGAATGATTTTGAGCA
 C Y T D A I A A L A K A K N D F E H
 703 TGCAAAAAGAAAAGCAAATGATGCTTTAGAAGAAGCTTTAAAAGATATACCTCA
 A K R K A N D A L E E A L K D I P H
 757 TTTTAGGGGGTACAATTATCTTTACCATTACCGGATAAATAATGCTAATGATGC
 F R G Y N Y L Y H Y R I N N A N D A
 811 AATGGAGAGTGCTAAAAGTTTGCTAGAGGTTGCTAAGAATAAACAAAAAGAACT
 M E S A K S L L E V A K N K Q K E L
 865 TAATGAAAATATGACTAAGACAAATAAGGACTTTCAAGAGTTAAATGATATATA
 N E N M T K T N K D F Q E L N D I Y
 919 TAAAAAATTGCAAGATATGGACTCTAGATAAGTCGAC
 K K L Q D M D S R . V D

Borrelia afzelii, pKo, OspA

1 GGTACCTTTGCCTGGTCAAATGAAAGTTCTTGTAAGTAAAGAAAAAGACAAAG
V P L P G E M K V L V S K E K D K
54 ACGGTAAGTACAGTCTAAAGGCAACAGTAGACAAGATTGAGCTAAAAGGAACT
D G K Y S L K A T V D K I E L K G T
107 TCTGATAAAGACAATGGTTCTGGGGTGCTTGAAGGTACAAAAGATGACAAAAG
S D K D N G S G V L E G T K D D K S
160 TAAAGCAAAATTAACAATTGCTGACGATCTAAGTAAACCACATTCGAACTTT
K A K L T I A D D L S K T T F E L
213 TCAAAGAAGATGGCAAAACATTAGTGCCAAGAAAAGTAAGTTCTAAAGACAAA
F K E D G K T L V P R K V S S K D K
266 ACATCAACAGATGAAATGTTCAATGAAAAAGGTGAATTGTCTGCAAAAACCAT
T S T D E M F N E K G E L S A K T M
319 GACAAGAGAAAATGGAACCAAACCTGAATATACAGAAATGAAAAGCGATGGAA
T R E N G T K L E Y T E M K S D G
372 CCGGAAAAGCTAAAGAAGTTTTAAAAAACTTTACTCTTGAAGGAAAAGTAGCT
T G K A K E V L K N F T L E G K V A
425 AATGATAAAGTAACATTGGAAGTAAAAGAAGGAACCGTTACTTTAAGTAAGGA
N D K V T L E V K E G T V T L S K E
478 AATTGCAAAATCTGGAGAAGTGACAGTTGCACTTAATGACACTGACACTACTC
I A K S G E V T V A L N D T D T T
531 AGGCTACTAAAAGACTGGCGCATGGAATTCAGGCACTTAAGTCGAC
Q A T K K T G A W N S G T . V D

Borrelia afzelii, pKo, OspC

1 GGTACCATTTATATCTTGTAAATAATTCAGGGAAAGGTGGGGATTCTGCATCTA
 V P F I S C N N S G K G G D S A S
 54 CTAATCCTGCTGACGAGTCTGCGAAAGGGCCTAATCTTACAGAAATAAGCAA
 T N P A D E S A K G P N L T E I S K
 107 AAAATTACAGATTCTAATGCATTTGTAAGTCTGCTGTTAAAGAAGTTGAGACTTT
 K I T D S N A F V L A V K E V E T L
 160 GGTTTTATCTATAGATGAACTTGCTAAGAAAGCTATTGGTCAAAAAATAGACA
 V L S I D E L A K K A I G Q K I D
 213 ATAATAATGGTTTAGCTGCTTTAAATAATCAGAATGGATCGTTGTTAGCAGGA
 N N N G L A A L N N Q N G S L L A G
 266 GCCTATGCAATATCAACCCTAATAACAGAAAAATTGAGTAAATTGAAAAATTT
 A Y A I S T L I T E K L S K L K N L
 319 AGAAGAATTAAGACAGAAATTGCAAAGGCTAAGAAATGTTCCGAAGAATTTA
 E E L K T E I A K A K K C S E E F
 372 CTAATAAACTAAAAAGTGGTCATGCAGATCTTGGCAAACAGGATGCTACCGAT
 T N K L K S G H A D L G K Q D A T D
 425 GATCATGCAAAGCAGCTATTTTAAAAACACATGCAACTACCGATAAAGGTGC
 D H A K A A I L K T H A T T D K G A
 478 TAAAGAATTTAAAGATTTATTTGAATCAGTAGAAGGTTTGTAAAAGCAGCTC
 K E F K D L F E S V E G L L K A A
 531 AAGTAGCACTAACTAATTCAGTTAAAGAACTTAACAAGTCCTGTTGTAGCAGA
 Q V A L T N S V K E L N K S C C S R
 584 AAGTCCAAAAACCTTAAGTCGAC
 K S K K P . V D

Borrelia afzelii, pKo, p17

1 GGTACCTATTACATTTAAAGAAAATGGAGCGGGGAAGATGAATTCTCAGGAA
 V P I T F K E N G A G E D E F S G
 54 TATACGATTTAATACTCAACGCCGAAAAGCAGTAGAAAAAATTGGGATGAAA
 I Y D L I L N A A K A V E K I G M K
 107 GATATGACAAAACGGTTCGAAGAGGCCGCTAAAGAAAATCCTAAAACCTACAGC
 D M T K T V E E A A K E N P K T T A
 160 TAATGGGATAATTGAGATTGTAAAAGTAATGAAAGCAAAGTGGAAAACATTA
 N G I I E I V K V M K A K V E N I
 213 AAGAAAAACAACTAAAAATCAAAAATAAGTCGAC
 K E K Q T K N Q K . V D

7 Abkürzungsverzeichnis

ACA	Akrodermatitis Chronica Atrophicans
as	Antisense
BSA	Bovines Serum Albumin
BSK-Medium	Babour-Stoenner-Kelly-Medium
CDC	Centers for Disease Control
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EM	Erythema migrans
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
GST	Gluthation–S–Transferase
HSP	Heat Shock Protein
IFT	Immunfluoreszenztest
kD	Kilodalton
Konz.	Konzentration
LA	Lyme Arthritis
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
NB	Neuroborreliose
Osp	Outer surface Protein
p	Das für ein Protein kodierende DNA-Fragment
p	Das Protein
PCR-RFLP	Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism
PVDF	Polyvinylidifluorchlorid
RekomBlot	Rekombinant hergestellter Immunoblot
RKI	Robert Koch Institut
rpm	Rounds per minute
s	Sekunden
s	Sense
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sp. nov.	Species nova
ssp	Subspezies

9. Literaturverzeichnis

- 1 Afzelius A (1910) Verhandlungen der dermatologischen Gesellschaft zu Stockholm. Arch Dermatol Syphilol. **101**: 404
- 2 Aguero-Rosenfeld ME, Nowakowski J, Bittker S, Cooper D, Nadelman RB, Wormser GP (1996) Evolution of the serologic response to *Borrelia burgdorferi* in treated patients with culture confirmed erythema migrans. J Clin Microbiol **34**: 1-9
- 3 Ai C, Hu R, Hyland KE, et al. (1990) Epidemiological and aetiological evidence for transmission of Lyme disease by adult *Ixodes persulcatus* in an endemic area in China. Int J Epidemiol **19**: 1061
- 4 American College of Physicians (1997) Guidelines for laboratory evaluation in the diagnosis of Lyme disease. Ann Intern Med **127**: 1106-1108
- 5 Anzola J, Luft BJ, Gorgone G, et al. (1992) *Borrelia burgdorferi* HSP70 homolog: Characterization of an immunoreactive stress protein. Infect Immun **60**: 3704
- 6 Asbrink E, Hederstedt B, Hovmark A (1985) The spirochaetal etiology of erythema chronicum migrans. Acta Derm Venerol (Stockh) **64**: 291-295
- 7 Asbrink E, Hovmark A (1985) Successful cultivation of spirochaetes from skin lesions of patients with erythema chronicum migrans Afzelius and acrodermatitis chronica atrophicans. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand Sect B **93**: 161-163
- 8 Asbrink E, Hovmark A (1988) Early and late cutaneous manifestations of *Ixodes*-borne borreliosis (erythema migrans, borreliosis, Lyme borreliosis). Ann NY Acad Sci **539**: 4
- 9 Association of State and Territorial Public Health Laboratory Directors (1995) Recommendations. In: Second National Conference on serologic diagnosis of Lyme disease. Association of Public Health Laboratories, Washington, D.C. 1-5
- 10 Atlas RM (Hrsg)(1997) Principles of Microbiology, 2nd edn. Wm. C. Brown Publishers, London 960-964, 1210
- 11 Balmelli T, Piffaretti (1995) Association between different clinical manifestations of Lyme disease and different species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Res Microbiol **146**: 329-340
- 12 Bannwarth A (1941) Chronische lymphozytäre Meningitis, entzündliche Polyneuritis und "Rheumatismus". Ein Beitrag zum Problem „Allergie und Nervensystem“. Arch Psychiatr Nervenkr. **113**: 284-376

- 13 Baranton G, Postic D, Saint Girons I, Boerlin P, Piffaretti JC, Assous M, Grimont PA (1992) Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov. and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *Int J Sys Bacteriol* **42**: 378-383
- 14 Barbour AG (1984) Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. *Yale J Biol Med.* **57**: 521
- 15 Barbour AG, Burgdorfer W, Hayes SF, Peter O, Aeschlimann A (1983) Isolation of a cultivable spirochaete from *Ixodes ricinus* ticks of Switzerland. *Curr Microbiol* **8**: 123–126
- 16 Barbour AG, Garon CF (1987) Linear plasmids of the bacterium *Borrelia burgdorferi* have covalently closed ends. *Science* **237**: 409
- 17 Barbour AG, Hayes SF (1986) Biology of *Borrelia* species. *Microbiol Rev* **50**: 381-400
- 18 Barbour AG, Hayes SF, Heiland RA, Schrupf ME, Tessier SF (1986) A *Borrelia* genus-specific monoclonal antibody binds to a flagellar epitope. *Infect Immun* **52**: 549-554
- 19 Barbour AG, Tessier SL, Hayes SF (1984) Variation in a major surface protein of Lyme disease spirochetes. *Infect Immun* **45**: 94
- 20 Benach JL, Bosler EM, Hanrahan JP, Coleman JL, Habicht GS, Bast TF, Cameron DJ, Ziegler JL, Barbour AG, et al. (1983) Spirochaetes isolated from the blood of two patients with Lyme disease. *N Engl J Med* **308**: 740-742
- 21 Benach JL, Coleman JL, Golightly MG (1988) A murine IgM monoclonal antibody binds an antigenic determinant in outer surface protein A, an immunodominant basic protein of the Lyme disease spirochete. *J Immunol.* **140**: 265
- 22 Berger BW, Johnson RC, Kodner C, et al. (1992) Cultivation of *Borrelia burgdorferi* from erythema migrans lesions and perilesional skin. *J Clin Microbiol* **30**: 359
- 23 Bergstrom S, Bundoc VG, Barbour AG (1989) Molecular analysis of linear plasmid-encoded major surface proteins, OspA and OspB, of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Molecular Microbiol* **3**: 479
- 24 Bockenstedt LK, Hodzie F, Feng S, Bourrel KW, de Silva A, Montgomery RR, Fikrig E, Radolf JD, Barthold SW (1997) *Borrelia burgdorferi* strain-specific OspC mediated immunity in mice. *Infect Immun* **65**: 4661- 4667
- 25 Bosler EM, Coleman JL, Benach JL, et al. (1983) Natural distribution of the *Ixodes dammini* spirochetes. *Science* **220**: 321

- 26 Brade V (1998) Borreliosen. In: Thomas L (Hrsg) Labor und Diagnose. Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik. 5. Auflage, TH-Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt/Main: 1201-1205
- 27 Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. **72**: 248
- 28 Brettschneider S, Bruckbauer H, Klugbauer N, Hofmann H (1998) Diagnostic Value of PCR for Detection of *Borrelia burgdorferi* in Skin Biopsy and Urine Samples from Patients with Skin Borreliosis. J Clin Microbiol **36**: 2685-2665
- 29 Brown SL, Hansen SL, Langone JJ (1999) Role of serology in the diagnosis of Lyme disease. JAMA **282**: 62-66
- 30 Bruckbauer HR, Preac Mursic V, Fuchs R, Wilske B (1992) Crossreactive proteins of *Borrelia burgdorferi*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis **11**: 224-232
- 31 Bundoc VG, Barbour AG (1989) Clonal polymorphisms of outer membrane protein OspB of *Borrelia burgdorferi*. Infect Immun **57**: 2733
- 32 Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grunwaldt F, Davies JP (1982) Lyme disease-a tick-borne spirochaetosis? Science **216**: 1317-1319
- 33 Burgdorfer W, Kierans JE (1983) Ticks and Lyme disease in the United States. ANN Intern Med **99**: 121
- 34 Busch U, Hitzo-Teufel C, Boehmer R, Fingerle V, Nitschko H, Wilske B, Preac Mursic V (1996) Three species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*) identified from cerebrospinal fluid isolates by pulsed-field gel electrophoresis and PCR. J Clin Microbiol **34**: 1072-1078
- 35 Canica MM, Nato F, du Merle L, Mazie JC, Baranton G, Postic D (1993) Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. Scand J Infect Dis **25**: 441-448
- 36 Carrol J, Gherardini FC (1996) Membrane protein variations with in vitro passage of *Borrelia burgdorferi*. Infect Immunol **64**: 392-398
- 37 Centers for Disease Control (1994) Proceedings of of the Second National Conference on Serologic Diagnosis of Lyme Disease. Washington, DC: Association of State and Territorial Public Health Laboratory Directors: 111

- 38 Centers for Disease Control (1995) Recommendations for test performance and interpretation from the Second International Conference on serologic diagnosis of Lyme Disease. *Morbidity and Mortality Weekly Report* **44**: 590-591
- 39 Centers for Disease Control and Prevention (1997) Lyme disease-United States 1996. *Morbidity and Mortality Weekly Report* **46**: 531-535
- 40 Centers for Disease Control and Prevention (1997) Recommendations and Reports: Case Definitions for Infectious Conditions Under Public Health Surveillance. *Morbidity and Mortality Weekly Report* **46** (RR10): 1-55
- 41 Chou PJ, Fasman GD (1974) Prediction of Protein Conformation. *Biochemistry* **13**: 222-245
- 42 Ciesielski CA, Markowitz LE, Horsley R, Hightower AW, Russell H, Broome CV (1989) Lyme disease surveillance in the United States 1983-1986. *Review of Infectious Diseases* H (Suppl.6): 1435-1441
- 43 Cimmino MA, (1998) Relative Frequency of Lyme Borreliosis and of its Clinical Manifestations in Europe. *Infection* **5**: 298
- 44 Cluss RG, Goel AS, Rehm HL, Schoenecker JG, Boothby JT (1996) Coordinate synthesis and turnover of Heat Shock Proteins in *Borrelia burgdorferi*: Degradation of DnaK during recovery from Heat Shock. *Infect Immun* **64**: 1736-1743
- 45 Coburn J, Leong JM, Erban JK (1993) Integrin α IIb β 3 mediates binding of *Borrelia burgdorferi* to human platelets. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **90**: 7059
- 46 Coburn J, Magoun L, Bodary SC, Leong JM (1998) Integrin $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_5\beta_1$ mediate attachment of Lyme disease spirochetes to human cells. *Infect Immun* **66**:1946
- 47 Craft JE, Fischer DK, Shimamoto GT, et al. (1986) Antigens of *Borrelia burgdorferi* recognized during Lyme disease: Appearance of a new IgM response and expansion of the IgG response late in the illness. *J Clin Invest* **78**: 934-939
- 48 Dattwyler RJ, Luft BJ (1989) Immunodiagnosis of Lyme borreliosis. *Rheumatology Clin North Am* **15**: 727-734
- 49 Dekonenko EJ, Steere AC, Berardi VP, et al. (1988) Lyme borreliosis in the Soviet Union: A cooperative US-USSR report. *J Infect Dis* **158**: 748
- 50 Dinerman H, Steere AC (1992) Lyme disease associated with fibromyalgia. *Ann Intern Med* **117**: 281
- 51 Dressler F, Ackermann R, Steere AC (1994) Antibody responses to the three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* in European Lyme borreliosis. *J Infect Dis* **169**: 313-318

- 52 Dressler F, Whalen JA, Reinhardt BN, Steere AC (1993) Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. *J Infect Dis* **167**: 392-400
- 53 Duray PH, Steere AC (1988) Clinical pathologic correlations of Lyme disease by stage. *Ann NY Acad Sci* **539**: 65
- 54 Dykhuizen AE, Polin DS, Dunn JJ, Wilske B, Preac Mursic V, Dattwyler RJ, Luft BJ (1993) *Borrelia burgdorferi* is clonal: Implications for taxonomy and vaccine development. *Proc Natl Acad Sci* **90**: 10163-10167
- 55 Engstrom SM, Shoop E, Johnson RC (1995) Immunoblot interpretation criteria for serodiagnosis of early Lyme disease. *J Clin Microbiol* **33**: 419-427
- 56 Fahrer H, Sauvaain MJ, v.d. Linden S, Zhioua E, Gern L, Aeschlimann A (1988) Prevalence of Lyme borreliosis in a swiss population at risk. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift* **118**: 65-69
- 57 Fahrer H, v. d. Linden SM, Sauvain MJ, Gern L, Zhioua E, Aeschlimann A (1991) The prevalence and incidence of clinical and asymptomatic Lyme Borreliosis in a population at risk. *J Infect Dis* **163**: 305-310
- 58 Feder HM Jr., Gerber MA, Luger SW, Ryan RW (1992) Persistence of serum antibodies to *Borrelia burgdorferi* in patients treated for Lyme disease. *Clin Infect Dis* **15**: 788-793
- 59 Fikrig ES, Barthold W, Persing DH, Sun X, Kantor FS, Flavell RA (1992) *Borrelia burgdorferi* strain 25015: Characterization of outer surface protein A and vaccination against infection. *J Immunol* **7**: 2256-2260
- 60 Fraser CM, Casjens S, Huang WM, et al. (1997) Genomic sequence of a Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* **390**: 580
- 61 Fuchs H, Wallich R, Simon MM, Kramer MD (1994) The outer surface protein A of *Borrelia burgdorferi* is a Plasminogen binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 12594-12598
- 62 Fuchs R, Jauris S, Lottspeich F, et al. (1992) Molecular analysis and expression of a *Borrelia burgdorferi* gene encoding a 22kDa protein (pC) in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiol.* **6**: 503
- 63 Fukunaga M, Takabashi Y (1994) Pulsed field gel electrophoresis analysis of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolated in Japan and taxonomic implications with Lyme disease spirochetes. *Microbiol Immunol* **38**: 747-751
- 64 Fung BP, McHugh GL, Leong JM, Steere AC (1994) Humoral immun response to outer surface protein C of *Borrelia burgdorferi* in Lyme disease: Role of the immunoglobulin M response in the serodiagnosis of early infection. *Infect Immun* **62**: 3213-3221

- 65 Garcia-Monco JC, Fernandez-Villar B, Benach JL (1989) Adherence of the Lyme disease spirochete to glial cells and cells of glial origin. *J Infect Dis* **160**: 497
- 66 Garin C, Bujadoux C (1922) Paralyse par les Tiques. *J Med Lyon*. **71**: 765-776
- 67 Ge Y, Charon NW (1997) An unexpected flaA homolog is present and expressed in *Borrelia burgdorferi*. *J Bacteriol* **179**: 552-556
- 68 Georgilis K, Steere AC, Klempner MS (1991) Infectivity of *Borrelia burgdorferi* correlates with resistance to elimination by phagocytic cells. *J Infect Dis* **163**:150
- 69 Gerber MA, Shapiro ED, Burke GS et al. (1996) Lyme disease in children in southeastern Connecticut. *N Engl J Med*. **335**: 1270
- 70 Gilmore RD, Murphree RL, James AM, Sullivan SA, Johnson BJB (1999) The *Borrelia burgdorferi* 37-Kilodalton immunoblot band (P37) used in serodiagnosis of early Lyme disease is the flaA gene product. *J Clin Microbiol* **37**: 548-551
- 71 Golde WT, Robinson-Dunn B, Stobierski MG, Dykhuizen D, Wang IN, Carlson V, Stiefel H, Shiflett S, Campbell GL (1998) Culture-confirmed reinfection of a person with different strains of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. *J Clin Microbiol* **36**:1015-1018
- 72 Gomes-Solecki MJC, Dunn JJ, Luft BJ, Castillo J, Dykhuizen DE, Yang X, Glass JD, Dattwyler RJ (2000) Recombinant chimeric *Borrelia* proteins for diagnosis of Lyme disease. *J Clin Microbiol* **38**: 2530-2535
- 73 Goosens HAT, van den Bogaard AE, Nohlmans MKE (1999) Evaluation of Fifteen Commercially Available Serological Tests for Diagnosis of Lyme Borreliosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **18**: 551-560
- 74 Gupta SK, Schönberg A, Hiepe T (1995) Prevalence of ticks in relation to their role as vector of *Borrelia burgdorferi* under autochthone conditions. *Appl Parasitol*. **36**: 97-106
- 75 Gustafson R, Svenungsson B, Forsgren M, et al. (1992) Two-year survey of the incidence of Lyme Borreliosis and tick-borne Encephalitis in a high-risk population in Sweden. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **11**: 894-900
- 76 Habicht GS, Beck G, Benach JL, et al. (1985) Lyme disease: spirochetes induce human and murine interleukin 1 production. *J Immunol* **134**: 3147
- 77 Halperin JJ, Little BW, Coyle PK, et al. (1987) Lyme disease: Cause of treatable peripheral neuropathy. *Neurology*. **37**: 1700
- 78 Halperin JJ, Luft BJ, Anand AK, et al. (1989) Lyme neuroborreliosis: Central nervous system manifestations. *Neurology*. **39**: 753

- 79 Hansen K, Bangsberg JM, Fjordvang H, et al. (1988) Immunochemical characterization of and isolation of the gene for a *Borrelia burgdorferi* immunodominant 60kDa antigen common to an wide range of bacteria. *Infect Immun* **56**: 2047
- 80 Hardin JA, Steere AC, Malawista SE (1979) Immune complexes and the evolution of Lyme arthritis: Dissimination and localization of abnormal Clq binding activity. *N Engl J Med.* **301**: 1358
- 81 Hauser U, Lehnert G, Lobentanzer R, Wilske B (1997) Interpretation criteria for standardized Western Blots for three European Species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *J Clin Microbiol* **35**: 1433-1444
- 82 Hauser U, Lehnert G, Wilske B (1998) Diagnostic value of proteins of three *Borrelia* species (*Borrelia burgdorferi* sensu lato) and implications for development and use of recombinant antigens for serodiagnosis of Lyme Borreliosis in Europe. *J Clin Microbiol* **5**: 456-462
- 83 Hauser U, Lehnert G, Wilske B (1999) Validity of interpretation criteria for standardized western blots (immunoblots) for serodiagnosis of Lyme borreliosis based on sera collected throughout Europe. *J Clin Microbiol* **37**: 2241-2247
- 84 Hilton E, Devoti J, Sood S (1996) Recommendation to include OspA and OspB in the new immunoblotting criteria for serodiagnosis of Lyme disease. *J Clin Microbiol* **34**: 1353-1354
- 85 Hofmann H (1996) Lyme borreliosis - problems of serological diagnosis. *Infection* **24**: 470-472
- 86 Hollstrom E (1948) Penicillin treatment of erythema chronicum migrans Afzelius. *Acta dermatol Venereol.* **28**: 295-324
- 87 Howe TR, LaQuier FW, Barbour AG (1986) Organization of genes encoding two outer surface proteins of the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi* within a single transcriptional unit. *Infect Immun* **54**: 207
- 88 Howe TR, Mayer LW, Barbour AG (1985) A single recombinant plasmid expressing two major outer surface proteins of the Lyme disease spirochete. *Science* **227**: 645
- 89 Hubalek Z, Halouzka J (1997) Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe, a review. *Eur J Epidemiol* **13**: 951-957
- 90 Hülße C, Herrmann H, Oheim S, Schröder L-W, v. Stenglin M (1995) Untersuchung zur Verbreitung von *Borrelia burgdorferi* in Mecklenburg-Vorpommern. *Hyg Med* **20**: 345-350

- 91 Jiang W, Luft BJ, Schubach W, Dattwyler RJ, Gorevic PD (1992) Mapping the major antigenic domains of the native flagellar antigen of *Borrelia burgdorferi*. J Clin Microbiol **30**: 1535-1540
- 92 Kalish RA, Leong JM, Steere AC (1993) Association of treatment resistant chronic Lyme arthritis with HLA-DR4 and antibody reactivity to OspA and OspB of *Borrelia burgdorferi*. Infect Immun **61**: 2774
- 93 Kalish RA, McHugh G, Granquist J, Shea B, Ruthazer R, Steere AC (2001) Persistence of Immunglobulin M or Immunglobulin G Antibody responses to *Borrelia burgdorferi* 10-20 years after active Lyme disease. Clin Infect Dis **33**: 780-785
- 94 Karlsson M, Hovind-Hougen K, Svennungson B, Stiernstedt G (1990) Cultivation and characterization of spirochetes from cerebrospinal fluid of patients with Lyme borreliosis. J Clin Microbiol **28**: 473-479
- 95 Kawabata M, Baba S, Iguchi K, et al. (1987) Lyme disease in Japan and its possible incriminated tick vector, *Ixodes persulcatus*. J infect Dis **156**: 854
- 96 Kimmig P (Stuttgart) und Maiwald M (Heidelberg) (1998) Expertenmeeting: „Procedere bei Zeckenstich“. Freiburg 19./20.3.98
- 97 Kochi S, Johnson RC, Dalmasso AP (1991) Complement-mediated killing of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. Role of antibody information in formation of an effective membrane attack complex. J Immunol **146**: 3964-3970
- 98 Kochi S, Johnson RC, Dalmasso AP (1993) Facilitation of complement-dependent killing of Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, by specific immunglobulin G Fab antibody fragments. Infect Immun **61**: 2532-2536
- 99 Koolmann J, Röhm KH (1998) Proteinfaltung In: Taschenatlas der Biochemie. Zweite überarbeitete und erweiterte Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York: 62-74
- 100 Kramer MD, Walich R, Simon MM (1996) The outer surface protein A (OspA) of *Borrelia burgdorferi*: A vaccine candidate and bioactive mediator. Infection **24**: 190-194
- 101 Kramer MD, Wallich R, Hofmann H, Simon MM (2000) Lyme Borreliose, Stand und Perspektiven der Diagnostik und Impfstoffentwicklung. Dt Ärztebl **49**: 2819-2820

- 102 Kramer MD, Wallich R, Simon MM (1995) Mechanismen der Pathogenese und Protektion bei der Lyme Borreliose In: Jochen Süß (Hrsg) 3. Potsdamer Symposium, Durch Zecken übertragbare Erkrankungen FSME und Lyme Borreliose, 11 März 1995. Weller Verlag Schriesheim: 143
- 103 Kuiper H, van Dam AP, Moll van Charante AW, Nauta NP, Dankert J, (1993) One year follow up study to assess the prevalence and incidence of Lyme borreliosis among Dutch forestry workers. Eur J Clin Microbiol Infect Dis **12**: 413-418
- 104 Lane RS, Lavoie PE (1988) Lyme borreliosis in california: Acarological, clinical and epidemiological studies. Ann NY Acad Sci **539**: 192
- 105 Lawrenz MB, Hardham JM, Owens RT, Nowakowski J, Steere AC, Wormser GP, Norris SJ (1999) Human Antibody responses to VlsE antigenic variation protein of *Borrelia burgdorferi*. J Clin Microbiol **37**: 3997-4004
- 106 Leong JL, Morrissey PE, Ortega-Barria E, et al. (1995) Hemagglutination and proteoglycan binding by the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. Infect Immun **63**: 874
- 107 Li M, Msuzawa T, Takada N, Ishiguro F, Fujita H, Iwaki A, Wang H, Wang J, Kawabata M, Yanagihara Y (1998) Lyme disease *Borrelia* species in northeastern China resemble those isolated from far eastern Russia and Japan. Appl Environ Microbiol **64**: 2705-2709
- 108 Liveris D, Wormser GP, Nowakowski J, Nadelmann R, Bittker S, Cooper D, Varde S, Moy FH, Forseter G, Pavia CS, Schwartz I (1996) Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* from Lyme disease patients by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. J Clin Microbiol **34**: 1306-1309
- 109 Logigian EL, Kaplan RF, Steere AC (1990) Chronic manifestations of Lyme disease. N Engl J Med **323**: 1438
- 110 Logigian EL, Steere AC (1992) Clinical and electrophysiological findings in chronic neuropathy of Lyme disease. Neurology **42**: 203
- 111 Loser C (1994) Vorkommen von Borrelien im Berliner Raum. In: Durch Zecken übertragene Erkrankungen: FSME und Lyme Borreliose / Potsdamer Symposien (ED.: J Süß). Weller-Verlag, Schriesheim: 76-85
- 112 Luft BJ, Gorevic PD, Jiang W, et al. (1991) Immunologic and structural characterization of the dominant 60- to 73-kDa antigens of *Borrelia burgdorferi*. J Immunol **146**: 2776-2783

- 113 Luft BJ, Mudri S, Jiang W, et al (1992) The 93-kilodalton protein of *Borrelia burgdorferi*: An immunodominant protoplasmatic cylinder antigen. *Infect Immunol* **60**: 4309
- 114 Ma B, Christen B, Leung D, Vigo-Pelfrey C (1992) Serodiagnosis of Lyme borreliosis by western immunoblot: Reactivity of various significant antibodies against *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol* **30**: 370-376
- 115 Magnarelli LA (1995) Current status of laboratory diagnosis for Lyme disease. *Am J Med* **98** (Suppl. 4A): 10S-14S
- 116 Magnarelli LA, Anderson JF (1988) Ticks and biting insects infected with the etiologic agent of Lyme disease, *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol* **26**: 1482
- 117 Magnarelli LA, Miller JN, Anderson JF, Riviere GR (1990) Cross-reactivity of nonspecific treponemal antibody in serologic tests for Lyme disease. *J Clin Microbiol* **28**: 1276-1279
- 118 Magnarelli MA, Ijdo JW, Padula SJ, Flavell RA, Fikrig E (2000) Serologic Diagnosis of Lyme Borreliosis by using Enzyme-Linked Immunosorbent Assays with Recombinant Antigens. *J Clin Microbiol* **38**: 1735-1739
- 119 Marconi RT, Hohenberger S, Jauris-Heipke S, Schulte-Spechtel U, LaVoia CP, Rößler D, Wilske B (1999) Genetic analysis of *Borrelia garinii* OspA serotype 4 strains associated with neuroborreliosis: Evidence for extensive genetic homogeneity. *J Clin Microbiol* **37**: 3965
- 120 Marconi RT, Samuels DS, Garon CF (1993) Transcriptional analyses and mapping of the ospC gene in Lyme disease spirochetes. *J Bacteriol* **175**: 926
- 121 Masuzawa T, Iwaki A, Sato Y, Miyamoto K, Korenberg EI, Yanagihara Y (1997) Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolated in far eastern Russia. *Microbiol Immunol* **41**: 595-600
- 122 Masuzawa T, Wilske B, Komikado T, Suzuki H, Kawabata H, Sato NXMK, Sato N, Isogai H, Johnson RC, Yanagihara Y (1996) Comparison of OspA serotypes for *Borrelia burgdorferi* sensu lato from Japan, Europe and North America. *Microbiol Immunol* **40**: 539-545
- 123 Mathiesen DA, Oliver Jr. JH, Kolbert CP, Tullson ED, Johnson BJ, Campbell GL, Mitchell PD, Reed KD, Telford SRB, Anderson JF, Lane RS, Persing PH (1997) Genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* in the United States. *J Infect Dis* **175**: 98-107

- 124 Melchers W, Meis J, Rosa P, Claas E, Nohlmans L, Koopman R, Horrevorts A, Galama J (1991) Amplification of *Borrelia burgdorferi* DNA in skin biopsies from patients with Lyme disease. *J Clin Microbiol* **29**: 2401-2406
- 125 Mielke M, Hahn H (1999) Borrelien. In: Hahn, Falke, Kaufmann, Ullmann (Hrsg) *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 3. Auflage 49,87,412
- 126 Mikrogen (2001) *recomBlot Borrelia IgG/IgM*. Westernblot mit rekombinanten Antigenen zum Nachweis von IgG- und IgM-Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi*-Serotypen: 4-22
- 127 Miller LC, Isa S, Vannier E, et al. (1990) Live *Borrelia burgdorferi* preferentially activate IL-1 β gene expression and protein synthesis over the interleukin-1 receptor antagonist. *J Clin Invest* **90**: 906
- 128 Moffat CM, Sigal LH, Steere AC, et al. (1984) Cellular immune findings in Lyme disease: Correlation with serum IgM and disease activity. *Am J Med* **77**: 625
- 129 Moody K, Barthold SW, Terwilliger GA (1990) Lyme borreliosis in laboratory animals: effect of host species and in vitro passage of *Borrelia burgdorferi*. *Am J Trop Med Hyg* **43**: 87-92
- 130 Moter S, Hofmann H, Wallich R, Simon MM, Kramer MD (1994) Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in lesional skin of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans by *ospA*-specific PCR. *J Clin Microbiol* **32**: 2980-2988
- 131 Muellegger RR, Zochling N, Schluenzen EM, Soyer HP, Hoedl S, Kerl H, Volkenandt M (1996) Polymerase chain reaction control of antibiotic treatment in dermatoborreliosis. *Infection* **24**: 76-79
- 132 Muellegger RR, Zochling N, Soyer HP, Hoedl S, Wienecke R, Volkenandt M, Kerl H (1995) No detection of *Borrelia burgdorferi*-specific DNA in erythema migrans lesions after minocycline treatment. *Arch Dermatol*. **131**: 678-682
- 133 Nadelman RB, Nowakowski J, Forseter G, Goldberg NS, Bittker S, Cooper D, Aguero-Rosenfeld M, Wormser GP (1996) The clinical spectrum of early Lyme borreliosis in patients with culture confirmed erythema migrans. *Am J Med* **100**: 502-508
- 134 Nadelman RB, Pavia CS, Magnarelli LA, et al. (1990) Isolation of *Borrelia burgdorferi* from the blood of seven patients with Lyme disease. *Am J Med* **88**: 21

- 135 Nakao M, Miyamoto K, Fukunaga M (1994) Lyme disease spirochetes in Japan: Enzootic transmission cycles in birds, rodents and *Ixodes persulcatus* ticks. *J Infect Dis* **170**: 878-882
- 136 Nohlmans MK, van den Bogaard AE, Blauw AA, van Boven CP (1991) Prevalence of Lyme borreliosis in Netherlands. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde* **135**: 2288-2292
- 137 Norman GL, Antig JM, Bigaignon G, Hogrefe WR (1996) Serodiagnosis of Lyme borreliosis by *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* western blots (immunoblots) **34**: 1732-1738
- 138 Norris SJ, Carter CJ, Howell JK, et al. (1992) Low-passage-associated proteins of *Borrelia burgdorferi* B31: Characterization and molecular cloning of OspD, a surface exposed, plasmid-encoded lipoprotein. *Infect Immun* **60**: 4662
- 139 O'Connell S, Granstrom M, Gray JS, Stanek G (1998) Epidemiology of European Lyme borreliosis. *Zentbl. Bakteriologie* **287**: 229-240
- 140 Ohlenbusch A, Matuschka FR, Richter D, Christen HJ, Thomssen R, Spielman A, Eiffert H (1996) Etiology of the acrodermatitis chronica atrophicans lesions in Lyme disease. *J Infect Dis* **174**: 421-423
- 141 Pachner AR, Duray P, Steere AC (1989) Central nervous system manifestations of Lyme disease. *Arch Neurol* **46**: 790-796
- 142 Park KH, Chang WH, Schwan TG (1993) Identification and characterization of Lyme disease spirochetes *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolated in Korea. *J Clin Microbiol* **31**: 1831-1837
- 143 Pavia CS, Wormser GP, Marmor GL, Norman GL (1997) Activity of sera from patients with Lyme disease against *Borrelia burgdorferi*. *Clin Infect Dis* **25**: 25-30
- 144 Peter O, Bretz AG, Postic D, Dayer E (1997) Association of distinct species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato with neuroborreliosis in Switzerland. *Clin Microbiol Infect* **3**: 423-431
- 145 Peters H (2000) Enzygnost® Borreliosis Interpretationshilfe bei diskrepanten Ergebnissen zum Western Blot. In: Dade Behring News 02/2000: 27-29
- 146 Pfister HW, Neubert U, Wilske B, Preac Mursic V, Einhaupl KM, Bosario GD (1986) Reinfection with *Borrelia burgdorferi*. *Lancet* **ii**: 984-985

- 147 Picken RN, Strle F, Picken MM, Ruzie-Sabljić E, Maraspin V, Lotric-Furlan S, Cimperman J (1998) Identification of three species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii*) among isolates from acrodermatitis chronica atrophicans lesions. *J Investig Dermatol* **110**: 211-214
- 148 Picken RN, Cheng Y, Strle F, Picken MM (1996) Patient isolates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato with genotypic and phenotyping similarities of strain 25015. *J Infect Dis* **174**: 1112-1115
- 149 Piesman J, Mather TN, Sinsky RJ (1987) Duration of Tick attachment and *Borrelia burgdorferi* transmission. *J Clin Microbiol* **25**: 557
- 150 Postic D, Assous MV, Grimont PAD, Baranton G (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
- 151 Postic D, Korenberg E, Gorelova N, Kovalevski YV, Bellenger E, Baranton G (1997) *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Russia and neighbouring countries: high incidence of mixed isolates. *Res. Microbiol* **148**: 691-702
- 152 Preac-Mursic V, Schierz G, Pfister HW, Einhäupl K, Wilske B, Weber K (1984) Isolierung einer Spirochäte aus Liquor cerebrospinalis bei Meningoradikulitis Bannwarth. *Münch Med Wochenschr* **126**: 275-276
- 153 Priem S, Rittig MG, Kamradt T, Burmester GR, Krause A (1997) An optimized PCR leads to rapid and highly sensitive detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme Borreliosis. *J Clin Microbiol* **35**: 685-690
- 154 Rahn DW (1991) Lyme disease clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* **20**: 201-218
- 155 Ranki A, Aavik E, Peterson P, Schauman K, Nurmilaakso (1994) Successful amplification of DNA specific for finnish *Borrelia burgdorferi* in erythema migrans but not in circumscribed scleroderma lesions. *J Investig Dermatol* **102**: 339-345
- 156 Rauter C, Oehme R, Diterich I, Engele M, Hartung T (2002) Distribution of Clinically relevant *Borrelia* Genospecies in Ticks assessed by a novel, Single Run, Real-Time PCR. *J Clin Microbiol* **40**: 36-43
- 157 Ribeiro J (1987) *Ixodes dammini*: Salivary anti-complement activity. *Exp Parasitol* **64**: 347-353
- 158 Ribeiro J, Makoul GT, Levine J, Robinson DR, Spielman A (1985) Antihemostasis, antiinflammatory and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. *J Exp Med* **161**: 332-344

- 159 Ribeiro J, Weis JJ, Telford SR III. (1990) Saliva of the tick *Ixodes dammini* inhibits neutrophil function. *Exp Parasitol* **70**: 382-388
- 160 Rijpkema SG, Tazelaar DJ, Molkenboer M, Noordhoek GT, Plantinga G, Schouls LM, Schellekens JF (1997) Detection of *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto *Borrelia garinii* and group VS116 by PCR in skin biopsies of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans. *Clin Microbiol Infect* **3**: 109-116
- 161 Robert Koch Institut (1998) Empfehlung zur Diagnostik und Therapie der Lyme Borreliose. *Epid Bull* **22**: 159-164
- 162 Robert Koch Institut (1998) Surveillance der Lyme-Borreliose am Beispiel des Bundeslandes Brandenburg **14**: 93-97
- 163 Robert Koch Institut (1999) Zur Lyme Borreliose in ausgewählten Bundesländern in den Jahren 1997 und 1998. *Epid Bull* **22**: 163-166
- 164 Robert Koch Institut (2000) Zur Lyme Borreliose in ausgewählten Bundesländern im Jahr 1999. *Epid Bull* **50**: 396-398
- 165 Robertson J, Guy E, Andrews N, Wilske B, Anda P, Granström M, Hauser U, Moosmann Y, Sambri V, Schellekens J, Stanek G, Gray J (2000) A European multicenter study of immunoblotting in serodiagnosis of Lyme borreliosis. *J Clin Microbiol* **38**: 2097-2102
- 166 Roessler D, Hauser U, Wilske B (1997) Heterogeneity of BmpA (P39) among european isolates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and influence of interspecies variability on serodiagnosis. *J Clin Microbiol* **35**: 2752
- 167 Rose CD, Fawcett PT, Klein JD, Epps SC, Caputo GM, Doughty RA (1993) Reinfection in pediatric Lyme borreliosis. *Ann Rheum Dis* **52**: 695-696
- 168 Saint Girons I, Gern L, Gray JS, Guy EC, Korenberg E, Nuttal PA, Rijpkema SGT, Schönberg A, Stanek G, Postic D (1998) Identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe. *Zent BI Bakteriol* **287**:190-193
- 169 Sato Y, Miyamoto K, Iwaki A, Masazuwa T, Yanagihara Y, Korenberg EI, Gorelova NB, Volkov VI, Ivanov LI, Liberova RN (1996) Prevalence of Lyme disease spirochetes in *Ixodes persulcatus* and wild rodents in eastern Russia. *Appl Environ Microbiol* **62**: 3887-3889
- 170 Schmidli J, Hunziker T, Moesli P, et al. (1988) Cultivation of *Borrelia burgdorferi* from joint fluid three month after treatment of facial palsy due to Lyme borreliosis. *J Infect Dis* **158**: 905
- 171 Schmidt BL (1997) PCR in Laboratory Diagnosis of Human *Borrelia burgdorferi* infections. *Clin Microbiol Rev* **10**: 196

- 185 Stanek G, O`Connell S, et al. (1996) European Union concerted action on risk assessment in Lyme borreliosis: clinical case definitions for Lyme borreliosis. *Wien Klin Wochenschr* **108**: 741-747
- 186 Stanek G, Wewalka G, Groth V, Neumann R (1985) Isolation of spirochaetes from the skin of patients with erythema chronicum migrans in Austria. *Zbl Bakt Hyg A* **260**: 88-90
- 187 Steere AC (1989) Lyme Disease. *N Engl J Med* **321**: 586-596
- 188 Steere AC (1994) Lyme Disease: A growing threat to urban populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 2378-2383
- 189 Steere AC (1995) *Borrelia burgdorferi* (Lyme Disease, Lyme Borreliosis) In: Mandell, Douglas, Bennett`s (Hrsg) Principles and Practice of Infectious Diseases, 4th edn. Churchill Livingstone Inc.: 2143-2155
- 190 Steere AC (2000) *Borrelia burgdorferi* (Lyme Disease, Lyme Borreliosis) In: Mandell, Douglas, Bennett`s (Hrsg) Principles and Practice of Infectious Diseases, 5th edn. Churchill Livingstone Inc.: 2504-2518
- 191 Steere AC, Broderick TE, Malawista SE (1978) Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis: Epidemiologic evidence for a tick vector. *Am J Epidemiol* **108**: 312
- 192 Steere AC, Grodzicki RL, Kornblatt AN, Craft JE, Barbour AG, Burgdorfer W, Schmid GP, Johnson E, Malawista SE (1983) The spirochaetal etiology of Lyme disease. *N Engl J Med* **308**: 733-740
- 193 Steere AC, Hardin JA, Ruddy S, et al. (1979) Lyme arthritis: Correlation of serum and cryoglobulin IgM with activity and serum IgG with remission. *Arthritis Reum* **22**: 471
- 194 Steere AC, Malawista SE (1979) Cases of Lyme disease in the United States: Locations correlated with distribution of *Ixodes dammini*. *Ann Intern Med* **91**: 730
- 195 Steere AC, Malawista SE, Snyderman DR, et al. (1977) Lyme arthritis: An epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. *Arthritis Rheum* **20**: 7
- 196 Stiernstedt G, Dattwyler R, Duray PH, Hansen K, Jirous J, Johnson RC, Karlsson M, Preac Mursic V, Schwan TG (1991) Diagnostic tests in Lyme borreliosis. *Scand J Infect Dis* **77**: 136-142
- 197 Strle F, Nelson JA, Ruzie-Sablje E, Cimperman J, Maraspin V, Lotrie-Furlan S, Cheng Y, Picken MM, Trenholme GM, Picken RN (1996) European Lyme borreliosis: 231 culture confirmed cases involving patients with erythema migrans. *Clin Infect Dis* **23**: 61-65

- 198 Strle F, Picken RN, Cheng Y, Cimperman J, Maraspin V, Lotrie-Furlan S, Ruzie-Sabljić E, Picken MM (1997) Clinical findings for patients with Lyme borreliosis causing by *Borrelia burgdorferi* sensu lato with genotypic and phenotyping similarities to strain 25015. Clin Infect Dis **25**: 273-280
- 199 Takada N, Ishiguro F, Fujita H, Wang HP, Wang JC, Masuzawa T (1998) Lyme disease spirochetes in ticks from northeastern China. J Parasitol **84**: 499-504
- 200 Trevejo RT, Krause PJ, Sikand VK, Schreifer ME, Ryan R, Lepore T, Porter W, Dennis DT (1999) Evaluation of two-test serodiagnostic method for early Lyme disease in clinical practice. J Infect Dis **179**: 931-938
- 201 Tugwell P, Dennis DT, Weinstein A, Wells G, Shea B, Nichol G, Hayward R, Lightfoot R, Baker P, Steere AC (1997) Laboratory evaluation in the diagnosis of Lyme disease. Ann Intern Med **127**: 1109-1123
- 202 van Dam AP, Kuiper H, Vos K, Widjojokusumu A, de Jongh BM, Spanjaard L, Ramselaar AC, Kramer MD, Dankert J (1993) Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. Clin Infect Dis **17**: 708-717
- 203 von Stedingk LV, Olsson I, Hanson HS, Asbrink E, Hovmark A (1995) Polymerase chain reaction for detection of *Borrelia burgdorferi* in skin lesions of early and late Lyme borreliosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis **14**: 1-5
- 204 Wallis RC, Brown SE, Kloter KO, et al. (1978) Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis: Field study of ticks. Am J Epidemiol **108**: 322
- 205 Wang G, van Dam AP, Dankert J (1999) Phenotypic and genetic characterization of a novel *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolate from a patient with Lyme borreliosis. J Clin Microbiol **37**: 3025
- 206 Wang G, van Dam AP, Le Fleche A, Postic D, Peter O, Baranton G, de Boer R, Spanjaard L, Dankert J (1997) Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19). Int J Syst Bacteriol **47**: 92
- 207 Wang G, van Dam AP, Schwartz I, Dankert J (1999) Molecular Typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: Taxonomic, Epidemiological and Clinical Implications. Clinical Microbiol Rev **12**: 633-653
- 208 Wheeler CM, Garcia Monco JC, Benach JL, et al. (1993) Nonprotein antigens of *Borrelia burgdorferi*. J Infect Dis **167**: 665

- 209 Wienecke R, Zochling N, Neubert U, Schlupen M, Meurer M, Volkenand M (1991) Molecular subtyping of *Borrelia burgdorferi* in erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans. *J Investig Dermatol* **103**: 19-22
- 210 Wilske B, Busch U, Eiffert H, Fingerle A, Pfister HW, Rössler D, Preac Mursic V (1996) Diversity of OspA and OspC among cerebrospinal fluid isolates of *Borrelia burgdorferi sensu lato* from patients with neuroborreliosis in Germany. *Med. Microbiol. Immunol.* **184**:195-201
- 211 Wilske B, Fingerle V, Hauser U, Rössler D (1997) Borrelien. *Laboratoriumsmedizin. Diagnostische Bibliothek*,1-12
- 212 Wilske B, Fingerle V, Preac Mursic V, Jauris-Heipke S, Hofman A, Loy H, Pfister HW, Rössler D, Soutschek E (1994) Immunoblot using recombinant antigens derived from different genospecies of *Borrelia burgdorferi sensu lato*. *Med Microbiol Immunol* **183**: 43-59
- 213 Wilske B, Habermann C, Fingerle V, Hillebrand B, Jauris-Heipke S, Lehnert G, Pradel I, Rössler D, Schulte-Spechtle U (1999) An improved IgG immunoblot for serodiagnosis of Lyme borreliosis. *Med Microbiol Immunol* **188**: 139-144
- 214 Wilske B, Preac Mursic V, Göbel UB, Graf B, Jauris S, Soutschek E, Schwab E, Zumstein G (1993) An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis. *J Clin Microbiol* **31**: 340-350
- 215 Yanagihara Y, Masuzawa T (1997) Lyme disease (Lyme borreliosis). *FEMS Immunol Med Microbiol* **18**:249-261
- 216 Yrjnen Y, Oksi J, Kalimo H, Viljanen MK (1997) Invasiveness of different genospecies of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in brain tissue In: Program and Abstracts of the 37th Interscience Conference on antimicrobial agents and chemotherapy. American Society for Microbiology, Washington DC 351
- 217 Zeidner N, Deitz M, Belasco D, Fish D (1996) Suppression of acute *Ixodes scapularis*-induced *Borrelia burgdorferi* infection using Tumor Necrosis Factor- α , Interleukin-2 and Interferon- γ . *J Infect Dis.* **173**: 187-195
- 218 Zhang ZF, Duo GI, Zhang JS, Wan KL, Zhu GF, Zheng L, Wang HY, Hou XX (1992) Survey on tick vectors of Lyme disease spirochetes in China. *Cin J Vectors Biol Control* **1**: 140-143
- 219 Zhang ZF, Wan KL, Zhang JS (1997) Studies on epidemiology and etiology of Lyme disease in China. *Chin. J. Epidemiol.* **18**: 8-11

10 Quellenverzeichnis

220 www.dis.strath.ac.uk/vie/LymeEu/images_epidemiology.html

Danksagung

Danken möchte ich meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Dr. Heinz–Hubert Feucht für die Möglichkeit, dieses interessante Thema bearbeiten zu dürfen. Ihm wie auch den anderen Mitarbeitern des Labors: Dr. Matthias Schröter, Dr. Bernhard Zöllner und Anja Koppe möchte ich für die Unterstützung, den Zuspruch und die gute Stimmung während der Arbeit – besonders in den dunklen Stunden der Forschung – danken.

Widmen möchte ich die Arbeit meinen Eltern, die das Studium wie so vieles andere auch erst ermöglicht haben.

Lebenslauf

Geburtstag 11.12.1975 in Bonn

Bildung

1982 - 1995 Schulbesuch in Rheinbreitbach und auf dem Privaten Gymnasium der Franziskanerinnen auf der Insel Nonnenwert, Remagen

1995 - 1996 Wehrpflicht beim Musikkorps Düsseldorf

1996 - 1998 Studium der Humanmedizin, Musikwissenschaft und Philosophie an der Universität Bonn

1998 Physikum
Abschluss des Grundstudiums der Philosophie

1998 – 2003 Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg

1999 Erstes Staatsexamen

1999 – 2003 Doktorarbeit in der Mikrobiologie, Thema: Generierung eines rekombinanten Immunoblots als Bestätigungstest einer Infektion mit *Borrelia burgdorferi*. Betreuer: Prof. Dr. Hubert Feucht

2001 Zweites Staatsexamen

2002 – 2003 Praktisches Jahr: Innere Medizin und Kinderheilkunde am Universitätskrankenhaus Hamburg Eppendorf, Chirurgie am Frere Hospital, East London, Südafrika

2003 Drittes Staatsexamen

Berufserfahrung

Famulaturen Famulaturen in der Chirurgie, Anästhesie, Inneren Medizin, Mikrobiologie und Kinder- Kardiologie in Hamburg und Loughlinstown, Irland

2000 – 2001 Studentische Hilfskraft am Zentrum für Klinisch-Theoretische Medizin 1, Institut für Infektionsmedizin der Universität Hamburg

1996 – 1998 Aushilfspflegekraft im Johannes Krankenhaus, Königswinter

Sonstiges

10.01 – 04.02 Reise durch Indien, Nepal, Ecuador, Peru, Bolivien und Chile

Interessen Deutsch, Englisch, Französisch, Spanisch, Klavier (2. Platz bei Jugend Musiziert 1993,1994), Schlagzeug, Komposition (Auftragsarbeit: "Frieden", 350-Jahrfeier des Westfälischen Friedens)

Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.